**BAB IV**

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

1. **Hasil Identifikasi Sampel**

Pada penelitian ini telah dilakukan identifikasi tanaman yang dilakukan di Laboratorium *Herbarium Medanese (MEDA)* Universitas Sumatera Utara. Hasil identifikasi tanaman tersebut menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan daun kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) yang termasuk ke dalam famili Rubiaceae. Hasil identifikasi tumbuhan dapat dilihat pada lampiran 4.

1. **Hasil Pengolahan Sampel**

Daun kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh di dataran tinggi Bener Meriah, Provinsi Aceh. Daun yang telah dikumpulkan dilakukan sortasi basah terlebih dahulu untuk memisahkan kotoran dan benda asing dari bahan simplisia. Daun segar sebanyak 5 kg dicuci kemudian dikeringkan. Setelah proses pengeringan, dilakukan sortasi kering untuk memisahkan kotoran yang masih menempel di simplisia kemudian simplisia diblender hingga menjadi serbuk lalu diayak dengan ayakan 40 mesh dan diperoleh berat serbuk simplisia sebanyak 800 g. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi menggunakan pelarut etanol 70% hingga diperoleh ekstrak kental 52,417 g berwarna hitam kecoklatan dengan bau yang khas.

1. **Hasil Pemeriksaan karakterisasi Simplisia**
2. **Pemeriksaan Makroskopik Simplisia Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner*)***

Pengamatan makroskopik dilakukan dengan mengamati secara langsung kondisi fisik daun kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) yang digunakan dalam penelitian ini. Dari hasil pemeriksaan secara makroskopik daun kopi robusta diperoleh hasil sebagai berikut;

**Tabel 4.1 Pengamatan Makroskopik Daun Kopi Robusta**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| No | Parameter | Keterangan |
| 1 | Bentuk | Daun berbentuk jorong dengan tulang daun menyirip, ujung daun meruncing, tepi daun berombak, permukaan daun licin dan mengkilat, panjang daun 10 – 17 cm dan lebar daun 6 – 8 cm. |
| 2 | Warna | Hijau |
| 3 | Rasa | Pahit |
| 4 | Bau | Khas |

1. **Pemeriksaan Mikroskopik Daun Kopi Robusta (Coffea canephora Pierre ex A. Froehner)**

Pemeriksaan mikroskopik serbuk simplisia bertujuan untuk melihat fragmen pengenal pada daun kopi robusta. Dari hasil pemeriksaan secara mikroskopik terlihat adanya jaringan epidermis, trikoma (rambut), palisade, spons, mulut daun dan sel idioblas.

**Gambar 4.1 Hasil Mikroskopik Serbuk Simplisia dan Daun Kopi Robusta**

1. **Penentuan Rendemen**

Dari 500 gram serbuk simplisia daun kopi robusta diperoleh rendemen ekstrak kental etanol 70% sebanyak 52,417g (10,483%). Dari 40 gram ekstrak kental etanol diperoleh rendemen fraksi n-heksan sebanyak 5,145 g (12,86%) dan fraksi etil asetat sebanyak 8,226 g (20,56%).

1. **Pemeriksaan Karakterisasi Simplisia**

Karakterisasi merupakan suatu Langkah awal untuk mengendalikan mutu simplisia agar dapat diperoleh bahan baku yang seragam yang akhirnya dapat menjamin efek farmakologi tanaman tersebut (BPOM, 2005). Parameter mutu simplisia mencakup penetapan kadar air, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar sari larut air dan penetapan kadar sari larut etanol. Hasil dari karakterisasi serbuk simplisia daun kopi robusta tertera pada tabel 4.2.

**Tabel 4.2 Hasil Karakterisasi Simplisia Daun Kopi**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| No | Parameter | Hasil (%) | Syarat MMI (%) |
| 1 | Kadar air | 4% |  |
| 2 | Kadar abu total | 3,52% |  |
| 3 | Kadar abu tidak larut asam | 0,18% |  |
| 4 | Kadar sari larut air | 26,48% |  |
| 5 | Kadar sari larut etanol | 20,89% |  |

Penetapan kadar air adalah pengukuran kandungan air pada simplisia yang telah dikeringkan dan diserbukkan. Tujuan penetapan kadar air adalah memberikan batasan minimal rentang besarnya kandungan air di dalam serbuk simplisia tersebut (Ditjen POM, 2000). Persyaratan kadar air simplisia menurut parameter standar yang berlaku adalah tidak lebih dari 10 %. Hasil penetapan

kadar air untuk simplisia daun kopi robusta adalah 4%. Hal ini berarti simplisia daun kopi memenuhi persyaratan kadar air.

Penetapan kadar abu total adalah suatu parameter dimana bahan simplisia dipanaskan pada temperatur dimana senyawa organic dan turunannya terdestruksi dan menguap sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik. Penetapan kadar abu total bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak (Ditjen POM, 2000). Persyaratan kadar abu simplisia menurut parameter standar yang berlaku adalah tidak lebih dari 4%. Hasil penetapan kadar abu total untuk simplisia daun kopi robusta adalah 3,52%. Hal ini berarti simplisia daun kopi robusta memenuhi persyaratan kadar abu total. Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu selanjutnya didihkan dengan 25 ml asam klorida selama 5 menit, bagian tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas lalu dipijarkan hingga bobot tetap kemudian ditimbang. Persyaratan kadar abu tidak larut asam adalah tidak lebih dari 1%. Hasil penetapan kadar abu tidak larut asam pada daun kopi robusta adalah 0,18%, dimana hasil tersebut memenuhi persyaratan kadar abu tidak larut asam. Kadar abu tak larut asam ini menunjukkan jumlah abu yang diperoleh dari faktor eksternal, bersumber dari pengotor yang berasal dari pasir atau tanah silikat (Depkes RI, 2000).

Penetapan kadar sari yang larut dalam air dan etanol bertujuan memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan yang dapat tersari oleh pelarut air dan etanol. Pada uji kadar sari larut air dilakukan dengan menimbang 5 gram serbuk simplisia daun kopi robusta kemudian dimaserasi selama 24 jam

dengan 100 ml air kloroform LP menggunakan labu tersumbat sambil dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam, disaring dan 20 ml filtrat yang diperoleh diuapkan hingga kering dalam cawan yang telah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105$°$C hingga bobot tetap. Kemudian kadar dihitung dalam persen senyawa yang larut dalam air terhadap ekstrak awal (Ditjen POM, 2000).

Berdasarkan parameter standar yang berlaku, kadar sari larut air tidak kurang dari 23,5%. Kadar sari larut air dari daun kopi robusta yang diperoleh adalah 26,48%. Penetapan kadar sari larut etanol dilakukan dengan menimbang sejumlah 5 gram serbuk simplisia yang dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol (95%) menggunakan labu bersumbat selama 6 jam dan selama 18 jam. 20 ml filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan yang telah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105$°$C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (95%) dihitung terhadap ekstrak awal (Ditjen POM, 2000).

Berdasarkan parameter standar yang berlaku, kadar sari larut etanol tidak kurang dari 13%. Kadar sari larut etanol dari daun kopi robusta adalah 20,89%. Berdasarkan hasil pengujian kadar sari larut dalam pelarut air dibandingkan dengan kadar sari larut dalam pelarut etanol, menunjukkan bahwa jumlah senyawa polar yaang larut dalam pelarut air lebih besar dibandingkan dengan senyawa non polar yang larut dalam pelarut etanol, dan masih memenuhi persyarataan yang disyaratkan.

1. **Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Kopi Robusta**

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi menggunakan

pelarut etanol 70%. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (Ditjen POM, 2000). Pemilihan pelarut yang sesuai merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang dapat menyari sebagian besar metabolit sekunder yang diinginkan dalam simplisia (Depkes RI, 2008). Maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dikarenakan etanol 70% merupakan pelarut yang bersifat universal yang mampu menarik senyawa polar dan non polar (senyawa kurang polar).

Ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi sebanyak 52,417 gram dari 500 gram serbuk simplisia (Rendemen 10,483%) dengan ekstrak yang berbentuk cairan kental, berwarna coklat kehitaman dan memiliki bau yang khas.

Fraksinasi merupakan metode pemisahan komponen campuran yang berasal dari ekstrak hasil ekstraksi. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lainnya berdasarkan perbedaan kepolaran. Metode fraksinasi yang biasa digunakan adalah dengan ekstraksi cair-cair. Proses fraksinasi ekstrak secara ekstraksi cair-cair dilakukan berdasarkan perbedaan kelarutan atau koefisien partisi senyawa diantara dua pelarut yang saling tidak bercampur (Harborne, 1987).

Fraksinasi dilakukan berturut-turut dengan pelarut n-heksana (non polar) dan etil asetat (semi polar). Senyawa yang bersifat semi polar yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kopi robusta akan terdistribusi ke dalam pelarut etil asetat sedangkan senyawa yang bersifat non polar akan terdistribusi ke dalam pelarut n-heksan. Dari 40 gram ekstrak etanol daun kopi robusta diperoleh fraksi n-heksan sebanyak 5,145 g (Rendemen 12,86%) dan fraksi etil asetat sebanyak 8,226 g (Rendemen 20,56%).

1. **Skrinning Fitokimia**

Skrining fitokimia merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder suatu bahan alam. Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan yang dapat memberikan gambaran mengenai kadnungan senyawa tertentu dalam bahan alam yang akan diteliti. Skrining fitokimia dapat dilakukan, baik secara kualitatif, semi kuantitatif, maupun kuantitatif sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Metode skrining fitokimia secara kualitatif dapat dilakukan melalui reaksi warna dengan menggunakan suatu pereaksi tertentu (Kristianti *et al*., 2008).

Skrinning fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder dalam serbuk, ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopi robusta. Hasil skrinning fitokimia dapat dilihat pada tabel 4.3.

**Tabel 4.3 Hasil Skrinning Fitokimia serbuk, ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopi robusta**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| No | Golongan Senyawa | Serbuk | Ekstrak Etanol | Fraksi Etil Asetat | Fraksi n-Heksan |
| 1 | Alkaloid | + | + | + | + |
| + Mayer | - | - | - | + |
| + Dragendrof | + | + | + | + |
| + Bouchardat | + | + | + | - |
| 2 | Flavonoid | + | + | + | + |
| 3 | Saponin | + | + | + | + |
| 4 | Tanin | + | + | + | - |
| 5 | Steroid/Tritepernoid | + Steroid | + Steroid | + Steroid | + Steroid |
| 6 | Polifenol | + | + | + | + |
| 7 | Glikosida | + | + | + | - |

Keterangan :

* : Tidak mengandung metabolit sekunder

+ : Mengandung metabolit sekunder

Berdasarkan tabel 4.3 hasil skrinning fitokimia serbuk, ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kopi robusta menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, steroid, polifenol dan glikosida. Sedangkan fraksi n-heksan tidak menunjukkan adanya tannin.

Pada uji senyawa alkaloid, hasil positif pereaksi Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih, pada pereaksi Dragendorf terdapat endapan berwarna merah atau jingga sedangkan untuk pereaksi Bouchardat terdapat endapan berwarna coklat (Septia Ningsih et al., 2020). Alkaloid dianggap positif apabila 2 dari 3 pereaksi terbentuk endapan atau terjadi perubahan warna, yang berarti serbuk simplisia, ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopi robusta positif mengandung senyawa alkaloid.

Pada uji flavonoid, terbentuknya warna hitam kemerahan, kuning atau jingga menunjukkan hasil positif flavonoid. Dari uji flavonoid pada serbuk dan fraksi daun kopi robusta diperoleh hasil yang positif karena terbentuknya warna kuning. Sedangkan pada ekstrak etanol terbentuk warna jingga.

Pada uji saponin, serbuk simplisia, ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopi robusta menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya busa dan dapat bertahan selama 10 menit serta tidak hilang setelah penambahan HCL. Timbulnya busa pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan untuk membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Marliana *et al*., 2005).

Hasil positif pada uji tannin ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman setelah penambahan FeCl3 1%. Hal ini dapat terjadi karena penambahan FeCl3 pada tannin akan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe3+ (Septia Ningsih et al., 2020). Serbuk simplisia, ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kopi robusta menunjukkan adanya senyawa tannin. Sedangkan fraksi n-heksan tidak menunjukkan adanya tannin karena tidak terbentuk warna hijau kehitaman.

