

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan uji kualitatif dan uji kuantitatif. Uji kualitatif mencakup uji organoleptik, uji kadar air dan identifikasi senyawa alkaloid dengan pereaksi (*Mayer, Wagner dan Dragendorff*) dan *scanning* panjang gelombang. Uji kuantitatif berupa pengukuran kadar kafein menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis. Kadar kafein dinyatakan dalam satuan mgCE/mg.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

a. Lokasi Sampling

Lokasi pengambilan sampel kopi diambil dari salah satu petani kopi robusta di Lampung Barat.

b. Lokasi Determinasi

Determinasi tumbuhan biji kopi robusta dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

c. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu

Kegiatan dilaksanakan mulai bulan Juni hingga September tahun 2024.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini yaitu Kopi Robusta di Lampung Barat.

2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah 5 kg buah kopi robusta yang matang dengan usia sekitar 8-11 bulan saat kulit buah berwarna merah yang diambil dari perkebunan salah satu petani Kopi Robusta di Balik Bukit, Liwa, Lampung Barat ($40^{\circ} 47' 16'' - 50^{\circ} 56' 42''$ LS dan $103^{\circ} 35' 08'' - 104^{\circ} 33' 51''$ BT).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Dalam penelitian ini, variabel bebas adalah variasi waktu ekstraksi pada waktu ke-15, 30, dan 45 menit.

2. Variabel Terikat

Dalam penelitian ini, terdapat beberapa variabel yang dipertimbangkan yaitu:

- a. Uji kualitatif : Uji organoleptik, uji alkaloid, uji kadar air dan uji *scanning* panjang gelombang maksimal.
- b. Uji kuantitatif : Kadar kafein yang ada dalam biji kopi robusta.

3. Variabel Terkendali

Dalam penelitian ini, variabel yang dikendalikan mencakup waktu pengeringan (menggunakan oven) dan suhu pengeringan.

- a. Sampel : Buah Kopi robusta yang matang usia sekitar 8-11 bulan saat kulit buah berwarna merah dan dipanggang hingga berwarna gelap.
- b. Ekstraksi : Pelarut etanol 70% dan metode UAE.
- c. Kondisi pengujian : Reagen, panjang gelombang dan instrument.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Metode ekstraksi Biji Kopi robusta (*Coffea canephora*) pada penelitian ini menggunakan *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) pada suhu 40°C selama 15, 30 dan 45 menit.
2. Analisis kualitatif pada penelitian ini meliputi pereaksi *Mayer*, *Wagner*, *Dragendorff* dan *scanning* panjang maksimal untuk mengidentifikasi adanya kandungan alkaloid pada ekstrak biji kopi.
3. Analisis kadar kafein pada Kopi robusta menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dinyatakan dalam satuan mgCE/mg.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat-alat yang digunakan

Berbagai alat dan instrument yang akan digunakan pada penelitian ini meliputi : ultrasonikator (*GT-Sonic*), Spektrofotometer UV-VIS (Thermo Fisher *Genesys 10S UV-VIS*), timbangan analitik (*Ohaus*) dengan kepekaan 0,1 mg, batang pengaduk, *beaker glass* (*Iwaki*) 500 mL, 250 mL dan 50 mL, cawan porselin, corong, corong pisah (*Iwaki*), labu erlenmeyer (*Iwaki*) 100 mL dan 50 mL, labu ukur (*Iwaki*) 25 mL dan 250 mL, mikropipet (*Ohaus*), pipet tetes, pipet ukur (*Iwaki*), pipet volume (*Iwaki*) 5 mL, pinset, raktabung reaksi dan tabung reaksi (*Iwaki*), sendok spatula dan alat-alat gelas lainnya.

2. Bahan-bahan yang digunakan

Penelitian ini menggunakan sampel berupa Biji Kopi robusta yang berasal dari Perkebunan Pekon Kubu Perahu, Kecamatan Balik Bukit, Liwa Kabupaten Lampung Barat. Bahan-bahan yang digunakan yaitu kafein *p.a.* (*Sigma Aldrich*), alumunium foil, aquadest (Teknis), *bluetip*, CaCO₃, etanol 70% (Teknis), kloroform *p.a.* (*Merck*) dan kertas saring.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan Sampel dan Determinasi Tumbuhan

Buah kopi robusta yang diambil dari Perkebunan Pekon Kubu Perahu, Kecamatan Balik Bukit, Liwa Kabupaten Lampung Barat ($40^{\circ} 47' 16'' - 50^{\circ} 56' 42''$ LS dan $103^{\circ} 35' 08'' - 104^{\circ} 33' 51''$ BT.). Determinasi tumbuhan biji kopi robusta dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta dilakukan untuk memastikan kebenaran tanaman yang akan diteliti.

2. Persiapan Sampel

Buah kopi robusta dipanen dengan usia matang 8 bulan yang berwarna merah dan keadaan segar pada pagi hari pukul 07.00-10.00 WIB untuk menjaga kualitas buah kopi karena suhu dan kelembabannya cenderung lebih rendah, sehingga buah kopi yang dipetik akan tetap segar dan kualitasnya terjaga. Buah kopi yang sudah dipetik sebesar 5 Kg. Buah kopi dipisahkan antara biji kopi dan daging buahnya dengan metode sortasi basah dengan cara biji kopi dicuci dengan air keran guna meminimalisir kotoran yang melekat di biji kopi robusta dan dikering anginkan (Suseno *et al.*, 2020) kemudian di giling dengan mesin *pulping* untuk memisahkan kulit buah (*pulp*) dengan biji (Sulistyaningtyas, 2017).

Setelah dilakukan sortasi hingga *pulping*, sampel dibawa menggunakan wadah tertutup rapat dan gelap dengan kondisi biji kopi kering. Biji kopi robusta mentah ditimbang seberat 1,5 kg dan dikeringkan hingga warna menjadi gelap dengan oven selama 60 menit pada suhu 200°C (Nurhidayat, 2023). Setelah itu, biji kopi robusta disortir dengan memilih biji kopi yang sesuai dengan kriteria yang tidak cacat. Kriteria cacat pada biji kopi yaitu biji kopi pecah, berlubang dan berwarna hitam (Aklimawati *et al.*, 2014).

Biji kopi kemudian dihaluskan dengan grinder menjadi serbuk untuk memperkecil ukuran partikel, lalu disaring dengan ayakan mesh 60. Jika terdapat serbuk kopi yang tidak lolos pada ayakan mesh 60, maka dihaluskan kembali hingga semua serbuk lolos pada ayakan mesh 60 (Sutrisno & Sholichah, 2020).

3. Uji Organoleptik Biji dan Serbuk Kopi Robusta

Evaluasi organoleptik pada biji dan serbuk kopi robusta mencakup penilaian terhadap warna, aroma, rasa pada biji kopi dan keseragaman pada serbuk kopi (Widyasari *et al.*, 2023) . Berdasarkan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2017), karakteristik serbuk kopi seperti "*bau lemah yang khas,*" "*praktis tidak berbau,*" "*tidak berbau,*" atau kualitas serupa dinilai berdasarkan pengamatan dilakukan sesudah 15 menit paparan sampel keudara. Penilaian kemurnian, aroma dari ekstrak tidak dianggap sebagai patokan, melainkan sekadar sebagai deskripsi saja (Kemenkes RI, 2017).

4. Penentuan Uji Alkaloid Secara Kualitatif

Uji alkaloid secara kualitatif dilakukan untuk memastikan adanya senyawa alkaloid dalam kopi robusta menggunakan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wulandari & Pandapotan (2022) pada pengujian pereaksi Mayer diketahui hasil positif mengandung alkaloid jika menghasilkan endapan berwarna putih, pereaksi kedua dengan pereaksi Wagner dinyatakan adanya alkaloid jika menghasilkan endapan berwarna putih dan pereaksi ketiga yaitu Dragendorff jika mengandung alkaloid akan menghasilkan endapan berwarna coklat. Keberadaan alkaloid dikonfirmasi dari tiga reagen menunjukkan hasil positif.

Uji alkaloid ini dilakukan dengan cara dimasukkan 2 gram serbuk kopi dalam beaker kemudian ditambahkan masing-masing 10 mL amonia dan kloroform, diikuti dengan penambahan 10 tetes H_2SO_4 . Campuran diaduk sampai homogen dan dibiarkan terpisah menjadi dua lapisan.

Lalu diambil bagian lapisan atas filtrat tersebut diambil masing-masing 1 ml didalam tiga tabung reaksi. Setiap tabung ditambahkan dengan masing-masing 1 mL reagen Wagner, Mayer, dan Dragendorff. Apabila filtrat mengandung alkaloid pada pereaksi Mayer akan membentuk endapan putih. Filtrat ditambahkan pereaksi Wagner membentuk endapan putih sedangkan filtrat bereaksi dengan pereaksi dragendorff membentuk putih (Surbakti *et al.*, 2018).

5. Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta

Metode yang digunakan untuk pengambilan filtrat ekstrak biji kopi dilakukan dengan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). 20 gram bubuk kopi dilarutkan dengan pelarut etanol 70% sejumlah 200 ml (1:10 b/v) menggunakan *Erlenmeyer* bertutup 250 mL pada suhu 30°C selama 15, 30 dan 45 menit (modifikasi dari Putro *et al.*, 2022). Sebelum dilakukan proses sonikasi, perlu dipastikan terlebih dahulu suhu sudah mencapai 30°C lalu masukkan sampel yang akan di ekstraksi menggunakan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Setelah proses sonikasi selesai, sampel disaring dengan kertas saring dan filtrat yang didapatkan diuapkan dengan *waterbath* pada suhu 60°C hingga mengental selama 1-2 hari (modifikasi dari Nurhidayat, 2023). Ekstrak yang sudah mengental disimpan di dalam botol kaca. Kemudian dihitung nilai persentase rendemen ekstrak dan dapat disimpan pada lemari pendingin untuk dianalisis selanjutnya (Hapsari *et al.*, 2021).

6. Pengukuran Kadar Air pada Serbuk dan Ekstrak Biji Kopi

Pengukuran kadar air dilaksanakan dengan memasukkan 5 gram serbuk kopi robusta dan ekstrak biji kopi sebesar 1 gram ke dalam *moisture analyzer* pada suhu 100°C kemudian ditunggu hingga warna pada layar alat menunjukkan warna hijau dan didapatkan nilai % *moisture content* (%). Kemudian catat kadar air pada serbuk dan ekstrak biji kopi pada masing-masing variasi waktu ekstraksi mengikuti prosedur tersebut (Nurhidayat, 2023).

7. Pemisahan Kafein di dalam sampel menggunakan Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi cair-cair pada sampel kopi dengan fase kloroform dan fase air menggunakan corong pisah. Pemisahan dua fase tersebut dengan cara dimasukkan 1 gram ekstrak kental ditimbang setiap variasi waktu ekstraksi, lalu ditambahkan dengan 150 mL aquadest panas, lalu gojog hingga homogen. Campuran dilakukan 2x replikasi (3x perlakuan) dengan menambahkan 25 mL kloroform setiap kali ekstraksi. Setelah cairan bening dan fase kloroform (fase bawah) diambil, kemudian ditambahkan dengan 1500 mg kalsium karbonat (CaCO_3) guna memisahkan senyawa kafein dengan senyawa basa lain dan disaring menggunakan kertas saring. Kemudian larutan tersebut diuapkan didalam *waterbath* dengan suhu 50°C sampai menjadi kental sampai semua kloroform menguap dengan durasi pengentalan 1-2 hari. Setelah proses selesai, ekstrak kental yang didapatkan akan disimpan pada lemari pendingin untuk dianalisis selanjutnya (Putro *et al.*, 2022)

8. Uji Kualitatif dengan *Scanning* Panjang Gelombang Maksimal

Uji *scanning* dilakukan untuk melihat panjang gelombang maksimal pada sampel kafein kopi robusta dalam rentang panjang gelombang 200-400 nm dengan blanko aquadest. Kontrol positif dibuat dengan kafein 20 ppm. Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan dengan cara diambil 5 mg sampel diletakkan dalam labu ukur berukuran 10 mL mencapai batas yang ditandai, lalu dilakukan pengenceran dengan cara diambil 1000 μL di ad 10 mL aquadest. Larutan kemudiandianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 200-400 nm dengan blanko *aquadest* (Modifikasi dari konsentrasi tertinggi Nurhidayat, 2023).

9. Penetapan Kadar Kafein dengan Spektrofotometri UV-VIS

Kuantifikasi kadar kafein dilakukan dengan metode Spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang maksimumnya, menggunakan standar kafein yang melibatkan langkah-langkah berikut:

a. Pembuatan Larutan Baku Kafein 200 ppm

Sebanyak 20 mg standar kafein ditimbang dan dilarutkan dengan aquadest dalam labu takar 100 ml lalu dihomogenkan hingga volume 100 mL (Nurhidayat, 2023).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Dilakukan penentuan panjang gelombang bertujuan untuk menemukan panjang gelombang yang menghasilkan serapan tertinggi, guna menentukan kurva kalibrasi dan mengukur kadar kafein dalam sampel. Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan dengan cara diambil 900 μ L larutan baku induk standar 200 ppm dan diletakkan dalam labu ukur berukuran 10 mL. Selanjutnya, dilarutkan dengan aquadest hingga mencapai tanda batas, menghasilkan larutan standar berkonsentrasi 18 ppm. Larutan tersebut kemudian dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 200-400 nm dengan blanko *aquadest* (Nurhidayat 2023).

c. Pembuatan Kurva Baku

Pembuatan kurva baku bertujuan untuk mendapatkan nilai absorbansi dan menggunakan *aquadest* sebagai blanko. Nilai absorbansi yang didapatkan digunakan untuk membuat persamaan regresi linear $y=bx+a$ dengan syarat nilai R mendekati 1 ($\geq 0,999$). Proses pembuatan kurva baku dilakukan dengan diambil dari larutan baku pada rentang seri konsentrasi sebesar 6, 9, 12, 15 dan 18 ppm menggunakan pelarut *aquadest*.

Langkah pertama dipipet 300, 450, 600, 750, dan 900 μ L dari induk 200 ppm kedalam labu ukur 10 mL, larutan ditambahkan dan dilarutkan dengan aquadest hingga mencapai tanda batas. Selanjutnya, setiap konsentrasi larutan dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum, dan kurva kalibrasi dibuat (Nurhidayat 2023).

d. Penetapan Kadar Kafein

Sampel ekstrak kafein dari berbagai variasi waktu ditimbang sejumlah 5 mg dan diencerkan dengan *aquadest* dalam labu takar 10 ml dan ditambahkan sampai tanda batas. Selanjutnya kadar kafein diukur menggunakan instrument Spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi yang diperoleh dimasukkan di dalam persamaan untuk mengukur kadar kafein dalam sampel. Jika absorbansi > 0,8 maka dilakukan pengenceran yang sesuai pada Lampiran 13. Dilakukan replikasi 2 kali (Modifikasi dari Nurhidayat 2023).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Analisis Data Total Kadar Air

Kadar air adalah parameter fisik zat yang menunjukkan kandungan air yang ada di dalam ekstrak tersebut. Prinsip pengukuran melibatkan pengeringan sampel menggunakan *moisture analyzer*.

2. Perhitungan Rendemen

a. Persentase Rendemen Biji Kopi robusta

$$\text{Persentase rendemen} = \frac{\text{berat biji kopi robusta}}{\text{berat buah kopi}} \times 100\%$$

b. Persentase Rendemen Ekstrak Etanol Biji Kopi robusta

$$\text{Persentase rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat serbuk kopi}} \times 100\%$$

c. Persentase Rendemen Ekstrak Kafein

$$\text{Persentase rendemen} = \frac{\text{berat kafein}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\%$$

3. Analisis Data Kadar Kafein

a. Kadar kafein (ppm)

Perhitungan kadar kafein (ppm) didapatkan dari rumus :

$$y = bx+a$$

Keterangan :

y = Absorbansi Sampel

b = *Slope*/Kemiringan

x = Kadar Sampel (ppm)

a = intersep (Ayuni, 2022)

b. Kadar Kafein Sesungguhnya (mgCE/mg)

Kadar kafein dalam sampel dapat dihitung menurut modifikasi penelitian Suwiyarsa *et al.*, (2018) sebagai berikut :

$$\text{Kadar kafein sesungguhnya (C)} = \frac{M.V}{m}$$

Keterangan :

C = Kadar sesungguhnya

M = Konsentrasi (ppm)

V = Volume larutan sampel (mL)

m = Berat sampel (mg)

c. Perhitungan Rata-rata

Nilai rata-rata kadar kafein sesungguhnya dapat dihitung dengan

$$x_1 + x_2 + x_3 : n$$

Keterangan :

x = jumlah nilai data = banyaknya data

d. Perhitungan SD

$$SD = \frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(N-1)}$$

Keterangan :

x = nilai dari masing-masing pengukuran

\bar{x} = rata-rata dari pengukuran

N = frekuensi penetapan

N-1 = derajat kebebasan

e. Penentuan Presisi

Penentuan presisi adalah ukuran keterulangan metode analisis yang ditentukan dengan menghitung keterulangan kadar kafein biji kopi robusta dari koefisiensi variasi (CV) yang mencakup nilai rata-rata (x) dan Standar deviasi (SD). Perhitungan CV sebagai berikut :

$$CV = SD/x \times 100\%$$

Keterangan :

SD = Standar deviasi

x = Nilai rata-rata

(Ayuni, 2022)

f. Perhitungan *Limit Error*

Batas kesalahan atau *limit error* (LE) dapat dihitung dengan

$$LE = \frac{t \text{ tabel} \times SD}{\sqrt{N}}$$

Keterangan :

SD = Standar Derivasi

N = frekuensi penetapan

T tabel = suatu harga yang besarnya tergantung pada derajat kebebasan dan taraf kepercayaan (Gandjar & Rohman, 2008).

g. Penentuan Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan seri konsentrasi pada larutan baku kafein dengan seri konsentrasi meliputi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm, lalu dianalisis pada panjang gelombang maksimal dengan metode Spektrofotometri UV-Vis. Linearitas yaitu nilai r yang harus mendekati 1 ($r \geq 0,999$) menggunakan persamaan kurva standar (Ayuni, 2022).

4. Analisis Data Statistika

Data variabel terikat berupa kadar kafein yang dipengaruhi oleh variabel bebas dari perbedaan waktu ekstraksi diolah secara dianalisis dengan metode statistik menggunakan perangkat lunak SPSS dengan menerapkan metode uji *One-Way ANOVA* karena dalam uji *One-Way ANOVA* digunakan dalam situasi yang hanya ada satu faktor yang mempengaruhi variabel terikat. Pada penelitian ini menggunakan satu faktor (variabel bebas) meliputi variasi waktu ekstraksi dengan variabel terikat berupa kadar kafein.

a. Uji Normalitas

Penilaian normalitas akan menggunakan metode *Shapiro-Wilk* (untuk sampel < 50) untuk menentukan apakah variabel acak mengikuti distribusi normal. Jika hasil uji normalitas menghasilkan hasil yang signifikan ($p < 0,05$), menunjukkan distribusi data non-normal maka dilakukan analisis non-parametrik. Sebaliknya, jika nilai p lebih besar dari 0,05, menunjukkan distribusi data normal, maka dilanjutkan pada analisis parametrik (Ghozali, 2011).

s

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas menggunakan uji *Levene's* bertujuan untuk memverifikasi bahwa kelompok data berasal dari sampel yang sama. Kriteria pengujiannya adalah apabila nilai signifikansi (p) lebih besar dari $\alpha=0,05$, maka hipotesis nol diterima (Ghozali, 2011).

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA