

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif kualitatif yang dilaksanakan di Laboratorium. Tahap awal adalah mengekstraksi daun kopi robusta secara maserasi dengan pelarut etanol 96%. Selanjutnya, tahap skrining flavonoid menggunakan reagen yang kemudian diidentifikasi lebih lanjut melalui Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terkait golongan flavonoid dalam ekstrak daun kopi robusta. Variabel dalam penelitian ini yaitu sifat organoleptik ekstrak, skrining flavonoid, dan identifikasi golongan flavonoid berupa flavon, flavonol, glikoflavon, dan biflavonoid menggunakan metode KLT.

B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah daun kopi robusta (*Coffea canephora Pierre ex. A. Froehner*) yang didapatkan dari Desa Kenali, Kecamatan Belalau, Kabupaten Lampung Barat.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Botani Unila untuk determinasi tanaman. Kemudian, di Laboratorium Kimia Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dilakukan proses pembuatan simplisia, ekstraksi, skrining organoleptik dan flavonoid daun kopi robusta. Selanjutnya, proses identifikasi golongan flavonoid menggunakan metode kromatografi lapis tipis di Laboratorium Steril Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari – April 2025.

D. Pengumpulan Data

1. Cara Pengumpulan Data

Setelah dilakukan proses elusi KLT, pengambilan data dilakukan dengan cara mengamati bercak noda yang terbentuk sebelum dan sesudah disinari di bawah

Lampu UV 254 nm dan 365 nm.

Lalu, Nilai R_f (*Retention Factors*) ditentukan menggunakan rumus berikut.

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh analit}}{\text{jarak yang ditempuh eluen}}$$

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Pada penelitian ini alat-alat yang diperlukan yaitu oven, *rotary evaporator*, *waterbath*, *hot plate*, bejana maserasi, timbangan analitik, blender, chamber, nampan stainless, wadah kaca simplisia, beaker glass 100 mL, gelas ukur 100 mL dan 25 mL, erlenmeyer 250 mL, corong glass 60 mL, cawan porselen 75 mL, Lampu UV 254 & 365 nm, tabung reaksi, pipet tetes sedang, pipet ukur 1,0 mL dan 2,0 mL, batang pengaduk, penggaris, *cutter*, pipa kapiler 2 μ L, pinset, dan botol reagen.

b. Bahan

Pada penelitian ini bahan-bahan yang diperlukan yakni daun kopi robusta, aquadest, etanol 96% teknis, aluminium foil, kertas saring, asam klorida pekat (HCl pekat), serbuk Magnesium (Mg), amil alkohol ($C_5H_{12}O$), asam klorida 2N (HCl 2N), plat silika 60 F254, n-butanol ($C_4H_{10}O$), asam asetat glasial (CH_3COOH).

3. Prosedur Kerja Penelitian

a. Determinasi Tanaman

Sampel penelitian daun kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex. *A. Froehner*) yang diperoleh dari desa Kenali, Kecamatan Belalau, Kabupaten Lampung Barat kemudian dilakukan determinasi di Laboratorium Botani Universitas Lampung guna memastikan kebenaran sampel daun kopi robusta dengan cara mengidentifikasi bagian-bagian tanaman.

b. Pembuatan Simplisia Daun Kopi Robusta

Berikut merupakan tahap pembuatan simplisia daun kopi robusta (Depkes RI, 1985) :

- 1) Diambil daun kopi robusta yang memenuhi kriteria yakni daun tua dan segar (helai daun ke 3 sampai 5 pada batang)

- 2) Dilakukan sortasi basah kumpulan daun kopi robusta dari zat pengotor yang menempel
- 3) Dicuci daun kopi robusta dengan air mengalir
- 4) Dilakukan perajangan daun kopi robusta kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 8 jam (Depkes RI, 1995)
- 5) Disortir kering simplisia agar bebas dari kotoran yang tertinggal
- 6) Dihaluskan simplisia menggunakan blender, kemudian dilakukan pengayakan dengan ayakan mesh no. 40 agar didapat bubuk homogen
- 7) Setelah diayak, serbuk simplisia daun kopi robusta disimpan pada suhu ruang dan dalam wadah tertutup.

c. Ekstraksi Simplisia Daun Kopi Robusta

Menurut Marjoni (2016) langkah pembuatan ekstrak secara maserasi yakni sebagai berikut.

- 1) Dibilas bejana maserasi dengan pelarut etanol 96% guna memastikan bahwa bejana tidak bocor, lalu dikeringkan
- 2) Sebanyak 300 gram simplisia daun kopi robusta dimasukkan ke dalam bejana maserasi
- 3) Ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 3000 mL ke dalam bejana maserasi hingga simplisia terendam semua, diaduk selama 10 menit
- 4) Bejana maserasi ditutup rapat dan dibalut alumunium foil, setelah itu diletakkan di ruang gelap dan dibiarkan selama 3 x 24 jam. Diaduk secara berkala
- 5) Setelah 3 hari, isi dalam bejana diserukai dan diperas
- 6) Disaring ampas maserasi menggunakan kain saring dengan bantuan corong di atas erlenmeyer
- 7) Hasil penyaringan dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* untuk diuapkan dengan suhu 40°C sampai pelarut pada filtrat habis
- 8) Pindahkan ekstrak ke dalam cawan penguap dan diuapkan di atas penangas air atau *waterbath* suhu 40°C hingga terbentuk ekstrak kental
- 9) Selanjutnya dimasukkan dalam wadah tertutup rapat

d. Uji Organoleptik

Dilakukan pemeriksaan organoleptik dari ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex. A. Froehner) menggunakan pancaindra yang meliputi deskripsi bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes RI, 2000).

e. Skrining Flavonoid

Mengacu pada Marjoni (2016) tahapan dalam skrining flavonoid yakni sebagai berikut.

- 1) Sebanyak 1 gram ekstrak daun kopi robusta ditimbang dan selanjutnya dipindahkan ke dalam *beaker glass*.
- 2) Sebanyak 50 ml akuades dituang ke dalam *beaker glass*.
- 3) Dipanaskan larutan di atas *hot plate* selama 5 menit
- 4) Disaring filtrat menggunakan corong glass yang dilapisi kertas saring, lalu dipipet filtrat sebanyak 5 ml
- 5) Ditambah serbuk magnesium (Mg) 0,1 gram, HCl pekat 1 mL, dan amil alkohol 2 mL
- 6) Dikocok dan biarkan sampai terbentuk lapisan yang memisah
- 7) Apabila sampel positif flavonoid, maka ditandai warna kuning, jingga, atau merah pada lapisan amil alkohol

f. Identifikasi Golongan Flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis

Menurut literatur Harborne (1987), tahap uji flavonoid menggunakan KLT yakni sebagai berikut.

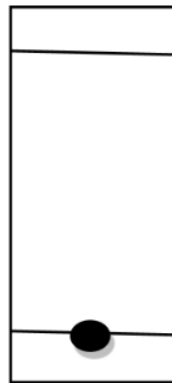
- 1) Tahap Pembuatan Eluen BAA (butanol : asam asetat : air)
 - a. Disiapkan alat dan bahan
 - b. Dibuat eluen BAA dengan cara tambahkan ke dalam erlenmeyer dengan bantuan gelas ukur masing-masing sebanyak 20 mL n-butanol, 5 mL asam asetat, 25 mL aquadest (4:1:5), lalu digoyangkan erlenmeyer hingga larutan homogen
 - c. Setelah homogen, simpan dalam wadah tertutup

2) Penjenuhan Chamber Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

- a. Disiapkan kertas saring dengan ukuran menyesuaikan besar chamber umumnya tinggi 18 cm, lebar sesuai dengan panjang chamber
- b. Dituangkan campuran eluen (n-butanol : asam asetat : aquadest) ke dalam chamber KLT dengan volume dan ketinggian 0,5 cm sampai 1 cm dalam chamber
- c. Dimasukkan kertas saring pada chamber hingga tercelup dalam pelarut
- d. Ditutup rapat chamber, biarkan selama 1 jam agar jenuh, hindari dari gangguan

3) Persiapan Plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Larutan Uji

- b. Digunting plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ sesuai ukuran yakni 10 cm x 3 cm
- c. Plat KLT diberi garis menggunakan pensil dengan batas jarak yakni 1 cm tepi batas atas dan 1,5 cm batas bawah; 1,5 dari tepi kanan dan kiri dari ujung plat KLT. Digambarkan sebagai berikut.



- d. Dilakukan aktivasi plat KLT menggunakan oven (suhu 100°C selama 30 menit)
- e. Dilakukan hidrolisis ekstrak etanol daun kopi robusta dengan HCl 2N, lalu dipanaskan selama 30 menit pada suhu 100°C, setelah itu, teteskan etanol 1-2 tetes
- f. Dilakukan penotolan ekstrak daun kopi robusta sebanyak 3 kali atau 6 µL menggunakan pipa kapiler 2 µL pada plat KLT yang telah diberi tanda
- g. Diletakkan plat KLT yang telah ditotolkan ekstrak ke dalam chamber
- h. Diamati perubahan yang terjadi pada plat KLT (selama 15 menit sampai 1 jam)

- 4) Identifikasi Golongan Flavonoid Daun Kopi Robusta
 - a. Disiapkan Lampu UV yang memiliki gelombang 254 nm dan 365 nm
 - b. Dilihat perubahan warna bercak noda yang terjadi sebelum disinari Lampu UV 254 nm dan sesudah disinari Lampu UV 254 nm dan UV 365 nm, lalu hitung nilai Rf
 - c. Diidentifikasi golongan flavonoid dengan membandingkan nilai Rf dan warna bercak noda pada kromatogram dengan literatur Harborne 1987.

E. Pengolahan dan Analisis Data

Penyajian data dari penelitian ini dilakukan dalam bentuk tabel, yang mencakup warna bercak noda pada plat Silika gel 60 F254 beserta nilai Rf. Data tersebut digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa flavonoid serta mendeteksi golongan flavonoid yang terdapat pada ekstrak daun kopi robusta. Selanjutnya, data dianalisis secara deskriptif kualitatif.