

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)



Sumber : Dokumentasi Pribadi

Gambar 2.1 Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*).

#### 1. Klasifikasi Tanaman

Klasifikasi tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) menurut Rahardjo (2012) adalah sebagai berikut:

<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae</i> (Tumbuhan)
<i>Subkingdom</i>	: <i>Tracheobionta</i> (Tumbuhan pembuluh)
<i>Super Divisi</i>	: <i>Spermatophyta</i> (Menghasilkan biji)
<i>Divisi</i>	: <i>Magnoliophyta</i> (Tumbuhan berbunga)
<i>Kelas</i>	: <i>Magnoliopsida</i> (Berkeping dua)
<i>Sub Kelas</i>	: <i>Asteridae</i>
<i>Ordo</i>	: <i>Rubiales</i>
<i>Famili</i>	: <i>Rubiaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Coffea</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Coffea canephora</i>

## 2. Morfologi Tanaman

### a. Deskripsi Tanaman

Tumbuhan kopi robusta rentan terhadap kekeringan karena memiliki perakaran yang dangkal. Tanaman kopi robusta yang ditanam di dataran rendah lebih tahan terhadap penyakit karat daun dan memiliki batang yang lebih kuat dan tebal dibanding dengan jenis arabika. Jika dibandingkan dengan liberika, batang kopi robusta lebih fleksibel dan padat. Tanaman ini bisa tumbuh hingga 6 m atau lebih jika dibiarkan tumbuh tanpa ada perlindungan dan pemangkasan (Cramer, (1957) dalam Anam *et al.*, (2023):14).

Tanaman ini memiliki ujung daun meruncing dan berbentuk oval. Daun kopi robusta umumnya berwarna hijau, tetapi warnanya bisa bervariasi tergantung pada kondisi tumbuh dan usia daun. Daun kopi robusta seringkali memiliki tepi yang bergelombang atau bergerigi, meskipun tingkat gelombangnya bisa bervariasi. Bagian ujung tangkai tumpul yang menyebabkan tepi daun berpisah. Memiliki tulang daun yang menyirip dengan sebuah pertulangan utama yang membentang dari pangkal hingga ujung tangkai daun. Selain itu, permukaan daun kopi robusta juga tampak mengkilap dan halus. Panjang daun kopi robusta biasanya berkisar antara 15 hingga 25 cm, sedangkan lebar daunnya lebih besar di bagian tengah, dengan panjang sekitar 10 hingga 15 cm. Daun kopi robusta tumbuh di bagian batang secara berselang seling dan biasanya terletak di cabang-cabang yang lebih tua, sementara itu, di bagian ranting, daun tumbuh di bagian bidang yang sama (Anam *et al.*, (2023):14).

Dibandingkan dengan buah kopi arabika, buah kopi robusta ukurannya lebih kecil. Saat buah masih muda, kulitnya berwarna hijau, dan saat matang, warnanya berubah menjadi merah. Tidak seperti tanaman arabika, buah robusta tidak akan gugur saat sudah matang, sebaliknya, buah tersebut akan tetap menempel pada batang tanaman. Dibandingkan dengan kopi arabika yang lebih lebar, pipih, dan bertekstur lebih halus, biji kopi robusta seringkali lebih bulat dan ukurannya lebih kecil (Anam *et al.*, (2023):15).

b. Habitat

Kopi robusta (*Coffea canephora*) tumbuh baik pada kondisi iklim tropis basah. Berbeda dengan kopi arabika, kopi robusta tumbuh di dataran rendah. Tanaman ini tumbuh subur pada ketinggian 400-800 mdpl. Suhu lingkungan yang ideal untuk pertumbuhan kopi robusta berada pada rentang 24-30°C, dengan curah hujan tahunan antara 2.000-3.000 mm (Wulandari, 2022).

Tanaman kopi robusta bisa tumbuh hingga rata-rata 10 meter, tetapi pemangkasan biasanya dilakukan berdasarkan kapasitas petani untuk memanen kopi. Tanaman ini memiliki daun yang lebih besar dan lebih lebar daripada kopi Arabika, dan bunganya memiliki bentuk yang tidak rata. Tanaman ini juga memiliki musim berbunga atau berbuah. Buah kopi Robusta biasanya berbentuk oval dan panjangnya rata-rata 12 mm. (Mulyani, 2019).

c. Kandungan Kimia

Jika membandingkan kopi robusta dengan kopi Arabika, terlihat bahwa kandungan senyawa dalam daun dan biji kopi robusta yang memiliki kualitas antibakteri dan antijamur yang lebih besar. Senyawa fitokimia yang terkandung dalam daun kopi robusta yakni flavonoid, alkaloid, saponin, fenolik/tanin dan steroid. Kandungan senyawa di daun kopi robusta memiliki aktivitas antioksidan, seperti asam klorogenat, kafein dan trigonelin (Marsya *et al.*, 2021).

3. Khasiat

Penelitian tentang sifat antibakteri daun kopi robusta telah menunjukkan bahwa daun kopi ini bisa menghentikan pertumbuhan bakteri *Escherchia coli*. Daun kopi robusta mengandung kafein, yang bisa memengaruhi sistem saraf simpatik dan meningkatkan tekanan darah, serta dapat menyebabkan hipertensi pada individu tertentu. Karena kandungan antioksidannya yang relatif tinggi, daun kopi robusta telah dikaitkan dengan sejumlah manfaat kesehatan, termasuk pencegahan penyakit kronis menurut penelitian epidemiologi sebelumnya (Beksono, 2014).

Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa daun kopi robusta mengandung polifenol tinggi, senyawa ini berkontribusi besar dalam senyawa antioksidan yang terkandung di daun kopi robusta. Polifenol diketahui

memiliki efek antioksidan yang bermanfaat bagi kesehatan, termasuk dalam mencegah penyakit kardiovaskular, kanker, dan osteoporosis. Selain itu, polifenol diyakini bisa membantu menghindari diabetes melitus dan penyakit neurologis (Beksono, 2014).

#### 4. Toksisitas

Dalam sebuah pengujian yang dilakukan oleh Kurniawan *et al* (2018), yang melakukan pengujian terhadap pertahanan larva nyamuk *aedes aegypti* terhadap aktivitas ekstrak etanol 70% daun kopi robusta, ditemukan bahwa senyawa flavonoid adalah komponen pertahanan tanaman yang beracun. Flavonoid berfungsi sebagai racun pernapasan yang mematikan larva dengan masuk melalui sistem pernapasan kedalam tubuh larva. Senyawa ini bisa merusak mekanisme pernapasan larva, menyebabkan kesulitan bernafas dan hingga kematian. Flavonoid bekerja sebagai racun perut (*stomach poisoning*) dan mengganggu mekanisme pencernaan larva *aedes aegypti*, akibatnya larva akan mengalami kematian akibat gagal tumbuh.

### B. Simplisia

Herbal atau simplisia merupakan bahan alam kering yang digunakan sebagai pengobatan tanpa melalui pengolahan lebih lanjut. Selain dinyatakan sebaliknya, simplisia dikeringkan tidak lebih dari suhu 60°C. Simplisia segar merujuk pada bahan alam yang belum mengalami proses pengeringan (Farmakope Herbal, 2017).

Simplisia nabati merupakan simplisia yang berasal dari tumbuhan utuh, bagian tumbuhan, atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan merupakan cairan atau zat yang berasal dari sel tumbuhan secara spontan melalui prosedur atau zat nabati lain yang dipisahkan dari tumbuhan secara khusus (Farmakope Herbal, 2017).

Bubuk simplisia nabati merupakan bentuk serbuk dari simplisia nabati yang memiliki tingkat kehalusan yang berbeda-beda. Berdasarkan tingkat kehalusannya, bubuk simplisia bisa dikategorikan sebagai amat halus, kasar, halus, sedikit kasar atau amat kasar (Farmakope Herbal, 2017).

Bubuk simplisia nabati harus bebas dari bagian jaringan dan benda aneh yang bukan bagian asli dari simplisia tersebut, seperti telur nematoda, komponen hama dan serangga, serta sisa tanah (Farmakope Herbal, 2017).

### **C. Ekstraksi**

#### **1. Ekstraksi**

Ekstraksi adalah prosedur pemisahan komponen kimia yang dapat larut dan terpisah dari bahan yang tidak bisa terlarut menggunakan pelarut cair. Prosedur ini memungkinkan zat tertentu terpisah berdasarkan pada kecocokan pelarut, baik organik maupun anorganik (Senduk, 2022). Senyawa aktif yang terkandung pada berbagai simplisia dapat diklasifikasikan menjadi kelompok seperti minyak atsiri, alkaloida, flavanoida, dan lain sebagainya. Dengan mengetahui kandungan senyawa aktif dalam simplisia dapat memudahkan dalam memilih pelarut yang pas untuk prosedur ekstraksi (Ningrum, 2018).

Ekstrak merupakan hasil dari proses ekstraksi yang umumnya digunakan sebagai bahan aktif dalam membuat sediaan obat. Ekstrak bisa berupa sediaan kering, kental, atau cair yang didapat dari penyarian simplisia nabati maupun hewani menggunakan metode yang tepat tanpa dipengaruhi langsung oleh cahaya matahari (Depkes, 1979). Menurut keputusan Ditjen POM (2000), prosedur ekstraksi bisa dibedakan menjadi ekstraksi menggunakan pelarut, uap serta prosedur ekstraksi lainnya.

#### **2. Metode Ekstraksi**

##### **a. Cara dingin**

Dalam metode ini, prosedur ekstraksi dilakukan tanpa menggunakan pemanasan untuk menghindari kerusakan senyawa yang diekstraksi.

##### **1) Maserasi.**

Maserasi adalah proses pemisahan komponen kimia dari simplisia menggunakan pelarut dengan cara dikocok atau diaduk beberapa kali pada suhu ruang (kamar). Metode ini merupakan metode ekstraksi yang didasarkan pada prinsip pencapaian konsentrasi seimbang secara teknologi. Maserasi kinetik merupakan prosedur yang dilakukan dengan cara diaduk secara terus menerus. Pengulangan prosedur dengan menambah pelarut baru setelah

penyaringan maserat pertama, dan seterusnya disebut remaserasi (Depkes RI, 2000: 10).

Sementara berdasarkan Sudarwati (2019), maserasi adalah prosedur ekstraksi sederhana dengan cara merendam bubuk simplisia dengan pelarut. Pelarut ini akan masuk kedalam rongga yang berisi bahan aktif dengan cara menembus dinding sel. Zat aktif tersebut akan terlarut akibat adanya konsentrasi yang berbeda antara senyawa aktif di dalam dan luar sel. Prosedur ini akan diulangi hingga tercapai konsentrasi yang seimbang antara larutan di luar dan dalam sel.

Kelebihan dari metode ini ialah peralatan serta teknik pengerjaannya yang sederhana dan mudah untuk dilakukan. Sedangkan, kekurangannya adalah prosedur ini membutuhkan waktu yang banyak, dan zat aktif hanya bisa terekstraksi sekitar 50% sehingga hasil ekstraksi yang diperoleh tidak sempurna (Marjoni, 2016: 46).

## 2) Perkolasi

Perkolasi ialah prosedur ekstraksi di mana pelarut yang sesuai dialirkan perlahan melalui simplisia dalam sebuah tempat yang disebut perkolator. Prinsip perkolasi melibatkan ekstraksi zat aktif dengan mengalirkan suatu pelarut kedalam bubuk simplisia yang telah dibasahi sebelumnya. Campuran tersebut kemudian ditempatkan dalam wadah silinder dengan penghalang berpori di bagian bawah (Marjoni, 2016: 49-50).

### b. Cara Panas

Dalam prosedur ini, pemanasan digunakan sepanjang prosedur ekstraksi, yang tentu saja mempercepat prosedur ekstraksi jika dibandingkan dengan metode ekstraksi tanpa pemanasan atau cara dingin.

#### 1) Refluks

Refluks ialah prosedur ekstraksi menggunakan pelarut pada suhu didihnya sampai periode waktu tertentu, dengan pelarut pada jumlah yang relatif konstan serta dilengkapi pendingin balik. Umumnya, dilakukan pengulangan pada residu pertama hingga 3 sampai 5 kali, karena itu metode ini bisa dianggap sebagai prosedur ekstraksi yang efektif (Depkes RI, 2000: 10).

## 2) Soxhletasi

Soxhletasi adalah prosedur pemisahan komponen dari bentuk contoh padatan melalui ekstraksi berulang dengan pelarut tertentu menggunakan alat sokhletasi (Marjoni, 2016: 65). Sokhletasi ini digunakan dengan pelarut organik spesifik yang melibatkan pemanasan, di mana setelah dingin uap yang terbentuk akan terus membasahi sampel. Dengan berkala, pelarut akan dikembalikan kedalam labu, membawa serta kandungan kimia yang hendak diisolasi (Sudarwati *et al*, 2019:23).

## 3) Digesti

Digesti ialah prosedur maserasi yang dilakukan dengan cara pengadukan berkala pada suhu yang melebihi suhu ruangan, biasanya menggunakan suhu 40°C sampai 50°C (Depkes RI, 2000: 10).

## 4) Infusa

Infus merupakan prosedur ekstraksi menggunakan pelarut berupa air pada suhu penangas air, di mana bejana infus direndam dalam penangas dengan air mendidih, pada suhu antara 96-98°C hingga waktu tertentu, biasanya 15 sampai 20 menit. (Depkes RI, 2000: 10). Infusa adalah sediaan berbentuk cair yang pembuatannya dilakukan dengan cara menyari simplisia berupa nabati menggunakan air pada suhu 90°C selama waktu 15 menit (Marjoni, 2016: 21).

## 5) Dekokta

Dekokta adalah metode ekstraksi yang dilakukan pada suhu mendidih air untuk waktu yang lebih lama dibandingkan infusa (Depkes RI, 2000: 10). Prosedur dekokta mirip dengan infusa, perbedaannya terletak pada durasi waktu pemanasan. Pada dekokta, pemanasan dilakukan lebih lama, yaitu sekitar 30 menit setelah suhu mencapai 90 °C. (Marjoni, 2016: 21).

## **D. Skrining Fitokimia**

Pengecekan fitokimia bertujuan untuk menganalisis senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi pengobatan. Pada dasarnya pendekatan secara skrining fitokimia merupakan analisis kualitatif terhadap komponen kimia yang ada pada tumbuhan maupun bagian-bagiannya, seperti batang, akar, daun, bunga, buah dan biji, dengan fokus khusus pada senyawa bioaktif yakni metabolit

sekunder, seperti antrakuinon, glikosida jantung, flavonoid, saponin, alkaloid, tannin, polifenol, kumarin, dan minyak atsiri (Marjoni, 2016). Bubuk simplisia atau ekstrak yang hendak diuji dimasukan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan reagen untuk pendeteksi. Adanya perubahan pada sampel akan menentukan keberadaan senyawa-senyawa yang terdapat pada tanaman (Purwati *et al*, 2017).

#### 1. Uji Flavonoid

Sebanyak 2 mg ekstrak daun kopi robusta di larutkan dalam etanol 10 ml. Setelah itu, 1 ml larutan tersebut dicampur dengan 2 mg bubuk Mg dan 1 ml HCl pekat. Warna jingga, kuning, atau merah yang muncul menandakan bahwa ekstrak positif flavonoid (Harborne, 1987).

#### 2. Uji Saponin

Ekstrak daun kopi robusta dilakukan pengenceran menggunakan air pada perbandingan 1:1, kemudian dikocok secara vertikal selama 15 menit. Jika terbentuk busa yang mencapai ketinggian 1-10 cm dan tetap stabil selama 15 menit, menunjukkan terdapatnya saponin (D. A., & Indonesia, P. B. P. D. G., 2020)

#### 3. Uji Alkaloid

Sejumlah 0,1 gram ekstrak daun kopi robusta dicampur dengan kloroform 1 ml dan amonia pekat 5 ml, kemudian ditambah reagen Mayer dan asam sulfat masing-masing 10 tetes. Pembentukan endapan putih menunjukkan terdapatnya alkaloid (Sangi *et al.*, 2019).

#### 4. Uji Fenolik

Sejumlah 0,5 gram ekstrak daun kopi robusta di larutkan dalam 10 ml etanol. Dari larutan ini, 1 ml diambil dan ditambahkan larutan FeCl 10% 2 tetes. Hasil positif ditunjukkan pada munculnya warna hijau atau hitam kebiruan (Harborne, 1987).

#### 5. Uji Triterpenoid/Steroid

Sejumlah 1 ml ekstrak daun kopi robusta dicampur dengan 10 tetes anhidrida, lalu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat ditambahkan perlahan melalui dinding tabung. Jika reaksi positif, akan terbentuk warna ungu yang menunjukkan keberadaan



terpenoid, atau warna biru - hijau yang menunjukkan keberadaan steroid (Sangi *et al.*, 2019).

#### E. Uji Antioksidan

Metode pengecekan untuk menguji aktivitas antioksidan pada tanaman, seperti daun kopi, beragam. Pengecekan aktivitas antioksidan sebenarnya dikategorikan menurut cara kerjanya (reaksi kimia), yaitu transfer atom hidrogen dan transfer elektron (Gupta, 2015; Xiao *et al.*, 2020).

