

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Determinasi Tanaman

Tanaman Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) yang diperoleh dari Perkebunan Liwa yang ada di daerah Lampung Barat telah dilakukan determinasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Ahmad Dahlan pada tanggal 20 Mei 2024 dengan nomor pendaftaran 261/Lab.BIO/B/V/2024. Kriteria dari tanaman kopi robusta yang dipetik untuk dilakukan determinasi yaitu buah kopi yang berwarna merah, batang, daun dan biji kopi robusta. Berdasarkan hasil determinasi, tanaman yang digunakan adalah *Coffea canephora* var. *robusta* (L.Linden) A.Chev sinonim dari *Coffea canephora* Pierre ex. A Froehner dapat dilihat pada Lampiran 3.

2. Persiapan Sampel

Buah kopi robusta dipetik sebanyak 3 kg lalu berat biji kopi mentah didapatkan sebesar kurang lebih 58,152 g. Kemudian biji kopi yang dipanggang didapatkan sebesar 50,732 g.

3. Ekstraksi Biji Kopi Robusta

Pada proses pembuatan ekstrak biji kopi robusta dengan variasi waktu 10, 20 dan 30 menit sebanyak kurang lebih 5 g serbuk biji kopi menggunakan pelarut 500 mL yang menghasilkan ekstrak kental dengan % rendemen yang ditampilkan pada Tabel 3. % rendemen ketiga variasi waktu memenuhi syarat karena >12,5% (BSN, 2008).

Tabel 3. Hasil Ekstraksi Biji Kopi Robusta

Variasi waktu	Berat simplisia (g)	Ekstrak kental + wadah (g)	Berat wadah (g)	Berat ekstrak (g)	% Rendemen
10	5 g	12,8287	11,6263	5,0010	24,043%
20	5 g	18,2738	16,4873	5,0029	35,709%
30	5 g	12,5067	11,4985	5,0024	20,154%

4. Uji Organoleptik pada Ekstrak Biji Kopi Robusta

Ekstrak biji kopi robusta diamati secara organoleptis berdasarkan tekstur, warna dan aroma. Berdasarkan hasil uji organoleptik, ekstrak biji kopi robusta dapat dilihat pada Tabel 4. Hasil uji organoleptis menunjukkan tekstur kental, warna coklat dan aroma yang khas pada semua sampel ekstrak biji kopi robusta.

Tabel 4. Uji Organoleptik pada Ekstrak Biji Kopi

Variasi Waktu	Tekstur	Warna	Aroma
10	Kental	Coklat	Khas
20	Kental	Coklat	Khas
30	Kental	Coklat	Khas

5. Hasil Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia pada penelitian ini untuk mengidentifikasi metabolit sekunder di dalam sampel ekstrak biji kopi robusta. Uji skrining fitokimia pada ekstrak biji kopi terdiri dari uji alkaloid, saponin, fenolik, tanin dan flavonoid. Hasil pengujian fitokimia ekstrak biji kopi robusta dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Skrining Fitokimia pada Ekstrak Biji Kopi Robusta

Senyawa metabolit sekunder	Pengujian	Ekstrak Biji Kopi Robusta			Teori (Tiwari <i>et al.</i> , 2011)
		Menit ke – 10	Menit ke – 20	Menit ke – 30	
Alkaloid	Mayer	+	+	+	Endapan kuning kecoklatan
	Wagner	+	+	+	Endapan kuning kecoklatan
	Dragendroff	+	+	+	Endapan kuning kecoklatan
Saponin	Aquadest panas	-	-	-	Tidak Berbuih
Fenolik	FeCl ₃	+	+	+	Hitam kebiruan
Tanin	Gelatin 1% dalam NaCl jenuh	+	+	-	Endapan coklat
Flavonoid	Etanol p.a., serbuk Mg, dan HCl pekat.	+	+	+	Warna kuning

Keterangan:

(+) = positif mengandung senyawa

(-) = negatif mengandung senyawa

6. Penentuan Nilai Aktivitas Antioksidan terhadap Peredaman DPPH

Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dari berbagai variasi waktu ekstraksi ekstrak biji kopi robusta menghasilkan nilai IC_{50} dalam kategori sangat kuat. Standar yang digunakan adalah kuersetin yang juga menghasilkan nilai IC_{50} dalam kategori sangat kuat. Data nilai IC_{50} dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Penetapan Radikal Bebas DPPH

