

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis studi yang dimanfaatkan ialah eksperimental bersama metode studi kualitatif yang bertujuan agar meyakini kadar asam klorogenat pada ekstrak biji kopi hijau arabika dengan memanfaatkan metode HPLC.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Studi ini dimanfaatkan 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 Arabika (*Coffea arabica*) yang tumbuh dipegunungan sangga buana, Loji, Karawang, Jawa barat.

3.3.2 Sampel

Sampel yang dimanfaatkan pada studi ini yakni biji kopi hijau Arabika (*Coffea arabica*) yang sudah siap di panen yakni pada umur 7 bulan. Karena kualitas kopi yang baik harus sesuai dengan umurnya dan digunakan sampel sebanyak 200 gr biji kopi hijau arabika.

3.4 Bahan dan Alat yang digunakan

3.4.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang dimanfaatkan pada studi ini terdiri dari biji kopi hijau arabika, (*Coffea arabica*), etanol 96%, kadar asam klorogenat standar (Sigma-Aldrich), aquadest, dan methanol HPLC.

3.4.2 Alat penelitian

Alat yang dimanfaatkan pada studi ini menggunakan berbagai alat yang terdiri dari maserator, *rotary evaporator*, timbangan analitik (*Electronic scale*), botol coklat, alat-alat gelas (Pyrex), batang pengaduk, spatula, pipet tetes, penyaring membrane 0,45 µm, mikrto pipet, vial dan system HPLC, Mesin HPLC.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Klasifikasi Variabel

a. Variabel bebas

Variabel bebas pada studi ini ialah ekstrak biji kopi hijau arabika (*Coffea Arabica*) yang telah siap panen dengan metode HPLC.

b. Variabel terikat

Variabel terikat pada studi ini ialah analisis skrining fitokimia pada sampel ekstrak biji kopi hijau.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Berlandaskan ini ialah hasil tabel definisi operasional variable yang terdapat pada studi:

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 agar memperoleh hasil uji pada Konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan	HPLC	Rasio angka
Variabel terikat			
Skrining alkaloid	Fitokimia Pengujian bersama	Pereaksi	Nominal positif Negative

	pereaksi yang ditandai dengan adanya perubahan warna		
Skrining flavonoid	Fitokimia pengujian bersama pereaksi yang Ditandai bersama Terdapat alterasi warna	Pereaksi	Nominal positif Negative
Skrining saponin	Fitokimia pengujian dengan pereaksi yang Ditandai bersama Terdapat alterasi warna	Pereaksi	Nominal positif Negative
Skrining tannin dan polifenol	Fitokimia pengujian bersama pereaksi yang Ditandai bersama Terdapat alterasi warna	Pereaksi	Nominal positif Negative

KARAWANG

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Determinasi Tanaman

Identifikasi tanaman di determinasi di Balai Besar studi serta Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Karanganyar, Jawa Tengah. Tujuan dijalankan determinasi ialah agar membuktikan kenyataan identitas bahwa tanaman yang digunakan benar sesuai prediksi pada proses penelitian.

3.7.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Kopi Hijau

Pada proses ekstraksi bersama memanfaatkan metode maserasi dilakukan penimbangan sebesar 200 gr serbuk biji kopi hijau dimaserasi diwadah bejana tertutup dengan memasukkan 200 gr serbuk biji kopi hijau ditambahkan 600 mL pelarut etanol 96% serta ditutup rapat terhindar dari sinar matahari langsung, diekstrak selama tiga hari dan diaduk setiap 8 jam sekali. Hasil ekstraksi kain memanfaatkan corong Buchner sehingga mendapatkan filtrate. Filtrate selanjutnya dipekatkan memanfaatkan rotary evaporator pada suhu 40°C selanjutnya menghasilkan ekstrak kental etanol biji kopi hijau (*Coffea arabika*) (Marcelinda et al., 2016). Ekstrak kental ditimbang dan dihitung rendemennya. Perhitungan rendemen dilakukan

menggunakan persamaan sebagai berikut:



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

3.7.3 Skrining Fitokomia

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

1. Pengujian alkaloid

Pengujian alkaloid dilakukan dengan mencampurkan ekstrak bersama 1 mL HCL serta aquadest, campuran dipanaskan selama 5 menit serta didinginkan sesudah itu dilakukan penyaringan.

