

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tanaman Kopi Robusta



Sumber : Dokumentasi Pribadi

Gambar 2.1 Tanaman Kopi Robusta

#### 1. Taksonomi Tanaman Kopi Robusta

Berdasarkan klasifikasi ilmiah, taksonomi tanaman kopi robusta yakni sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan Berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (Tumbuhan Dikotil)
Ordo	: Rubiales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: Coffea
Spesies	: <i>Coffea canephora</i> Pierre ex. A. Froehner (Cronquist, 1981)

#### 2. Morfologi Tanaman Kopi Robusta

##### a. Daun

Daun kopi robusta umumnya memiliki bentuk oval atau elips dengan ujung daun agak runcing membulat dan pangkal daun tumpul (Soesanto, 2020). Pada bagian tepi daun bentuknya berombak dan permukaan daun mengkilat serta licin. Bentuk tulang daun kopi robusta menyirip dan terbentang dari pangkal sampai

ujung daun (Rizwan, 2022).

Daun ini dapat tumbuh pada bagian ranting, cabang, dan batang. Apabila tumbuh pada ranting, susunan pasangan daun tersebut tidak berselang-seling atau terletak pada bidang yang sama. Sedangkan, apabila tumbuh pada batang, susunan berselang-seling. Daun kopi robusta yang masih muda dicirikan dengan warna coklat kekuningan, sedangkan daun kopi robusta yang tua berwarna hijau (Rizwan, 2022).

#### b. Bunga dan Buah

Secara bergerombol, bunga kopi tumbuh di ketiak daun berbau harum dan berbunga putih. Rangkaian bunga ini disebut bunga majemuk. Bunga-bunga umumnya muncul dalam 2 hingga 3 kelompok, dengan setiap kelompoknya berisi 4 hingga 6 kuntum bunga. Bunga kopi umumnya mekar saat musim kemarau dan siap dipetik saat berkembang menjadi buah di akhir musim kemarau (Rizwan, 2022).

Umumnya dihasilkan dua butir biji kopi dari satu buah kopi, namun terkadang berasal dari satu biji atau tidak memiliki biji sama sekali. Bagian yang digunakan untuk minuman kopi adalah bagian endosperm atau lembaga biji (Rizwan, 2022).

#### c. Batang dan Akar

Tanaman kopi merupakan tanaman berbatang kayu yang memiliki tinggi 2-4 meter, memiliki ranting dan cabang berwarna keabu-abuan, dan berkambium karena termasuk tumbuhan berkeping dua (*dicotyledoneae*). Perakaran tanaman kopi berada pada 30 cm di atas lapisan tanah (Rahardjo, 2021).

### 3. Habitat

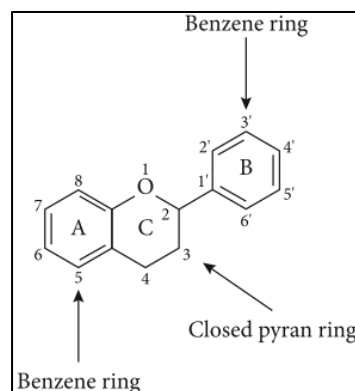
Secara botani, tanaman kopi robusta diklasifikasikan ke dalam famili *Rubiaceae* dari genus *Coffea* yang termasuk tumbuhan tropik dan banyak ditemui di Asia Tenggara dan Afrika Barat. Tanaman ini dapat tumbuh pada ketinggian 100-600 m di atas permukaan laut. Tumbuh baik pada suhu 24-30°C dan curah hujan 1.250-2.500 mm/ tahun. pH tanah yang baik untuk tanaman kopi robusta tumbuh yakni 5,5 – 6,5 (Kementan Ditjenbun, 2014).

#### 4. Kandungan

Dari hasil uji laboratorium, dinyatakan bahwa terdapat senyawa polifenol yang paling banyak terkandung dalam tanaman kopi yaitu asam klorogenat yang memiliki efek farmakologi sebagai antioksidan dapat menangkal radikal bebas dalam tubuh (Dewajanti, 2019). Studi lain mengungkapkan bahwa ekstrak daun kopi robusta mengandung senyawa-senyawa seperti flavonoid, alkaloid, saponin, dan steroid (Nintowati, 2024).

##### a. Flavonoid

Flavonoid merupakan metabolit sekunder golongan senyawa polifenol yang banyak ditemukan pada divisi angiospermae dan dikenal sebagai pemberi pigmen kuning atau merah pada pucuk, daun, dan buah. Flavonoid tersebar pada semua bagian tanaman seperti daun, bunga, buah, biji, ataupun akar (Marjoni, 2023). Berikut struktur dasar senyawa flavonoid.



Sumber : Roy; *et. al.*, 2022

Gambar 2.2 Struktur Dasar Flavonoid.

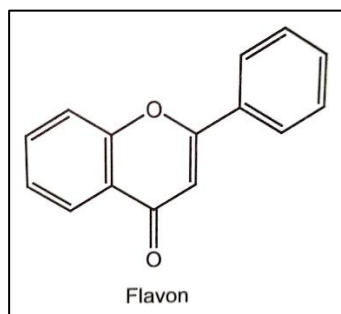
Senyawa flavonoid tersusun atas inti C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> yakni 3 atom C yang terhubung dengan dua cincin aromatik, umumnya dengan ikatan oksigen heterosiklik yaitu ikatan atom O. Senyawa ini termasuk polifenol karena terdapat dua atau lebih gugus hidroksil yang larut dalam suasana basa dan bersifat agak asam. Senyawa flavonoid yang berikatan dengan gula akan membentuk glikosida. Ini membuat glikosida larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, dan etil asetat. Namun, flavonoid yang tidak berikatan dengan gula (dalam bentuk aglikon flavonoid) sifatnya kurang polar, sehingga lebih mudah larut dalam

kloroform dan eter (Hanani, 2015).

Flavonoid diakui memiliki berbagai khasiat bagi kesehatan, termasuk sifat antikanker, antioksidan, antibakteri, dan antifungi. Berdasarkan substitusi karbon pada gugus aromatik sentral atau cincin C, flavonoid terbagi menjadi beberapa subkelompok (Panche, Diwan, Chandra, 2016), yaitu :

#### 1) Flavon

Flavon merupakan salah satu subkelompok dari flavonoid. Senyawa ini terdapat pada daun, bunga, dan buah dalam bentuk glikosida. Senyawa seperti luteolin, apigenin, dan tangeritin diklasifikasikan sebagai bagian dari subkelas flavonoid. Contoh sumber utama flavon yaitu seledri, ginkgo biloba, dan mint (Panche, Diwan, Chandra, 2016).

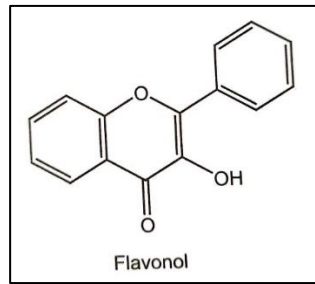


Sumber : Hanani, 2015

Gambar 2. 3 Struktur Flavon.

#### 2) Flavonol

Ciri khas senyawa flavonol yaitu adanya gugus keton dan gugus hidroksil yang berada pada posisi 3 dari cincin C. Beberapa subkelas flavonol yaitu kaempferol, quercetin, dan myricetin. Flavonol telah terbukti memiliki berbagai karakteristik yang bermanfaat. Ini termasuk potensi antioksidan dan penurunan risiko penyakit pembuluh darah. Sumber utama flavonol didapat dari bawang, kangkung, tomat, apel, dan teh (Panche, Diwan, Chandra, 2016).

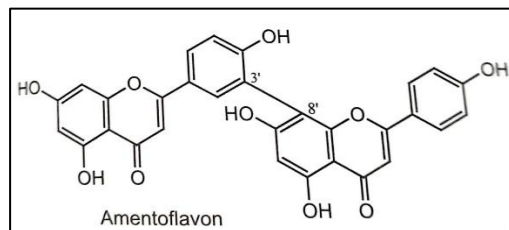


Sumber : Hanani, 2015

Gambar 2. 4 Struktur Senyawa Flavonol

### 3) Biflavonoid

Biflavonoid merupakan dimer dari flavon dan memiliki rangka yang terdiri dari 30 atom karbon. Senyawa ini terdistribusi luas dalam tumbuhan angiospermae, gymnospermae, dan briophyta.. Contoh subkelas biflavonoid yaitu kayaflavon (Harborne, 1987).

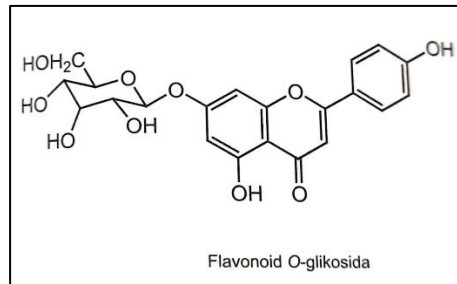


Sumber : Hanani, 2015

Gambar 2. 5 Struktur Senyawa Biflavonoid

### 4) Glikoflavon

Ciri yang menjadi pembeda dengan jenis flavonoid lain yakni terletak pada struktur glikoflavon terdapat gula pada ikatan karbon C-C. Ciri lain glikoflavon yakni mengalami isomerisasi selama hidrolisis asam dan menampilkan dua bintik pada kromatogram (Harborne, J.B, 1987).