Kemampuan antioksidan untuk menyerap radikal bebas dengan memberikan atom hidrogen, dinilai dengan teknik HAT (Hydrogen Atom Transfer Based), seperti  *$\beta$ -Carotene Bleaching Assay*, TRAP, dan ORAC, (Pisoschi *et al.*, 2016; Gupta, 2015). Di sisi lain, pengurangan kapasitas antioksidan terhadap radikal bebas dinilai dengan teknik berbasis ET (*Electron Transfer*), yang mencakup metode FRAP, CUPRAC, FIC, DMPD, dll. (Gupta, 2015; Pisoschi *et al.*, 2016). Sedangkan ABTS dan DPPH diperkirakan memakai kedua metode (HAT atau ET) (Pisoschi *et al.*, 2016).

##### 1. Metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl*)

Reaksi oksidasi-reduksi merupakan dasar pengoperasian metode DPPH (Purwanti, 2019). DPPH adalah salah satu radikal bebas buatan yang dapat larut pada zat polar seperti metanol dan etanol (Malik *et al.*, 2013; Susilo *et al.*, 2012). DPPH akan menggunakan dua mekanisme untuk bereaksi, yaitu mekanisme donor electron dan mekanisme donor atom hidrogen, di mana radikal DPPH akan mengambil pasangan elektron dari zat kimia antioksidan dengan cara menyumbangkan atom hidrogen (Apak *et al.*, 2013; Malik *et al.*, 2019).

Ketika DPPH direduksi oleh senyawa antioksidan, maka akan berubah menjadi DPPH-H yang menandakan bahwa daun kopi robusta mengandung senyawa antioksidan (Falah, 2016; Malik *et al.*, 2019). Berubahnya warna berkaitan dengan jumlah elektron yang diterima oleh DPPH dan menunjukkan kekuatan aktivitas antioksidan dalam daun kopi robusta saat intensitasnya diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan *spektrofotometer* (Falah, 2016; Malik *et al.*, 2019; Purwanti, 2019; Widyasanti *et al.*, 2016).

DPPH adalah teknik yang paling sederhana, paling cepat, dan paling murah untuk menguji aktivitas antioksidan. DPPH juga bisa digunakan di laboratorium yang sensitif dan sederhana (Purwanti, 2019). *Ácsová et al.* (2020) menyatakan bahwa pendekatan ini rentan terhadap beberapa keadaan, dan pelarut DPPH perlu diganti secara berkala. Daun kopi mengandung senyawa polifenol dengan gugus hidroksil dimana atom hidrogennya memberi jalan bagi radikal bebas DPPH, menstabilkan bahan kimia reaktif karena elektronnya yang tidak berpasangan. Semakin melimpah elektron yang diberikan kepada radikal bebas maka semakin besar kandungan polifenol dan aktivitas antioksidan yang terkandung pada daun kopi (Falah, 2016; Widyasanti *et al.*, 2016).

## 2. Metode ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*)

Zat kimia *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)* adalah zat yang digunakan sebagai penghasil radikal bebas dalam metode ABTS untuk menguji aktivitas antioksidan (Oliveira *et al.*, 2014). Menurut Windiawati *et al.* (2015), ABTS merupakan substrat dari enzim peroksidase yang bisa dioksidasi oleh peroksida ( $H_2O_2$ ) untuk menghasilkan kation radikal. Karakteristik kimia reagen ABTS stabil dan larut dalam air dan minyak.

Dengan memberikan proton kepada radikal bebas, zat kimia antioksidan dianggap mampu menstabilkannya. Hal ini terlihat dari memudarnya warna dari biru kehijauan menjadi tidak berwarna ketika kation radikal ABTS diturunkan (Shalaby *et al.*, 2014; Sukweenadhi *et al.*, 2020). Saat menggunakan metode ABTS untuk mengukur aktivitas antioksidan, kalium persulfat ( $K_2S_2O_8$ ) harus terlebih dahulu mengoksidasi senyawa ABTS untuk menciptakan kation radikal ABTS ( $ABTS^+$ ), yang kemudian berinteraksi dengan komponen antioksidan (Oliveira *et al.*, 2014; Shalaby *et al.*, 2014). *Spektrofotometer* yang diatur pada panjang gelombang 734 nm dapat digunakan untuk mengukur penghilangan warna serapan (Sukweenadhi *et al.*, 2020).

### 3. Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Kemampuan antioksidan dalam mereduksi kompleks *ferric* ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dari *ferric-tripyridyl-triazine* (TPTZ) menjadi kompleks *ferro* ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi biru merupakan dasar penilaian aktivitas antioksidan dengan memanfaatkan metode verifikasi FRAP, yang memiliki panjang gelombang 593 nanometer (Dontha, 2016; Jayanthi *et al.*, 2011; Pires *et al.*, 2017; Sukweenadhi *et al.*, 2020). TPTZ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , dan dapar asetat digabungkan untuk membuat reagen FRAP yang tidak berwarna (Sukweenadhi *et al.*, 2020). Karena umumnya reaksi berlangsung pada pH asam 3,6, penambahan  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dan dapar asetat diperlukan untuk membuat molekul kompleks  $\text{Fe}^{3+}$  (Choirunnisa *et al.*, 2016). Dalam proses reduksi-oksidasi, bahan kimia antioksidan digunakan sebagai agen pereduksi dalam metode FRAP (Choirunnisa *et al.*, 2018). Cara kerja pendekatan FRAP adalah dengan menggunakan transfer elektron untuk menonaktifkan radikal bebas (Rahmah *et al.*, 2023).

### 4. Metode CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*)

Interaksi reduksi-oksidasi antara radikal bebas dan antioksidan yang dinilai dengan melihat bagaimana antioksidan mereduksi ion cupric ( $\text{Cu}^{2+}$ ) menjadi cuprous ( $\text{Cu}^+$ ) melalui donor elektron merupakan dasar metode CUPRAC (Dontha, 2016). Reagen  $\text{Cu(II)-neocuproin}$  ( $\text{Cu}^{2+}-(\text{Nc})_2$ ) digunakan dalam prosedur ini, sebagai oksidator atau agen pengkhelat (Gülçin, 2012; Maryam *et al.*, 2016). Perubahan warna menjadi kuning kecokelatan menunjukkan adanya aktivitas antioksidan. Pada 450 nm, hasil reaksi reduksi ion  $\text{Cu}^{2+}$  bisa dipantau (Maryam *et al.*, 2016).

### 5. Metode ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Prinsip mendasar di balik metode ORAC adalah untuk mengukur kemampuan antioksidan dalam mereduksi radikal peroksil melalui donor hidrogen, yang ditunjukkan oleh penurunan intensitas fluoresensi molekul selama periode reaksi (Aristizabal *et al.*, 2015; Gülçin, 2012).

Untuk menentukan apakah senyawa antioksidan bisa menurunkan radikal bebas, metode uji ORAC menggunakan inisiator bis azida/AAPH (*2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride*) dalam pembentuk radikal peroksil

melalui oksidasi. Inisiator ini kemudian bereaksi dengan molekul fluorensen seperti  *$\beta$ -picoerythrin* atau *fluorescein*, yang menyebabkan hilangnya kapasitas fluorensensi, yang merupakan indikator kemampuan senyawa antioksidan untuk mengurangi radikal bebas. Peluruhan fluorensensi akan dipantau selama 30 menit setelah penambahan AAPH, dan intensitas fluorensensi akan menurun seiring dengan degenerasi oksidatif. Peluruhan fluorensensi bisa dideteksi pada panjang gelombang 480 nm-520 nm selama emisi dan selama eksitasi (Gülçin, 2012). Dalam hal ini, molekul fluorensensi dari degenerasi oksidatif terlindungi oleh kandungan antioksidan dalam daun kopi; semakin banyak senyawa antioksidan yang ada, semakin banyak peluruhan fluorensensi dan kehilangan sinyal yang terjadi (Ácsová *et al.*, 2020; Gülçin, 2012).

#### F. Baku Perbandingan

Baku perbandingan yang ditetapkan dalam artikel farmakope Indonesia resmi tersedia sebagai bahan murni atau sebagai campuran kimia, termasuk eksipien atau bahan terapeutik tertentu. Setiap monografi menentukan cara penggunaan bahan-bahan ini, yang biasanya digunakan untuk pengujian identifikasi atau penentuan kandungan. (Kemenkes, 2021).

##### 1. Baku Perbandingan Pencemaran

- a) Pencemaran organik, yang bisa mencakup bahan awal, produk sampingan, bahan antara, katalisator, pereaksi, dan hasil urai, dihasilkan selama proses produksi atau selama penyimpanan bahan.
- b) Pencemaran anorganik, seperti garam anorganik, pereaksi, logam berat dan katalisator yang biasanya dihasilkan selama proses sintesis.
- c) Pelarut yang tersisa dari proses sintesis, yang bisa berupa larutan anorganik atau organik.

Baku perbandingan pencemaran bisa berupa campuran dari banyak pencemaran atau bahan tunggal yang dimurnikan.

##### 2. Bahan Perbandingan Bersertifikat

Bahan yang selaras dengan *International Organization for Standardization (ISO) Guide 30-35* dan memiliki karakteristik nilai

bersertifikat dengan ketertelusuran metrologi dan ketidakpastian terkait merupakan bahan pembanding bersertifikat.

### 3. Baku Pembanding Farmakope Indonesia untuk Produk Biologik

Antara syarat dan ketentuan baku pembanding farmakope Indonesia untuk produk biologi mungkin terdapat perbedaan dalam definisi, satuan atau standar lain yang diakui secara global. Dalam persyaratan farmakope Indonesia, untuk memastikannya diperlukan pengecekan dan penetapan kadar baku pembanding farmakope Indonesia.

### 4. Baku Uji Verifikasi Kinerja Farmakope Indonesia

Bahan ini dipakai untuk membantu atau menganalisis dan mengendalikan kinerja instrumen, guna menjamin bahwa hasilnya akurat dan/atau tepat, atau memberikan hasil yang sesuai. Serupa dengan uji identifikasi antioksidan, kuersetin merupakan standar referensi yang sering digunakan. Kuersetin adalah zat yang mengandung flavonol paling melimpah dengan aktivitas antioksidan. Dengan menyerap radikal bebas dan menghelat ion logam transisi, kuersetin bisa menghentikan *Low Density Lipoprotein* (LDL) dari oksidasi (Minarno, 2015).

## G. Spektrofotometri

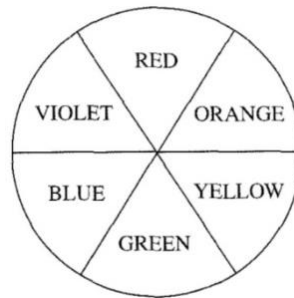
*Spektrofotometri* adalah teknik analisis yang mengukur penyerapan cahaya monokromatik oleh garis-garis larutan yang memiliki warna pada panjang gelombang tertentu, memakai kisi difraksi dengan detektor tabung foto atau monokromator prisma. Spektrofotometri adalah analisis penyerapan energi yang lebih menyeluruh yang bisa dianggap sebagai perluasan dari inspeksi visual. Penyerapan radiasi sebuah sampel dilihat pada panjang gelombang yang berbeda dan kemudian dikirim melalui suatu perkam untuk memperoleh spektrum yang berbeda dari masing-masing konstituen (Khopkar, 1990).

Pada analisis farmasi, spektrofotometri serapan atom, cahaya tampak, inframerah, dan ultraviolet sering digunakan. Berbagai panjang gelombang, dari inframerah dan serapan atom hingga sinar ultraviolet dengan gelombang pendek bisa digunakan untuk pengukuran. Spektrum dipisahkan menjadi

empat area untuk kemudahan pengacuan: *ultraviolet* (190-380 nm), cahaya tampak (380-780 nm), inframerah dekat (780-3000 nm), dan inframerah jauh (2,5 -40  $\mu\text{m}$ ) (FI edisi IV, 1995).

Kelompok fungsional molekul bisa dideskripsikan dan diperiksa secara kualitatif menggunakan spektrofotometri serapan. Spektroskopi UV-VIS adalah istilah untuk metode spektroskopi yang digunakan dalam rentang panjang gelombang tampak dan ultraviolet. Panjang gelombang serapan maksimum suatu unsur atau senyawa bisa diketahui dengan menghitung spektrum serapan. Kurva standar yang direkam pada panjang gelombang serapan tertinggi juga bisa digunakan untuk menghitung konsentrasi unsur atau senyawa dengan mudah (Fatimah, 2012). Spektrofotometri serapan *ultraviolet*-cahaya tampak (UV-Vis) digunakan untuk mengukur serapan atau transmisi guna menganalisis spesies kimia baik secara kualitatif maupun kuantitatif (Khopkar, 1990). Transmisi (T) adalah pengukuran cahaya yang dihamburkan, dan penyerapan (A) adalah pengukuran cahaya yang diserap. Dinyatakan dengan hukum lambert-beer atau Hukum Beer yang berbunyi jumlah radiasi cahaya tampak (ultraviolet, inframerah dan sebagainya) yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan (Neldawati, 2013). Meskipun spektrum cahaya ultraviolet atau cahaya tampak suatu material biasanya kurang tepat, spektrum tersebut tetap bisa membantu sebagai tambahan identifikasi (FI edisi IV, 1995).

Panjang gelombang radiasi tertentu diserap (absorpsi) secara selektif, sementara panjang gelombang lainnya ditransmisikan saat radiasi atau cahaya putih bergerak melalui larutan berwarna. Area warna yang berlawanan adalah tempat larutan berwarna menyerap warna paling banyak. misalnya larutan merah akan menyerap radiasi maksimum pada daerah warna hijau. Dengan kata lain, warna yang diserap adalah kebalikan dari warna yang diamati (Fatimah, 2012).



Sumber : Fatimah (2012).

Gambar 2. 2 Warna Komplementer

Alfiani (2017) menyatakan bahwa alat spektroskopi UV-Vis tersusun atas lima bagian utama, yaitu sebagai berikut:

1. Sumber radiasi

Sumber radiasi UV adalah lampu yang berbahan dasar *Hidrogen* (H) atau *Deuterium* (D). Sementara sumber radiasi inframerah dekat (IR) yang juga memancarkan cahaya tampak menggunakan lampu filamen tungsten, yang memiliki rentang daya emisi 350 hingga 3500 nm.

2. Monokromator

Radiasi polikromatik berasal dari berbagai sumber dan memiliki beberapa panjang gelombang. Bagian ini bekerja dengan membagi cahaya menjadi cahaya monokromatis sesuai kebutuhan. Bahan optik berbentuk prisma digunakan untuk membuat monokromator.

3. Wadah sampel

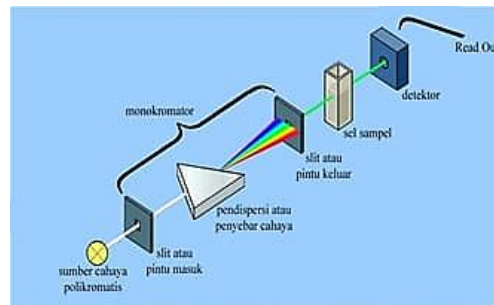
Wadah sampel, yang juga dikenal sebagai sel penyerap, umumnya disebut sebagai kuvet. Beberapa kuvet berbentuk seperti tabung, dan terdapat pula yang berbentuk kotak. Suatu bahan tidak bisa digunakan sebagai kuvet jika bereaksi dengan sampel atau pelarut, atau jika menyerap cahaya yang melewatinya dan bertindak sebagai sumber radiasi.

4. Detektor

Detektor biasanya terhubung dengan peralatan perekam, seperti printer, dan memiliki kapasitas untuk mengubah energi radiasi menjadi arus listrik atau variabel suhu lainnya. Jumlah energi cahaya yang diubah menjadi energi listrik dicatat secara kuantitatif.

## 5. Rekorder

Bagian ini menerima sinyal listrik dari detektor, memperkuatnya menggunakan penguat, dan kemudian menerjemahkan nilai yang dihasilkan menjadi % transmitansi atau absorbansi.



Sumber : Oktivendra, 2019

Gambar 2. 3 Instrumen spektrofotometri

Lampu tungsten berfungsi sebagai sumber radiasi untuk spektroskopi UV-Vis. Kuvet adalah istilah umum untuk wadah sampel. Kuvet kuarsa berfungsi baik untuk spektroskopi tampak maupun UV-Vis. Spektroskopi tampak bisa dilakukan dengan kuvet plastik. Sel untuk spektroskopi UV-Vis biasanya berukuran panjang 1 cm, terdapat pula beberapa sel yang hanya berukuran panjang 0,1 cm (Fatimah, 2012).

Kromofor adalah bagian molekul yang menyerap cahaya tampak dan ultraviolet. Suatu molekul bisa memiliki beberapa kromofor di dalamnya (Roth dan Blaschke, 1994). Sampel kimia menyerap sebagian energi elektromagnetik yang melewatinya, sementara sebagian lagi dipancarkan. Dengan melacak penyerapan cahaya, larutan berwarna bisa ditentukan konsentrasinya. Tiga metode yang bisa digunakan untuk menilai konsentrasi dalam daerah tampak yakni, spektrofotometri, fotometri, dan kolorimetri visual. Dua metode terakhir terbatas pada pengukuran di wilayah tampak, sementara metode pertama bisa digunakan untuk mendeteksi penyerapan dalam rentang tampak dan ultraviolet (Khopkar, 1990).

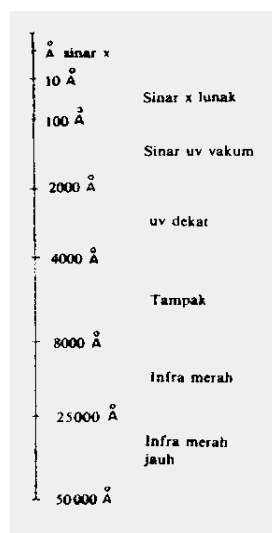
Guna menjamin bahwa pengukuran dilakukan dalam kondisi pengujian yang sama untuk sampel uji dan bahan referensi, termasuk pengaturan lebar



celah, penempatan sel, kompensasi sel, dan transmitansi, pengujian dan penetapan kadar secara spektrofotometri biasanya memerlukan baku pembanding referensi (FI edisi IV, 1995).

Untuk pengukuran spektrofotometri, bisa digunakan cairan apa pun yang sesuai dan murni, dalam rentang pengukuran 220 hingga 880 nm, dan yang menunjukkan sedikit atau tidak ada absorbs, serta mudah melarutkan zat yang akan diukur. Air, etanol, metanol, asetonitril, sikloheksana, dan heksana adalah pelarut yang paling sering digunakan. Pelarut menentukan posisi serapan, yang akan bergeser ke arah panjang gelombang yang lebih panjang seiring dengan meningkatnya polaritas pelarut (Roth dan Blaschke, 1994).

Bergantung pada bagian spektrum, beberapa satuan panjang gelombang digunakan; untuk cahaya ultraviolet dan cahaya tampak, *angstrom* dan *nanometer* biasanya digunakan. Sebaliknya, mikrometer merupakan satuan yang banyak digunakan dalam spektrum inframerah. Nanometer (nm) didefinisikan sebagai  $10^{-9}$  m atau  $10^{-7}$  cm, sedangkan mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) didefinisikan sebagai (Kristianingrum, 2018).



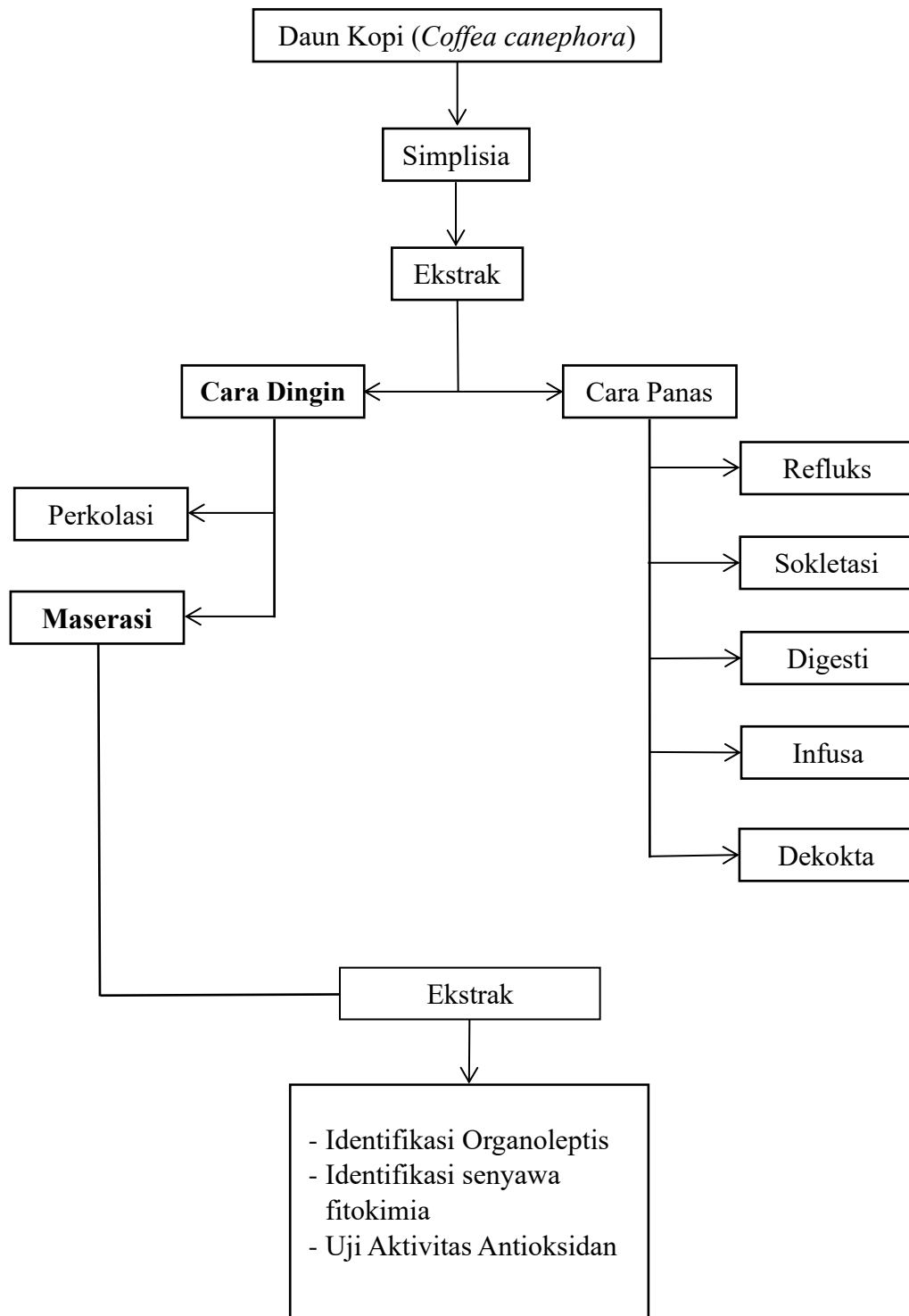
Sumber : Modul Penuntun Praktikum Farmasi Fisika

Gambar 2. 4 Spektrum Elektromagnetik

Panjang gelombang cahaya tampak memiliki kemampuan untuk mengubah iris mata manusia, sehingga menghasilkan persepsi visual subjektif. Bagian spektrum *ultraviolet* dan inframerah, yang terletak di sebelah kiri dan kanan zona tampak, dipengaruhi oleh sebagian besar radiasi yang dilepaskan oleh benda panas, yang berada di luar jangkauan yang bisa dideteksi oleh mata. Setiawan (2017) menyatakan bahwa analisis spektrofotometri menggunakan tiga wilayah panjang gelombang elektromagnetik, yaitu:

1. Daerah UV ;  $\lambda = 200 - 380 \text{ nm}$
2. Daerah visible (tampak);  $\lambda = 380 - 700 \text{ nm}$
3. Daerah inframerah (IR);  $\lambda = 700 \text{ nm} - 3000 \text{ nm}$

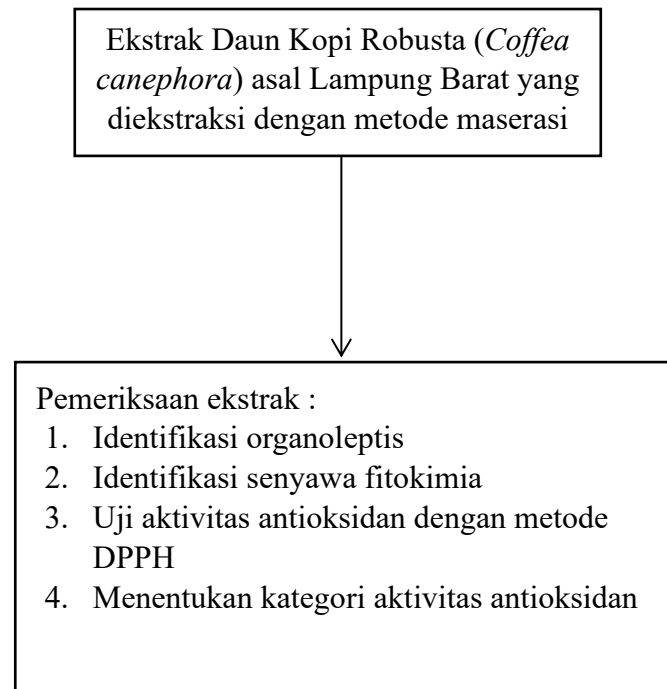
## H. Kerangka Teori



Sumber : Marjoni (2016),  
Sari (2021).

Gambar 2. 5 Kerangka Teori

## I. Kerangka Konsep



Gambar 2. 6 Kerangka Konsep

## J. Definisi Operasional

Tabel 2.1 Definisi Operasional

Variable Penelitian	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Skor
Sifat organoleptis ekstrak etanol daun kopi robusta ( <i>Coffea canephora</i> )	Sebagai pengenalan awal yang sederhana dengan mendeskripsikan bentuk, warna, dan bau (Depkes RI, 2000:31)	Observasi	Panca indra - Indera peraba - Indera penglihatan - Indera penciuman	Konsistensi ekstrak, warna, dan bau	Nominal
Senyawa Flavonoid	Senyawa yang pada lapisan amil alkohol terbentuk warna merah, kuning, atau jingga (Marjoni, 2016)	Observasi	Indra penglihatan	(+) terbentuk warna jingga, kuning, atau merah pada lapisan amil alkohol (-) tidak terbentuk warna jingga, kuning, atau merah pada lapisan amil alkohol	Nominal
Senyawa Saponin	Senyawa yang setelah penambahan larutan HCl 2 N terbentuk buih (Marjoni, 2016)	Observasi	Indera penglihatan	(+) terbentuk buih pada sampel (-) tidak terbentuk buih pada sampel	Nominal
Senyawa Alkaloid	Senyawa yang setelah penambahan pereaksi dragendrof, bauchardat, dan mayer terbentuk endapan (Marjoni, 2016)	Observasi	Indera penglihatan	(+) terbentuk endapan pada minimal dua sampel (-) tidak terbentuk endapan pada minimal dua sampel	Nominal
Senyawa Fenolik	Senyawa yang setelah penambahan pereaksi FeCl <sub>3</sub>	Observasi	Indera penglihatan	(+) terbentuk warna biru hingga kehitaman (-) tidak	Nominal

Variable Penelitian	Definisi Oprasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Skor
	terbentuk warna biru hingga kehitaman (Marjoni, 2016)			terbentuk warna biru hingga kehitaman	
Senyawa Steroid / Triterpenoid	Senyawa yang setelah penambahan pereaksi <i>Lieberman Burchard</i> terbentuk warna biru hingga hijau atau terbentuk warna merah hingga ungu (Marjoni, 2016)	Observasi	Indera penglihatan	(+) terbentuk warna merah hingga ungu atau biru hingga hijau (-) tidak terbentuk warna merah hingga ungu atau biru hingga hijau	Nominal
Kadar antioksidan	Besarnya hambatan kadar radikal bebas dengan menghitung $IC_{50}$	Observasi	Instrumen	1 = $IC_{50}$ : <50 ppm 2 = $IC_{50}$ : 50 – 100 ppm 3 = $IC_{50}$ : 101 – 150 ppm 4 = $IC_{50}$ : 151 – 200 ppm 5 = $IC_{50}$ : >500 ppm	Ordinal
Kategori aktivitas antioksidan	Tingkat kekuatan aktivitas antioksidan dengan melihat besarnya nilai $IC_{50}$	Observasi	Perbandingan dengan parameter $IC_{50}$	1=sangat kuat 2=kuat 3=sedang 4=lemah 5=tidak aktif	Rasio