Filtrate dianalisis bersama pereaksi mayer serta dragendroft. Terdapat alkaloid pada pereaksi mayer ditandai bersama terwujudnya endapan kuning, selanjutnya adanya alkaloid pada pereaksi dragendroft ditandai bersama terwujudnya endapan merah jingga.

2. Pengujian flavonoid

Pengujian flavonoid dijalankan bersama upaya melarutkan 1 mL ekstrak bersama 10 mL methanol panas dan dimasukkan kembali 0,1 gr serbukmg serta 5 tetes HCL pekat. Terbentuknya warna jingga, merah muda atau merah tua yang tidak hilang dalam 3 menit menandakan adanya flavonoid.

3. Pengujian saponin

Pengujian saponin dijalankan bersama upaya melarutkan 1 mL ekstrak kedalam 20 mL air panas, didinginkan serta disaring. Filtrat yang dihasilkan selanjutnya dikocok kuat-kuat sewaktu 10 detik. Terbentuknya buih yang stabil menandakan adanya saponin.

4. Pengujian tannin

Pengujian tannin dan polifenol dijalankan bersama upaya melarutkan 1 mL ekstrak bersama 20 mL air panas, selanjutnya didinginkan serta disaring. Hasil penyaringan ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Terbentuknya warna ungu, hijau, biru, merah, atau hitam kuat menandakan terdapat tannin.

5. Pengujian penolik

Pengujian fenolik dijalankan bersama upaya melarutkan 1 mL ekstrak bersama 10 tetes larutan FeCl₃ 5%. Terwujudnya warna merah, biru, ungu, hitam menandakan terdapat senyawa fenolik.

3.8 Pengujian *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

3.8.1 Pembuatan Kuva Kalibrasi Standar Asam Klorogenat

Ditimbang 2,5 mg standar asam klorogenat bersama 25 mL methanol untuk mendapatkan larutan induk 100 ppm. Larutan induk 100 ppm seterusnya dibuat variasi pengenceran bersama konsentrasi 2. 4. 6. 8. 10. 12 ppm dalam labu berukuran 10 mL bersama mengambil 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1.2 mL

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

Ditimbang 50 mg ekstrak biji kopi hijau dalam 50 mL methanol HPLC untuk mendapat larutan induk 1000 ppm. Larutan induk 1000 ppm selanjutnya dibuat variasi pengenceran bersama konsentrasi 2,4,6,8,10,12 ppm dalam labu berukuran 10 mL bersama 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 gelombang 150 mm, diameter 4,6 mm selaku fase diam serta methanol selaku fase gerak bersama laju alir 1 mL / menit serta diinjeksikan sebanyak 20 μ L.

Sampel kopi dan standar yang sudah diencerkan di ultra sonikan selama 15 menit, disaring menggunakan penyaring membrane ukuran 0,2 μ m dengan volume larutan 10 μ l diinjeksikan ke system HPLC dengan memodifikasi panjang gelombang 335 nm. Panjang gelombang yang dimanfaatkan didasarkan pada penelitian terdahulu bersama panjang gelombang 335 nm dengan nilai absorbansi yang didapat 3,55 (Setianingsih, 2023).

3.9.1 Analisis Data

Pada studi ini analisis kandungan kadar asam klorogenat ekstrak etanol biji kopi arabika (*Coffea arabika*) menggunakan metode hplc dapat dilihat pada luas permukaan dibawah kurva yang diperoleh. Hasil terkait selanjutnya dianalisis secara kuantitatif untuk mengetahui kandungan kadar asam klorogenat pada sampel menggunakan metode HPLC.

3.9.2 Diagram Alir penelitian

