

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Penelitian yang akan dilakukan bersifat eksperimental di Laboratorium Kimia dengan menggunakan ekstrak etanol 96% daun kopi robusta (*Coffea canephora*) asal Lampung Barat yang akan dilakukan identifikasi senyawa fitokimia dan uji aktivitas antioksidan.

#### **B. Subjek Penelitian**

Subjek pada penelitian ini ialah ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) asal Lampung Barat yang sudah diekstraksi dengan metode maserasi.

#### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Tangkarakang untuk melakukan identifikasi tanaman, ekstraksi, identifikasi senyawa fitokimia, serta uji aktivitas antioksidan. Penelitian ini dilaksanakan pada Januari - Mei 2024.

#### **D. Pengumpulan Data**

##### **1. Cara Pengumpulan Data**

Pengumpulan data dilakukan dengan mengumpulkan sampel daun kopi robusta (*Coffea canephora*) segar dan tua yang didapat dari desa Kenali, Kecamatan Belalau, Kabupeten Lampung Barat. Sampel akan melewati beberapa tahapan sampai menjadi bubuk simplisia kering. Setelah itu, serbuk simplisia diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Filtrat hasil ekstraksi kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dan dikentalkan menggunakan *waterbath*. Setelah diperoleh ekstrak kental, dilakukan identifikasi organoleptis, kemudian dilakukan identifikasi kandungan senyawa fitokimia untuk melihat kandungan alkaloid, flavonoid,

tanin, saponin, steroid dan triterpenoid. Setelah itu, ekstrak akan dibuat menjadi larutan sampel yang dilarutkan menggunakan etanol *pro analysis* untuk kemudian diuji aktivitas antioksidannya.

## 2. Alat dan Bahan

### a. Alat

Dalam penelitian ini peralatan yang diperlukan ialah blender XS-685, *hot air sterilizer oven* YCO-010, neraca analitik *bel engineering*, ayakan *mesh* no. 40, *rotary evaporator* DLAB RE100-Pro, *waterbath* CRWB-30, kompor listrik *maspion*, *vortex mixer* VM-300P *incubator - stream series*, *spektrofotometer Uv Vis – 1900i with Multi-cell Sample Compartmen*, *kuvet*, batang pengaduk, spatula, aluminium foil, beaker glass (100 mL, 250 mL, 500 mL, 100 mL), gelas ukur (10 mL dan 50 mL), erlenmeyer (250 mL), rak tabung reaksi, tabung reaksi, bulb, corong gelas, kertas saring, cawan porselen (100 mL), plat tetes, pipet ukur (1,0 mL, 2,0 mL, 3,0 mL, 4,0 mL dan 5,0 mL, 20,0 mL), pipet tetes kecil, labu ukur (10 mL, 25 mL, 50 mL, dan 100 mL), botol kaca gelap.

### b. Bahan

Dalam penelitian ini bahan yang diperlukan adalah daun kopi robusta (*Coffea canephora*), etanol 96%, magnesium stearat (Mg) serbuk, amil alkohol (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O), asam klorida (HCl) pekat, asam klorida (HCl) 2N, pereaksi dragendrof, pereaksi mayer, pereaksi bouchardat, aquadest, n-heksan, asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pekat, pereaksi besi (III) klorida (FeCl<sub>3</sub>), asam asetat (CH<sub>3</sub>COOH), kuersetin, kristal DPPH, etanol *pro analysis*.

## 3. Prosedur Kerja Penelitian

### a. Identifikasi Tanaman

Daun kopi robusta (*Coffea chanepora*) dikumpulkan dari desa Kenali, Kecamatan Belalau, Kabupaten Lampung Barat. Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Botani Unila, untuk mengetahui kebenaran dari sample ekstrak daun kopi robusta (*Coffea chanepora*).

### b. Pembuatan Simplisia Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Langkah pembuatan simplisia daun kopi robusta adalah sebagai berikut:

- 1) Diambil daun kopi robusta (*Coffea canephora*) segar dan sudah tua.

