

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman

Dilakukan identifikasi tanaman yang bertujuan untuk mendapatkan kebenaran tanaman yang akan diuji agar terhindar dari kesalahan pengumpulan bahan ataupun tercampurnya tanaman yang diteliti dengan tanaman lain. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan, pada tanggal 28 Juli 2023 dengan nomor SK 368/Lab.Bio/B/VIII/2023. Hasil determinasi menunjukkan ketiga sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *Coffea canephora var. robusta* (L.Linden) A.Chev. Sinonim dari *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner.

2. Preparasi sampel

Sampel kopi robusta (*Coffea canephora var. robusta*) diambil pada bulan Juli 2023 di tiga tempat berbeda, yaitu di Desa Gesing, Kecamatan Kandangan, Kabupaten Temanggung dengan ketinggian ± 677 mdpl; Desa Banjarsari, Kecamatan Grabag, Kabupaten Magelang dengan ketinggian ± 822 mdpl; dan Desa Pentingsari, Kecamatan Cangkringan, Kabupaten Sleman dengan ketinggian ± 782 mdpl. Buah kopi yang didapat langsung dilakukan sortasi basah dengan memisahkan mencuci dengan air mengalir sembari memisahkan biji kopi dengan kulit dan buah kopi.

Dilakukan pengeringan sampel dengan di oven selama 60 menit pada suhu 200°C , hal tersebut dilakukan agar kadar air yang terkandung pada biji kopi berkurang dan tidak mudah ditumbuhi mikroba atau mikroorganisme lain. Setelah proses pengeringan dengan oven, biji kopi didinginkan. Pendinginan sangat perlu dilakukan untuk mencegah agar tidak terjadi pemanasan lanjutan atau biji kopi menjadi gosong (*over roasted*) yang dapat mengubah warna, flavor, dan tingkat kematangan, serta untuk memisahkan sisa kulit ari yang terlepas dari biji kopi (Aditya *et al.*, 2015).

Sampel yang sudah kering kemudian dihaluskan agar menjadi serbuk dengan bantuan *grinder*. Penghalusan sampel dilakukan dengan maksud memperbesar bidang kontak dengan pelarut (Purba & Andaka, 2018). Hal ini dikarenakan permukaan kontak serbuk simplisia yang luas dengan pelarut. Kemudian, serbuk diayak menggunakan ayakan mesh 60 agar diperoleh bubuk kopi yang homogen (Suaniti *et al.*, 2022). Pengayakan mempermudah untuk mendapatkan serbuk berukuran seragam (Witdarko *et al.*, 2023).

Kopi robusta bubuk yang diperoleh ditimbang dan diukur kadar kelembabannya menggunakan *moisture analyzers*. Berat basah, berat serbuk, dan kadar kelembaban pada sampel dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Berat Basah, Berat Serbuk, dan Kadar Kelembaban Sampel

Sampel	Bobot basah (g)	Bobot Bubuk (g)	Kadar Kelembaban (%)
Kopi Kab. Temanggung	512,7	206,82	0,98
Kopi Kab. Magelang	452,52	169,9	1,24
Kopi Kab. Sleman	597,36	221,05	1,45

3. Ekstraksi sampel

Rendemen ekstrak yang didapatkan dihitung sebagai persentase perbandingan bobot ekstrak yang dihasilkan terhadap bobot serbuk kopi robusta yang digunakan saat diekstraksi dan ditunjukkan pada **Tabel 3**. Berdasarkan yang diperoleh, ekstrak kental dari ketiga sampel memenuhi syarat rendemen ekstrak kental yaitu nilainya tidak kurang dari 10% (Farmakope Herbal Indonesia, 2017).

Tabel 3. % Rendemen Ekstrak Kental

Sampel	Bobot Serbuk (g)	Bobot Wadah + Sampel (g)	Bobot Wadah (g)	Bobot Ekstrak (g)	Rendemen (%)
Kopi Kab. Temanggung	50	80,07	63,39	16,68	33,38
Kopi Kab. Magelang	50	50,73	34,86	15,87	31,74
Kopi Kab. Sleman	50	51,47	36,34	15,13	30,26

Untuk ekstrak kafein dilakukan tahapan lanjutan guna memisahkan kafein dari senyawa lainnya. Kafein terlebih dahulu diisolasi dengan menambahkan CaCO_3 ke dalam larutan ekstrak kental kopi. Penambahan

CaCO_3 bertujuan untuk memutuskan ikatan kafein dengan senyawa lainnya, sehingga kafein akan berada dalam basa bebas (Hasibuan *et al.*, 2023).

Larutan kopi yang sudah ditambahkan dengan CaCO_3 ditambahkan kloroform *p.a* (*pro analysis*) dan dilakukan ekstraksi dengan metode ekstraksi cair-cair. Dari penambahan kloroform itu terbentuklah 2 fase yaitu fase air dan fase kloroform yang ditunjukkan pada **Gambar 8**. Dilakukannya ekstraksi dengan metode cair-cair dikarenakan senyawa kafein yang dapat larut dalam air dan kondisi sampel yang berupa larutan, sehingga sesuai dengan metode ekstraksi cair-cair (Hasibuan *et al.*, 2023).



Gambar 8. Proses Ekstraksi Sampel

Rendemen yang didapatkan dihitung sebagai persentase bobot ekstrak hasil ekstraksi cair-cair yang telah diuapkan (ekstrak kering) dan dihasilkan terhadap bobot ekstrak kental kopi robusta yang dapat dilihat pada **Tabel 4**. Ekstrak kering dibuat guna menganalisis kandungan kafein pada sampel karena sudah dilakukan pemisahan kandungan kafein pada ekstrak kopi sebelumnya dengan bantuan CaCO_3 .

Tabel 4. % Rendemen Ekstrak Kering

Sampel	Bobot ekstrak kental (g)	Bobot Wadah + Sampel (g)	Bobot Wadah (g)	Bobot Ekstrak (g)	Rendemen (%)
Kopi Kab. Temanggung	1	11,85	11,56	0,29	29
Kopi Kab. Magelang	1	10,14	9,8	0,26	26
Kopi Kab. Sleman	1	16,38	16,09	0,29	29

4. Uji Organoleptis

Uji organoleptis pada simplisia bertujuan untuk memberikan penilaian awal atau pengenalan awal secara objektif dan sederhana terhadap simplisia. Prinsip dari uji ini melibatkan penggunaan indera untuk mengamati dan mendeskripsikan karakteristik simplisia berdasarkan bentuk, warna, dan aroma. Hasil uji dari organoleptis ekstrak dapat dilihat pada **Tabel 5** dan ekstrak kering pada **Tabel 6**.

Tabel 5. Hasil Uji Organoleptis Ekstrak Kental

Prameter	Hasil
Bentuk	Kental
Warna	Coklat kehitaman
Aroma	Khas

Tabel 6. Hasil Uji Organoleptis Ekstrak Kering

Prameter	Hasil
Bentuk	Serbuk
Warna	Putih kekuningan
Aroma	Khas

5. Skirining fitokimia

Skirining fitokimia dilakukan guna mendapatkan informasi terkait kandungan senyawa alkaolid dan tanin pada ketiga sampel kopi robusta dari ketiga tempat berbeda. Uji ini dianalisis secara visual dengan mengamati perubahan warna yang terjadi pada sampel dengan penambahan pereaksi. Hasil dari skrining fitokimia dapat dilihat pada **Tabel 7**, dan **Lampiran 3**.

Tabel 7. Hasil Skrining Fitokimia

Sampel	Metabolit Sekunder	Pereaksi	Pustaka	Hasil
Kopi Kab. Temanggung	Alkaloid	Sampel + <i>Aquadest</i> + HCl + Wagner	Merah kecoklatan	+
		Sampel + <i>Aquadest</i> + HCl + Dragendorf	Endapan coklat muda sampai kuning	+
		Sampel + <i>Aquadest</i> + HCl + Mayer	Endapan putih	-
Kopi Kab. Magelang	Tanin	Sampel + <i>Aquadest</i> + FeCl ₃ 5%	Biru kehitaman	+
	Alkaloid	Sampel + <i>Aquadest</i> + HCl + Wagner	Merah kecoklatan	+

Sampel	Metabolit Sekunder	Pereaksi	Pustaka	Hasil
Kopi Kab. Sleman		Sampel + <i>Aquadest</i> + HCl + Mayer	Endapan coklat muda sampai kuning	+
		Sampel + <i>Aquadest</i> + HCl + Dragendorf	Endapan putih	-
	Tanin	Sampel + <i>Aquadest</i> + FeCl ₃ 5%	Biru kehitaman	+
	Alkaloid	Sampel + <i>Aquadest</i> + HCl + Wagner	Merah kecoklatan	+
		Sampel + <i>Aquadest</i> + HCl + Dragendorf	Endapan coklat muda sampai kuning	+
		Sampel + <i>Aquadest</i> + HCl + Mayer	Endapan putih	-
	Tanin	Sampel + <i>Aquadest</i> + FeCl ₃ 5%	Biru kehitaman	+

6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis kualitatif yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan KLT sebagai pendahuluan untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa kafein dan tanin pada sampel kopi robusta dari Kabupaten Temanggung, Kabupaten Magelang, dan Kabupaten Sleman. Proses identifikasi dengan menggunakan KLT bertujuan untuk melihat pemisahan sampel berupa pola kromatogram yang khas pada ekstrak berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut (eluen) (Depkes, 2000).

Pada penelitian ini perbandingan yang digunakan untuk uji kafein adalah kafein standar dan untuk uji tanin adalah asam galat. Sedangkan fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah plat silika gel 60 F₂₅₄ nm. Pada optimasi fase gerak yang dilakukan dapat dilihat pada **Tabel 8**.

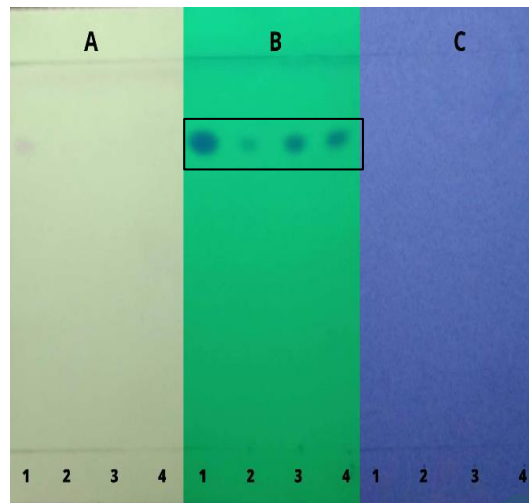
Tabel 8. Optimasi Fase Gerak Kafein dan pada KLT

No.	Metabolit Sekunder	Fase Gerak	Hasil
1.	Kafein	kloroform : etanol (9:1)	Terelusi dan terjadi pemisahan yang baik
2	Tanin	metanol : <i>aquadest</i> (6:4)	Terelusi dengan jelas namun tinggi dan terjadi <i>tailing</i>

No.	Metabolit Sekuner	Fase Gerak	Hasil
		metanol : <i>aquadest</i> (8:2)	Terelusi namun tinggi dan terjadi <i>tailing</i>
		metanol : <i>aquadest</i> (9:1)	Terelusi tipis namun tinggi
		n-heksan : etil asetat (3:7)	Tidak terjadi elusi
		etanol : etil asetat (9:1)	Terelusi dan terjadi pemisahan yang baik

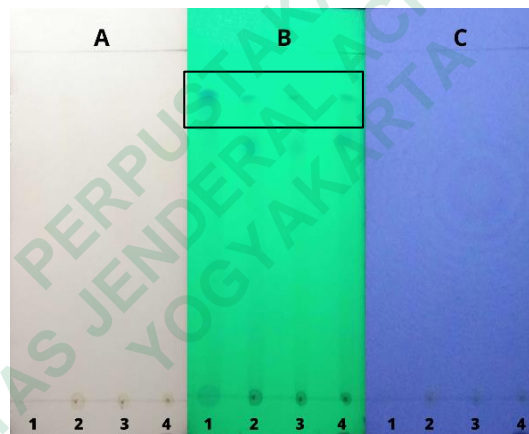
Berdasarkan optimasi fase gerak, maka digunakan kloroform *p.a* : etanol *p.a* (9 : 1 v/v) untuk uji kafein dan etanol : etil asetat (9:1 v/v) untuk uji tanin. Larutan baku standar yang digunakan pada uji kafein adalah kafein anhidrat dengan konsentrasi 10.000 ppm. Pada uji tanin menggunakan asam galat sebagai standar dengan konsentrasi 500 ppm. Konsentrasi larutan sampel baik itu kafein maupun tanin menggunakan konsentrasi 10.000 ppm. Larutan sampel yang akan diuji sebelumnya dilakukan proses penyaringan dengan kertas saring guna mendapatkan filtrat yang jernih agar tidak mempengaruhi penotolan pada plat.

Plat KLT terlebih dahulu diaktivasi dengan memanaskan pada oven dengan suhu 100°C selama 10 menit untuk menghilangkan pelarut sisa pencucian dan mengaktifkan gugus silanol dan siloksan dari plat (Yuda *et al.*, 2017). Bercak dilihat di bawah sinar UV 254 nm dan 365 nm. Hasil yang diperoleh dari analisis kualitatif dapat dilihat pada **Gambar 9**. untuk uji kafein dan **Gambar 10**. pada uji tanin sebelum dilakukan penyemprotan FeCl₃ 5% dan **Gambar 11**. sesudah dilakukan penyemprotan penyemprotan FeCl₃ 5%. Penyemprotan FeCl₃ 5% dapat memberikan indikasi atau memperjelas keberadaan tanin melalui reaksi warna. Untuk nilai R_f dari uji KLT dapat dilihat pada **Tabel 9**.



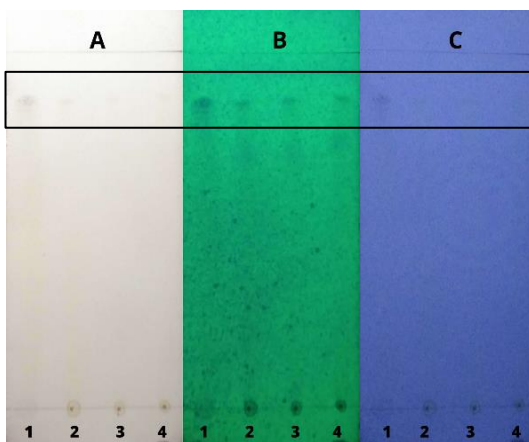
Gambar 9. Hasil Uji KLT Sampel Kafein

Keterangan: A: Sinar tampak; B: Sinar UV 254 nm; C: Sinar UV 365 nm; 1: Standar kafein; 2: Sampel Sleman; 3: Sampel Magelang; 4: Sampel Temanggung



Gambar 10. Hasil Uji KLT Sampel Tanin Sebelum Disemprot FeCl_3 5%

Keterangan: A: Sinar tampak; B: Sinar UV 254 nm; C: Sinar UV 365 nm; 1: Standar asam galat; 2: Sampel Sleman; 3: Sampel Magelang; 4: Sampel Temanggung



Gambar 11. Hasil Uji KLT Sampel Tanin Setelah Disemprot FeCl_3 5%

Keterangan: A: Sinar tampak; B: Sinar UV 254 nm; C: Sinar UV 365 nm; 1: Standar asam galat; 2: Sampel Sleman; 3: Sampel Magelang; 4: Sampel Temanggung

Tabel 9. Nilai Rf

Uji KLT	Analit	Nilai Rf
Kafein	Standar kafein	0,6857
	Sampel Sleman	0,6857
	Sampel Magelang	0,6857
	Sampel Temanggung	0,7142
Tanin	Standar tanin	0,7857
	Sampel Sleman	0,7857
	Sampel Magelang	0,7857
	Sampel Temanggung	0,7857

Dari **Gambar 9.** dan **Gambar 10.** dapat diamati secara visual bahwa terdapat bercak yang sejajar dengan standar. Berdasarkan pengamatan bercak terhadap plat kafein dan tanin serta nilai Rf yang didapat, diketahui sampel positif mengandung kafein dan tanin. Dikatakan positif karena hasil Rf sesuai atau mendekati Rf atau dengan toleransi selisih tidak boleh lebih dari 10% dan warna bercak harus sama dari standar kafein dan asam galat yang juga ditotolkan (Sulastri *et al.*, 2019; Wilantari, 2018). Rf KLT yang bagus berkisar antara 0,2 - 0,8. Jika Rf terlalu tinggi, yang harus dilakukan adalah mengurangi kepolaran eluen, dan sebaliknya (Suwiyarsa *et al.*, 2018).

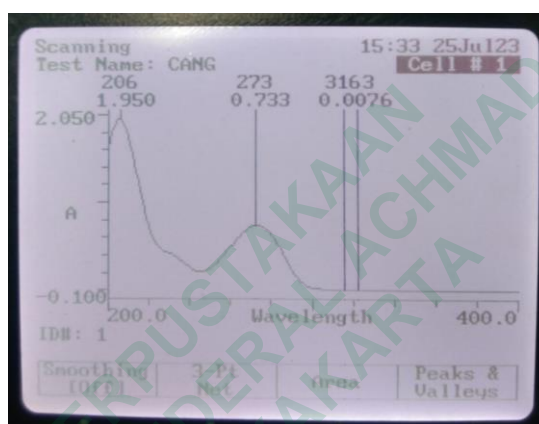
7. Penentuan kadar kafein total

Penentuan kurva baku pada standar kafein bertujuan untuk mendapatkan persamaan regresi linear untuk mengukur suatu kadar dari nilai absorbansi yang didapatkan pada spektrofotometer UV-Vis. Perhitungan persamaan regresi linear didapatkan dari hubungan antara konsentrasi larutan kafein (ppm) dengan absorbansinya. Kurva baku dibuat dengan menggunakan standar kafein 200 ppm sebagai induk standar kemudian diencerkan menjadi seri konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm.

Untuk mencari panjang gelombang maksimal larutan baku kafein dengan konsentrasi 15 ppm diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 250-350 nm karena pada rentang panjang tersebut merupakan daerah panjang gelombang pengukuran spektrofotometri UV. Hal tersebut dikarenakan menurut Kresnadipayana & Lestari (2017) nilai serapan sampel yang diuji harus

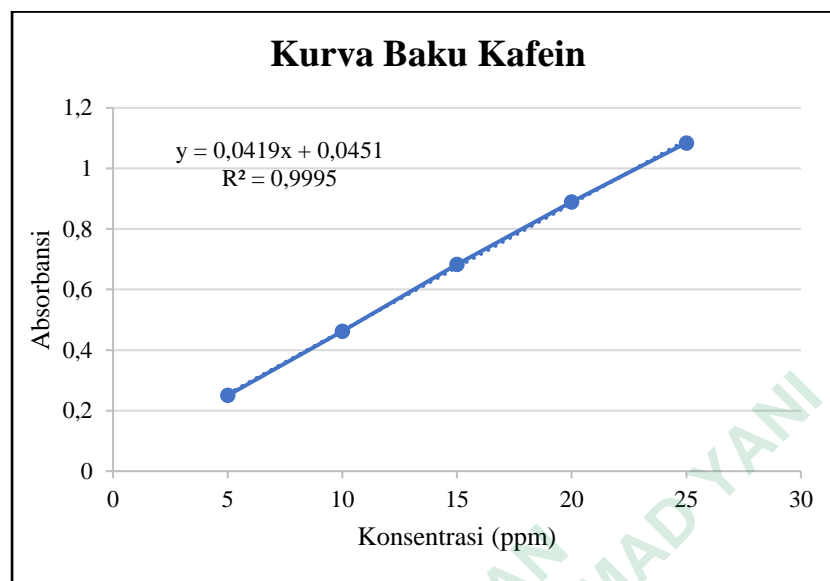
berada pada panjang gelombang maksimum atau puncak sehingga didapatkan nilai serapan yang maksimal. Selain itu, faktor dari keadaan preparasi sampel yang berbeda, maka perlu dilakukan penetapan panjang gelombang maksimum pada penelitian ini.

Senyawa yang akan ditetapkan kadarnya secara spektrofotometri ultraviolet harus memiliki gugus kromofor pada strukturnya agar dapat menyerap radiasi elektromagnetik. Gugus kromofor yang dimiliki kafein terdapat ikatan rangkap yang mengandung ikatan π (Hasibuan *et al.*, 2023).



Gambar 12. Panjang Gelombang Maksimum Kafein ($\lambda_{\text{maks}} = 273 \text{ nm}$)

Pada hasil *scanning* menunjukkan panjang gelombang yang didapatkan adalah 273 nm seperti pada **Gambar 12**. Adanya gugus kromofor yang panjang mengakibatkan pelarut kloroform tampak tinggi pada serapan awal deteksi UV (Isnindar *et al.*, 2016). Hasil panjang gelombang 273 nm diukur serapan larutan standar kafein (5, 10, 15, 20, dan 25 ppm) yang sudah dibuat dengan menggunakan *aquadest* sebagai blanko. Pengukuran kurva baku dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali untuk meminimalisir kesalahan dalam Analisa. Kurva yang didapat direfleksikan menjadi sebuah garis lurus seperti pada **Gambar 13**. Dari kurva baku tersebut didapatkan persamaan regresi linear antara konsentrasi vs absorbansi yaitu $y = 0,0419x + 0,0451$ dengan nilai r sebesar 0,9997. Dari persamaan regresi tersebut, maka dapat dikatakan linear karena nilai r mendekati 1 ($r \leq 1$). Persamaan regresi dari kurva baku kafein dapat dilanjutkan untuk menentukan kandungan kafein yang terdapat pada ketiga sampel kopi robusta.



Gambar 13. Kurva Baku Kafein

Sampel kopi yang digunakan yaitu sampel kopi robusta dari tiga tempat berbeda. Pengukuran dilakukan dengan tiga kali pengulangan, sehingga dilakukan perhitungan ralat menggunakan *standart error mean* (SEM). Hasil penetapan kadar kafein dari masing-masing sampel dapat diamati pada **Tabel 10**.

Tabel 10. Kadar Kafein Total

Sampel	$\bar{x} \pm \text{SEM}$ (mgCE/gram)
Kopi Kab. Temanggung	4,748 \pm 0,004
Kopi Kab. Magelang	6,012 \pm 0,011
Kopi Kab. Sleman	4,925 \pm 0,017

Keterangan: Kadar dinyatakan dalam rata-rata kadar \pm SEM

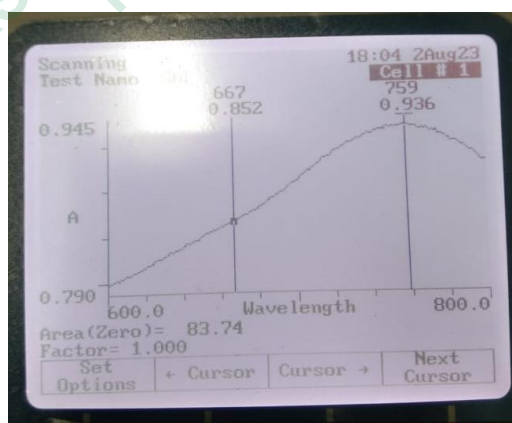
Berdasarkan data yang tertera pada **Tabel 10**, terdapat nilai kadar yang berbeda untuk setiap sampel kopi robusta mulai dari yang tertinggi yaitu kadar dari kopi Magelang, lalu kopi Sleman dan kopi Temanggung. Hal ini menunjukkan bahwa lokasi tumbuh mempengaruhi kandungan kafein pada kopi.

8. Penentuan kadar tanin total

Penentuan kurva baku pada standar asam galat bertujuan untuk mendapatkan persamaan regresi linear untuk mengukur suatu kadar dari nilai absorbansi yang didapatkan pada spektrofotometer UV-Vis. Perhitungan persamaan regresi linear didapatkan dari hubungan antara konsentrasi larutan

asam galat (ppm) dengan absorbansinya. Kurva baku dibuat dengan menggunakan standar asam galat 100 ppm sebagai induk standar yang kemudian diencerkan menjadi seri konsentrasi 40, 50, 60, 70, dan 80 ppm. Standar tanin yang digunakan yaitu asam galat. Pemilihan asam galat dikarenakan asam galat merupakan golongan tanin terhidrolisis sehingga dapat digunakan sebagai pembanding dalam pengukuran kadar tanin total

Untuk mencari panjang gelombang maksimal larutan baku kafein dengan konsentrasi 15 ppm diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 250-350 nm karena pada rentang panjang tersebut merupakan daerah panjang gelombang pengukuran spektrofotometri UV. Larutan baku asam galat dengan konsentrasi 60 ppm diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 600-800 nm karena pada rentang panjang tersebut merupakan daerah panjang gelombang pengukuran spektrofotometri *visible*. Hal tersebut dikarenakan menurut Kresnadipayana & Lestari (2017) nilai serapan sampel yang diuji harus berada pada panjang gelombang maksimum atau puncak sehingga didapatkan nilai serapan yang maksimal. Selain itu, faktor dari keadaan preparasi sampel yang berbeda, maka perlu dilakukan penetapan panjang gelombang maksimum pada penelitian ini.

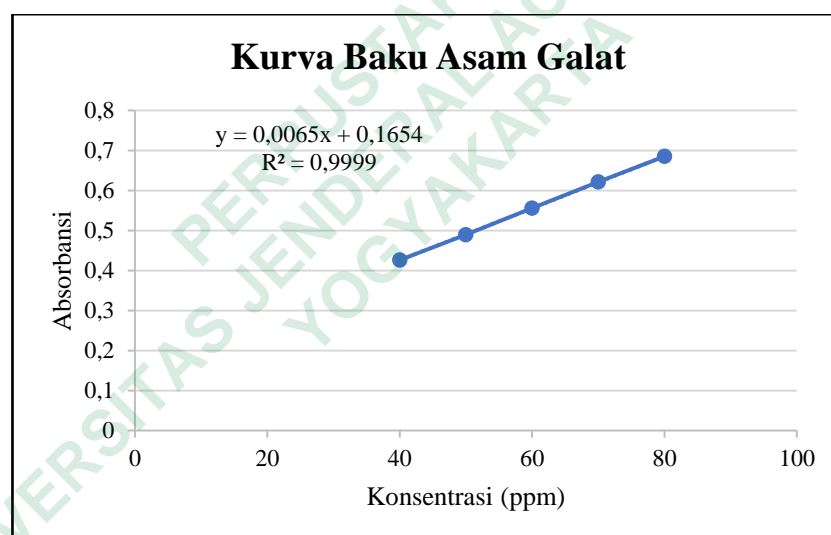


Gambar 14. Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat ($\lambda_{\text{maks}} = 759 \text{ nm}$)

Hasil panjang gelombang yang didapatkan (759 nm) pada **Gambar 14.** ditentukan waktu optimal menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan interval waktu 1 menit dari 0 hingga 75 menit untuk mendapatkan absorbansi

yang stabil. Pada penelitian ini didapatkan waktu stabil pada 72 menit dengan absorbansi 0,548 nm.

Berdasarkan hasil panjang gelombang maksimal dan waktu optimal yang didapat, larutan standar (40, 50, 60, 70, dan 80 ppm) yang sudah dibuat dibaca serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis dengan etanol 96% sebagai blankonya. Kurva yang didapat direfleksikan menjadi sebuah garis lurus seperti pada **Gambar 15**. Dari kurva baku tersebut didapatkan persamaan regresi linear antara konsentrasi vs absorbansi yaitu $y = 0,0065x + 0,1654$ dengan nilai r sebesar 0,9999. Dari persamaan regresi tersebut, maka dapat dikatakan linear karena nilai r mendekati 1 ($r \leq 1$). Persamaan regresi dari kurva baku asam galat dapat dilanjutkan untuk menentukan kandungan tanin yang terdapat pada ketiga sampel kopi robusta.



Gambar 15. Kurva Baku Asam Galat

Sampel kopi yang digunakan yaitu sampel kopi robusta dari tiga tempat berbeda. Pengukuran dilakukan dengan tiga kali pengulangan, sehingga dilakukan perhitungan ralat menggunakan *standart error mean* (SEM). Tanin yang dibaca pada spektrofotometer UV-Vis harus direaksikan dengan reagen pembentuk warna yaitu *Folin Ciocalteu* dan natrium karbonat (Na_2CO_3). Pembentukan warnanya berdasarkan reaksi reduksi oksidasi, dimana tanin sebagai reduktor dan *Folin Ciocalteu* sebagai oksidator. Tanin yang teroksidasi akan mengubah reagen *Folin Ciocalteu* (kuning), yang mengandung

fosfomolibdat menjadi senyawa yang dapat menghasilkan warna biru (Suryanto & Wehantouw, 2019). Na_2CO_3 bertujuan untuk membuat suasana basa agar terjadi reaksi reduksi *Folin Ciocalteu* oleh gugus hidroksil dari polifenol di dalam sampel dan akan membentuk kompleks molybdenum-tungsten berwarna biru (Pratama *et al.*, 2019). Hasil penetapan kadar tanin dari masing-masing sampel dapat diamati pada **Tabel 11**.

Tabel 11. Kadar Tanin Total

Sampel	$\bar{x} \pm \text{SEM}$ (mgGAE/gram)
Kopi Kab. Temanggung	$7,860 \pm 0,240$
Kopi Kab. Magelang	$7,700 \pm 0,360$
Kopi Kab. Sleman	$7,566 \pm 0,176$

Keterangan: Kadar dinyatakan dalam rata-rata kadar \pm SEM

Tabel 11. menunjukkan nilai kadar yang berbeda untuk setiap sampel kopi robusta mulai dari yang tertinggi yaitu kopi Temanggung, lalu kopi Magelang dan kopi Sleman. Hal ini menunjukkan bahwa lokasi tumbuh mempengaruhi kandungan tanin pada kopi.

9. Analisis data

Data kadar yang telah didapatkan dan diolah kemudian dilanjutkan untuk dianalisis dengan menggunakan bantuan *software* SPSS. SPSS digunakan untuk mengetahui apakah data yang didapatkan terdistribusi normal atau tidak. Pada uji homogenitas dilakukan dengan uji *Levene's* sedangkan untuk uji normalitas digunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah data yang diperoleh kurang dari 50.

Hasil analisis terhadap kadar kafein total pada kopi robusta dari ketiga tempat (**Tabel 12**) menunjukkan kehomogenan namun terjadi ketidaknormalan pada distribusi data. Oleh karena itu tidak dapat dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA*, sehingga digunakan uji *Kruskal-Wallis test* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan dari ketiga sampel kopi robusta. Berdasarkan analisa *Kruskal-Wallis* seperti ditunjukkan pada **Tabel 12**. kadar kafein total menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan. Hal ini dikarenakan nilai sig. (*P. value*) menunjukkan angka lebih kecil dari 0,05. Pada uji *post hoc pairwise comparisons* dimana yang berbeda signifikan hanya kopi Temanggung-Magelang saja dan yang lainnya tidak signifikan.

Tabel 12. Hasil Uji Statistik Kadar Kafein Total

Sampel	Kadar Kafein Total			
	Homogenitas	Normalitas	Kruskal-Wallis	Post Hoc (Pairwise Comparisons)
Temanggung	0,138	< 0,001	0,027*	T-S 0,169**
Magelang		1		T-M 0,006*
Sleman		0,253		S-M 0,169**

Keterangan: Terdapat perbedaan yang signifikan = *, tidak terdapat perbedaan yang signifikan = **, Temanggung = T, Magelang = M, Sleman = S

Hasil analisis terhadap kadar tanin total pada kopi robusta dari ketiga tempat (**Tabel 13**) menunjukkan homogen dan normal. Sehingga dapat dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* dan *post Hoc LSD* karena memenuhi syarat. Berdasarkan analisa dengan *One Way ANOVA* dan *post hoc* seperti ditunjukkan pada **Tabel 13**, kadar tanin total tidak ada perbedaan secara signifikan. Hal ini dikarenakan nilai sig. (*P. value*) menunjukkan angka lebih besar dari 0,05.

Tabel 13. Hasil Uji Statistik Kadar Tanin Total

Sampel	Kadar Tanin Total			
	Homogenitas	Normalitas	ANOVA	Post Hoc
Temanggung	0,353	0,463	0,745**	M 0,678** S 0,462**
Magelang		0,463		T 0,678** S 0,739**
Sleman		0,637		T 0,462** M 0,739**

Keterangan: Terdapat perbedaan yang signifikan = *, tidak terdapat perbedaan yang signifikan = **, Temanggung = T, Magelang = M, Sleman = S

B. Pembahasan

Penelitian ini menggunakan biji buah kopi robusta yang berasal dari 3 tempat tumbuh yang berbeda dan dengan ketinggian tumbuh yang berbeda pula. Tempat tumbuh diketahui dapat mempengaruhi kandungan senyawa kimia pada kopi, seperti kandungan kafein dan tanin, sehingga estimasi kandungan ini penting untuk mengevaluasi kualitas kopi serta implikasi potensial bagi kesehatan (Virhananda *et al.*, 2022; Putri, 2022).

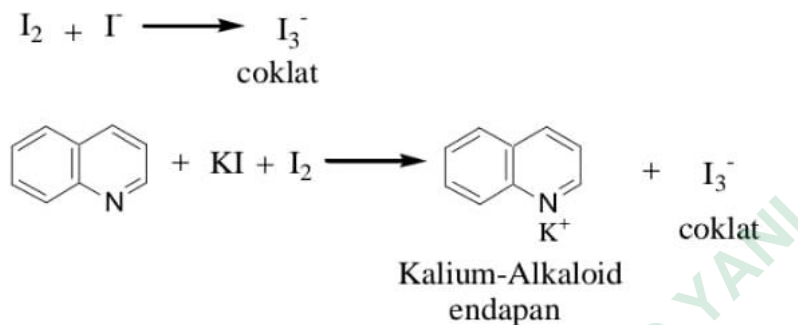
Kopi robusta yang akan diuji sebelumnya sudah dilakukan sortasi basah

terlebih dahulu guna memisahkan kotoran ataupun buah kopi yang belum matang serta memisahkan biji kopi dari kulit dan buah kopi. Selanjutnya kopi dikeringkan, disortasi kering, dihaluskan, dan diayak dan lalu diukur kadar kelembabannya dengan alat *moisture analyzer*. Berdasarkan pengujian, didapatkan kadar kelembaban sebesar 0,98% untuk sampel Temanggung; 1,24% untuk sampel Magelang; dan 1,45% untuk sampel Sleman. Menurut Trinovita (2020), kadar kelembaban yang baik adalah <5%. Kadar kelembaban pada bubuk kopi Kabupaten Temanggung, Kabupaten Magelang, dan Kabupaten Sleman yang diperoleh sudah memenuhi standar syarat, dan juga sesuai dengan pernyataan Yusianto (1999) dalam Panggabean (2011) bahwa kadar kelembaban kopi sangrai berkisar antara 0-5%. Tujuan penetapan kadar kelembaban ini bertujuan guna menjaga kualitas sampel dalam masa penyimpanan. Kadar kelembaban yang tinggi mengakibatkan mudahnya bakteri, kapang, dan khamir untuk berkembang biak sehingga akan terjadi perubahan pada bahan (Agustina *et al.*, 2019).