Warna biru sampai hijau pada sampel menyatakan hasil positif senyawa steroid, sedangkan untuk warna merah kecoklatan sampai ungu menyatakan hasil positif uji terpenoid (Septia Ningsih et al., 2020). Serbuk simplisia, ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopi robusta menunjukkan warna hijau yang berarti positif steroid. Hal ini terjadi karena senyawa steroid bereaksi dengan H2SO4 sehingga menghasilkan warna hijau hingga biru.

Pada uji polifenol, Serbuk simplisia, ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopi robusta diperoleh hasil yang positif yaitu terbentuknya warna hijau kehitaman. Senyawa fenolik dinyatakan positif apabila terdapat perubahan warna hitam kebiruan hingga hitam pekat pada saat penambahan FeCl3 1%. FeCl3 dapat bereaksi dengan gugus –OH aromatis (Septia Ningsih *et al*., 2020).

Pada hasil skrinning glikosida dengan metode refluks. Serbuk simplisia, ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kopi robusta menunjukkan hasil positif senyawa glikosida. Hal ini ditandai dengan terbentuknya cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida. Sedangkan pada fraksi n-heksan menunjukkan hasil negatif.

1. **Hasil Pengukuran Panjang Gelombang Absorbansi Maksimum**

Penetapan kadar fenolik total diawali dengan mengukur panjang gelombang maksimum dari larutan baku asam galat menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dengan bantuan instrumen spektrofotometer Visible dengan konsentrasi 25 mcg/ml dan diperoleh panjang gelombang maksimum 749 nm dengan absorbansi 0,486 Abs. Menurut Ganjar dan Rohman (2007) warna komplementer untuk pengujian fenolik yaitu berwarna hijau kebiruan dengan rentang panjang gelombang yaitu 610-750 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang dapat dilihat pada gambar 4.2.

**Gambar 4.2 Panjang Gelombang Asam Galat**

1. **Hasil Pengukuran *Operating Time***

Operating Time bertujuan untuk mengetahui waktu paling stabil dari pengukuran suatu senyawa yang diperoleh saat absorbansi. Operating time dilakukan dengan mengukur antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan. Penetapan operating time perlu dilakukan untuk meminimalisir terjadinya kesalahan pada saat pengukuran (Suharyanto & Prima, 2020). Larutan baku yang akan diukur absorbansinya dalam penelitian ini merupakan suatu senyawa kompleks yang membutuhkan waktu agar reaksi yang terbentuk stabil. Penentuan *Operating Time* dilakukan dengan menggunakan larutan baku dengan penambahan reagen *Folin-Ciocalteu* yang diukur pada panjang gelombang 600-750 nm. Hasil Pengukuran *operating time* pada menit ke 24-26, dapat dilihat pada lampiran 19.

1. **Hasil Penetapan Kurva Kalibrasi Asam Galat dengan Reagen *Folin Ciocalteu***

Penentuan kurva kalibrasi dengan berbagai seri konsentrasi dari larutan baku asam galat yaitu 15 mcg/ml, 20 mcg/ml, 25 mcg/ml, 30 mcg/ml dan 35 mcg/ml yang telah direaksikan dengan reagen *Folin-Ciocalteu.* Masing-masing seri konsentrasi diukur pada panjang gelombang 749 nm sehingga diperoleh kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (mcg/ml) dengan absorbansi 0,2 – 0,8. Hasil dapat dilihat pada tabel 4.4 dan lampiran 20.

**Tabel 4.4 Nilai Absorbansi Larutan Baku Asam Galat**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Konsentrasi | Absorbansi | Persamaan Regresi |
| 0 | 0 |  |
| 15 | 0,286 |  |
| 20 | 0,357 | y = 0,0183x – 0,0007 |
| 25 | 0,442 |  |
| 30 | 0,555 |  |
| 35 | 0,647 |  |

Tabel diatas menunjukkan nilai absorbansi larutan baku asam galat dari berbagai konsentrasi. Dari data diatas diperoleh kurva kalibrasi seperti ditunjukkan pada gambar berikut :

**Gambar 4.3 Kurva Kalibrasi Asam Galat**

Persamaan regresi yang diperoleh dari larutan larutan baku asam galat yaitu y = 0,0183x – 0,0007 dengan koefisien korelasi sebesar 0,9989. Nilai linieritas menunjukkan korelasi antara konsentrasi dan hasil absorbansinya.

1. **Hasil Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol, Fraksi Etil Asetat dan Fraksi n-Heksan Daun Kopi Robusta**

Penetapan kadar fenolik total menggunakan metode Folin-Ciocalteu dengan bantuan instrumen spektrofotometer Visible. Folin-Ciocalteu akan membentuk kompleks molibdenum tungsten yang berwarna biru dikarenakan reduksi senyawa fosfotungstat-fosfomolibdat oleh senyawa fenolik dan Semakin pekat warna biru yang dihasilkan menunjukkan semakin banyaknya kandungan senyawa fenol yang terdeteksi. Reaksi antara senyawa fenolik dengan Folin-Ciocalteu terjadi pada suasana basa agar membentuk ion fenolat dari senyawa fenolik. Oleh karena itu untuk memberi suasana basa ditambahkan Na2CO3 agar terjadi reaksi reduksi *Folin-Ciocalteu* oleh gugus hidroksil dari fenolik yang terdapat dalam sampel (Febriyanto et al., 2021).

Pada penelitian ini digunakan pelarut yang berbeda kepolarannya. Proses ekstraksi dan fraksinasi dengan pelarut organic yang berbeda tingkat kepolaran akan mempengaruhi jenis dan kadar senyawa bioaktif. Pelarut yang berbeda ini akan berpengaruh terhadap perolehan senyawa fenolik pada daun kopi robusta (Pratiwi & Wardaniati, 2022).

Penetapan kadar fenolik total dihitung dengan menggunakan persamaan garis regresi linier y = ax + b yang diperoleh dari hasil kurva kalibrasi larutan baku asam galat sehingga didapat nilai konsentrasi (x). Nilai x kemudian akan disubtitusikan dalam rumus perhitungan kadar fenolik total. Penetapan kadar fenolik total dilakukan dengan replikasi sebanyak 6 kali pengulangan dan diambil nilai rata-ratanya seperti yang disajikan dalam tabel 4.5.

**Tabel 4.5 Nilai Fenolik Total Ekstrak Etanol, Fraksi Etil Asetat dan Fraksi n-Heksan Daun Kopi Robusta**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Kadar Sebenarnya(mg GAE/g Ekstrak Etanol) | Kadar Sebenarnya(mg GAE/g Fraksi Etil Asetat) | Kadar Sebenarnya(mg GAE/g Fraksi n-Heksan) |
| 25,9438$$\pm 0,0889 mg GAE/g$$ | 28,048 $\pm 0,3692 mg GAE/g$ | 15,5231 $\pm 0,7213mg GAE/g$ |

Berdasarkan data diatas, terdapat hasil kadar sebenarnya dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopi robusta.

**Gambar 4.4 Diagram Hasil Penetapan Kadar Fenolik Total**

Berdasarkan diagram diatas, terdapat hasil kadar sebenarnya dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopi robusta. Dari hasil penelitian ini diperoleh kadar rata-rata fenolik total berturut-turut dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun kopi robusta adalah 25,9438$\pm 0,0889 mg GAE/g$, 28,048 $\pm 0,3692 mg GAE/g $ dan 15,5231 $\pm 0,7213mg GAE/g$. Kadar rata-rata fenolik dari fraksi etil asetat lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi n-heksan dikarenakan fraksi etil asetat memiliki kemampuan yang baik dalam mereduksi reagen Folin-Ciocalteu daripada fraksi lainnya (Rondonuwu et al., 2017). Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal atau ekstraksi yang digunakan sebagai isolasi pada senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak awal dapat dipisahkan kedalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama. Metode fraksinasi dapat meningkatkan kandungan senyawa yang dikehendaki dengan menghilangkan atau memisahkan senyawa yang tidak dikehendaki, sehingga diperoleh fraksi yang lebih murni. Hasil fraksinasi dikatakan lebih murni mengandung fenolik dikarenakan etil asetat lebih spesifik untuk menarik senyawa fenol dibandingkan dengan kadar konsentrasi ekstrak dimana ekstrak memiliki banyak komponen yang terkandung didalamnya sehingga perlu konsentrasi yang lebih tinggi untuk mendeteksi kadar fenol didalamnya (Kumalasari et al., 2021).