- 2) Kemudian pisahkan daun kopi robusta yang terkumpul dari kotoran yang menempel
- 3) Selanjutnya cuci bersih pada air mengalir
- 4) Daun kopi robusta yang telah dicuci bersih selanjutnya dilakukan perajangan.
- 5) Setelah dirajang, daun kopi robusta dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dengan menggunakan kombinasi sinar matahari dan oven pada suhu 50°C (Winangsih dan Parman, 2013:21).
- 6) Setelah kering, disortir kembali simplisia dari kotoran yang tersisa.
- 7) Selanjutnya haluskan simplisia menggunakan blender.
- 8) Terakhir serbuk simplisia diayak menggunakan ayakan *mesh* no. 40 untuk mendapatkan bubuk simplisia yang halus.

c. Ekstraksi Simplisia Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Marjoni (2016:41-42) menyatakan bahwa prosedur berikut dapat digunakan dalam ekstraksi serbuk simplisia menggunakan metode maserasi :

- 1) Ditimbang 500 gram serbuk simplisia daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan neraca analitik
- 2) Dimasukkan serbuk simplisia yang telah ditimbang ke wadah gelap atau wadah tertutup
- 3) Direndam serbuk simplisia dengan 3.500 ml pelarut etanol 96%
- 4) Setelah itu, tutup wadah dengan aluminium foil dan biarkan di tempat bebas cahaya selama tiga hari sambil diaduk setiap 5 jam. Lakukan selama  $\pm$  5 menit tiap satu kali pengadukan
- 5) Setelah waktu perendaman selesai, disaring maserat maserasi dan pisahkan dari ampasnya
- 6) Selanjutnya ampas sisa maserasi digunakan untuk remaserasi, direndam menggunakan 1.500 ml pelarut etanol 96% selama 2 hari, sambil diaduk tiap 5 jam sekali. Lakukan selama  $\pm$  5 menit tiap satu kali pengadukan
- 7) Disaring kembali maserat hasil remaserasi dan dipisahkan dari ampasnya, lalu satukan dengan filtrat hasil maserasi
- 8) Kemudian filtrat dipekatkan dengan cara menguapkan di suhu 50°C dalam *rotary evaporator*
- 9) Selanjutnya dilakukan pengentalan menggunakan *waterbath* di suhu 50°C.

- 10) Ekstrak yang diperoleh dimasukkan kedalam wadah ekstrak kemudian ditimbang
- 11) Setelah itu rendemen ekstrak dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\%$$

d. Identifikasi Organoleptis

Dengan pengenalan menggunakan panca indera, uji organoleptik ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dilakukan untuk mengidentifikasi warna (hijau tua, coklat, kuning, dan sebagainya), bentuk (padat, kental, cair, dan sebagainya), dan bau (aromatik, tidak berbau, dan sebagainya).

e. Identifikasi Senyawa Fitokimia

1) Uji Flavonoid

Marjoni (2016:9) menyatakan bahwa untuk mendeteksi kandungan flavonoid bisa dilakukan dengan prosedur berikut :

- a) Ekstrak daun kopi robusta ditimbang sejumlah 10 gram di neraca analitik, lalu ditambahkan air 100 mL
- b) Selanjutnya dididihkan selama  $\pm 5$  menit campuran tersebut menggunakan kompor listrik, kemudian filtrat disaring menggunakan kertas saring dalam keadaan panas
- c) Setelah itu, sejumlah 5 mL filtrat dipipet menggunakan pipet ukur, tambahkan bubuk Mg stearat sebanyak 0,1 gram, HCl pekat 1 mL dan amil alkohol 2 mL, lalu kocok homogen dan diamkan hingga terbentuk lapisan yang memisah
- d) Jika lapisan amil alkohol terbentuk warna merah, kuning, atau jingga maka sampel positif mengandung senyawa flavonoid

2) Uji Saponin

Marjoni (2016:12) menyatakan bahwa untuk mendeteksi kandungan saponin bisa dilakukan dengan prosedur berikut:

- a) Diambil ekstrak daun kopi robusta sejumlah 0,5 gram ke tabung reaksi, tambahkan air suling panas 10 mL

- b) Diamkan larutan hingga dingin, kemudian selama 10 detik larutan dikocok kuat-kuat
- c) Jika dalam waktu 10 menit terbentuk busa atau buih setinggi 1-10 cm, tambahkan larutan HCl 2N 1 tetes
- d) Adanya kandungan saponin ditandai dengan buih yang tidak hilang dengan tinggi tidak kurang dari 1 cm

### 3) Uji Alkaloid

Marjoni (2016:8), menyatakan bahwa untuk mendeteksi kandungan alkaloid bisa dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- a) Diambil ekstrak daun kopi robusta sejumlah 0,5 gram
- b) Ditambahkan air suling 9 mL dan HCl 2N 1 mL, lalu selama 2 menit panaskan larutan di penangas air
- c) Diamkan hingga dingin, lalu saring menggunakan kertas saring. Filtrat hasil penyaringan akan digunakan untuk prosedur berikut:
  - Filtrat diambil sejumlah 3 tetes, ditambahkan pereaksi mayer 2 tetes. Akan menghasilkan endapan putih atau kuning
  - Filtrat diambil sejumlah 3 tetes, ditambahkan pereaksi bouchardat 2 tetes. Akan menghasilkan endapan coklat.
  - Filtrat diambil sejumlah 3 tetes, ditambahkan pereaksi dragendrof 2 tetes. Akan menghasilkan endapan merah bata
- d) Sampel positif mengandung alkaloid apabila tidak kurang dari 2 atau 3 pereaksi yang terbentuk endapan

### 4) Uji Fenolik

Marjoni (2016:10), menyatakan bahwa untuk mendeteksi kandungan tanin bisa dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- a) Ditimbang ekstrak daun kopi robusta sejumlah 0,5 gram, kemudian diekstrak menggunakan aquades 10 mL
- b) Disaring hasil ekstraksi menggunakan kertas saring, selanjutnya diencerkan filtrat menggunakan aquades hingga tidak lagi berwarna
- c) Diambil filtrat yang telah diencerkan sejumlah 2 mL, kemudian tambahkan  $\text{FeCl}_3$  1-2 tetes

d) Terbentuknya warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid

5) Uji Steroid/Triterpenoid

Marjoni (2016:12), menyatakan bahwa untuk mendeteksi kandungan steroida/triterpenoid bisa dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

e) Ekstrak daun kopi robusta ditimbang sejumlah 1 gram di neraca analitik, kemudian dimaserasi selama 2 jam menggunakan 20 mL n-heksan, lalu disaring menggunakan kertas saring.

a) Setelah itu, dalam cawan penguap filtrat diuapkan

b) Ditambahkan  $H_2SO_4$  1 tetes dan asam asetat anhidrat 2 tetes pada sisa penguapan filtrat

c) Apabila terbentuk warna hijau atau biru menunjukkan adanya senyawa steroid, sedangkan terbentuknya warna ungu atau merah menunjukkan adanya senyawa triterpenoid

f. Uji Aktivitas Antioksidan

Pindan et al. (2021) serta Fauzi dan Santoso (2021) menyatakan bahwa prosedur berikut dapat digunakan untuk memverifikasi antioksidan menggunakan metode DPPH:

1) Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

a) Ditimbang kristal DPPH sejumlah 1,971 mg di neraca analitik

b) Dilarutkan kristal DPPH dengan etanol *pro analysis* 50 mL menggunakan labu ukur 50 mL

c) Dengan menggunakan *vortex* campur larutan hingga homogen, lalu disimpan di botol gelap dan dibungkus dengan *aluminium foil*

2) Pembuatan Larutan Sampel

a) Ditimbang ekstrak etanol daun kopi robusta sejumlah 40 mg di neraca analitik

b) Dilarutkan ekstrak dengan pelarut etanol *pro analysis* sebanyak 20 mL menggunakan labu ukur 20 mL

c) Dengan menggunakan *vortex* campur larutan hingga homogen, lalu disimpan di botol gelap dan dibungkus dengan *aluminium foil*

- d) Secara berturut-turut, dibuat variasi konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm
- 3) Pembuatan Larutan Kuersetin
  - a) Ditimbang kuersetin sejumlah 2,5 mg di neraca analitik
  - b) Dilarutkan kuersetin dengan pelarut etanol *pro analysis* sebanyak 50 mL menggunakan labu ukur 50 mL
  - c) Dengan menggunakan *vortex* campur larutan hingga homogen, lalu disimpan di botol gelap
  - d) Secara berturut-turut, dibuat variasi konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm.
- 4) Pembuatan Larutan Blanko
  - a) Diambil larutan DPPH sejumlah 4 mL menggunakan pipet ukur
  - b) ditambahkan 1-2 mL etanol *pro analysis*.
- 5) Pembuatan Larutan Kontrol
  - a) Diambil larutan DPPH sebanyak 1 mL menggunakan pipet ukur
  - b) Ditambahkan etanol *pro analysis* sejumlah 4 mL, dengan menggunakan *vortex* kocok larutan hingga homogen
    - a) Selama 30 menit larutan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C
    - c) Dengan *spektrofotometer Uv-Vis*, ukur serapan larutan kontrol pada panjang gelombang 500-600 nm hingga didapatkan panjang gelombang maksimum
  - 6) Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH
    - b) Dari masing-masing konsentrasi ekstrak daun kopi robusta dan kuersetin diambil sebanyak 4 mL dengan menggunakan pipet ukur
    - c) Ditambahkan larutan DPPH 1 mL, lalu gunakan *vortex* untuk mencampur larutan hingga homogen
    - d) Selama 30 menit larutan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C
    - e) Setelah prosedur inkubasi, diamati perubahan warna yang terjadi
    - f) Kemudian, dengan *spektrofotometer Uv-Vis* ukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan
    - g) Pembacaan dilakukan sebanyak 3 kali
    - h) Terakhir, hitung nilai IC<sub>50</sub>

### E. Analisis Data dan Penentuan Persen Inhibisi

1. Cari absorbansi larutan blanko, larutan pembanding serta larutan sampel pada panjang gelombang maksimumnya. Untuk masing-masing larutan pembanding dan larutan sampel, pembacaan diulang sebanyak 3x untuk dicari rata-ratanya.
2. Setelah didapatkan absorbansi larutan blanko, larutan sampel dan larutan pembanding, selanjutnya hitung % inhibisi dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

- Absorbansi kontrol = absorbansi larutan DPPH pada panjang gelombang maksimum (517 nm)
- Absorbansi sampel = absorbansi larutan uji atau larutan pembanding pada panjang gelombang maksimum (517 nm)

### F. Penentuan Nilai IC<sub>50</sub>

Persamaan linier yang menghubungkan persentase penghambatan pada berbagai konsentrasi larutan uji dan larutan acuan (*quercetin*) bisa digunakan untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> diartikan sebagai konsentrasi larutan uji yang bisa menghasilkan 50% penghambatan radikal bebas. Nilai ini bisa dihitung menggunakan rumus berikut, yang didasarkan pada persamaan regresi linier korelasi antara I dan K :

$$y = ax + b$$

Keterangan:

- y = 50
- x = konsentrasi larutan uji (K)

Tabel 3. 1 Kategori Kekuatan Aktivitas Antioksidan  
(Nasution, Batubara, Surjanto, 2015:6)

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

Untuk memudahkan peneliti dalam membuat persamaan garis linear, peneliti akan menggunakan microsoft excel dalam pengolahan data tersebut, sehingga dapat terlihat kurva perbandingan nilai  $IC_{50}$  masing-masing larutan sampel dan kategori aktivitas antioksidannya.