

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan menggunakan metode penelitian kuantitatif yang bertujuan untuk mengetahui kandungan kadar asam klorogenat pada ekstrak biji kopi robusta (*Coffea Canephora Pierre ex A. Froehner*) dengan menggunakan metode HPLC.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama tujuh bulan terhitung dari bulan Desember 2022 sampai bulan Agustus 2023 di Laboratorium Bahan Alam Universitas Buana Perjuangan Karawang dan Laboratorium sentral Universitas Padjajaran Bandung.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Pohon kopi hijau robusta (*Coffea Canephora Pierre ex A. Froehner*) yang tumbuh di pegunungan Sanggabuana, Loji, Karawang, Jawa Barat.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kopi hijau robusta (*Coffea Canephora Pierre ex A. Froehner*) yang dipanen pada umur 11 bulan. Kualitas kopi yang baik harus sepadan dengan umurnya, dan sampelnya yang digunakan sebanyak 200 gram biji kopi robusta.

3.4 Bahan dan Alat Yang Digunakan

3.4.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari biji kopi hijau robusta, (*Coffea Canephora Pierre ex A. Froehner*), etanol 96%, asam klorogenat standar (Sigma-Aldrich), aquades, dan metanol HPLC.

3.4.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari maserator, *rotary evaporator*, neraca analitik (neraca electronic), botol berwarna coklat, alat gelas

(pyrex), batang pengaduk, spatula, pipet penetes, filter membran ukuran 0,45 μ m, mikropipet, vial dan sistem HPLC.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea Canephora Pierre ex A. Froehner*).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah analisis skrining fitokimia pada sampel ekstrak biji kopi hijau.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Berikut ini merupakan hasil tabel definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian:

Tabel 3.1 Tabel Definisi Operasional Variabel

Variabel penelitian	Definisi operasional	Alat ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Bebas				
Kadar asam klorogenat	Analisis kadar asam klorogenat metode HPLC	HPLC.	Ordinal	%
Linieritas	Kemampuan untuk memperoleh hasil pengujian pada konsentrasi analit dalam rentang tertentu	HPLC	Rasio	angka
Variabel Terikat				
Skrining fitokimia alkaloid	Pengujian dengan menggunakan reagen ditandai	Pereaksi	Nominal	Positif Negatif

	dengan adanya perubahan warna			
Skrining fitokimia flavonoid	Pengujian dengan menggunakan reagen ditandai dengan adanya perubahan warna	Pereaksi	Nominal	Positif Negatif
Skrining fitokimia saponin	Pengujian dengan menggunakan reagen ditandai dengan adanya perubahan warna	Pereaksi	Nominal	Positif Negatif
Skrining fitokimia tanin dan polifenol	Pengujian dengan menggunakan reagen ditandai dengan adanya perubahan warna	Pereaksi	Nominal	Positif Negatif

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Determinasi Tanaman

Identifikasi pemastian tumbuhan dilakukan di Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional di Karanganyar, Jawa Tengah. Tujuan dari pemastian tumbuhan adalah untuk membuktikan kebenaran identitas tumbuhan yang digunakan sesuai prediksi dalam proses penelitian.

3.7.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Kopi Hijau

Proses ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dilakukan dengan memasukkan 200 g biji kopi hijau ditambah dengan 600 mL pelarut etanol 96% dalam wadah tertutup, terhindar dari sinar matahari langsung, dan diekstrak selama tiga hari sambil sesekali diaduk. Hasil ekstraksi disaring melalui corong buchner hingga diperoleh filtrat. Filtratnya kemudian dipekatkan pada suhu 40°C dengan menggunakan penguap putar untuk

memperoleh ekstrak kental etanol pekat dari biji kopi hijau (*Coffea Canephora Pierre ex A. Froehner*) (Marcelinda *et al.*, 2016). Ekstrak pekat ditimbang dan dihitung rendemennya. Perhitungan rendemen dilakukan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia kering}} \times 100\%$$

3.7.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan dengan melarutkan ekstrak biji kopi dengan reagen pendeteksi golongan pada tabung reaksi (Mangiwa, 2019). Pengujian fitokimia yang akan dilakukan terdiri dari:

1. Pengujian Alkaloid

Pengujian alkaloid dilakukan dengan mencampurkan ekstrak dengan 1 mL HCL dan aquades, dipanaskan dan didinginkan campuran selama 5 menit, kemudian dilakukan penyaringan.

Filtrat dianalisis menggunakan pereaksi mayer dan dragendorf. Adanya alkaloid pada pereaksi mayer ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna kuning, sedangkan adanya alkaloid dalam pereaksi dragendorf ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah jingga.

2. Pengujian Flavonoid

Pengujian flavonoid dilakukan dengan melarutkan 1 mL ekstrak dan menaburkan bubuk magnesium secukupnya Bersama dengan 10 tetes asam klorida pekat. Terbentuknya warna jingga, merah muda, atau merah tua yang tidak hilang dalam waktu 3 menit menunjukkan adanya flavonoid.

3. Pengujian Saponin

Pengujian saponin dilakukan dengan cara melarutkan 1 mL ekstrak dalam 20 mL air panas, didinginkan dan disaring. Filtrat yang

dihasilkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Pembentukan busa yang stabil menunjukkan adanya saponin.

4. **Pengujian Tanin**

Pengujian tanin dilakukan dengan cara melarutkan 1 mL ekstrak dalam 20 mL air panas, kemudian didinginkan dan disaring. Hasil penyaringan ditambah dua sampai tiga tetes larutan FeCl_3 1%. Terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam kuat menunjukkan adanya tanin.

5. **Pengujian Fenolik**

Pengujian fenolik dilakukan dengan cara melarutkan 1 mL ekstrak dengan 10 tetes larutan FeCl_3 1%. Terbentuknya warna merah, biru, ungu dan hitam menunjukkan adanya senyawa fenolik.

3.8 **Proses Pengujian High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

3.8.1 **Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar Asam Klorogenat**

Larutkan 2,5 mg standar asam klorogenat dalam 25 mL metanol untuk mendapatkan larutan induk 100 ppm. Larutan induk 100 ppm kemudian dijadikan beberapa variasi pengenceran berbeda dibuat dari konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12 ppm dalam labu berukuran 10 mL dengan pengambilan 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2 mL

3.8.2 **Pembuatan Larutan Ekstrak biji kopi hijau (*Coffea Canephora*)**

Larutkan 50 mg ekstrak biji kopi hijau dalam 50 mL metanol HPLC untuk mendapatkan larutan induk 1000 ppm. Larutan induk 1000 ppm kemudian dijadikan beberapa variasi pengenceran berbeda dibuat dari konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12 ppm dalam labu berukuran 10 mL dengan mengambil 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2 mL.

3.9 Analisis Kadar Asam Klorogenat Metode HPLC

Pada analisa ekstrak etanol biji kopi dengan metode HPLC digunakan kolom C18 dengan panjang 150 mm dan diameter 4,6 mm digunakan sebagai fase diam, dan metanol HPLC banding asam asetat 1% (1:1) digunakan sebagai fase gerak dengan laju aliran 1 mL/menit dan diinjeksikan sebanyak 10 μ L.

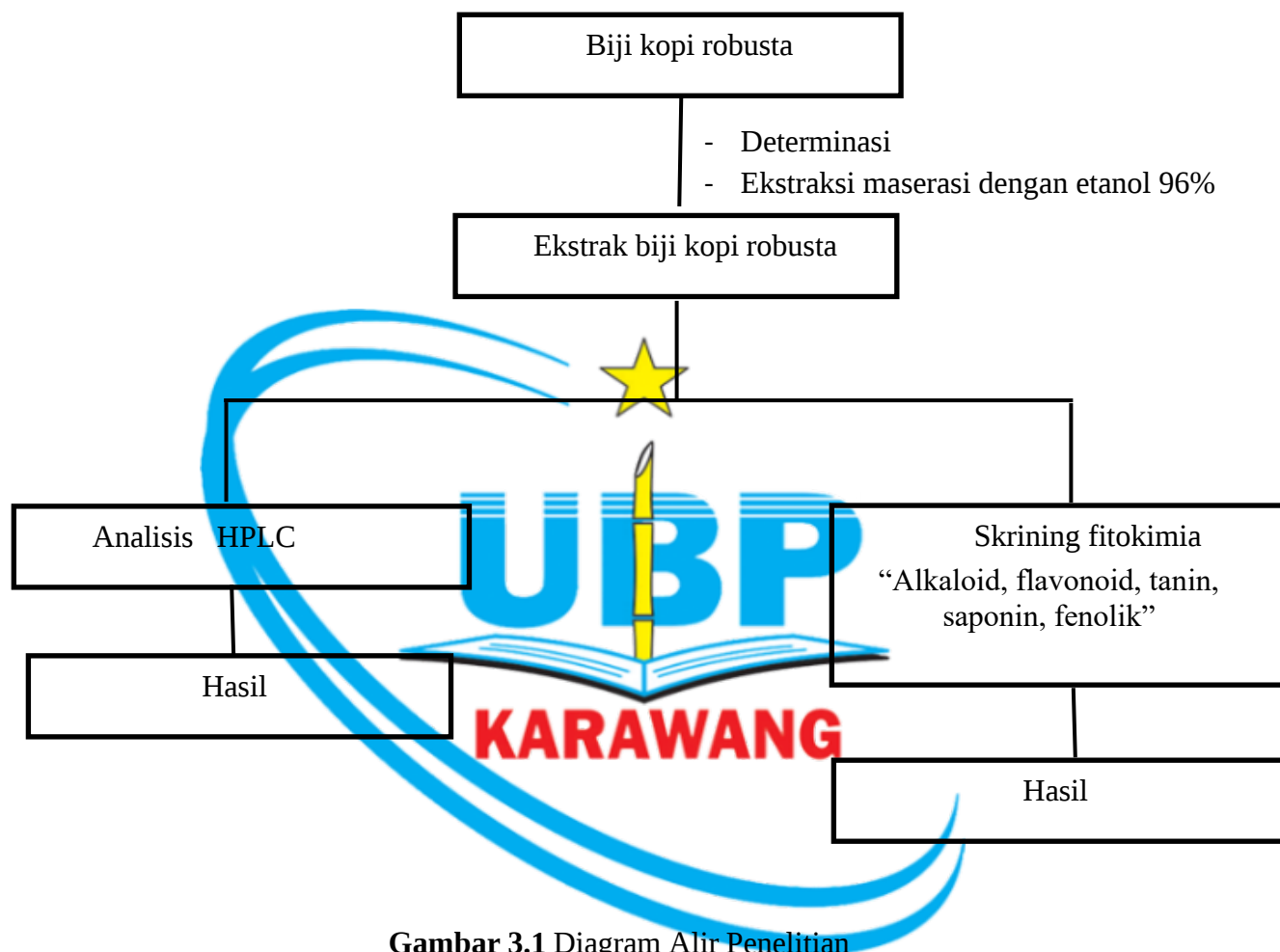
Sampel kopi dan standar yang sudah diencerkan disonikasi dalam 15 menit, disaring menggunakan filter membran ukuran 0,2 μ m dengan volume larutan 10 μ l diinjeksikan ke sistem HPLC dengan memodifikasi panjang gelombang 335 nm. Panjang gelombang yang digunakan didasarkan pada penelitian terdahulu dengan Panjang gelombang 335 nm dengan nilai absorbansi yang didapat 3,55 (Setianingsih, 2023).

3.10 Analisis Data

Pada penelitian ini analisis kandungan kadar asam klorogenat ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea Canephora Pierre ex A. Froehner*) menggunakan metode HPLC dapat dilihat pada luas permukaan di bawah kurva yang diperoleh. Hasil tersebut kemudian dianalisis secara kuantitatif untuk mengetahui kandungan kadar asam klorogenat pada sampel menggunakan metode HPLC.

3.11 Diagram Alir Penelitian

Rancangan diagram alir pada penelitian kali ini adalah sebagai berikut:



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian