

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan metode praklinis yang dilakukan di laboratorium bahan alam Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.2 Sampel

Tanaman kopi dideterminasi oleh Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor. Determinasi dilakukan untuk menentukan apakah spesies yang digunakan sesuai dengan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini.

3.3 Bahan dan Alat

berikut bahan-bahan dan alat-alat yang digunakan :

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan terdiri dari alat-alat gelas, mikro pipet, cawan penguap, penangas air (*waterbath*), neraca analitik, Maserator, seperangkat alat *rotary evaporator* dan *spektrofotometer UV-Vis*.

1.3.2 Bahan

Biji kopi hijau dan biji kopi hitam asli dari mekarbuana, *Reagen Mayer*, *Reagen Wagner*, *Reagen Bouchardat*, asam sulfat pekat, HCl 2 N, besi (III) klorida 1%, Mg, HCl 2%, asam asetat anhidrat; DPPH, etanol 70%, dan vitamin C.

3.4 Lokasi Penelitian

Lokasi Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Balitro, Bogor, pada tanggal 07 Juni 2022. UPT Labolaturium Materia Medica Batu, Malang pada Tanggal 08 Agustus 2022. Laboratorium bahan alam, Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang pada Tanggal 21 Juni 2022.

3.5 Variabel Penelitian

Berikut beberapa variabel yang digunakan dalam penelitian ini :

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu Ekstrak etanol kopi hijau dan kopi hitam Desa Mekarbuana, Kecamatan Tegalwaru, Kabupaten Karawang.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pengujian antioksidan dengan metode DPPH

3.6 Prosedur Penelitian

Berikut adalah tahap prosedur dalam melakukan uji antioksidan ekstrak etanol biji kopi hijau dan biji kopi hitam Desa Mekarbuana :

3.6.1 Persiapan Sampel

Biji kopi hijau dan biji kopi hitam robusta yang didapatkan di Desa Mekarbuana, Kecamatan Tegalwaru, Kabupaten Karawang, Jawa Barat.

3.6.2 Determinasi Tanaman

Kopi di determinasi di Pusat Penelitian Herballmart UPT Laboratorium Herba Medica Batu, Malang. Tujuan determinasi tanaman yaitu untuk mendapatkan kebenaran identitas dengan jelas dari suatu tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian.

3.6.3 Prosedur ekstraksi biji kopi hijau dan biji kopi hitam metode maserasi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. 1000 gram serbuk simplisia kopi hijau dan kopi hitam dimasukkan ke dalam maserator, pelarut etanol 70% dimasukkan hingga simplisia tersebut terendam seluruhnya. Diamkan selama 3x24 jam, sambil sesekali diaduk. Setelah 3 hari, maserat dikeluarkan dan ditampung. Remaserasi dilakukan selama 3 hari hingga maserat menjadi jernih. Hasil penampungan pelarut dicampurkan kemudian dilakukan pemekatan ekstrak menggunakan alat *vacum rotary evaporator* dilanjutkan dengan *water bath* pada suhu 70°C (Yulianti, 2015).

3.6.4 Skrining Fitokimia

Setelah diperoleh ekstrak kental, kemudian dilakukan uji skrining fitokimia berupa alkaloid, flavonoid, fenolik, kuinon, saponin, tanin, steroid dan terpenoid.

Pembuatan larutan uji ekstrak kopi hijau dan ekstrak kopi hitam Mekarbuana, dengan menimbang 500 mg ekstrak etanol biji kopi hijau dan biji kopi hitam dalam 50ml etanol (Abriani & Fikayuniar, 2020)

Uji**Alkaloid**

Ambil 1 ml larutan ekstrak lalu tambahkan 2 ml HCl 2N kemudian kocok perlahan lalu pisahkan dalam 2 tabung yang berbeda masing-masing tabung 1ml.

Tabung 1, tambahkan 1 tetes reagen dragondroff, keberadaan alkaloid ditandai dengan terjadinya endapan merah atau jingga dan lapisan bawah cairan HCl.

Tabung 2, tambahkan 1 tetes mayer, keberadaan alkaloid akan ditandai dengan adanya 2 lapisan yang terbentuk, lapisan bawah berwarna hijau dan lapisan bawah endapan putih.

Uji**Flavonoid**

Ambil 1 ml ekstrak masukan kedalam tabung, tambahkan serbuk Mg q.s lalu masukan 10 tetes HCl pekat maka apabila hasil positif akan terbentuk endapan putih.

Uji**Fenolik**

Ambil 1 ml ekstrak masukan kedalam tabung, tambahkan 10 tetes FeCl_3 1% lalu amati, keberadaan Fenolik ditandai dengan adanya perubahan warna hitam pada sampel.

Uji**Kuinon**

Ambil 1 ml ekstrak masukan dalam tabung, tambahkan NaOH 5 tetes lalu amati, keberadaan kuinon ditandai dengan perubahan warna jingga pada sampel.

Uji**Saponin**

Ambil 1 gram ekstrak kental larutkan dengan aquades yang sudah dipanaskan sebanyak 10ml, diamkan sampai tidak terlalu panas kocok selama 10-15 detik lalu amati, keberadaan saponin ditandai dengan adanya busa/buih pada sampel.

Uji**Tanin**

Ambil ekstrak sebanyak 3 ml masukan kedalam tabung, lalu tambahkan 5 tetes gelatin lalu amati perubahan yang terjadi, keberadaan tanin ditandai dengan adanya endapan putih pada sampel.

Uji**Steroid****dan****Triterpenoid**

Ambil larutan ekstrak 2ml, lalu diuapkan, tambahkan 5 tetes liberman bouchard kemudian amati perubahan yang terjadi, adanya steroid dan terpenoid ditandai dengan adanya cincin biru kehijauan pada sampel.

3.6.5 Uji Aktivitas Antioksidan ekstrak biji kopi dengan metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH 50 ppm

Ditimbang sebanyak 5 mg DPPH dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian dilarutkan menggunakan pelarut etanol dan ditepatkan volumenya hingga tanda batas kemudian diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya ukur panjang gelombang maksimum DPPH 515 nm (Didit Purwanto dkk, 2017)

b. pembuatan larutan uji ekstrak biji kopi hijau dan biji kopi hitam

1. Larutan Induk (1000 ppm)

100 mg ekstrak etanol biji kopi hijau dan biji kopi hitam dilarutkan ke dalam 100 ml etanol p.a dalam labu ukur.

$$\text{Ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}} \rightarrow 1000 \text{ ppm} = \frac{\text{mg}}{0,1 \text{ L}}$$

$$\text{mg} = 1000 \text{ ppm} \times 0,1 \text{ L}$$

$$= 100 \text{ mg} \rightarrow 0,1 \text{ g}$$

2. Larutan Seri

Ambil masing-masing larutan ekstrak etanol biji kopi hijau dan biji kopi hitam (diambil dari larutan induk yang sudah dibuat) sebanyak 0,1ml, 0,2ml, 0,3ml, 0,4ml, 0,5ml, lalu masing-masing dimasukkan dalam labu ukur 10ml dan tambahkan etanol p.a sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan ekstrak etanol biji kopi hijau dan biji kopi hitam dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm.

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$10 \text{ ppm} = V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$= 10 \text{ ml} \cdot 10 \text{ ppm} = \dots \times 1000 \text{ ppm}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \cdot 10 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0,1 \text{ ml} = 100 \text{ Mikroliter}$$

$$20 \text{ ppm} = V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$= 10 \text{ ml} \cdot 20 \text{ ppm} = \dots \times 1000 \text{ ppm}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \cdot 20 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0,2 \text{ ml} = 200 \text{ Mikroliter}$$

$$30 \text{ ppm} = V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$= 10 \text{ ml} \cdot 30 \text{ ppm} = \dots \times 1000 \text{ ppm}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \cdot 30 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0,3 \text{ ml} = 300 \text{ Mikroliter}$$

$$40 \text{ ppm} = V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$= 10 \text{ ml} \cdot 40 \text{ ppm} = \dots \times 1000 \text{ ppm}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \cdot 40 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0,4 \text{ ml} = 400 \text{ Mikroliter}$$

$$50 \text{ ppm} = V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$= 10 \text{ ml} \cdot 50 \text{ ppm} = \dots \times 1000 \text{ ppm}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \cdot 50 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0,5 \text{ ml} = 500 \text{ Mikroliter}$$

c. Pembuatan larutan Kontrol positif

Ditimbang sebanyak 5 mg asam askorbat dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian dilarutkan dengan menggunakan etanol p.a dan ditepatkan volumenya hingga tanda batas. Selanjutnya, ambil masing-masing larutan tersebut sebanyak 0,2 mL, 0,6 mL, 1 mL, 1,4 mL, dan 1,8 mL, lalu diencerkan kembali dengan etanol p.a dalam labu ukur 10 mL sehingga diperoleh larutan kontrol positif dengan konsentrasi 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm dan 9 ppm.

Pembuatan larutan induk control positif :

$$\text{Ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}} = 50 \text{ ppm} \frac{\text{mg}}{0,1 \text{ L}}$$

$$\text{Mg} = 50 \text{ ppm} \times 0,1 \text{ L}$$

$$= 5 \text{ mg}$$

Pembutan larutan seri control positif :

$$1 \text{ ppm} = V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$= 10 \text{ ml} \cdot 1 \text{ ppm} = \dots \times 50 \text{ ppm}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \cdot 1 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} = 0,2 \text{ ml} = 200 \text{ Mikroliter}$$

$$3 \text{ ppm} = V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$= 10 \text{ ml} \cdot 3 \text{ ppm} = \dots \times 50 \text{ ppm}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \cdot 3 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} = 0,6 \text{ ml} = 600 \text{ Mikroliter}$$

$$5 \text{ ppm} = V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$= 10 \text{ ml} \cdot 5 \text{ ppm} = \dots \times 50 \text{ ppm}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \cdot 5 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} = 1 \text{ ml} = 1000 \text{ Mikroliter}$$

$$7 \text{ ppm} = V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$= 10 \text{ ml} \cdot 7 \text{ ppm} = \dots \times 50 \text{ ppm}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \cdot 7 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} = 1,4 \text{ ml} = 1400 \text{ Mikroliter}$$

$$9 \text{ ppm} = V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$= 10 \text{ ml} \cdot 9 \text{ ppm} = \dots \times 50 \text{ ppm}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \cdot 9 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} = 1,8 \text{ ml} = 1800 \text{ Mikroliter}$$

d. Perhitungan nilai IC50

Nilai IC50 dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH

dari masing-masing konsentrasi larutan sampel. Setelah didapatkan presentasi inhibisi dari masing-masing konsentrasi, kemudian ditentukan persamaan $y=a +bx$ dengan perhitungan secara regresi linear dimana x dan y adalah persentasi inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan Inhibition Concentration 50% (IC50)

e. Penentuan Nilai IC50

Nilai IC50 merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji ($\mu\text{g/ml}$) yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50% (mampu menghambat/meredam proses oksidasi sebesar 50%. Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya. Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/ml}$) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % peredaman (antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu Y).

Tabel 3.1 Kategori kekuatan aktivitas antioksidan

Kategori	Konsentrasi Antioksidan (ppm)
Sangat kuat	<50
Kuat	50-100
Sedang	101-150
Lemah	151-200

(Sumber : Mardawati *et al.*, 2008).

3.7 Diagram alir penelitian





