

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimental laboratorium secara kualitatif dan kuantitatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan kadar total kandungan senyawa kafein dan tanin antara kopi robusta yang berasal dari Kabupaten Temanggung, Kabupaten Magelang, dan Kabupaten Sleman.

B. Lokasi dan Waktu

1. Lokasi

Sampel diambil dari tiga perkebunan kopi yang berbeda yaitu di Desa Gesing, Kecamatan Kandangan, Kabupaten Temanggung (Q56J+CJ Gesing) dengan ketinggian ± 667 mdpl; Desa Banjarsari, Kecamatan Grabag, Kabupaten Magelang (M955+WW5, Mejing) dengan ketinggian ± 822 mdpl; dan Desa Pentingsari, Kecamatan Cangkringan, Kabupaten Sleman (9C6J+43 Umbulharjo) dengan ketinggian ± 782 mdpl. Penelitian dilakukan di Laboratorium Prodi Farmasi (S-1) di Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu

Penelitian dilakukan sejak bulan Juni 2023 hingga Agustus 2023. Penelitian ini terdiri dari tiga tahapan, yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap penyelesaian.

C. Sampel Penelitian

Sampel yang diambil adalah biji kopi robusta hasil panen pada bulan Juli 2023 yang berusia 8-11 bulan sejak dari kuncup, buah yang sudah mencapai kematangan penuh dan berwarna merah dari perkebunan kopi Desa Gesing, kecamatan Kandangan, Kabupaten Temanggung; Desa Banjarsari, Kecamatan

Grabag, Kabupaten Magelang; dan Desa Pentingsari, Kecamatan Cangkringan, Kabupaten Sleman.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pelarut, tempat pengambilan sampel, dan fase gerak.

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil identifikasi dan kadar total kafein serta tanin.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah umur panen dan suhu penyeduhan.

E. Definisi Operasional

1. Analisis kualitatif dari senyawa kafein dan tanin dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis dan memperhatikan nilai R_f.
2. Kafein total dinyatakan sebagai mg CE (*Caffeine Equivalent*) dalam satu gram.
3. Tanin total dinyatakan sebagai mg GAE (*Gallic Acid Equivalent*) dalam satu gram.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada tahap preparasi yaitu: pengayak mesh 60; beaker glass 25 mL, 50 mL, dan 100 mL; *chamber* KLT; corong *buchner*; corong pisah 30 mL; erlenmeyer dengan ukuran 50 mL dan 100 mL; *grinder* halus; *hotplate*; kipas angin; labu takar 10 mL; lampu UV; lap bersih; *magnetic stirrer*; *moisture analyzer type* MB90; oven Memmert UN30; pipa kapiler; pipet ukur 5 mL, 10 mL, dan 25 mL; *micropipet*; propipet; penangas air; spatula; sudip; spektrofotometer Genesys 10S UV-Vis; tabung reaksi dan rak tabung reaksi; timbangan analitik Ohaus; dan wadah bersih.

2. Bahan

Bahan-bahan yang dipergunakan pada tahap preparasi yaitu: kopi robusta dari perkebunan kopi Desa Gesing, Kecamatan Kandangan, Kabupaten Temanggung; kopi robusta dari perkebunan kopi di Desa Banjarsari, Kecamatan Grabag, Kabupaten Magelang; kopi robusta dari perkebunan kopi Desa Pentingsari, Kecamatan Cangkringan, Kabupaten Sleman; *aquadest*, *aquabidest*, kloroform *p.a*; amonia (NH_3); kalsium karbonat (CaCO_3); *bluetip*; kertas saring; etanol.*p.a* 96%; methanol *p.a*; plat silika gel 60 F₂₅₄; kafein anhidrat ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$) Sigma; asam galat Sigma; besi (III) klorida (FeCl_3) 5%; pereaksi Wagner, dagendorff, dan meyer laboratoriu bio analitika Surabaya; reagen *Folin Ciocalteu*; dan natrium karbonat (Na_2CO_3).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Preparasi sampel

Sampel kopi robusta yang digunakan dikupas untuk memisahkan antara biji dan daging buahnya, selanjutnya dilakukan sortasi basah dengan cara biji dicuci lalu biji kopi dikering anginkan. Biji kopi yang sudah bersih kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 200°C selama 60 menit sambil sesekali diaduk hingga kadar kelembaban pada biji kopi di bawah 7 % (BSN, 2004). Setelah proses pengeringan selesai, biji kopi didinginkan di tempat terbuka dan dihaluskan dengan menggunakan *grinder* lalu disaring dengan ayakan mesh 60. Serbuk yang didapat kemudian dilakukan uji kadar kelembaban dengan *moisture analyzers*.

2. Ekstraksi sampel

Untuk membuat ekstrak kopi yang akan diuji kadar kafein dan taninnya, ditimbang 50 gram bubuk kopi robusta dan campurkan dengan 500 mL air yang telah dipanaskan hingga mendidih. Aduk campuran kopi dan air selama 15 menit menggunakan *magnetic stirrer*, lalu disaring menggunakan corong *buchner* untuk memisahkan antara residu dengan filtratnya. Filtrat dipekatkan dengan cara diuapkan di atas penangas air dengan suhu 60°C - 80°C hingga

didapatkan ekstrak kental. Ekstak kental yang didapat dihitung rendemennya dengan rumus: $\text{rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$

Uji tanin dapat dilakukan dengan sampel ekstrak kental yang telah diperoleh sebelumnya, sedangkan uji kafein diperlukan tahapan lebih lanjut untuk memisahkan kafein dari senyawa lainnya. Preparasi uji kafein dilakukan dengan cara ditimbang 1 gram ekstrak kental ditambahkan dengan 150 mL *aquadest* panas, 1500 mg kalsium karbonat (CaCO_3), dan digojog hingga homogen. Dilakukan tiga kali ekstraksi dengan menambahkan 25 mL kloroform setiap kali ekstraksi. Fase bawah (fase kloroform) diambil dan diuapkan hingga seluruh kloroform menguap. Didapatkan ekstrak kering yang akan digunakan untuk pengujian kafein. Ekstak kering yang didapat dihitung rendemennya dengan rumus: $\text{rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kering}}{\text{bobot ekstrak kental}} \times 100\%$

3. Uji organoleptis

Pengujian menggunakan Indera untuk mendeskripsikan bentuk, warna, dan aroma/bau.

4. Analisis kualitatif dengan uji tabung

a. Uji alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan metode Wagner, Dragendorf, dan Meyer. Dilakukan dengan mengambil 25 mg ekstrak kafein dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan *aquadest* sampai tanda batas. Larutan diambil sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan 5 ml *aquadest*, 3 ml HCl, kemudian dipisah menjadi 3 bagian A, B, dan C. Filtrat A diberikan 3 tetes reagen Wagner dan terbentuknya warna merah kecoklatan menandakan adanya alkaloid. Filtrat B diberikan 3 tetes reagen Dragendorf dan terbentuknya warna coklat muda sampai kuning menandakan adanya kandungan alkaloid. Filtrat C diberikan 3 tetes pereaksi Meyer dan munculnya endapan putih menandakan adanya kandungan alkaloid

b. Uji tanin

Dilakukan dengan mengambil 10 mg ekstrak kental kopi dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan *aquadest* sampai tanda batas. Larutan diambil sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan 1 mL *aquadest* dan 1-2 tetes larutan FeCl_3 5%. Adanya kandungan tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru-kehitaman.

5. Analisis kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Persiapan fase gerak

Pelarut yang digunakan sebagai fase gerak untuk identifikasi senyawa kafein adalah kloroform *p.a* : etanol *p.a* (9 : 1) dan untuk identifikasi senyawa tanin adalah etanol *p.a* : *etil asetat* (9 : 1) yang kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* untuk dijenuhkan

b. Persiapan fase diam

Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel 60 F₂₅₄ dengan dimensi 9 cm tinggi dan 4,5 cm lebar yang telah 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.

c. Pembuatan larutan baku

Larutan baku kafein dapat dibuat 1.000 ppm dengan cara ditimbang kafein anhidrat *p.a* sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan tambahkan kloroform *p.a* sampai tanda batas lalu dihomogenkan. Untuk pembuatan larutan baku tanin dibuat 500 ppm dengan cara ditimbang asam galat sebanyak 5 mg dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan tambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas lalu dihomogenkan.

d. Persiapan sampel

Untuk uji kafein ditimbang sejumlah 10 mg ekstrak kafein yang telah dipersiapkan sebelumnya ke dalam labu takar 1 mL dan ditambahkan kloroform *p.a* sampai tanda batas lalu dihomogenkan. Sedangkan untuk uji tanin dilakukan dengan cara yang sama dengan kafein namun pelarut yang digunakan adalah *aquadest*.

e. Uji KLT

Larutan baku dan sampel ditotolkan pada plat tepat di garis bawah dengan menggunakan pipa kapiler. Jarak antar totolan adalah 1 cm, Selanjutnya plat dimasukan ke dalam bejana yang sudah dijenuhkan lalu ditutup dan diperhatikan sampai eluen naik ke tanda batas atas. Setelah itu plat dikeluarkan dari bejana dan diangin anginkan sampai kering. Plat diamati di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 dan 365 nm. Untuk plat tanin disemprotkan dengan FeCl_3 5% lalu diamati lagi di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 dan 365 nm.

6. Analisis kuantitatif dengan spektrofotometri UV Vis

a. Kafein

1) Pembuatan larutan baku kafein

Dibuat larutan induk baku kafein dengan konsentrasi 200 ppm dengan cara ditimbang 20 mg kafein standar lalu dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dengan *aquadest* hingga volume 100 mL.

Untuk membuat kurva kalibrasi, dilakukan pembuatan larutan standar baku dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Cara pembuatannya adalah dengan memipet 0,25; 0,5; 0,75; 1; dan 1,25 mL dari induk 200 ppm ke dalam labu takar 10 mL dan kemudian dilarutkan dengan *aquadest* hingga tanda batas. Dilanjutkan dengan membaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 273 nm dan dibuat kurva kalibrasi.

2) Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan baku kafein dengan konsentrasi 15 ppm diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum ditetapkan berdasarkan panjang gelombang yang dimiliki absorbansi tertinggi. Pada Farmakope Indonesia edisi IV (1995) perbedaan ini masih dalam batas yang diperoleh yaitu berbeda 1 nm dengan literatur.

3) Penetapan kadar kafein

Ekstrak kopi robusta yang telah dipersiapkan sebelumnya diambil 25 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan *aquadest* sampai tanda batas. Selanjutnya, absorbansinya dibaca dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 273 nm.

b. Tanin

1) Pembuatan larutan Na_2CO_3 7,5 %

Lakukan penimbangan natrium karbonat sebanyak 7,5 gram, lalu dicampur dengan *aquadest* dalam *beaker glass* dan dipanaskan hingga natrium karbonat larut seluruhnya. Diambil dan dimasukkan ke dalam labu takar berukuran 100 mL dan ditambahkan dengan *aquadest* sampai tanda batas hingga di dapatkan larutan Na_2CO_3 jenuh 7,5 %.

2) Pembuatan larutan baku asam galat

Dibuat larutan induk baku asam galat dengan konsentrasi 100 ppm dengan cara ditimbang 10 mg kafein standar lalu dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dengan etanol 96 % *p.a* hingga volume 100 mL.

3) Penentuan *operating time*

Sebanyak 0,5 mL larutan induk asam galat dengan konsentrasi 100 ppm ditambahkan dengan reagen *Folin Ciocalteu* sebanyak 2 mL, selanjutnya ditambahkan dengan 4 mL Na_2CO_3 7,5 % lalu digojog dan didiamkan selama 3 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan interval waktu 1 menit dari 0 hingga 75 menit untuk mendapatkan absorbansi yang stabil.

4) Pembuatan seri kadar asam galat

Dari larutan induk asam galat dipipet 4; 5; 6; 7; dan 8 mL lalu ditambahkan dengan etanol 96 % *p.a* hingga 10 mL, sehingga dihasilkan konsentrasi 40, 50, 60, 70, dan 80 ppm.

Setiap konsentrasi dipipet 0,1 mL ditambahkan dengan 0,4 mL reagen *Folin Ciocalteu* lalu digojog dan didiamkan selama 6 menit. Setiap konsentrasi tadi ditambahkan dengan 0,5 mL larutan Na_2CO_2 7,5 % dan digojog hingga homogen dan didiamkan selama 72 menit pada suhu ruang. Dilanjutkan dengan membaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 759 nm dan dibuat kurva kalibrasi.

5) Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan baku asam galat dengan konsentrasi 60 ppm dipipet 0,1 mL ditambahkan dengan 0,4 mL reagen *Folin Ciocalteu* lalu digojog dan didiamkan selama 6 menit. Setiap konsentrasi tadi ditambahkan dengan 0,5 mL larutan Na_2CO_2 7,5 % dan digojog hingga homogen dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang antara 600-800 nm. Pada Rao (1967) perbedaan ini masih dalam batas yang diperolehkan yaitu berbeda 2 nm dengan literatur.

6) Penetapan kadar tanin

Dibuat larutan 1.000 ppm dari ekstrak kopi robusta yang telah dipersiapkan sebelumnya, ditimbang 10 mg dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, lalu ditambahkan *aquadest* sampai tanda batas. Lakukan replikasi sebanyak 3 kali. Larutan yang diperoleh dipipet 300 μL dan ditambah 1,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* dan digojog. Didiamkan selama 3 menit, ditambah 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5% dan didiamkan lagi selama 72 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, absorbansinya dibaca dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 759 nm.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Perhitungan Rf (*Retention factor*)

Nilai Rf (*Retention factor*) dihitung dengan melihat posisi noda pada fase diam setelah dilakukan elusi pada metode kromatografi lapis tipis. Nilai Rf dihitung menggunakan rumus (Rusnaeni *et al.*, 2016):

$$Rf = \frac{\text{jarak migrasi analit}}{\text{jarak migrasi eluen}}$$

2. Perhitungan kadar kafein dan tanin

Analisis data uji kandungan total kafein dan tanin, dengan menghitung persamaan regresi linear $y = bx + a$ berdasarkan nilai konsentrasi larutan dan absorbansi (sumbu y). Kandungan senyawa kafein dihitung dalam satuan mg CE/gram dan kandungan senyawa tanin dihitung dalam satuan mg GAE/gram. (sumbu x).

3. Analisis SPSS

Data kadar masing-masing kelompok sampel yang diperoleh diolah secara statistik menggunakan perangkat lunak SPSS. Sebelumnya, dilakukan pengujian distribusi data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene's*. Distribusi dikatakan normal jika signifikansi pada tabel *Test of Normality* $> \alpha = 5\% = 0,05$; dan dikatakan tidak normal jika signifikansi pada tabel *Test of Normality* $< \alpha = 5\% = 0,05$. Data untuk kafein dinyatakan tidak homogen dan tidak normal karena $\text{Sig.} < \alpha = 5\% = 0,05$, sehingga dilanjutkan dengan uji *kruskal wallis* dan *post-hoc pairwise comparisons*, data dinyatakan berbeda signifikan jika didapatkan $\text{Sig.} > \alpha = 5\% = 0,05$ dan sebaliknya. Lalu untuk tanin dinyatakan homogen dan normal karena $\text{Sig.} > \alpha = 5\% = 0,05$ sehingga diuji *One Way ANOVA* dan diuji *post hoc LSD*, data dinyatakan berbeda signifikan jika didapatkan $\text{Sig.} > \alpha = 5\% = 0,05$ dan sebaliknya.