Sampel	IC_{50} (ppm)	Kategori (Nasution <i>et al.</i> , 2015)
Kuersetin	1,423	Sangat kuat
Ekstrak biji kopi menit ke – 10	29,970	Sangat kuat
Ekstrak biji kopi menit ke – 20	30,506	Sangat kuat
Ekstrak biji kopi menit ke – 30	23,311	Sangat kuat

7. Analisis Data

Analisis hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dengan SPSS. Hal ini diperlukan karena terdapat nilai IC_{50} dari larutan standar kuersetin, ekstrak biji kopi robusta pada variasi waktu menit ke – 10, 20 dan 30. Analisis statistik diamati dengan uji normalitas dan uji homogenitas. Hasil analisis nilai IC_{50} kuersetin, ekstrak biji kopi robusta pada variasi waktu menit ke – 10, 20 dan 30 menunjukkan bahwa data sampel terdistribusi normal dan homogen ($>0,05$). Setelah homogen dan terdistribusi normal, dilakukan uji *One Way ANOVA* dan uji *Post Hoc Test*. Hasilnya menunjukkan peredaman yang signifikan ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dari nilai IC_{50} kuersetin, ekstrak biji kopi robusta pada variasi waktu menit ke – 10, 20 dan 30. Hasil analisis statistik dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Analisis Peredaman Radikal Bebas DPPH

No.	Nilai IC ₅₀	Normalitas (<i>Shapiro Wilk</i>)	Homogenitas (<i>Levene Statistic</i>)	One Way ANOVA	Post Hoc
1	Kuersetin	0,268	0,134		0,000
2	Ekstrak biji kopi robusta menit ke – 10	0,066	0,423	<0,000	0,000
3	Ekstrak biji kopi robusta menit ke – 20	0,917	0,454		0,000
4	Ekstrak biji kopi robusta menit ke – 30	0,821	0,145		0,000
					0,823
					0,021
					0,015
					0,000
					0,021

B. PEMBAHASAN

Penelitian ini diawali persiapan sampel pada buah kopi robusta di Perkebunan Liwa, Lampung Barat. Buah kopi dipanen dengan usia 8-11 bulan yang berwarna merah dan keadaan segar yang dipanen pada jam 07.00-10.00 WIB. Pemetikan buah kopi pada pagi hari agar mendapatkan berat buah kopi yang optimal (Fuadi *et al.*, 2018). Buah kopi Robusta Lampung Barat dikeringkan menggunakan sinar matahari selama 3 hari, agar mudah dikupas dan dipisahkan antara biji dengan buah kopi (Dhamayanthie, 2022). Biji kopi tersebut dilakukan determinasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Ahmad Dahlan untuk mengidentifikasi jenis biji kopi yang dikategorikan sebagai *Coffea canephora* atau jenis robusta. Biji kopi robusta dipanggang menggunakan *airfryer* pada suhu 190°C selama 30 menit hingga mendapatkan warna biji kopi yang *light*. Tingkat panggang digolongkan menjadi *light*, *medium* dan *dark*. Kategori panggang *light* dipilih karena menghasilkan nilai IC₅₀ paling baik dibandingkan panggang *medium* atau *dark*, walaupun % rendemen paling rendah dibandingkan dengan kategori lain (Adawiyah *et al.*, 2023).

Metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) dipilih pada penelitian ini. Prinsipnya adalah terjadi efek kavitasi pada dinding sel dan sel tanaman yang disebabkan adanya gelombang ultrasonik yang mempermudah penetrasi pelarut

pada sel sehingga meningkatkan nilai rendemen (Aldino *et al.*, 2023). Kelebihan metode UAE adalah membutuhkan pelarut yang lebih sedikit, waktu ekstraksi yang cukup singkat, dan mengurangi kerusakan akibat pemanasan (Dey & Rathod, 2013). Penelitian ini menggunakan suhu ekstraksi 40°C karena tidak merusak sampel namun malah meningkatkan kelarutan pada proses ekstraksi (Andriani *et al.*, 2019). Pelarut ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, karena merupakan pelarut dengan polaritas yang tinggi sehingga dapat mengekstraksi atau memisahkan berbagai macam senyawa polar dari yang polar hingga semi polar (Surya & Luhurningtyas, 2021). Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan menjadi ekstrak kental dengan cara menguapkan pelarut sampai ekstrak menjadi kental dengan menggunakan *waterbath*. Proses *waterbath* yang dilakukan menggunakan suhu 50°C dikarenakan untuk meningkatkan proses penguapan pelarut dan diharapkan tidak merusak senyawa antioksidan pada ekstrak (Sayakti *et al.*, 2022).