Pada penelitian ini dilakukan analisa terhadap ketiga sampel dengan metode uji tabung, KLT, dan spektrofotometri UV Vis. Pada skrining alkaloid dengan uji tabung ditambahkan larutan asam berupa HCl. Penambahan HCl bertujuan untuk membuat suasana larutan berubah bersifat asam dan mengubah seluruh bentuk alkaloid menjadi garam sehingga apabila diberikan peraksi warna larutan dapat bereaksi dengan garam alkaloid pada larutan uji (Wilantari, 2018). Alkaloid dilakukan uji dengan 3 pereaksi, hal ini dikarenakan adanya protein yang mengendap pada penambahan pereaksi yang mengandung logam berat dapat memberikan reaksi positif palsu pada beberapa senyawa (Marliana *et al.*, 2005). Hasil pengujian alkaloid pada kopi bubuk robusta diperoleh hasil positif setelah dilakukan pengujian dengan 3 reagen dan ditandai dengan hasil positif pada 2 reaksi yaitu pada penambahan reagen Wagner dan reagen Dagendorf. Kafein merupakan senyawa alkaloid yang terdapat dalam kopi (Maghfiroh, 2019).

Pada Marliana (2005), hasil positif pada uji Wagner ditandai dengan dengan terbentuknya endapan merah kecoklatan. Diperkirakan endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Wagner, iodin bereaksi dengan ion I^- dari kalium iodida menghasilkan ion I_3^- yang berwarna coklat. Pada uji Wagner,

ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Reaksi yang terjadi pada uji Wagner ditunjukkan pada **Gambar 16**.



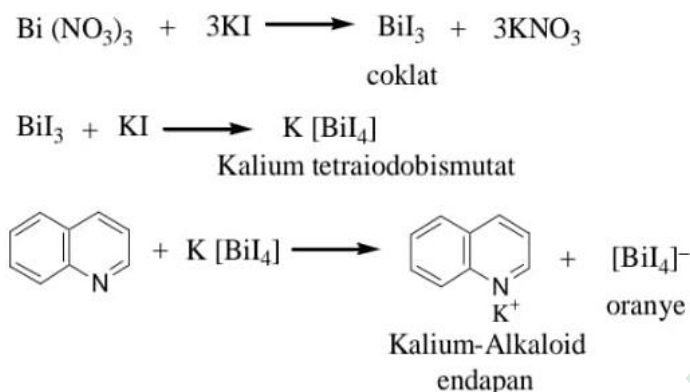
Gambar 16. Perkiraan Reaksi Uji Wagner (Marliana *et al.*, 2005)

Pada Marliana (2005), hasil positif alkaloid pada uji Dragendorff juga ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Dragendorff, bismut nitrat dilarutkan dalam HCl agar tidak terjadi reaksi hidrolisis karena garam-garam bismut mudah terhidrolisis membentuk ion bismutil (BiO^+), yang reaksinya ditunjukkan pada **Gambar 17**.



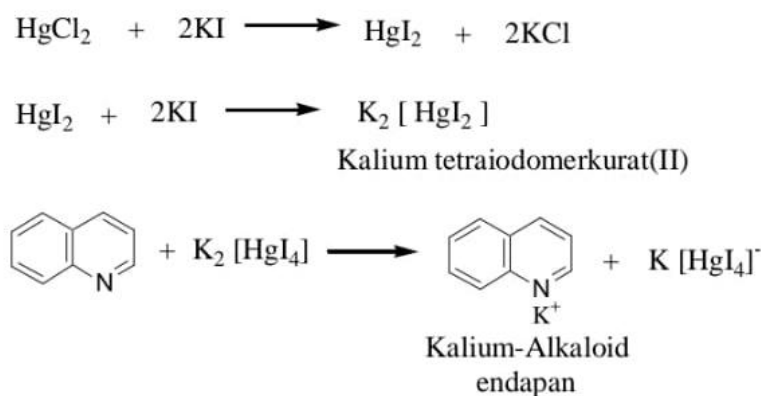
Gambar 17. Perkiraan Reaksi Hidrolisis Bismut (Marliana *et al.*, 2005)

Agar ion Bi^{3+} tetap berada dalam larutan, maka larutan itu ditambah asam sehingga kesetimbangan akan bergeser ke arah kiri. Selanjutnya ion Bi^{3+} dari bismut nitrat bereaksi dengan kalium iodida membentuk endapan hitam Bismut (III) iodida yang kemudian melarut dalam kalium iodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam. Reaksi pada uji Dragendorff ditunjukkan pada **Gambar 18**.



Gambar 18. Perkiraan Reaksi Uji Dragendorff (Marliana *et al.*, 2005)

Pada uji Meyer hasil yang didapatkan adalah endapan merah muda, sehingga hasil yang didapatkan negatif. Pada hasil uji yang dilakukan Marliana (2005) dikatakan positif jika terjadi endapan putih. Endapan putih itu diperkirakan adalah kompleks kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Mayer, larutan merkuri(II) klorida ditambah kalium iodida akan bereaksi membentuk endapan merah merkuri(II) iodida. Jika kalium iodida yang ditambahkan berlebih maka akan terbentuk kalium tetraiodomerkurat(II). Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (McMurry & Fay, 2004). Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat(II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Perkiraan reaksi yang terjadi pada uji Mayer ditunjukkan pada **Gambar 19**.



Gambar 19. Perkiraan Reaksi Uji Mayer (Marliana *et al.*, 2005)

Pada skrining tanin menunjukkan hasil positif pada ketiga sampel setelah ditambahkan FeCl_3 5% dengan ditandai terbentuknya warna biru kehitaman. Tanin yang didapatkan pada pengujian ini merupakan tanin terhidrolisis yang bereaksi dengan FeCl_3 menghasilkan warna biru kehitaman (Fajriaty *et al.*, 2018). Pembentukan tinta hijau atau biru-hitam pada ekstrak setelah ditambahkan dengan FeCl_3 sebagai tanin akan membentuk kompleks dengan ion Fe_3^+ (Pratama *et al.*, 2019).

Setelah skrining fitokimia dilanjutkan dengan uji KLT untuk membuktikan apakah benar kopi robusta dari ketiga tempat mengandung kafein dan tanin. KLT memungkinkan untuk pemisahan yang lebih baik dan lebih rinci dari campuran senyawa. Ini terjadi karena setiap senyawa memiliki pergerakan yang berbeda pada fase diam dan fase bergerak, yang memungkinkan pemisahan komponen yang lebih baik (Dröge, 2002). Prinsip uji KLT yaitu untuk memisahkan komponen kimia berdasarkan prinsip absorbansi dan partisi, yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen) (Romlah *et al.*, 2019). Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel 60 F₂₅₄ yang memiliki sifat polar. Pada pengujian kafein, fase gerak yang digunakan adalah kloroform : etanol (9:1) yang bersifat lebih non polar. Sedangkan pada pengujian tanin, baku standar menggunakan asam galat dan fase gerak yang digunakan adalah etanol : etil asetat (9:1). Tanin memiliki sifat yang mudah larut dalam pelarut polar, sehingga etanol dan etil asetat karena memiliki sifat polar yang sangat efektif dalam mengidentifikasi senyawa organik seperti tanin. Fase gerak akan membawa naik senyawa organik melalui dinding plat silika, dimana senyawa organik yang dibawa akan meninggalkan jejak yang dapat dilihat pada sinar UV 254 nm.

Berdasarkan hasil KLT kafein dan tanin didapatkan nilai Rf seperti pada **Tabel 8**. Hasil nilai Rf digunakan untuk mengidentifikasi adanya perbedaan senyawa dalam sampel pada uji KLT. Senyawa yang mempunyai Rf lebih besar berarti mempunyai kepolaran yang lebih rendah, begitu juga sebaliknya. Senyawa yang lebih polar akan tertahan kuat pada plat, sehingga menghasilkan nilai Rf yang rendah (Suwiyarsa *et al.*, 2018). Berdasarkan hasil KLT yang diperoleh ketiga sampel dikatakan positif karena hasil Rf sesuai atau mendekati Rf dari standar

kafein dan asam galat yang juga ditotolkan (Wilantari, 2018).

Metode kuantitatif yang digunakan pada penelitian ini adalah metode spektrofotometri UV-Vis. Pengujian diawali dengan pembuatan kurva baku standar dari standar dari kafein anhidrat dengan konsentrasi 200 ppm sebagai standar uji kafein dan asam galat dengan konsentrasi 100 ppm sebagai standar uji tanin. Berdasarkan pengujian didapatkan kadar kafein seperti **Tabel 8**. dan kadar tanin seperti pada **Tabel 9**. Kopi Magelang memiliki kadar kafein total paling tinggi dibandingkan kopi Sleman dan Temanggung. Tetapi kadar tanin total, kopi Temanggung memiliki kadar lebih tinggi dibandingkan kopi Magelang dan kopi Sleman. Kandungan kafein yang tinggi pada kopi Magelang tidak selalu mengindikasikan bahwa kandungan tanin juga lebih tinggi dibandingkan kopi lain. Kandungan kafein dan tanin dipengaruhi oleh faktor-faktor lain pengolahan dan tempat tumbuh.

Berdasarkan hasil analisis kualitatif dan kuantitatif yang dilakukan pada penelitian ini, didapatkan bahwa sampel kopi robusta dari Kabupaten Temanggung, Kabupaten Magelang, dan Kabupaten Sleman positif mengandung kafein dan tanin dengan kadar yang berbeda-beda. Hal ini dapat dikarenakan beberapa faktor seperti sampel kopi yang digunakan tidak diperoleh dari satu tempat tumbuh melainkan dari tiga tempat tumbuh yang berbeda. Perbedaan letak geografis dapat mempengaruhi kandungan senyawa pada tanaman karena unsur hara yang terdapat dalam tanah berbeda proporsinya. Ketinggian tempat tumbuh dapat berpengaruh terhadap intensitas cahaya, suhu dan kelembaban lingkungan tumbuh tanaman, sehingga akan mengakibatkan proses metabolisme pada tanaman tersebut akan terganggu dan mempengaruhi senyawa yang dihasilkan dari proses metabolisme tanaman (Tarakanita *et al.*, 2020).

Selain perbedaan tempat tumbuh, faktor lain yang dapat menyebabkan proses metabolisme dari suatu metabolit sekunder berbeda adalah tingkat rapat tajuk (bagian atas atau daun-daun dan cabang-cabang yang terletak di atas batang utama tanaman) serta jenis tanah yang ada. Berdasarkan Tarakanita (2020), tingkat kerapatan atau penutupan tajuk tanaman juga akan memengaruhi intensitas cahaya, suhu, dan kelembaban. Jika tajuknya jarang, intensitas cahaya yang masuk ke

permukaan tanah akan lebih besar, menyebabkan peningkatan suhu dan penurunan kelembaban. Perbedaan jenis tanah dapat dipengaruhi oleh unsur hara dan tekstur tanah yang berbeda sesuai dengan jenis tanah tempat tumbuh.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
PERPUSTAKAAN
YOGYAKARTA