Sumber : Hanani, 2015

Gambar 2. 6 Struktur Senyawa Glikoflavon

b. Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa yang termasuk dalam kategori metabolit sekunder. Ciri khasnya memiliki satu atom nitrogen yang membuatnya bersifat basa. Banyak spesies tanaman yang mengandung zat ini. Karena sifat basanya, senyawa ini diisolasi dengan HCl atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dalam bentuk garam. Garam ini disebut juga alkaloid bebas yang berbentuk kristal tidak berwarna (Marjoni, 2023).

c. Tanin

Tanin merupakan metabolit sekunder golongan senyawa polifenol yang bersifat polar dan banyak terkandung pada bagian kulit batang dan daun yang berfungsi melindungi tumbuhan dari hama. pada serta dapat memberikan rasa pahit atau sepat dilidah. Senyawa ini ditemukan dalam teh, kopi, cokelat, dan wine (Marjoni, 2023).

d. Saponin

Saponin merupakan metabolit sekunder yang memiliki rasa pahit dan membentuk busa stabil di air. Hal ini disebabkan adanya kombinasi rantai gula (hidrofilik) dan sapogenin (hidrofobik). Senyawa ini dikenal sebagai senyawa non-volatil (Marjoni, 2023).

## B. Simplisia

Bahan alam yang telah dikeringkan, belum mengalami pengolahan, dan dapat digunakan sebagai pengobatan disebut simplisia. Simplisia terbagi atas tiga jenis yaitu simplisia nabati, hewani, dan pelikan atau mineral. Simplisia nabati dapat diperoleh dari eksudat tanaman, bagian-bagian tanaman, tanaman secara keseluruhan, atau kombinasi dari ketiganya. Terdapat beberapa syarat kemurnian

dari simplisia nabati yakni harus terbebas dari fragmen maupun tanda pengotor lain, lendir, cendawan, maupun bahan beracun yang dapat berbahaya bagi kesehatan. Bau dan warna yang berbeda juga tidak boleh dimiliki oleh simplisia (Depkes RI, 2000).

Menurut Buku Cara Pembuatan Simplisia milik Departemen Kesehatan RI Tahun 1985, Proses pengolahan tanaman menjadi simplisia dilakukan secara bertahap yaitu :

1. Pengumpulan bahan baku

Kandungan senyawa aktif dalam suatu simplisia bervariasi. Ini bergantung pada waktu panen, bagian tanaman yang dimanfaatkan, umur tanaman, dan lingkungan tempat tumbuhnya. Bahan baku dapat dikumpulkan saat panen secara manual, menggunakan alat bantu, atau dengan mesin. Namun, jika ingin meneliti senyawa aktif fenol, glikosida sebaiknya tidak menggunakan alat yang terbuat dari logam karena akan merusak senyawa aktif simplisia. Pengambilan daun sebagai bahan baku dapat dilakukan dengan memetik daun tua atau daun muda (pucuk) secara manual, satu per satu.

2. Sortasi Basah

Menghilangkan kontaminan dan elemen asing dari simplisia—seperti kotoran, rumput, batu, batang, daun, dan akar yang rusak—adalah tujuan dari prosedur ini. Jumlah mikroba awal juga berkurang dengan membersihkan simplisia dari tanah.

3. Pencucian

Simplisia dicuci untuk menghilangkan tanah dan kotoran lain yang menempel. Proses ini menggunakan air bersih dari sumber seperti mata air, sumur, atau PAM.

4. Perajangan

Proses ini untuk mempercepat pengeringan, pengepakan, dan penggilingan. Perajangan dapat dilakukan dengan pisau atau dengan mesin perajang khusus. Agar dapat mempercepat waktu pengeringan, bahan yang dikeringkan harus dirajang setipis mungkin. Namun, proses ini berpotensi mengurangi atau menghilangkan zat berkhasiat yang mudah menguap.

## 5. Pengeringan

Tujuan dari pengeringan adalah untuk mengurangi kadar air dan menghentikan proses enzimatik pada simplisia untuk menjaga kualitas dan memperpanjang masa penyimpanan. Salah satu metode pengeringan adalah dengan menjemur simplisia di bawah sinar matahari selama dua sampai tiga hari dan menutupnya dengan kain hitam. Cara lainnya adalah pengeringan buatan dengan menggunakan oven. Suhu oven yang ideal tidak boleh melebihi 60°C. Jika simplisia mengandung senyawa yang mudah menguap dan tahan panas, seperti flavonoid, suhu yang disarankan adalah antara 30 dan 45°C.

## 6. Sortasi Kering

Proses ini dilakukan untuk menyingkirkan sisa benda asing atau kotoran yang masih menempel pada simplisia setelah dikeringkan.

## 7. Penyimpanan

Kualitas simplisia dipengaruhi beberapa faktor, seperti cahaya, oksigen, reaksi kimia, dehidrasi, penyerapan air, kontaminasi, serangga, dan jamur. Daun atau herba kering, dalam bentuknya yang paling sederhana, dapat menyerap uap air dari udara di sekitarnya. Penyerapan ini dapat mencapai 10-15% dari berat daun atau herba. Untuk pengemasan, wadah bersifat inert dan tidak beracun. Contoh penyimpanan simplisia kering yakni dalam karung plastik atau dijahit, atau botol kaca yang tertutup rapat.

## C. Ekstraksi

Ekstraksi didefinisikan sebagai proses mengeluarkan komponen kimia dari bagian tanaman dengan menggunakan pelarut yang sesuai untuk mengekstrak zat aktif. Kemudian diuapkan pada rotary evaporator dan didapatkan ekstrak kental setelah dilakukan pengentalan menggunakan *waterbath*. Ekstrak atau sari adalah hasil dari proses ekstraksi. Pemilihan metode ekstraksi disesuaikan dengan jenis, sifat fisik, dan sifat kimia senyawa yang ingin diambil (Marjoni, 2016).

Pemilihan pelarut dipilih disesuaikan dengan sifat kepolaran senyawa yang akan disari, seperti polar atau non-polar. Untuk mengekstraksi metabolit sekunder dan skrining fitokimia biasanya dipakai metanol, etanol 70%, dan etanol 96% karena merupakan pelarut umum (Hanani, 2015). Secara umum, metode ekstraksi

terbagi menjadi dua kategori yakni ekstraksi panas dan ekstraksi dingin, dimana ekstraksi panas memerlukan pemanasan dan ekstraksi dingin tidak memerlukan pemanasan agar senyawa tidak rusak (Marjoni, 2016).

## 1. Ekstraksi Cara Dingin

### a. Maserasi

Maserasi adalah proses perendaman simplisia dalam pelarut yang sesuai selama tiga hingga lima hari pada suhu kamar (20-25 °C). Untuk mencegah reaksi dan perubahan warna yang disebabkan oleh cahaya, metode ini harus dilakukan di tempat yang terlindung dari cahaya langsung. Pengadukan sesekali diperlukan untuk menjaga keseimbangan konsentrasi zat yang diekstraksi dalam cairan. Tanpa pengadukan, perpindahan zat aktif akan berkurang (Irianti, 2021).

Maserasi bekerja dengan prinsip keseimbangan konsentrasi. Pelarut akan menembus dinding sel tanaman dan masuk ke dalam sel yang mengandung zat aktif. Karena adanya perbedaan konsentrasi, zat aktif di dalam sel akan larut dan berpindah. Perbedaan konsentrasi, zat aktif di dalam sel akan larut dan berpindah ke dalam pelarut, didorong oleh larutan yang lebih pekat. Proses pelarutan ini mengikuti aturan *like dissolves like*, artinya senyawa dengan sifat kelarutan yang mirip akan saling melarutkan (Hujjatusnaini, 2021; Marjoni, 2016).

### b. Perkolasi

Perkolasi adalah metode ekstraksi di mana serbuk simplisia yang sudah dibasahi diekstraksi dengan cara dialiri pelarut (penyari). Prosesnya dimulai dengan merendam (maserasi) serbuk simplisia selama tiga jam. Setelah itu, serbuk dipindahkan ke dalam wadah silinder berpori. Pelarut kemudian dialirkan melalui serbuk, melarutkan zat aktif hingga mencapai titik jenuh. Kerugian dari metode ini adalah kurang efisien dalam melarutkan komponen karena kontak sampel padat tidak merata (Marjoni, 2016).

## 2. Ekstraksi Cara Panas

### a. Digesti

Digesti dikenal sebagai metode pengadukan berkelanjutan atau kontinyu. Metode maserasi kinetik melibatkan penggunaan suhu di atas suhu kamar,

umumnya berkisar antara 40-50°C (Depkes RI, 2000).

b. Infusa

Ekstraksi cara ini dilakukan memakai pelarut polar yakni air yang direbus pada suhu 90°C selama 15 menit (Ditjen POM, 1979). Biasanya infusa untuk mengekstraksi simplisia yang tidak tahan panas dalam waktu lama dan mengandung minyak atsiri. Metode ini termasuk metode paling murah, mudah, tidak mudah menguap, dan tidak mudah terbakar. Namun, dihasilkan ekstrak yang tidak dapat disimpan lebih dari 24 jam dan tidak stabil (Hanani, 2015).

c. Soxhletasi

Metode ekstraksi ini dikenal sebagai ekstraksi sinambung karena jumlah pelarut yang digunakan konstan saat proses ekstraksi dilakukan terus menerus. Soxhletasi menggunakan suhu mendidih 100°C dengan pelarut organik. Alat soxhletasi disebut soxhlet (Hanani, 2015).

d. Refluks

Refluks merupakan ekstraksi yang menggunakan prinsip pendinginan pelarut volatil dikondensor setelah dilakukan penguapan pada suhu yang tinggi, sehingga akan dihasilkan embun pada kondensor yang nantinya akan turun kembali ke labu ekstraksi menjadi pelarut (Marjoni, 2016).

#### **D. Kromatografi**

Kromatografi merupakan teknik untuk memisahkan zat-zat dalam suatu campuran. Cara kerjanya dengan membuat zat bergerak atau bermigrasi di dalam sebuah sistem. Sistem terdiri atas fase diam atau media yang tidak bergerak yang berfungsi untuk menahan atau melarutkan sementara zat yang lewat. Sedangkan fase gerak, atau sering disebut eluen merupakan cairan yang membawa zat-zat terlarut melewati fase diam. Pemisahan ini terjadi karena perbedaan kecepatan migrasi komponen-komponen, yang dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti adsorpsi, partisi, dan perbedaan ukuran molekul (Kemenkes RI, 2017)

Kromatografi dibagi menjadi dua kategori utama berdasarkan fase gerak yakni kromatografi cair dan kromatografi gas. Beberapa jenis kromatografi cair meliputi kromatografi kertas, kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi cair kinerja tinggi. Sementara itu, kromatografi gas-padat dan kromatografi gas-cair adalah bagian dari kromatografi gas (Marjoni, 2016).

## 1. Kromatografi Cair

### a. Kromatografi kolom

Kromatografi kolom adalah teknik kromatografi yang berfungsi untuk memisahkan dan memurnikan senyawa. Kolom yang dipakai bergantung kebutuhan, yaitu daya pisah yang diinginkan dan besarnya sampel yang dipisahkan. Contoh kolom yang sering digunakan berupa gelas, plastik, dan nilon. Umumnya kolom ini berdiameter 2 cm dan panjang 45 cm. Sedangkan fase diam dalam kolom adalah selulosa, silika gel, alumina, dan arang (Irianti, 2021).

### b. Kromatografi Kertas (KK)

Kromatografi kertas menggunakan fase diam yaitu sehelai kertas dengan ketebalan yang sesuai dengan tujuan penggunaan. Sedangkan Fase gerak yang digunakan pada metode ini dapat menggunakan fase gerak tunggal maupun campuran dengan prinsip gaya gravitasi dari fase gerak (Hujjatusnaini, 2021).

### c. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

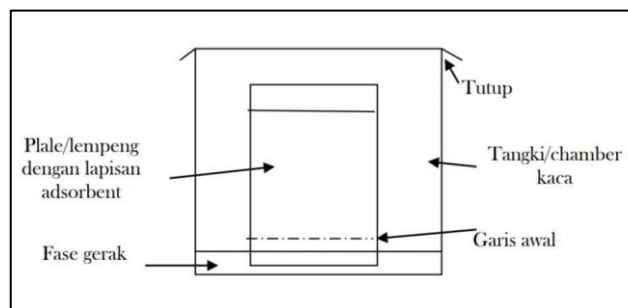
Kromatografi lapis tipis termasuk metode kromatografi planar yang berfungsi dalam pemisahan campuran senyawa. Pemisahan ini terjadi berdasarkan pendistribusian senyawa dalam fase diam dan fase gerak.

Pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT), fase diam yang digunakan umumnya terbuat dari serbuk silika, aluminium oksida, atau selulosa. Fase diam ini akan ditempelkan pada penyangga kaca, lembaran aluminium, atau bahan plastik dengan ketebalan sangat tipis 0,1-0,25 mm (Harborne, 1987). Fase gerak atau sering disebut eluen merupakan pelarut murni atau campuran pelarut. Pemilihan eluen bergantung pada senyawa yang akan dianalisis. Apabila hendak menganalisis senyawa polar, eluen yang digunakan sebaiknya cukup polar, dan begitu sebaliknya karena hal ini menggunakan prinsip *like dissolves like* (Rosamah, 2019).

Senyawa yang akan dianalisis dilarutkan homogen dan di totolkan pada fase diam menggunakan pipa kapiler, lalu diletakkan vertikal dalam suatu wadah pengembang berisi eluen. Batas bawah plat KLT harus terendam eluen, namun totolan noda harus berada di atas batas eluen. Interaksi langsung antara spot totolan dengan eluen tidak diperbolehkan sebab tidak akan terjadi migrasi atau pemisahan senyawa (Kemenkes RI, 2017).

Kemudahan migrasi pada plat KLT bergantung pada eluen yang dipakai dan kuat tidaknya komponen berinteraksi dengan fasa diam. Komponen yang memiliki interaksi kuat dengan eluen atau yang tidak teradsorpsi oleh adsorben akan merambat lebih tinggi, sehingga komponen akan terpisah yang ditandai adanya bercak noda. Untuk melihat noda dengan jelas, dapat digunakan sinar ultraviolet (UV) pada panjang gelombang 254 nm atau 365 nm. Untuk hasil optimal pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT), sampel yang ditotolkan pada plat harus sekecil dan sesempit mungkin, agar bercak tidak menyebar dan mengakibatkan puncak ganda, yang bisa mengganggu analisis (Rosamah, 2019).

Hasil yang didapat dari identifikasi senyawa menggunakan KLT yaitu perbandingan migrasi yang ditempuh oleh senyawa pada fase diam dibagi migrasi yang ditempuh oleh pelarut atau eluen yang dikenal dengan nilai  $R_f$  (*Retention factor*). Nilai  $R_f$  bergantung dengan sifat eluen yang digunakan dan senyawa yang dipisahkan. Rentang nilai  $R_f$  terbaik yakni antara 0,2-0,8. Metode ini paling banyak digunakan oleh banyak industri dalam penelitian dikarenakan sensitivitas alat tinggi, teknik cukup sederhana, biaya rendah dan waktu pengembangan yang cepat (Hujjatusnaini, 2021).



Sumber : Rosamah, 2019.

Gambar 2.7 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

#### d. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCT) memiliki alat yang dapat digunakan bersamaan dalam analisis kualitatif dan kuantitatif. bergantung pada jenis fase diam yang digunakan sebagai hasil dari proses partisi, adsorpsi, atau pertukaran ion (Hujjatusnaini, 2021).

## 2. Kromatografi Gas

Dalam kromatografi gas, fase geraknya berupa gas. Gas ini akan membawa sampel melalui fase diam yang berbentuk padat. Kromatografi ini merupakan jenis kromatografi partisi yang dapat memisahkan secara kuantitatif senyawa yang mudah menguap dengan titik didih 350°C-400°C (Teonata; *et. al.*,2021).

## E. Pemeriksaan Flavonoid

Flavonoid umumnya ditemukan dalam tumbuhan sebagai campuran berbagai jenis, dan sangat jarang ditemukan dalam bentuk tunggal di jaringan tanaman. Penggolongan flavonoid didasarkan pada sifat kelarutan dan reaksi warnanya.

### 1. Skrining Flavonoid

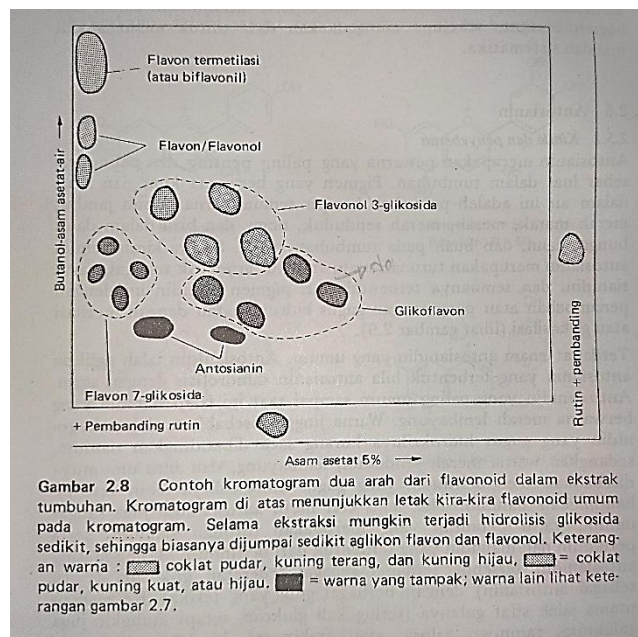
Identifikasi flavonoid dapat dilakukan secara kualitatif sebagai langkah awal mendeteksi adanya flavonoid yang terdapat dalam suatu tanaman. Berdasarkan Marjoni (2016) senyawa flavonoid secara umum dapat ditelusuri secara kualitatif dengan mencampur serbuk atau ekstrak yang telah dididihkan dengan 0,1 gram serbuk magnesium (Mg), 1 ml asam klorida (HCl) pekat, 2 ml amil alkohol. Hasil akan positif apabila terbentuk warna kuning, jingga, atau merah pada lapisan amil alkohol.

Sedangkan menurut literatur Markham pada tahun 1998, terdapat 3 uji dalam mengidentifikasi senyawa flavonoid dalam suatu tanaman. Pertama, uji wilstatter yang menggunakan serbuk magnesium (Mg) dan asam klorida (HCl) pekat sebagai pereaksi. Jika larutan berubah warna menjadi merah, ini menandakan senyawa positif flavonoid golongan flavonol dan flavanon. Kedua, uji *Bate Smith-Matcalfe* menggunakan pereaksi asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) yang dipanaskan bersama simplisia ataupun ekstrak. Hasil dinyatakan positif flavonoid, jika terbentuk warna jingga. Ketiga, uji dengan pereaksi larutan natrium hidroksida (NaOH) 10%. Hasil positif senyawa flavonoid golongan fenol jika terbentuk warna merah hingga-coklat (Markham, 1998).

## 2. Penegasan Flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis

Untuk memastikan adanya senyawa flavonoid dalam suatu tanaman, dapat digunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Umumnya, plat silika gel 60 F254 berfungsi sebagai fase diam. Sementara itu, fase geraknya bervariasi, seperti etil asetat, asam format, kloroform, metanol, dan air, atau kombinasi dari pelarut-pelarut tersebut (Hanani, 2015). Beberapa kombinasi pelarut umum yang sering dipakai dalam pengujian flavonoid adalah campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 8:2. Selain itu, terdapat juga eluen forestal yang terdiri dari asam asetat, HCl pekat, dan air dengan perbandingan 30:3:10; eluen fenol yang merupakan campuran fenol dan air dengan perbandingan 3:1; atau eluen BAA yang tersusun dari n-butanol, asam asetat, dan air dengan perbandingan 4:1:5 (Harborne, J.B, 1987:88)

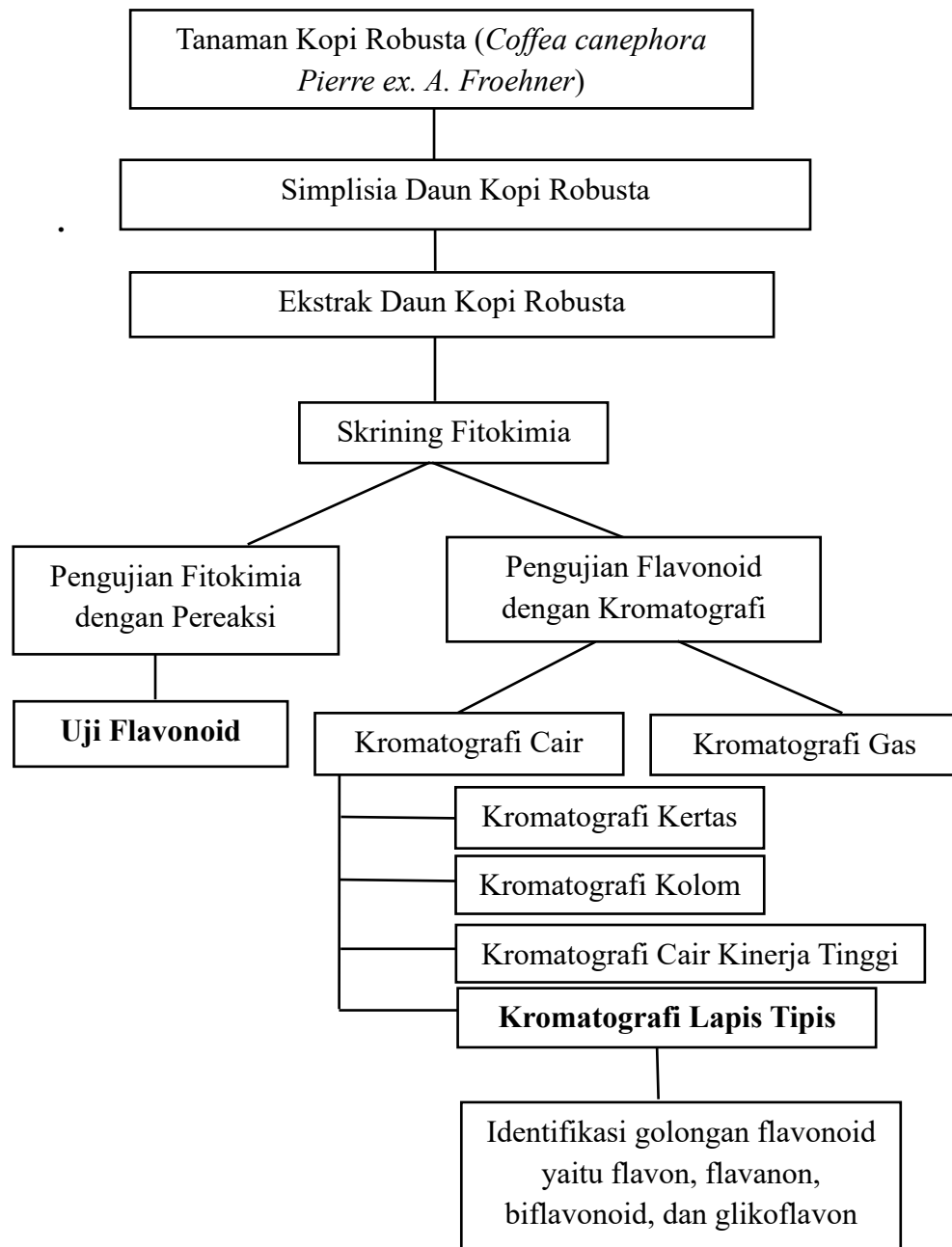
Secara umum untuk mengidentifikasi golongan flavonoid dapat menggunakan kromatogram BAA (n-butanol : asam asetat : air). Adanya flavon ditandai dengan bercak cokelat pudar, kuning terang, kuning-hijau di bawah Lampu UV dan memiliki nilai  $R_f$  0,75-0,83. Adanya flavonol ditandai dengan bercak cokelat pudar, kuning terang, hijau-kuning di bawah Lampu UV dan memiliki nilai  $R_f$  0,31-0,83. Adanya biflavonil ditandai dengan warna cokelat redup di bawah Lampu UV dan memiliki nilai  $R_f$  0,98 atau mendekati 1. Sedangkan, glikoflavon memiliki nilai  $R_f$  0,31-0,41 dan terbentuk bercak cokelat dan kuning redup, atau hijau-kuning di bawah Lampu UV (Harborne, 1987:88).



Sumber : Harborne, J.B, 1987:75

Gambar 2.8 Kromatogram BAA

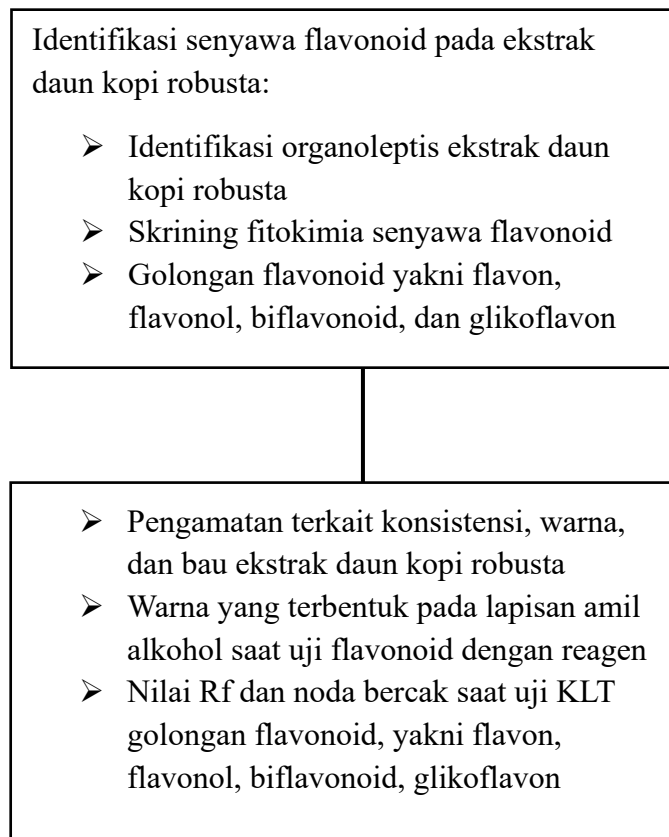
## F. Kerangka Teori



Sumber : Marjoni, 2016:9-10; J.B Harborne, 1987

Gambar 2.9 Kerangka Teori

## G. Kerangka Konsep



Gambar 2.10 Kerangka Konsep.

## H. Definisi Operasional

Tabel 2.1 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Sifat Organoleptik Daun Kopi Robusta	Pengenalan awal dengan melakukan deskripsi bentuk, rasa, bau, dan warna (Depkes RI, 2000:31)	Observasi	Pancaindra dan lembar <i>checklist</i>	Konsistensi bentuk, rasa, bau, dan warna	Nominal
Skrining Flavonoid	Senyawa pada lapisan amil alkohol berwarna kuning, jingga, atau merah (Marjoni, 2016:9-10)	Observasi	Lembar <i>checklist</i>	(+) pada lapisan amil alkohol berwarna kuning, jingga, atau merah  (-) pada lapisan amil alkohol tidak terdapat warna kuning, jingga, atau merah	Nominal
Golongan Flavonoid	Beberapa golongan flavonoid yang terdapat dalam daun kopi robusta yakni : flavon, flavonol, biflavonoid, dan glikoflavon	Metode kromatografi lapis tipis	Chamber, penggaris, dan plat Silika gel 60 F254	(+) <b>Flavon</b> memiliki nilai Rf 0,73 sampai 0,89. Di bawah sinar UV terdapat bercak oranye kecoklatan redup, kuning terang atau hijau-kuning (Harborne, 1987:88)	Nominal

Variabel Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Golongan Flavonoid	Beberapa golongan flavonoid yang berpotensi terdapat dalam daun kopi robusta yakni : flavon, flavonol, biflavonoid, dan glikoflavon	Metode kromatografi lapis tipis	Chamber, penggaris, dan plat Silika gel 60 F254	(+) <b>Flavonol</b> memiliki nilai Rf 0,31 sampai 0,83. Di bawah sinar UV terdapat bercak kuning terang, fluoresensi kuning, atau hitam redup (Harborne, 1987 :88)	Nominal
				(+) <b>Biflavonoid</b> memiliki nilai Rf mendekati 0,98 atau mendekati 1 Di bawah sinar UV terdapat bercak kuning terang, fluoresensi coklat redup (Harborne, 1987:88)	Nominal
				(+) <b>Glikoflavon</b> memiliki nilai Rf 0,31-0,41 dan terbentuk atau tidak terbentuk warna coklat redup. kuning terang, atau hijau-kuning di bawah Lampu UV (Harborne, 1987:88)	Nominal