**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

1. **Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental. Tahap penelitian dimulai dengan pengumpulan bahan, pembuatan ekstrak etanol daun kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi, dilanjutkan dengan fraksinasi dengan etil asetat dan n-heksan, skrinning fitokimia dan penetapan kadar fenolik total ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan *n*-heksan daun kopi robusta dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis.

1. **Variabel Penelitian**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan daun kopi robusta. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji penetapan kadar fenolik total ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-heksan daun kopi robusta.

1. **Parameter Penelitian**

Parameter penelitian ini meliputi pengumpulan bahan, pembuatan ekstrak etanol, fraksinasi dengan etil asetat dan *n*-heksan, uji karakterisasi simplisia, skrinning fitokimia dan penetapan kadar fenolik total dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis.

1. **Jadwal dan Lokasi Penelitian**
2. **Jadwal Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2023 – Mei 2023.

1. **Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al – Washliyah Medan.

1. **Bahan**

Bahan – bahan yang digunakan yaitu daun kopi robusta (*Coffea canephora Pierre* ex A. Froehner), aquadest, asam asetat, etanol 70%, etanol p.a, n-heksan, etil asetat, asam klorida, amil alcohol, raksa (II) klorida, kalium iodide, natrium hidroksida, iodium, bismuth (II) nitrat, besi (III) klorida, asam klorida pekat, timbal (II) asetat, alfa naftol, asam nitrat, asam sulfat pekat, toluene, asam asetat anhidrat, klorofom, kloralhidrat, aqua bebas CO2, serbuk magnesium, air suling, asam galat, Natrium karbonat dan reagen *Folin-Ciocalteau.*

1. **Peralatan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat destilasi, *rotary evaporator*, corong pisah, kapas, tisu, botol berwarna gelap, aluminium foil, timbangan analitik, pipet tetes, gelas ukur, erlenmeyer, seperangkat alat spektrofotometri UV-Vis, *hot plate*, oven, tanur dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

1. **Pengumpulan dan Pengolahan Sampel**
   * 1. **Pengumpulan Sampel**

Sampel tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) yang diperoleh dari Kabupaten Bener Meriah, Aceh. Metode pengambilan sampel dilakukan secara *purposive* yaitu tanpa membandingkan dengan tumbuhan serupa dari daerah lain.

* + 1. **Determinasi Tumbuhan**

Determinasi tumbuhan yang memiliki tujuan untuk memastikan kebenaran

bahan penelitian yang digunakan dilakukan di Herbarium Medanense (MEDA), Universitas Sumatera Utara.

* + 1. **Pengolahan Sampel**

Daun kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) yang telah diperoleh disortasi basah untuk membersihkan kotoran yang melekat dari simplisia, ditimbang berat basahnya 5 kg kemudian dikeringkan pada suhu 50◦C di dalam lemari pengering. Dilakukan sortasi kering untuk memisahkan simplisia dari benda–benda, selanjutnya simplisia diserbukkan dan siap untuk diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi.

1. **Pembuatan Larutan Pereaksi**
2. **Asam Klorida 2 N**

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat dimasukkan dama *beaker glass* yang telah berisi 25 ml air akuades, ditunggu sampai dingin dan diencerkan dengan aquadest hingga 100 ml (Depkes RI, 2020).

1. **Asam Sulfat 2 N**

Sebanyak 6 ml asam sulfat pekat dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang berisi 25 ml akuades, diencerkan dengan aquadest sampai 100 ml (Depkes RI, 2020).

1. **Asam Nitrat 0,5 N**

Sebanyak 3,5 ml asam nitrat pekat dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang berisi 25 ml akuades, diencerkan dengan aquadest sampai 100 ml (Depkes RI, 2020).

1. **Besi (III) Klorida 1% b/v**

Sebanyak 1 g besi (III) klorida dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang

berisi 25 ml akuades, diencerkan dengan aquadest sampai 100 ml (Depkes RI, 2020).

1. **Timbal (III) Asetat 0,4 M**

Sebanyak 15,17 g timbal (II) asetat ditimbang, kemudian dilarutkan dalam air suling bebas karbondioksida hingga 100 ml (Depkes RI, 2020).

1. **Pereaksi Mayer**

Sebanyak 1,36 g raksa (II) klorida, dilarutkan dalam 60 ml aquadest, kemudian pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 10 ml air suling. Kedua larutan dicampurkan dan ditambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 ml (Kemenkes RI, 2017).

1. **Pereaksi Molisch**

Sebanyak 3 g alfa-naftol dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N sampai garis tanda (Kemenkes RI, 2017).

1. **Pereaksi Bouchardat**

Sebanyak 4 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml aquadest, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 g iodium dan dicukupkan dengan aquadest hingga 100 ml (Kemenkes RI, 2017).

1. **Pereaksi Dragendrof**

Sebanyak 0,85 g bismut (III) nitrat ditimbang, dilarutkan dalam 100 ml asam asetat glacial ditambahkan 4 ml air suling. Pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 8 g kalium iodide dilarutkan dalam 20 ml air suling, kemudian kedua larutan dicampurkan sama banyak, lalu ditambahkan 20 ml asam asetat glasial dan

diencerkan dengan air suling sampai 100 ml (Kemenkes RI, 2017).

1. **Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 M**

Timbal (II) asetat sebanyak 15,17 g dilarutkan dalam air suling bebas CO2 hingga 100 ml (Depkes RI, 2020).

1. **Pemeriksaan Karakteristik Simplisia**
   * + 1. **Pemeriksaan Makroskopik**

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap tumbuhan daun kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) dengan mengamati warna, bentuk dan ukuran.

* + - 1. **Pemeriksaan Mikroskopik**

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan dengan cara serbuk daun kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) diletakkan diatas kaca objek, lalu ditetesi dengan kloralhidrat, difiksasi dan dilapisi dengan *cover glass*, selanjutnya diamati dibawah mikroskop.

* + - 1. **Penentuan Rendemen**

Penentuan rendemen dilakukan dengan menimbang sampel kering daun kopi robusta kemudian hasil ekstraksi yang diperoleh ditimbang kembali. Pada hasil fraksinasi, rendemen diperoleh dengan menimbang bobot ekstrak dan bobot hasil fraksinasi.

*% Rendemen =*

* + - 1. **Penetapan Kadar air**

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode Azeotropi. Alat terdiri dari labu alas bulat 500 ml, alat penampung dan pendingin, tabung penyambung dan penerima 10 ml.

1. Penjenuhan toluen

Sebanyak 200 ml toluen dan 2 ml aquadest dimasukkan ke dalam labu alas bulat, dipisahka alat penampung dan pendingin, kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan didinginkan selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 ml.

1. Penetapan kadar air simplisia

Sebanyak 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama dimasukkan ke dalam labu yang berisi toluen jenuh tersebut, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi sebagian dalam pendingin dibilas dengan toluen. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0.05 ml. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (v/b) (Ditjen POM, 2000).

Perhitungan:

*% Kadar Air Simplisia*

* + - 1. **Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air**

Sebanyak 5 g serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 ml kloroform P (2,5 ml kloroform dalam 100 ml aquades) selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata (yang telah ditara) di atas penangas air hingga kering, sisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 2000).

*%Kadar Sari Larut Dalam air*

* + - 1. **Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol**

Sebanyak 5gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol (96%) dalam labu tersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudia dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan penguap berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 96% dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 2000).

%*Kadar Sari Larut Dalam Etanol*

* + - 1. **Penetapan Kadar Abu Total**

Sebanyak 2gram serbuk dimasukkan kedalam krus porselin yang telah dipijarkan dan ditara kemudian krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pemijaran dilakukan pada suhu 500-600°C selama 3 jam kemudian didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Ditjen POM, 2000).

%*Kadar Abu Total*

* + - 1. **Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam**

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dipanaskan dengan 25 ml asam klorida 2 N selama 5 menit, sebagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas, residu dengan kertas saring dipijarkan sampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 2000).

%*Kadar Abu Tidak Larut Asam*

1. **Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kopi Robusta**

Ekstraksi serbuk daun kopi robusta dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ditimbang 500 gram daun kopi robusta (*Coffea canephora Pierre* ex A. Froehner), kemudian dimasukan serbuk daun kopi robusta yang akan disari kedalam bejana maserasi. Dituang secara perlahan 75 bagian pelarut etanol 70% sebanyak 3750 ml kedalam bejana maserasi yang berisi serbuk daun kopi robusta sampai semua sampel terendam dan tertutup rapat selama 5 hari terlindungi dari cahaya. Sambil sering diaduk, lalu diperas sehingga didapat maserat (Maserat I). Kemudian ampas yang diperoleh dibilas dengan 25 bagian etanol 70% sebanyak 1250 ml, dipindahkkan ke dalam bejana tertutup (maserat I dan maserat II), dimaserasi selama 2 hari. Selanjutnya disaring ke dalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari ekstrak diuapkan dengan menggunakan *Rotary Evaporator* dibawah titik didih hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979)

1. **Fraksinasi**

Fraksinasi dilakukan berturut-turut dengan pelarut n-heksana dan etil asetat. Sebanyak 15gram ekstrak etanol dilarutkan dalam 100 ml etanol 96% dan ditambahkan 100 ml aquadest lalu dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian ditambah larutan n-heksana 200 ml, digojok dan didiamkan hingga terpisah sempurna. Fase n-heksana akan berada pada bagian atas dan fase etanol-air berada pada bagian bawah, kemudian dipisahkan. Fase etanol-airnya diekstraksi lagi dengan n-heksana sebanyak 3 kali. Fase etanol-air kemudian ditambahkan dengan etil asetat 200 ml, digojok dan didiamkan hingga terpisah sempurna. Fase etil asetat akan berada pada bagian atas dan fase etanol-air berada pada bagian bawah, kemudian dipisahkan. Fase etanol-airnya diekstraksi lagi dengan etil asetat sebanyak 3 kali. Kemudian larutan n-heksana dan larutan etil asetat yang dihasilkan masing-masing dipekatkan hingga didapatkan fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat yang kental (Sarker *et al*., 2006).

1. **Skrinning Fitokimia**
2. **Pemeriksaan Alkaloid**

Sebanyak 0,5 g serbuk, ekstrak etanol dan fraksi daun ditimbang kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dipakai untuk uji alkaloida, diambil 3 tabung reaksi, lalu kedalamnya dimasukkan 0,5 ml filtrat. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan pereaksi yang berbeda.

1. Tabung reaksi I : ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer

2. Tabung reaksi II : ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat

3. Tabung reaksi IIi : ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff

Alkaloid positif jika terjadi endapan atau kekeruhan pada paling sedikit dua dari tiga percobaan diatas (Ditjen POM, 2000).

1. **Pemeriksaan Flavonoid**

Sebanyak 10 g serbuk, ekstrak etanol dan fraksi daun ditimbang lalu sampel uji ditambahkan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, kedalam 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoida positif jika terjadi warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Ditjen POM, 2000).

1. **Pemeriksaan Saponin**

Sebanyak 0,5 g serbuk, ekstrak etanol dan fraksi daun ditimbang dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil dan tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin (Ditjen POM, 2000).

1. **Pemeriksaan Tanin**

Sebanyak 1 g serbuk, ekstrak etanol dan fraksi daun ditimbang, dididihkan selama 3 menit dalam 100 ml air suling lalu didinginkan dan disaring. larutan diambil 2 ml ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Ditjen POM, 2000).

1. **Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid**

Sebanyak 1 g serbuk, ekstrak etanol dan fraksi daun dimaserasi selama 2 jam dengan 20 ml n-heksan, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Pada sisa ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchad. Timbulnya warna biru atau biru hijau menunjukkan adanya steroida, sedangkan warna merah, merah muda atau ungu menunjukkan adanya triterpenoida (Harborne, 1987).

1. **Pemeriksaan Glikosida**

Sebanyak 3gram serbuk, ekstrak etanol dan fraksi daun kemudian disari dengan 30 ml campuran 7 ml bagian etanol 96% dan 3 bagian aquadest ditambah dengan 10 ml HCl 2 N. Direfluks selama 30 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 ml filtrat ditambahkan 25 ml aquadest dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari dengan 20 ml campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol dilakukan berulang sebanyak tiga kali. Kumpulan sari air diuapkan pada temperatur tidak lebih dari 500C. Sisanya dilarutkan dalam 2 ml metanol. Kemudian diambil 0,1 ml larutan percobaan dimasukkan kedalam tabung reaksi, diuapkan di penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes pereaksi molish. Kemudian secara perlahan ditambahkan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida (Ditjen POM, 2000).

1. **Pemeriksaan Fenol**

Sebanyak 0,5 g serbuk, ekstrak etanol dan fraksi daun ditimbang dan ditambahkan 3-4 tetes FeCl3 terjadinya perubahan warna hitam kebiruan hingga hitam pekat menunjukkan adanya kandungan fenol (Ditjen POM, 2000).

1. **Penentuan Kadar Senyawa Fenolik Total**
2. **Pembuatan Larutan Induk Asam galat (1000 ppm)**

Sebanyak 10 mg asam gallat ditimbang, lalu ditambahkan dengan etanol p.a pada labu takar 10 mL hingga tanda batas bawah (Puspitasari *et al*., 2019).

1. **Pembuatan reagen Na2CO3 7%**

Natrium karbonat ditimbang 7gram dilarutkan dalam 100 mL aquadest pada labu takar hingga tanda batas bawah (Puspitasari *et al*., 2019).

1. **Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Etanol 70 %, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi n-Heksan Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner)**

Ekstrak etanol 70 %, fraski etil asetat, dan fraksi n-heksan sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam masing-masing beaker glass 10 mL, dilarutkan dengan etanol p.a sampai terlarut sempurna, disaring menggunakan kertas saring ke dalam labu takar 10 mL, ditambahkan dengan etanol p.a hingga tanda batas (Puspitasari *et al*., 2019).

1. **Pembuatan Seri Konsentrasi Asam Galat**

Seri konstentrasi dibuat pada berbagai seri yaitu 15, 20, 25, 30, dan 35 ppm dalam 10 mL etanol p.a (Puspitasari *et al*., 2019).

1. **Penentuan Panjang Gelombang (λ) Maksimum Fenolik**

Pengukuran panjang gelombong maksimum menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan pembanding asam galat. Sebanyak 200 µL dari seri konsentrasi 25 ppm ditambahkan 400 µL Folin-Ciocalteu, didiamkan selama 8 menit, ditambahkan 4 mL Na2CO3 7%. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang 500-800 nm (Puspitasari *et al*., 2019).

1. **Pengukuran Operating Time (OT)**

Operating time diukur dengan spektrofotometer UV-VIS dengan pembanding asam galat. Sebanyak 200 µL dari seri konsentrasi 25 ppm ditambahkan 400 µL *Folin-Ciocalteu*, didiamkan selama 8 menit, ditambahkan 4 mL Na2CO3. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum 749 nm (Puspitasari *et al*., 2019).

1. **Penetapan Kurva Asam Galat**

Sebanyak 200 µL dari seri konsentrasi asam galat 15, 20, 25, 30, dan 35 ppm ditambahkan 400 µL Folin-ciocalteu, didiamkan selama 8 menit, ditambahkan 4 mL Na2CO3 7%. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 743 nm dan pada operating time menit ke-24 (Puspitasari *et al*., 2019).

1. **Pembacaan Absorbansi Sampel Ekstrak Fenolik Total Ekstrak Etanol 70 %, Fraksi Etil Asetat, Fraksi n-Heksan Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner)**

Sampel ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan daun kopi dipipet 200 μL ditambahkan 400 μL *Folin-ciocalteu*, didiamkan selama 8 menit, ditambahkan 4 mL Na2CO3 7%. Absorbasi dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum 749 nm dan operating time menit ke-24. Dilakukan pengenceran sampel ekstrak hingga terbaca pada absorbansi antara 0,200 – 0,600 (replikasi 6 kali) (Puspitasari *et al*., 2019).

1. **Analisis Data**

Pengolahan data yang dihasilkan terlebih dahulu dilakukan dengan metode kurva standar, regresi linier y = bx + a dibuat berdasarkan data absorbansi dan konsentrasi dari larutan standar (Puspitasari *et al*., 2019).