Berdasarkan hasil ekstraksi biji kopi robusta memiliki nilai rendemen sebesar 24,043% pada variasi waktu ke-10 menit, 35,709% pada variasi waktu ke-20 menit dan 20,154% pada variasi waktu ke-30 menit. Ketiga rendemen dari variasi waktu tersebut memenuhi syarat dikarenakan % rendemen lebih dari >12,5% (BSN, 2008). Menurut (Dewatisari, *et al.*, 2017) bahwa nilai % rendemen yang tinggi menunjukkan banyaknya komponen bioaktif yang terkandung di dalamnya, sehingga apabila jumlah rendemen semakin tinggi maka jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam sampel juga semakin banyak. Sebagaimana yang telah dilaporkan Harbone, (1987) bahwa tingginya senyawa aktif yang terdapat pada suatu sampel ditunjukkan dengan tingginya jumlah rendemen yang diperoleh. % rendemen yang paling tinggi didapatkan pada variasi waktu ekstraksi menit ke-20 dibandingkan dengan variasi waktu lainnya sehingga dapat disimpulkan waktu ekstraksi menit ke-20 adalah waktu ekstraksi yang optimal. Hasil yang diperoleh sesuai dengan penelitian Andriani *et al.*, (2019), yang menunjukkan bahwa terdapat penurunan nilai % rendemen seiring dengan meningkatnya waktu ekstraksi. Penurunan ini disebabkan oleh kejenuhan yang telah terjadi dalam proses ekstraksi.

Hasil analisis senyawa metabolit sekunder pada ekstrak biji kopi robusta meliputi alkaloid, saponin, fenolik, tanin, dan flavonoid. Alkaloid adalah salah satu senyawa metabolisme sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan. Senyawa ini banyak ditemukan pada organ tumbuhan salah satunya pada biji. Pada ketiga sampel direaksikan dengan reagen Wagner, menghasilkan endapan berwarna coklat. Pada reagen Mayer, ketiga sampel membentuk endapan berwarna coklat. Pada reagen Dragendorff, ketiga sampel menunjukkan terbentuknya endapan coklat kekuningan dapat tercantum pada Tabel 5. Hasil uji alkaloid memiliki kesamaan dengan penelitian dari Khafid *et al.*, (2023).

Pada uji pereaksi Wagner, reaksi terjadi akibat pasangan elektron bebas pada nitrogen yang menyusun senyawa alkaloid dengan reagen Wagner berupa iodium dan kalium iodida sehingga terbentuknya endapan kuning coklat dari kalium-alkaloid menurut Putriantari & Santosa (2014). Pada uji pereaksi Mayer, reaksi atom nitrogen yang terdapat pada alkaloid dengan ion logam K^+ dalam kalium tetraiodomerkurat (II) yang dapat membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam menghasilkan endapan dari kalium-alkaloid berdasarkan Ergina & Indarini (2014). Pada uji pereaksi Dragendorff, salah satu komponen penyusun reagen Dragendorff yaitu bismut nitrat yang mengandung garam bismuth dengan kalium iodida membentuk endapan hitam Bismut (III) iodide, lalu terlarut ke dalam kalium iodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat. Pada uji alkaloid dengan reagen Dragendorff, nitrogen dari alkaloid bereaksi dengan kalium tetraiodobismutat membentuk kalium-alkaloid. Oleh karena itu, ketiga ekstrak biji kopi direaksikan dengan pereaksi Wagner, Mayer dan Dragendorff dapat diketahui positif mengandung alkaloid.

Saponin adalah suatu glikosida yang sangat banyak ditemukan pada bagian tumbuhan, dimana struktur kimianya terdiri atas glikon dan aglikon. Bagian aglikon merupakan sapogenin sedangkan bagian glikon terdiri dari glukosa, fruktosa, dan jenis gula lainnya (Khafid *et al.*, 2023). Hasil uji saponin pada ketiga sampel variasi waktu tidak menghasilkan busa stabil selama 10 menit. Penelitian Utami *et al.*, (2019) juga menunjukkan biji kopi robusta tidak mengandung adanya saponin.

Senyawa fenolik merupakan hasil metabolit sekunder dari tanaman dengan kombinasi antara mono dan polisakarida yang berikatan dengan satu atau lebih gugus fenolik, atau sebagai turunan ester atau metil ester (Mahardani & Yuanita, 2021). Hasil uji fenolik dari ketiga sampel variasi waktu menunjukkan adanya warna hitam kebiruan. Tanin merupakan produk metabolit sekunder dari senyawa golongan fenolik yang sulit dikristalkan dan dipisahkan serta memiliki kandungan protein yang sulit untuk diendapkan. Tanin juga terdiri dari senyawa polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan (Khafid *et al.*, 2023). Hasil uji senyawa tanin dari ketiga sampel variasi waktu menunjukkan adanya endapan putih, sehingga dapat diidentifikasi adanya fenolik dan tanin di dalam ekstrak biji kopi robusta. Pada penelitian Permana *et al.*, (2023) juga menemukan adanya fenolik dan tanin pada kopi robusta dengan uji kualitatif.

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder dari kelompok senyawa fenol yang ditemukan di alam. Flavonoid berperan dalam memberikan warna dan rasa, khususnya pada biji (Mierziak, *et al.*, 2014). Senyawa flavonoid bersifat mudah teroksidasi pada suhu tinggi dan tidak tahan panas (Rompas, 2012). Hasil uji ketiga sampel variasi waktu menunjukkan adanya warna kuning sehingga ketiga ekstrak biji kopi mengandung flavonoid. Penelitian lain menunjukkan adanya flavonoid pada biji kopi robusta (Hudáková *et al.*, 2016). Jenis flavonoid yang ditemukan pada biji kopi antara lain rutin, myricetin, fisetin dan jenis flavonoid lain (Gligor, *et al.*, 2023).

Berdasarkan hasil skrining fitokimia, ekstrak kopi robusta mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, fenolik, flavonoid dan tanin. Kandungan tersebut berpotensi sebagai antioksidan pada ekstrak biji kopi yang didominasi golongan fenolik. Salah satu contoh golongan tersebut yang berperan sebagai antioksidan adalah asam klorogenat. Asam klorogenat merupakan senyawa yang memiliki gugus OH yang dapat menangkal radikal bebas pada Gambar 4 (Pathak *et al.*, 2013). Untuk menentukan seberapa besar aktivitas antioksidan pada ekstrak biji kopi robusta, maka dilakukan pengujian dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl). Metode ini memiliki

keuntungan berupa metode yang sederhana, cepat dan selektif terhadap senyawa antioksidan dengan instrument Spektrofotometer UV –Vis (Bawole et al., 2021).

Penentuan panjang gelombang maksimal untuk mengetahui nilai absorbansi maksimal (range 0,2 – 0,8). Penentuan panjang gelombang maksimal dapat dilihat pada Lampiran 8. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan (Fauzi et al., 2021). Penentuan *operating time* dilakukan menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis dengan mengamati absorbansi pada standar kuersetin 2 ppm dengan DPPH pada waktu yang tertentu. Penentuan OT bertujuan untuk mengetahui waktu stabil antara senyawa DPPH bereaksi dengan senyawa antioksidan (standar kuersetin) pada menit ke-0 hingga menit ke-60. Hasil penentuan *operating time* dapat dilihat pada Lampiran 8. Pada penelitian Ruddat Iaina Rahmah *et al.*, (2023) mendapatkan hasil OT yang stabil antara menit ke-21-ke41, sedangkan pada penelitian ini didapatkan hasil OT yang stabil pada menit ke-31.

Pengujian aktivitas antioksidan antara standar kuersetin dan ekstrak biji kopi robusta variasi waktu ekstraksi menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH. Kuersetin merupakan standar pembanding yang digolongkan menjadi salah satu senyawa flavonoid sebagai antioksidan alami. Selain mudah didapat, standar kuersetin sering digunakan sebagai larutan pembanding senyawa antioksidan yang telah direkomendasikan oleh BPOM. Oleh karena itu kuersetin dipilih sebagai kontrol positif atau larutan pembanding (Lim, 2012).

