

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian eksperimental ini menganalisis dengan metode uji kualitatif dan uji kuantitatif. Sampel kopi diamati uji organoleptik untuk mengidentifikasi warna, tekstur, dan aroma. Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui adanya alkaloid, saponin, flavonoid, fenolik dan tanin pada ekstrak biji kopi Robusta. Metode kuantitatif berupa pengujian peredaman radikal bebas DPPH untuk mengukur tingkat antioksidan pada ekstrak kopi Robusta yang berasal dari Lampung Barat.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Waktu penelitian yang dilakukan pada bulan Juli sampai Agustus 2024.

2. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi, Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

3 kg buah kopi Robusta (*Coffea canephora*) yang dikumpulkan dari Perkebunan Kopi Liwa, Lampung Barat dipanen pada umur 8-11 bulan ketika kulit buah berubah menjadi merah.

2. Sampel

Biji kopi Robusta yang sudah dipisahkan dari daging buah.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas
Variasi waktu ekstraksi UAE.
2. Variabel Terikat
Nilai IC₅₀ ekstrak biji kopi Robusta (*Coffea canephora*).
3. Variabel terkendali dari ekstrak biji kopi Robusta
Lokasi tumbuh, usia buah kopi, warna buah kopi, warna biji kopi, suhu ekstraksi, dan waktu panen jam 07.00-10.00 WIB.

E. Definisi Operasional

1. *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) adalah metode ekstraksi yang memanfaatkan gelombang ultrasonikasi sehingga metode ini dapat dipengaruhi oleh variasi waktu ekstraksi pada 10, 20 dan 30 menit.
2. Kopi Robusta (*Coffea canefora*) adalah salah satu jenis kopi yang banyak dibudidayakan di Indonesia dan menjadi salah satu komoditas unggulan
3. Nilai IC₅₀ adalah kemampuan suatu ekstrak yang berpotensi sebagai antioksidan untuk menghambat 50% peredaman radikal bebas.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian
Batang pengaduk, beaker glass (*Pyrex*) 500 mL, 250 mL, dan 50 mL, cawan porselin, corong, corong pisah (*Pyrex*), grinder, kertas saring, labu 28odide282828c (*Pyrex*) 100 mL dan 50 mL, labu ukur (*Pyrex*) 25 mL dan 250 mL, *magnetic stirrer*, mikropipet 1000-100 μ L (*Ohaus*), pipet volume (*Iwaki*) 5 mL, pinset, rak tabung reaksi, sendok, spatula, spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Fisher, Genesys 10S UV-Vis*), tabung reaksi (*Pyrex*), timbangan analitik (*Ohaus*) dengan kepekaan 0,1 mg, ultrasonikator (*Cole-Parmer*), *waterbath*, *hot plate*, dan alat-alat gelas lainnya.
2. Bahan penelitian
DPPH (*Merck p.a.*), kuersertin (*p.a.*), Etanol 70% (Teknis), metanol (*Merck p.a.*), *bluetip*, kertas saring, Pereaksi Mayer (Teknis), Pereaksi Wagner

(Teknis), Pereaksi Dragendroff (Teknis), FeCl_3 (Teknis), Aquadest (Teknis), Larutan Gelatin 1% (Teknis), NaCl jenuh (Teknis).

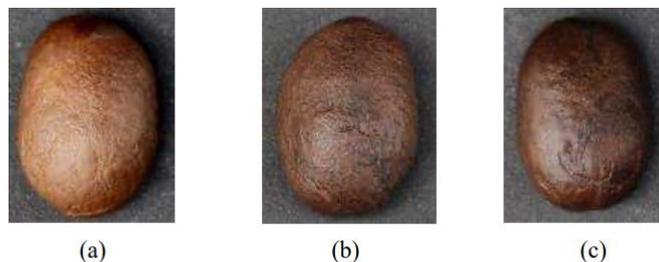
G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Uji determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Ahmad Dahlan. Proses determinasi ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasikan biji kopi Robusta (*Coffea canephora*).

2. Persiapan sampel

Buah kopi Robusta Lampung Barat yang dipanen dengan usia 8-11 bulan yang berwarna merah dan keadaan segar yang dipanen pada jam 07.00-10.00 WIB. Buah kopi Robusta Lampung Barat yang dipanen kemudian ditimbang sebanyak 3 kg. Buah kopi Robusta Lampung Barat dibersihkan untuk mengurangi kotoran yang melekat pada buah kopi Robusta. Buah kopi Robusta Lampung Barat kemudian ditiriskan dan dikeringkan pada sinar matahari selama 3 hari tergantung kondisi cuaca, agar mudah dikupas dan dipisahkan antara biji dengan buah kopi. Biji kopi dipanggang menggunakan *airfryer* pada suhu 190°C selama 30 menit hingga mendapatkan warna biji kopi yang *light*. Perbedaan warna biji kopi yang sudah dipanggang dapat diamati pada Gambar 8. Setelah itu, biji kopi Robusta diserbuk menggunakan grinder hingga membentuk bubuk kopi. Bubuk kopi disimpan pada tempat yang sejuk dan tertutup (Adawiyah *et al.*, 2023).



Gambar 8. Warna Biji Kopi setelah Dipanggang (Prastyaningsih & Kusri, 2021).

3. Proses Ekstraksi Biji Kopi dengan Metode UAE

5 g bubuk kopi ditimbang dan dilarutkan dalam 500 mL larutan etanol 70% dengan rasio 1:100 (b/v). Kemudian diekstraksi pada suhu 40°C selama 10, 20, dan 30 menit dengan alat sonikator. Filtrat ekstrak disaring dengan kertas saring lalu diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C selama 7 hari untuk mendapatkan ekstrak pekat kemudian dihitung % rendemennya. Ekstrak biji kopi yang pekat disimpan dalam lemari es untuk analisis selanjutnya (Modifikasi Gligor *et.al.*, 2023). % rendemen dihitung pada persamaan 2.

$$\% \text{rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{bobot bubuk kopi awal (gram)}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

4. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan pada ekstrak biji kopi untuk mengamati warna, tekstur, dan bau (Depkes, 2008).

5. Skrining Fitokimia

a. Identifikasi alkaloid

0,5 g ekstrak biji kopi dari berbagai variasi waktu pada menit ke – 10, 20, dan 30 diencerkan menggunakan aquadest kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Lalu masing-masing ekstrak yang sudah diencerkan diambil 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu masing-masing ekstrak ditambahkan 3 tetes dengan Reagen Mayer, Reagen Dragendroff, dan Reagen Wagner (Tiwari *et al.*, 2011).

b. Identifikasi Saponin

0,5 g ekstrak biji kopi dari berbagai variasi waktu pada menit ke – 10, 20, dan 30 diencerkan menggunakan aquadest kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Lalu masing-masing ekstrak yang sudah diencerkan diambil 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Dikocok selama 10 detik menggunakan aquadest panas. Terbentuknya buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit menunjukkan hasil positif adanya senyawa saponin (Tiwari *et al.*, 2011).

c. Identifikasi Fenolik

0,5 g ekstrak biji kopi dari berbagai variasi waktu pada menit ke – 10, 20, dan 30 diencerkan menggunakan aquadest kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Lalu masing-masing ekstrak yang sudah diencerkan diambil 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu masing-masing ekstrak ditambahkan 3-4 tetes FeCl_3 5%. Adapun hasil yang ditunjukkan terjadi perubahan warna hitam kebiruan menunjukkan adanya fenolik (Tiwari *et al.*, 2011).

d. Identifikasi Tanin

0,5 g ekstrak biji kopi dari berbagai variasi waktu pada menit ke – 10, 20, dan 30 diencerkan menggunakan aquadest kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Lalu masing-masing ekstrak yang sudah diencerkan diambil 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu masing-masing ekstrak ditambahkan beberapa tetes larutan gelatin 1% b/v dalam NaCl jenuh. Endapan putih menunjukkan adanya tanin (Tiwari *et al.*, 2011).

e. Identifikasi Flavonoid

0,5 g ekstrak biji kopi dari berbagai variasi waktu pada menit ke – 10, 20, dan 30 diencerkan menggunakan aquadest kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Lalu masing-masing ekstrak yang sudah diencerkan diambil 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu masing-masing ekstrak ditambahkan dengan 5 tetes etanol p.a., lalu dikocok sampai homogen. Setelah itu ditambah dengan serbuk Mg 0,2 g dan 5 tetes HCl pekat. Jika terjadi perubahan warna kuning menunjukkan adanya flavonoid pada sampel (Junito *et al.*, 2018).

6. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan larutan stok DPPH 0,1 mM

Pembuatan larutan induk DPPH 0,1 mM ditimbang sebesar 3,9432 mg, lalu ditambahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan kemudian dilarutkan menggunakan metanol p.a hingga mencapai batas yang ditentukan (Wigati *et al.*, 2018).

b. Pembuatan larutan stok kuersetin (100 ppm)

Kuersetin ditimbang kurang lebih 10 mg yang dilarutkan dengan metanol p.a. hingga tanda batas dengan labu ukur 100 mL sehingga didapatkan konsentrasi kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm (Modifikasi dari Wigati *et al.*, 2018).

c. Pembuatan larutan seri konsentrasi kuersetin

Seri konsentrasi larutan standar kuersetin yang dibuat yaitu 1, 2, 3, 4, 5 yang diambil dari larutan standar induk kuersetin 100 ppm dengan volume total sebanyak 10 mL (Modifikasi dari Wigati *et al.*, 2018).

d. Penentuan panjang gelombang maksimal

Diambil DPPH 0,1 mM sebanyak 2 mL kemudian dimasukkan kedalam kuvet dan menggunakan blanko (metanol p.a.) untuk dilakukan *Scanning* Panjang gelombang sekitar 400-600 nm yang akan digunakan untuk mendapatkan absorbansi pada rentang $\pm 0,2 - 0,8$ menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Fauzi *et al.*, 2021), dengan panjang gelombang maksimal yang diperoleh sebesar 517 nm.

e. Penentuan *Operating Time*

Diambil sebanyak 1 mL larutan induk standar kuersetin 2 ppm kemudian ditambahkan 2 mL larutan DPPH 0,1 mM. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum dan diukur selama 60 menit dengan interval setiap 1 menit pada penelitian ini diperoleh *operating time* pada menit ke – 31 (Modifikasi dari Wigati *et al.*, 2018).

f. Penentuan absorbansi kontrol (blanko)

2 mL larutan DPPH 0,1 mM dipindahkan ke labu ukur 10 mL, sebelumnya labu ukur ditutup menggunakan aluminium foil. Selanjutnya larutan blanko dapat didiamkan hingga menit ke – 31 pada suhu kamar (Wigati *et al.*, 2018).

g. Pembuatan larutan stok sampel

Ekstrak biji kopi pada variasi waktu 10, 20, dan 30 menit tersebut dibuat masing-masing larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Ekstrak

biji kopi ditimbang 10 mg dengan dilarutkan 100 mL metanol p.a. hingga tanda batas labu ukur sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak biji kopi sebesar 100 ppm (Modifikasi dari Wigati *et al.*, 2018).

h. Pembuatan seri konsentrasi sampel

Seri konsentrasi ekstrak biji kopi disiapkan mulai dari 5, 10, 20, 40, dan 80 ppm, dari larutan induk 100 ppm ke dalam labu ukur 10 mL lalu diambil sebanyak 0,5; 1; 2; 4; 8 dan 10 mL pada masing-masing variasi waktu (Modifikasi dari Wigati *et al.*, 2018).

i. Pengujian kuersetin terhadap DPPH

Kuersetin dibuat dengan seri konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm kemudian masing-masing diambil 1 mL, lalu ditambahkan 2 mL larutan DPPH 0,1 mM. Kemudian, ditutup menggunakan alumunium foil dan diinkubasi selama *operating time* pada suhu kamar. Absorbansi yang akan diukur pada panjang gelombang maksimal sekitar 500-600 nm (Modifikasi dari Wigati *et al.*, 2018).

j. Pengujian sampel terhadap DPPH

1 mL dari masing-masing konsentrasi pada tiga variasi waktu ditambahkan 2 mL larutan DPPH 0,1 mM. Setiap sampel ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi selama *operating time* pada suhu kamar. Terakhir, absorbansi diukur masing-masing sampel pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan (Wigati *et al.*, 2018).

H. Metode dan Analisis Data

1. Metode Pengolahan dan Analisa Data

Hasil absorbansi kontrol positif kuersetin, sampel ekstrak biji kopi, dan blanko diperoleh dengan metode Spektrofotometri UV-Visibel pada panjang gelombang maksimum. Uji aktivitas antioksidan dilakukan sebanyak tiga kali untuk setiap konsentrasi sampel ekstrak biji kopi dan larutan kontrol positif kuersetin. Aktivitas antioksidan dari standar dan sampel kopi Robusta dihitung menggunakan Persamaan 2.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

Nilai IC_{50} diperoleh dengan memotong garis antara penghambatan 50% dan sumbu konsentrasi menggunakan persamaan linier ($y = bx + a$), di mana y adalah % peredaman radikal bebas dan x adalah nilai konsentrasi (ppm) (Molyneux, 2004).

Tabel 2. Kategori Kekuatan IC_{50} (Nasution *et al.*, 2015)

No.	Kategori	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)
1	Sangat Kuat	<50
2	Kuat	50-100
3	Sedang	101-150
4	Lemah	151-200

Data nilai IC_{50} pada metode DPPH dengan perbedaan waktu ekstraksi dianalisis dengan uji statistika menggunakan *Statistical Program Service Solution* (SPSS) versi 26 pada taraf kepercayaan 95%. Uji statistika Shapiro-Wilk digunakan untuk menguji normalitas data jika sampel data sebesar tiga sampel (Razali & Wah, 2011). Uji homogenitas data dapat digunakan dengan uji *Levene*. Jika hasil uji diperoleh nilai signifikan $> 0,05$, maka variabel independent memiliki variasi yang sama sedangkan jika $< 0,05$ menunjukkan data dengan variasi yang berbeda (Ghozali, 2011).

Uji Normalitas menunjukkan jika signifikansi atau nilai probabilitas (p) kurang dari 0,05, maka data tidak memiliki distribusi normal, dan jika signifikansi atau nilai probabilitas (p) lebih dari 0,05, maka distribusi data

dapat normal dan homogen. Uji statistika *One Way* ANOVA dan *Post Hoc Test* digunakan untuk menilai suatu data tersebut dapat terdistribusi homogen dan normal.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
PERPUSTAKAAN
YOGYAKARTA