

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental laboratorium. kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) yang telah di ekstrak dengan pelarut etanol 96% kemudian dilakukan purifikasi dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, campuran etil asetat dan n- heksana. Kemudian di uji fenolik total dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.

B. Lokasi Penelitian

1. Lokasi penelitian

- a. Determinasi Tanaman dilaksanakan di laboratorium Universitas Diponegoro.
- b. Purifikasi dan penetapan kadar dilaksanakan di Laboratorium Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian akan dilaksanakan pada bulan September 2019-Januari 2020.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (Independent variable): pelarut purifikasi ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) dengan pelarut etanol 96 %.

2. Variabel terikat (Dependent variable) :

- a. Kadar fenolik total dalam ekstrak etanol kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.)
- b. Kadar fenolik total dalam ekstrak n-heksan kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.)
- c. Kadar fenolik total dalam ekstrak etil asetat kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.)
- d. Kadar fenolik total dalam ekstrak n-heksan kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.)
- e. Kadar fenolik total dalam ekstrak n-heksan-etil asetat kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.)

D. Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini menggunakan biji kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) yang di ambil dari daerah Dusun Kruwisan, Kledung, Gunung Sumbing, Kabupaten Temanggung-Jawa Tengah. Karakteristik pemilihan biji yang digunakan yaitu memiliki bentuk yang agak meanjang, bidang cembungnya tidak terlalu tinggi, lebih bercahaya dibandingkan dengan jenis lainnya, ujung biji mengkilap, dan celah tengah dibagian datarnya berlekuk.

E. Pengumpulan Data

1. Pengumpulan bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari tanaman kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) yang berasal dari Dusun Kruwisan, Kledung, Gunung Sumbing, Kabupaten Temanggung-Jawa Tengah. Kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) yang digunakan pada penelitian ini dikumpulkan pada bulan Oktober 2018 dari Rumah Kopi Mukidi Temanggung.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman pada penelitian ini dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi, Universitas Diponegoro.

3. Penyiapan Alat dan Bahan

Seperangkat alat ekstraksi dengan metode maserasi, penyaring, Erlenmeyer (Herma), corong pisah, gelas ukur (Iwaki), rotary vacuum evaporator (RE100-PRO), spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV Mini 1240.

Bahan-bahan yang dibutuhkan adalah Simplisia kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.), etanol teknis 96%, n-heksana dari (Bratachem), etil asetat (Merck®), air panas, reagen Folin Ciocalteu, asam galat, Na_2CO_3 , Aquades.

4. Penyimpanan Simplisia

Kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) dari pohon dipilih yang warna merah, selanjutnya dilakukan sortasi untuk memilih biji kopi yang

paling bagus. Setelah itu, kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) dikeringkan sampai kering selama 2-3 minggu. Kemudian, dipisahkan kotoran-kotoran dan kulitnya. kemudian dihaluskan dengan blender, setelah diblender didapatkan serbuk halus kemudian dilakukan ekstraksi.

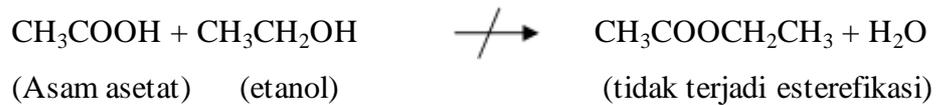
5. Pembuatan Ekstrak Kopi Hijau Arabika (*Coffea arabica* L.)

Pembuatan ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Serbuk kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) sebanyak 300 gram yang telah diblender dan diayak, dilarutkan dalam etanol 96%. Pelarut yang digunakan sebanyak 3 L (1 : 10). Maserasi dilakukan selama 1 hari dan dilanjutkan remaserasi selama 2 hari dalam ruangan yang terlindung cahaya matahari dan dilakukan pengadukan tiap 12 jam. Kemudian ekstrak yang diperoleh dari maserat pertama disaring menggunakan kain flannel. Setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dilakukan remaserasi. Maserat pertama dan maserat kedua yang telah dikumpulkan, selanjutnya diuapkan menggunakan penangas air (water bath) dengan suhu 78°C.

6. Uji Bebas Etanol

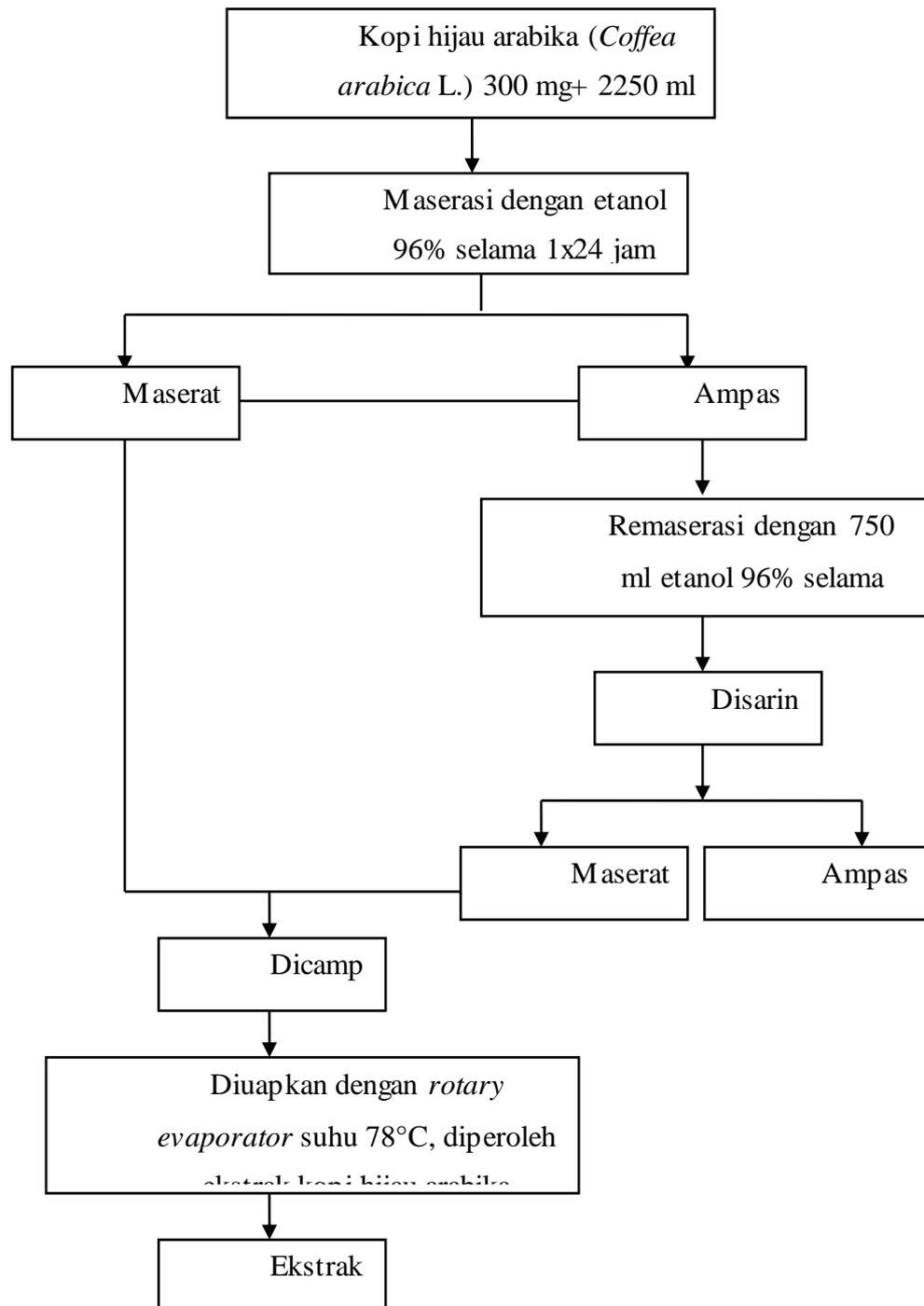
Uji bebas etanol dilakukan untuk membuktikan bahwa tidak ada kandungan etanol yang terdapat dalam ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.). Ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak tercium bau khas ester. Ester dihasilkan dari reaksi asam karboksilat dan alkohol ketika dipanaskan bersama dengan bantuan katalis asam di tandai dengan bau khas ester (Kurniawati, 2015).

Berikut adalah reaksi esterifikasi:



Ekstrak harus bebas dari etanol karena etanol bersifat higroskopis.

Uji bebas etanol dilakukan untuk membebaskan ekstrak dari etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi, selain itu etanol sendiri bersifat sebagai antibakteri dan antifungi sehingga tidak akan menimbulkan positif palsu pada perlakuan sampel (Kurniawati, 2015). Hasil yang diperoleh dari penelitian yang dilakukan pada masing-masing ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) menunjukkan bahwa tidak tercium bau khas ester pada hasil uji, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak yang akan digunakan sebagai sampel uji adalah bebas dari etanol dan dapat digunakan untuk tahap selanjutnya.



Gambar 3.1 Skema Kerja Pembuatan Ekstrak Kopi Hijau Arabika (*Coffea arabica* L.)

1. Purifikasi

Setelah dilakukan ekstraksi kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) menghasilkan ekstrak kental, selanjutnya ekstrak kental dibagi menjadi tiga bagian, ekstrak pertama dipurifikasi dengan menggunakan n –heksan (non polar), ekstrak kedua akan purifikasi dengan menggunakan etil asetat (semi polar), ekstrak ketiga akan di purifikasi dengan campuran etil asetat dan n –heksan (campuran semi polar dan non polar).

a. Purifikasi n-heksan

Ekstrak terpurifikasi kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) ditimbang sebanyak 10 gram, dilarutkan dengan 200 ml (1:20) air panas. Kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Kemudian kedalam larutan tersebut ditambahkan 200 ml n-heksan. Corong dikocok secara terus menerus, kemudian didiamkan. Setelah terpisah menjadi 2 lapisan, maka lapisan n-heksan akan berada diatas lapisan air. Pelarutan dengan n-heksan di ulangi hingga diperoleh lapisan n-heksan berubah warna menjadi bening. Larutan hasil pemisahan tersebut dikumpulkan dan dievaporasi sehingga didapatkan ekstrak terpurifikasi dan fase n-heksan (Hernani, *et al.*, 2007).

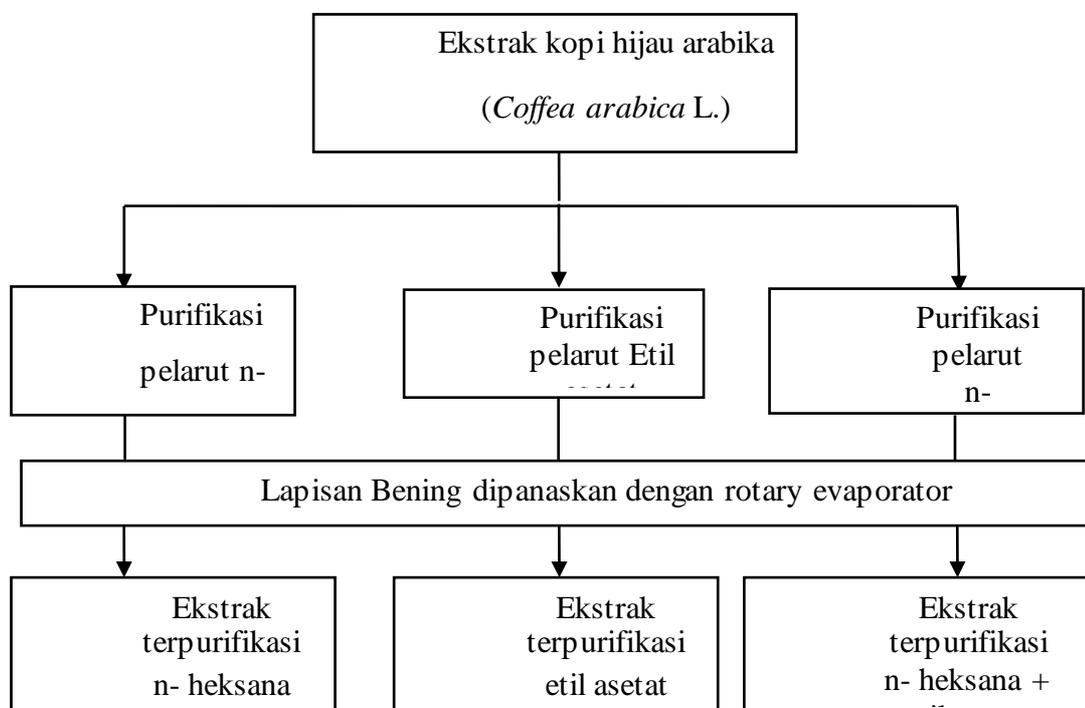
b. Purifikasi etil asetat

Sebanyak 10 gram ekstrak terpurifikasi kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) dimasukkan dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan air panas sebanyak 200 ml (1 : 20) hingga homogen. Suspensi dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan etil asetat 200 ml.

Dilakukan penggojogan kurang lebih satu menit, kemudian didiamkan. Penambahan etil asetat dilakukan hingga diperoleh fraksi etil asetat yang bening dimana lapisan etil asetat akan berada diatas. Kemudian dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental dan dihitung rendamennya (Agustina, *et al.*, 2015).

c. Purifikasi campuran etil asetat dan n-heksana

Sebanyak 10 gram ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) kemudian difraksinasi cair-cair bertingkat dengan pelarut n-heksan dan etil asetat. Proses purifikasi ekstrak dihentikan hingga fase n-heksan dan etil asetat yang dihasilkan berwarna jernih. Fase aquadest yang telah terbebas dari komponen non polar selanjutnya dipekatkan dan dihitung rendamennya (Januarti dan Wijayanti, 2018).



Gambar 3.2 Skema Kerja Pembuatan Ekstrak Terpurifikasi Ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.)

2. Penapisan Fitokimia

Uji penapisan fitokimia merupakan uji pendahuluan yang dilakukan terhadap ekstrak kental kopi hijau arabika dengan tujuan untuk mengetahui adanya kandungan metabolit sekunder dengan menggunakan pereaksi warna. Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, dan terpenoid mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh (Sheela, 2013).

a. Identifikasi Flavonoid

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan metode Wiltstater Cyanidin. Ekstrak terpurifikasi kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg, ditambahkan 20 mL etanol dan dipipet 10 mL ke dalam tabung reaksi lain. Campuran ditambahkan 0,5 mL HCl pekat, 3-4 butir magnesium dan 1 mL amil alkohol. Tabung reaksi dikocok beberapa saat dan diamati terjadinya perubahan. Apabila terjadi pembentukan atau perubahan warna menunjukkan reaksi positif terhadap flavonoid.

b. Identifikasi Alkaloid

Masing-masing ekstrak terpurifikasi kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) ditimbang 10 mg kemudian ditambahkan 10 mL kloroform diaduk rata. Campuran disaring ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 0,5 mL H_2SO_4 dan dikocok baik-baik, dibiarkan beberapa saat. Lapisan yang terbentuk diuji dengan pereaksi Dragendorff dan Mayer. Hasil positif apabila terbentuk endapan

kuning jingga (orange) dengan pereaksi Dragendorff dan endapan putih dengan pereaksi Mayer.

c. Identifikasi Tanin

Identifikasi tanin dilakukan dengan metode Ferri Klorida. Masing-masing ekstrak terpurifikasi kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) ditimbang 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas, dan 5 tetes larutan NaCl 10%. Campuran dibagi menjadi 2 tabung reaksi, tabung pertama sebagai kontrol dan tabung kedua ditambahkan larutan FeCl₃ 1% 3 tetes. Tanin terhidrolisa memberikan warna biru atau biru hitam.

d. Identifikasi Terpenoid

Masing-masing ekstrak terpurifikasi dilarutkan dengan 2 mL kloroform, setelah itu ditambahkan asam anhidrat sebanyak 1 mL, selanjutnya ditambahkan dengan 1 mL H₂SO₄ pekat, melalui dinding tabung. Adanya triterpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan (Djamil and Anelia, 2009).

3. Analisis Kadar Fenolik (Ahmad *et al.*, 2015).

a. Pembuatan Larutan induk Asam Galat

Asam Galat ditimbang 100 mg dilarutkan dalam etanol p.a hingga 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.

b. Pembuatan Larutan Na_2CO_3 7,5 %

Sebanyak 3,5 gram Natrium karbonat kemudian dilarutkan dengan aquades hingga 50 ml.

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan asam galat 40 ppm diambil sebanyak 0,4 mL ditambahkan dengan reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 0,4 ml, kemudian digojog dan didiamkan selama 8 menit. selanjutnya ditambahkan dengan 4 ml natrum karbonat 7,5%, digojog homogen. Diamkan selama operating time lalu baca absorbansi pada panjang gelombang 600-800 nm sebanyak 3x replikasi. Dari panjang gelombang yang diperoleh diatas maka didapat panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 755,20 yang mendekati panjang gelombang teoritis.

d. Penentuan Operating Time

Larutan asam galat 40 ppm diambil sebanyak 0,4 mL ditambahkan dengan reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 0,4 ml, selanjutnya ditambahkan dengan 4 ml natrum karbonat 7,5% (Ditimbang sebanyak 3,5 gram Natrium Karbonat kemudian dilarutkan dengan aquades hingga 50ml). Baca absorbansi larutan dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 755,20 nm selama 30 menit. Operating Time yang diperoleh adalah selama 10-15 menit.

e. Penentuan Kurva Baku Asam Galat

Larutan standar asam galat 1000 ppm dibuat dengan menimbang 10 mg asam galat dilarutkan dengan etanol p.a hingga volume 10 mL. Dari larutan stock dipipet sebanyak 0,4 mL diencerkan dengan etanol hingga volume 10 mL dihasilkan konsentrasi 40 ppm. Dari larutan tersebut dipipet 1, 2, 3, 4, 5 mL dan dicukupkan dengan etanol hingga 10 mL, sehingga dihasilkan konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm. Untuk masing-masing konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm ditambahkan 1,5 mL reagen Folin-Ciocalteu dikocok dan dibiarkan 3 menit, ditambahkan 1,2 mL larutan Na_2CO_3 (natrium karbonat) 7,5 % kocok hingga homogen. Ditambahkan aquabidestillata hingga 10 mL dan diamkan selama operating time dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang yang diperoleh.

f. Penentuan Fenolik Total

Sampel ekstrak etanol 96% kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) masing-masing ditimbang 10 mg dilarutkan dengan etanol 96% ad 10 ml kemudian diambil masing-masing sebanyak 1 mL ditambahkan dengan reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 0,4 ml, selanjutnya ditambahkan dengan 4 ml natrum karbonat 7,5%, dibuat sebanyak 3 kali replikasi untuk masing-masing perlakuan. Diamkan selama operating time lalu baca absorbansi pada panjang gelombang maksimum sebanyak 3 kali. Dari nilai absorbansi maka kadar dapat

diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi kedalam persamaan $y = bx + a$.

F. Perhitungan Kadar

Pada penelitian ini metode pengumpulan data yang digunakan adalah observasi atau penelitian, hasil dari perhitungan kadar fenol yang terkandung dalam ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) menggunakan spektrofotometer. Hasil perhitungan kadar fenol dengan persamaan $y = bx + a$ dinyatakan dalam satuan mg ekuivalen asam galat/g sampel (mg GAE/g) pada masing-masing perlakuan. maka data tersebut digunakan pada uji statistik SPSS versi 25.0 untuk mengetahui perbedaan dari kadar fenol yang dihasilkan dari setiap perlakuan.

Keterangan :

Y = Nilai absorbansi

X = Kadar Flavonoid

a,b = konstanta

G. Analisa Data.

Data dianalisa menggunakan uji statistik SPSS untuk mengetahui kadar fenol total dengan perbedaan pengaruh pelarut purifikasi dilakukan dengan uji ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD (Least Significance Different) dengan taraf kepercayaan 95% untuk menguji adanya perbedaan antara perlakuan yang satu dengan yang lain. Uji statistik ini menggunakan program komputer SPSS versi 21.0.