Pengujian aktivitas antioksidan pada standar kuersetin dan ekstrak biji kopi robusta dilakukan sebanyak 3 kali secara berurutan pada setiap konsentrasi untuk mendapatkan data presisi. Berdasarkan dari nilai yang diperoleh, kuersetin dan ketiga ekstrak variasi waktu termasuk di dalam kategori antioksidan yang sangat kuat. IC_{50} merupakan suatu parameter yang berkaitan dengan konsentrasi antioksidan yang dapat menangkap radikal DPPH sebesar 50% (Molyneux, 2004). Semakin kecil nilai IC_{50} yang diperoleh pada sampel maka semakin tinggi efektivitas sampel sebagai antioksidan. Berdasarkan hasil percobaan ekstrak biji kopi robusta pada variasi waktu menit ke – 10, 20 dan 30, nilai IC_{50} paling baik adalah ada pada variasi waktu menit ke – 30 sebesar $23,11 \pm 4,638$ ppm kemudian ekstrak biji kopi robusta pada variasi waktu menit ke – 10 sebesar $29,97 \pm 2,737$

ppm dan yang terakhir ekstrak biji kopi robusta variasi waktu pada menit ke – 20 sebesar $30,50 \pm 1,745$ ppm. Berdasarkan hasil analisis statistic dengan *SPSS Software*, telah dilakukan uji *Oneway ANOVA* dan uji *Post Hoc Test* dengan menunjukkan bahwa nilai IC_{50} pada ekstrak biji kopi robusta dengan variasi waktu 10, 20, 30 menit dan kuersetin berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) yaitu 0,000 sehingga diasumsikan bahwa aktivitas antioksidan pada ekstrak biji kopi robusta dengan variasi waktu 10, 20, 30 dan kuersetin menggunakan metode peredaman DPPH terdapat perbedaan secara signifikan ($p < 0,005$).

Pengaruh variasi waktu ekstraksi pada ekstrak biji kopi robusta dapat mempengaruhi nilai rendemen dan nilai IC_{50} . Hasil penelitian ini diketahui %rendemen ekstrak biji kopi robusta pada variasi waktu 10, 20 dan 30 berturut-turut sebesar 24,043%, 35,709% dan 20,154%, sedangkan nilai IC_{50} ekstrak biji kopi robusta berturut-turut sebesar $29,970 \pm 2,737$ ppm; $30,506 \pm 1,745$ ppm dan $23,311 \pm 4,638$ ppm. Hasil korelasi antara %rendemen dengan IC_{50} dari uji Pearson menghasilkan nilai r sebesar 0,740 menunjukkan kategori korelasi kuat namun tidak berbeda signifikan karena nilai p lebih dari 0,05 pada Lampiran 16. Persentase rendemen dan nilai antioksidan dikaitkan banyaknya kandungan bioaktif pada suatu ekstrak (Senduk *et al.*, 2020). Namun penelitian lain menyatakan rendemen dipengaruhi oleh kadar air dimana mempengaruhi komponen senyawa aktif dari ekstrak (Asyikaputri, *et al.*, 2023). Pada penelitian ini % rendemen tertinggi bukan terdapat pada waktu ekstraksi maksimal yaitu pada menit ke 30, melainkan pada menit ke-20, hal ini kemungkinan terjadi karena pengaruh kadar air yang tinggi yang menyebabkan jumlah senyawa metabolit sekunder yang terkandung lebih sedikit. Oleh karena itu, dari penelitian ini menunjukkan semakin tinggi nilai rendemen pada ekstrak biji kopi maka semakin rendah nilai IC_{50} nya (Jabnabillah & Margina, 2022).

Pada penelitian ini nilai antara standar kuersetin dan ekstrak sama-sama menghasilkan nilai IC_{50} dalam kategori sangat kuat, akan tetapi nilai IC_{50} kuersetin lebih kecil dibandingkan dengan nilai IC_{50} pada ekstrak biji kopi robusta dengan variasi waktu 10, 20 dan 30 menit, yang artinya aktivitas antioksidan ekstrak biji kopi robusta dengan variasi waktu 10, 20 dan 30 menit lebih rendah dibandingkan

dengan aktivitas antioksidan pada kuersetin. Aktivitas antioksidan yang lebih rendah dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti, mudah rusaknya sifat yang terpapar oleh oksigen, proses panen simplisia, suhu saat ekstraksi dan pemekatan ekstrak, metode ekstraksi yang kurang cukup untuk menarik suatu senyawa yang memiliki sifat antioksidan pada simplisia, dan lamanya penyimpanan ekstrak (Molyneux, 2004). Perbedaan nilai IC_{50} pada kuersetin dan ekstrak biji kopi robusta dengan variasi waktu 10, 20 dan 30 menit disebabkan karena kuersetin merupakan standar yang memiliki lima gugus hidroksil. Reaksi kuersetin secara langsung dapat mendonorkan satu elektronnya sehingga dapat menstabilkan senyawa radikal.

PERPUSTAKAAN
JENDERAL ACHMAD YANI
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA