

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini dilakukan bersifat non eksperimental dengan metode deskriptif kuantitatif. Penelitian yang dilakukan adalah menganalisa penetapan kadar Flavanoid total daun kopi robusta (*Coffea canephora*) di lampung barat dengan metode spektrofotometri Visibel.

B. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) yang diperoleh di Desa Kenari, Kecamatan Bela alau Kabupaten Lampung Barat. Provinsi Lampung.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu Dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung untuk melakukan ekstrasi dan Laboratorium Kimia Farmasi Politeknik kesehatanTanjungkarang untuk proses optimasi serta validasi metode analisis.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian akan dilaksanakan pada bulan maret – juli 2024.

D. Teknik Pengumpulan Data

1. Alat

Alat – alat yang akan digunakan pisau, baskom, blender, kuvet, inkubator, waterbath, neraca analitik, beaker glas, gelas ukur, batang pengaduk, corong glas, Erlenmeyer, rotaryevaporator, spektrofotometri uv-vis, pipet tetes, rak tabung, tabung reaksi, spatula, neraca analitik, cawan porselen, lemari pendingin, oven, aluminium foil, kertas saring, bulb, penjepit kayu, Erlenmeyer, waterbath, ayakan NO. 40, Labu ukur10 ml, labu ukur 100 ml, pipet volume, pipet ukur, wadah, plastik klip.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut etanol 70%, daun kopi robusta (*Coffea canephora*), Mg stearat, amil alkohol, aquades, HCl_(p), NaOH, AlCl₃ 10%, H₂SO₄, kalium asetat, kuersetin, HCL 2N, dragendrof, Mayer, bouchardat, asam sulfat, FeCl₃ 5%.

E. Prosedur Kerja Penelitian

1. Identifikasi Tanaman

Pemeriksaan atau Identifikasi tanaman Daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung. Dimana hasilnya Dilihat pada lampiran 9 halaman 65-66.

2. Pembuatan Simplisia Daun muda kopi robusta (*Coffea canephora*) Dengan Motode Pengerinan.

- a. Diambil sebanyak 3 kg tanaman Daun muda segar kopi robusta (*Coffea canephora*)
- b. Dilakukan sortasi basah untuk memisahkan Daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dari kotoran maupun benda asing.
- c. Dicuci Daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan air mengalir jika ada kotoran yang susah hilang atau melekat pada daun dan ditiriskan jika tidak ada, daun kopi robusta bisa langsung dirajang.
- d. Dirajang Daun kopi robusta (*Coffea canephora*) untuk memperkecil ukuran daun.
- e. Dilakukan pengeringan simplisia yang sudah dirajang, pengeringan daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dapat dilakukan menggunakan oven dengan suhu 50°C (Winangsih dan Parman, 2013:21). Setelah kering, hasil dari simplisia sebanyak 2 kg lalu kembali disortir dari kotoran yang masih tersisa.
- f. Dilakukan sortasi kering Daun kopi robusta (*Coffea canephora*) untuk memisahkan simplisia dari benda-benda asing maupun kotoran.
- g. Diperhalus simplisia Daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan blender hingga terbentuk serbuk kasar.
- h. Simplisia kering yang sudah menjadi serbuk diayak menggunakan pengayak nomor 40, dengan hasil sebanyak 900g simplisia kering.

3. Pembuatan ekstraksi Daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan metode maserasi
 - a. Ditimbang serbuk daun kopi robusta sebanyak 800g di neraca analitik.
 - b. 800g simplisia daun kopi robusta yang telah ditimbang dimasukkan dan dibagi kedalam 2 toples. Toples pertama berisi 400 g dan toples kedua berisi 400 g serbuk simplisia.
 - c. Kemudian direndam dengan pelarut etanol 70% sebanyak 5,6 mL
 - d. Aduk campuran simplisia dan pelarut sampai homogen.
 - e. Lalu tutup toples dan dibiarkan selama 3 hari didalam ruangan terlindung dari cahaya, sambil diaduk sebanyak 3 jam sekali. Satu kali pengadukan dilakukan selama 5 menit.
 - f. Setelah 3 hari, sari – sari dan ampas dari hasil maserasi disaring dengan kertas saring kemudian dimasukkan kedalam wadah drigen lalu ditutup hingga rapat.
 - g. Dilakukan remaserasi dengan direndam pelarut etanol 70% sebanyak 2,4 liter selama 2 hari.
 - h. Selama perendaman, tiap 6 jam dilakukan pengadukan selama 5 menit.
 - i. Hasil remaserasi yang sudah direndamkan selama 2 hari kemudian di saring dengan kertas saring lalu dimasukkan ke dalam wadah drigen yang sudah tercampur dengan maserat pertama tutup rapat.
 - j. Kumpulkan maserat 1 dan 2, masukan kedalam rotary evaporator untuk diuapkan pada suhu 50°C sehingga didapatkan ekstrak kental pada daun kopi robusta (*Coffea canephora*).
 - k. Pindahkan ekstrak pekat tersebut kedalam cawan penguap (berat cawan kosong ditimbang terlebih dahulu) dan diuapkan di atas waterbath hingga diperoleh ekstrak kental.
 - l. Masukan estrak kental kedalam wadah dan disimpan di lemari es (Dina PermataWijaya, 2021).

4. Pengujian Organoleptik terhadap ekstrak etanol daun kopi robusta

Pengujian organoleptik dilakukan dengan cara menggunakan panca indera dalam mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa yang ada pada ekstrak etanol daun kopi robusta.

5. Pembuatan skrining fitokimia dengan metode reaksi warna

a. Pemeriksaan Flavonoid

Menurut Marjoni (2016:9), pengujian flavonoid dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Ditimbang 5 gram ekstrak daun kopi robusta, lalu tambahkan 50 mL air.
- 2) Didihkan campuran tersebut sekitar kurang lebih 5 menit, saring filtrat dalam keadaan panas.
- 3) Dipipet 5 mL filtrat, lalu tambahkan 0,1 gram serbuk Mg stearat, 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol, lalu dikocok, biarkan lapisannya memisah.
- 4) Sampel positif mengandung flavonoid jika terbentuk lapisan amil alkoholyang berwarna merah, kuning, atau jingga.

b. Pemeriksaan alkaloid

Menurut Marjoni (2016:8), pengujian alkaloid dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Diambil sampel ekstrak etanol daun kopi robusta seujung spatula.
- 2) Ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air suling, lalu panaskan di penangasair selama 2 menit.
- 3) Didinginkan, lalu saring. Filtrat yang telah tersaring akan dipakai untuk percobaan berikut:
 - a) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer. Akan menghasilkan endapan putih / kuning.
 - b) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi *bouchardat* menghasilkan endapan coklat.
 - c) Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi *dragendrof* menghasilkan endapan merah bata.
- 4) Apabila terdapat endapan paling sedikit dengan 2 atau 3 pereaksi, maka sampel positif mengandung alkaloid.

c. Pemeriksaan steroid dan triterpenoid

Menurut Marjoni (2016:12), pengujian steroida/triterpenoid dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Diambil sampel ekstrak etanol daun kopi robusta sejung spatula kedalam cawan porselen dan ditambahkan dengan 20 ml n-heksana selama 2 jam, lalu disaring.
- 2) Filtrat diuapkan dalam cawan dengan lemari asam hingga meninggalkan seperti kerak pada cawan porselen.
- 3) Pada sisa filtrat, ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H_2SO_4 .
- 4) Hasil positif steroid apabila terbentuk warna biru atau hijau, sedangkan hasil positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau ungu.

d. Pemeriksaan saponin

Menurut Marjoni (2016:12), pengujian saponin dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Diambil sampel ekstrak etanol daun kopi robusta sejung spatula dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air suling panas.
- 2) Didinginkan kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik.
- 3) Terbentuk buih atau busa selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10.
- 4) Tambahkan 1 tetes larutan HCl 2N, apabila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

e. Skrining fitokimia golongan Tanin (Marliana, dkk, 2005).

Menurut Marjoni (2016:10), pengujian tanin dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Diambil sampel ekstrak etanol daun kopi robusta sejung spatula ditambahkan dengan 10 mL aquades panas, Diaduk dan disaring.
- 2) Hasil ekstraksi disaring kemudian filtrat diencerkan dengan aquades sampai tidak berwarna.
- 3) Diambil 2 mL filtrat yang telah diencerkan, kemudian tambahkan 1-2 tetes $FeCl_3$.
- 4) Hasil positif sampel mengandung tanin, ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman.

6. Analisis kuantitatif dan penetapan kadar flavonoid total dengan spektrofotometri visible
 - a. Pembuatan larutan AlCl_3 10%
 - 1) Ditimbang Sebanyak 1 gram serbuk AlCl_3 10%
 - 2) Dimasukan kedalam beaker glass.
 - 3) Kemudian dilarutkan dengan sebagian etanol 70% hingga larut sempurna.
 - 4) larutan kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL dan ditambahkan etanol 70% hingga tanda batas.
 - b. Pembuatan larutan CH_3COOK 1M
 - 1) Ditimbang Sebanyak 0,9814 gram serbuk kalium asetat.
 - 2) Kemudian dimasukkan ke dalam beaker glass.
 - 3) dilarutkan dengan sebagian aquadest hingga larut sempurna dengan menggunakan batang pengaduk.
 - 4) Larutan kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL dan tambahkan aquadest hingga tanda batas.
 - c. Pembuatan larutan baku kuersetin
 - 1) Pembuatan larutan baku induk kuersetin 1000 ppm
 - 2) Ditimbang serbuk kuersetin sebanyak 10 mg.
 - 3) Kemudian dilarutkan dengan etanol 70% dalam beaker glass sambil diaduk dengan batang pengaduk sampai larut sempurna kemudian dimasukan kedalam labu ukur 10 mL.
 - 4) Sehingga diperoleh larutan kuersetin 1000 ppm.
 - d. Pembuatan Larutan Blanko
 - 1) Dipipet etanol 70 % sebanyak 4 ml.
 - 2) Ditambahkan kalium asetat 1 ml.
 - 3) Ditambahkan alumunium klorida 1 ml.
 - 4) Dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml
 - 5) Kemudian tambahkan aquades sampai tanda batas.

- e. Pembuatan larutan seri standar kuersetin
- 1) Pembuatan larutan standar dengan cara larutan induk dipipet sebanyak 0,2 ml, 0,4ml, 0,6ml, 0,8ml dan 1 mL masing-masing ke dalam labu ukur 10 mL menggunakan buret.
 - 2) Volume nya dicukupkan dengan etanol 70% sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm.
- f. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum (maks)
- 1) larutan standar (4 ppm) dipipet 0,5 mL ke dalam labu ukur 10 mL.
 - 2) Ditambahkan Etanol 70% ditambahkan sebanyak 1,5 mL.
 - 3) Ditambahkan aluminium klorida 10% sebanyak 0,1 mL.
 - 4) Ditambahkan kalium asetat 1 M sebanyak 0,1 mL .
 - 5) ditambahkan air suling sebanyak 2,8 mL.
 - 6) dikocok sampai homogen.
 - 7) Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 350 – 500 nm.
- g. Pembuatan kurva kalibrasi
- 1) larutan standar 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dipipet sebanyak 0,5 mL.
 - 2) Dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL.
 - 3) Ditambahkan 1,5 mL etanol 70%.
 - 4) Ditambahkan 0,1 mL aluminium klorida 10%.
 - 5) Ditambahkan 0,1 kalium asetat 1 M.
 - 6) Ditambahkan air suling 2,8 ml.
 - 7) dikocok sampai homogen. Larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit kemudian serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.
- h. Penetapan Kadar Flavanoid dengan metode spektrofotometri visibel
- 1) Pembuatan larutan sampel ekstrak daun kopi robusta (*Coffea Canephora*) ditimbang sebanyak 10 mg.
 - 2) kemudian dilarutkan dengan 5 mL etanol 70% dalam gelas kimia 100 mL.
 - 3) Larutan diaduk menggunakan batang pengaduk, setelah itu dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml.

- 4) Gelas kimia dibilas dengan etanol 70% kemudian dimasukkan kedalam labu ukur hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm.
- 5) Setelah diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 1000 ppm, dilakukan pengenceran dengan cara :
 - a) Dipipet 1 mL larutan sampel 1000 ppm
 - b) Dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL
 - c) Ditambahkan dengan etanol 70% sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm.
 - d) Lalu dipipet sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10ml.
 - e) Ditambahkan 1,5 mL etanol 70%.
 - f) Ditambahkan 0,1 mL aluminium klorida 10%.
 - g) Ditambahkan 0,1 mL kalium asetat 1 M.
 - h) Ditambahkan air suling 2,8 mL kemudian kocok sampai homogen.
- 6) Larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.
- 7) Kemudian dilakukan perhitungan kadar flavonoid menggunakan rumus metode Chang, dkk., (2002).

Kandungan Flavonoid (%) =

$$\frac{C \times V \times FP \times 10^{-3}}{M} \times 100\%$$

Keterangan :

C = Konsentrasi ekstrak etanol (mg/ml)

V = Volume total ekstrak etanol (ml)

Fp = Faktor pengenceran

M = Berat sampel (mg)

F. Prosedur penggunaan spektrofotometri visible

1. Hidupkan sumber listrik dengan mencolokkan kabel ke stop kontak.
2. Hidupkan Spektrofotometri visible dengan menekan tombol on pada bagian samping, tunggu hingga proses booting selesai.
3. Hidupkan layar monitor computer dengan menekan tombol on pada CPU.
4. Sambungkan spektrofotometri visible dengan monitor computer dengan menekan “*connect*” pada layar spektrofotometri visible , tunggu hingga semua proses selesai.
5. Masukkan blanko 1 pada spektrofotometri visible lalu tekan “*int multicef*”, tunggu hingga proses selesai.
6. Masukkan blanko 2 pada spektrofotometri visible lalu tekan “*baseline*” masukkan range panjang gelombang yaitu 350 – 500 nm.
7. Keluarkan blanko 2, masukkan kuvet berisi larutan standar ke dalam spektrofotometri visible lalu klik “*spectrum*” lalu “*method*” masukkan range panjang gelombang yaitu 350- 500 nm , atur pengulangan sebanyak 3 kali, lalu klik start dan akan muncul hasil panjang gelombang maksimumnya. Klik “*peakpick*” dan “*print preview*” lalu save data dalam bentuk pdf.
8. Keluarkan kuvet larutan standar yang digunakan untuk mencari panjang gelombang, masukkan kuvet berisi larutan seri standar kuersetin 4 ppm ,lalu klik “*photometric*” dan “*method*” masukkan panjang gelombang maksimum yang sudah didapatkan, klik “*multiple point*” dan pengulangan diatur sebanyak 3 kali, klik “*start*” dan akan muncul absorbansinya. Lakukan yang sama pada larutan seri standar 2 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm, klik “*peak pick*” dan “*print preview*” lalu save data dalam bentuk pdf.
9. Keluarkan kuvet berisi larutan standar seri masukkan kuvet berisi larutan sampel ekstrak etanol daun kopi robusta 100 ppm cari absorbansinya dengan cara , Klik “*photometric*” dan “*method*” masukkan panjang gelombang maksimum yang sudah didapatkan, klik “*multiple point*” dan pengulangan diatur sebanyak 3 kali klik “*start*” dan akan muncul absorbansinya. Klik “*peak pick*” dan “*print preview*” lalu save data dalam bentuk pdf.
10. Matikan monitor computer dan spektrofotometri visible , cabut sumber listrik.

G. Analisis data

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data deskriptif berdasarkan nilai kadar flavonoid ekstrak etanol daun kopi robusta dengan menggunakan rumus

yaitu:

$$y = ax + b$$

y = absorbansi

b = slope

x = konsentrasi

a = intersep

ditentukan dengan cara menginterpolasikan data absorbansi sampel yang diperoleh dari alat spektrofotometer sehingga dapat diketahui konsentrasinya dan disajikan dalam bentuk grafik.