

**ISOLASI SENYAWA ANTIOKSIDAN DARI FRAKSI  
METANOL BIJI KOPI LIBERIKA  
(*Coffea liberica*)**

S K R I P S I



**TRI RIZKI SAPUTRI  
F1C117003**

**PROGRAM STUDI KIMA  
JURUSAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS JAMBI  
2021**

## SURAT PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah benar karya sendiri. Sepanjang pengetahuan saya, tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis atau diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang telah lazim.

Tanda tangan yang tertera dalam halaman pengesahan adalah asli. Jika tidak asli, saya siap menerima sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Jambi, Juli 2021

Yang menyatakan



Ti Rizki Saputri

ELCA120013

## RINGKASAN

Kopi merupakan salah satu komoditi dengan area perkebunan yang luas dan juga minuman kopi saat ini sedang marak dikonsumsi oleh khalayak masyarakat. Adapun minuman kopi yang beredar di pasaran telah melewati proses pemanggangan (*roasting*). Pada penelitian ini, digunakan sampel berupa biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) yang sudah dilakukan proses *roasting*. Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut metanol dengan cara maserasi. Lalu ekstraksi dilanjutkan dengan cara fraksinasi (partisi cair-cair) menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol. Selanjutnya dilakukan skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan (kualitatif) sehingga diperoleh informasi mengenai fraksi yang berpotensi untuk dilanjutkan ke tahap isolasi.

Pada proses fraksinasi diperoleh persentase ekstrak terbesar pada fraksi metanol dengan nilai rendemen sebesar 25,5659 %. Pada fraksi metanol juga diperoleh informasi kandungan senyawa fitokimia terbanyak, dan memiliki aktivitas peredam terhadap radikal bebas, oleh karena itu isolasi dilakukan pada fraksi metanol dengan cara kromatografi vakum cair. Isolat yang diperoleh selanjutnya dilakukan karakterisasi menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR. Isolat yang diperoleh berupa padatan putih dan jika dilihat melalui karakterisasi, termasuk pada golongan senyawa alkaloid, diduga sebagai senyawa kafein.

Radikal bebas atau oksidan memiliki efek reaktif di dalam tubuh manusia dan dapat memicu timbulnya berbagai jenis penyakit. Antioksidan diketahui memiliki kemampuan untuk mengambat atau meredam adanya radikal bebas di dalam tubuh manusia. Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antioksidan secara kuantitatif menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) pada isolat F1. Isolat F1 yang diperoleh terbukti memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai 22,89 ppm yang tergolong pada rentang aktivitas antioksidan kuat.

## SUMMARY

Coffee is one of the commodities with a large plantation area and coffee drinks are currently mostly consumed by public. The coffee drinks on the market have gone through a roasting process. In this study, samples were used in the form of Liberica Coffee beans (*Coffea liberica*) which had been roasted. Extraction was carried out using methanol as a solvent through maceration. Then the extraction was continued through fractionation (liquid-liquid partition) using n-hexane, ethyl acetate and methanol as solvents. Furthermore, phytochemical screening and antioxidant activity tests (qualitative) were carried out in order to obtain information about the fractions which have the potential to continue to the isolation stage.

In the fractionation process, the largest extract percentage was obtained in the methanol fraction with a yield value of 25.5659%. Information on the methanol fraction also obtained the highest content of phytochemical compounds, and had scavenging activity against free radicals, therefore isolation was carried out on the methanol fraction by liquid vacuum chromatography. The isolates were then characterized using UV-Vis and FT-IR spectrophotometer instruments. The isolate was in the form of a white solid and according to the characterization result, it was included in the alkaloid compound group, suspected to be a caffeine compound.

Free radicals or oxidants have reactive effects in the human body and can trigger various types of diseases. Antioxidants are known to have the ability to inhibit or reduce the presence of free radicals in the human body. In this study, quantitative testing of antioxidant activity was carried out using the DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) on F1 isolates. The F1 isolate obtained was proven to have antioxidant activity with a value of 22.89 ppm which belongs to the range of strong antioxidant activity.

**ISOLASI SENYAWA ANTIOKSIDAN DARI FRAKSI  
METANOL BIJI KOPI LIBERIKA  
(*Coffea liberica*)**

**S K R I P S I**

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana  
pada Program Studi Kimia



**TRI RIZKI SAPUTRI  
F1C117003**

**PROGRAM STUDI KIMIA  
JURUSAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS JAMBI  
2021**

## HALAMAN PENGESAHAN

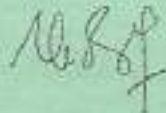
Skripsi dengan judul **"ISOLASI SENYAWA ANTIOKSIDAN DARI FRAKSI METANOL BJI KOPI LIBERIKA (COFFEA LIBERICA)"** yang disusun oleh Tri Rizki Saputri, NIM:F1C117003 telah dipertahankan di depan tim penguji pada tanggal 1 Juli 2021 dan dinyatakan lulus.

### Susunan Tim Penguji

Ketua : Dr. Madyawati Latief, S.P., M.Si.  
Sekretaris : Heriyanti, S.T., M.Sc., M.Eng.  
Anggota : 1. Drs. Faizar Farid, M. Si.  
2. Dr. Diah Riski Gusti, S.Si., M.Si.  
3. Nindita Clourisa Amaris Susanto, S.Si., M.Sc.

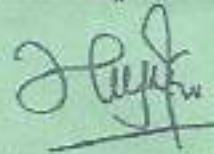
### Disetujui :

Pembimbing Utama,



Dr. Madyawati Latief, S.P., M.Si.  
NIP. 197206241999032001

Pembimbing Pendamping,



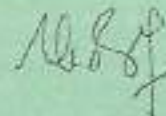
Heriyanti, S.T., M.Sc., M.Eng  
NIP. 198405022014042001

### Diketahui :



Prof. Drs. Nindita Clourisa Amaris, M, M.Sc., Ph.D.  
NIP. 196405191991121001

Ketua Jurusan MIPA,  
Fakultas Sains dan Teknologi



Dr. Madyawati Latief, S.P., M.Si.  
NIP. 197206241999032001



## RIWAYAT HIDUP



Tri Rizki Saputri, lahir di Jambi pada tanggal 26 Oktober 1999. Penulis merupakan anak ke 3 dari 3 bersaudara dari pasangan Sabar Sugianto dan Satriyah. Penulis pertama kali masuk pendidikan formal di SDN 25/IV Kota Jambi pada tahun 2005. Pada tahun 2011 penulis melanjutkan pendidikan ke SMPN 7 Kota Jambi dan tamat pada tahun 2014. Pada tahun yang sama penulis melanjutkan sekolah ke SMA N 4 Kota Jambi dan tamat pada tahun 2017. Pada tahun yang sama penulis terdaftar sebagai mahasiswi di Universitas Jambi Fakultas Sains dan Teknologi Program Studi Kimia, melalui jalur SBMPTN. Selama perkuliahan penulis pernah mengikuti lomba Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) yang diadakan oleh KEMRISTEKDIKTI lolos sampai tahap pendanaan dengan judul “Amobilisasi Serat Daun Nanas (*Ananas comosus*) dengan Ca-alginat sebagai adsorben logam Cr (VI) dalam limbah elektroplating”, Lomba Debat Bahasa Inggris tingkat Fakultas dan meraih Juara 2, ikut serta dalam lomba karya seni akustik band, menjadi bagian dari organisasi HIMKI (Himpunan Mahasiswa Kimia) FST Universitas Jambi, IKAHIMKI (Ikatan Himpunan Mahasiswa Kimia Indonesia), BEM (Badan Eksekutif Mahasiswa) FST Universitas Jambi, serta pernah berpartisipasi dalam Program Holistik Pembinaan dan Pemberdayaan Desa di Dusun Pompa Air, Kecamatan Sungai Gelam, Provinsi Jambi. Selama kuliah, penulis juga pernah dipercaya menjadi Asisten Laboratorium Kimia Dasar I dan II. Penulis juga telah menyelesaikan magang di UPTD BPSMB Disperindag Provinsi Jambi.

## **PRAKATA**

Penulis panjatkan puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat kesehatan dan kesempatan sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tugas akhir ini. Dalam pelaksanaan dan penyusunan laporan ini, penulis banyak dibantu dan didukung oleh berbagai pihak sehingga penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Drs. Damris M, M.Sc., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Jambi.
2. Dr. Madyawati Latief, S.P., M.Si. selaku ketua jurusan MIPA Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Jambi
3. Heriyanti, S.T., M.Sc., M.Eng. selaku Ketua Prodi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Jambi
4. Dr. Madyawati Latief, S.P., M.Si. selaku pembimbing utama yang telah banyak sabar membantu baik secara moril maupun materil, memberikan pengarahan, saran, masukan, dan bimbingan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tugas akhir ini.
5. Heriyanti, S.T., M.Sc., M.Eng. selaku pembimbing pendamping yang juga telah sabar dan teliti memberikan pengarahan dan bimbingan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tugas akhir ini.
6. Drs. Faidzar Farid, M.Si., Dr. Diah Riski Gusti, S.Si., M.Si., dan Nindita Clourisa Amaris Susanto, S.Si., M.Sc. selaku dosen penguji yang sudah memberikan saran dan kritikan kepada penulis.
7. Edwin Permana, S.T., M.T. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama proses perkuliahan dari semester 1 hingga semester 8.
8. Seluruh Bapak serta Ibu dosen FST, khususnya dosen Prodi Kimia yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang dengan sabar memberikan ilmu dan didikan selama penulis mengikuti bangku perkuliahan.
9. Seluruh Pegawai dan Pengurus Laboratorium Tugas Akhir, Pak Slamet, Bu Ety, dan seluruh civitas akademika FST yang telah membantu kelancaran untuk menyelesaikan segala urusan yang menyangkut penulisan tugas akhir dan penelitian.
10. Orang tua ku Bapak Sabar Sugianto dan Ibu Satriyah yang telah memberikan kasih sayang, memberikan do'a, dukungan moril maupun materil dan semangat selama ini.
- 11.** Kedua kakakku, Dian Eka Putri S.E. dan Rahmad Dwi Putra, S.T., M.Sc. yang telah memberikan dukungan baik secara moril maupun materil, serta



menjadi salah satu motivasi bagi penulis untuk tetap semangat menyelesaikan tugas akhir ini.

12. Tim Organik Kopi (Laras, Shara, Novi, Intan, dan Jihan), Tim Organik Antiinflamasi dan tanaman Obat (Rumaida, Indah, Rahmani, Devi, Ardi, dan Jammes) yang telah sama-sama berjuang ketika berada di Laboratorium Tugas Akhir sejak Juni 2020 lalu.
13. Anne, Riza, Gati, Pumik, dan Opi yang telah memberikan semangat dan doa kepada penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini, Keda Group (Intan, Rumaida, Shara, Kiki, Laras, Devi, Novi, Gita, Ulfa) dan Gaboetz Grup (Intan, Shara, Novi, Gita, Ulfa, Wawan, dan Ardi) yang telah sama-sama susah dan senang berjuang dari semester 1 kuliah hingga saat ini, telah banyak membantu, telah sabar memaklumi segala sikap dan sifat penulis, serta memberikan hiburan tawa dan canda ketika sedang *stuck* dalam menyusun tugas akhir ini.
14. Teman-teman satu angkatan Kimia 2017 lainnya (Widy, Jihan, Nurul, Niken, Indah, Rahma, Riny, Rohil, Gym, Metik, Khairil, Anisa, Irvan, Fiza, Jammes, Rahmani, Vera, Salim, Kak Debora, Autar, dan Dea) yang sudah sama-sama berjuang dari awal hingga saat ini, kalian sangat memotivasi.
15. Kakak-kakak senior Kimia yang telah banyak bersedia untuk menampung pertanyaan dari penulis, serta adik-adik Kimia FST yang juga sudah memotivasi secara tidak langsung agar penulis segera menyelesaikan tugas akhir ini.
16. Serta segenap pihak-pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang secara langsung maupun tidak langsung membantu penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini.

Semoga jasa baik yang mereka berikan kepada penulis dapat menjadi amal jariah disisi Allah SWT. dan mendapatkan balasan yang baik disisi Nya. Penulis menyadari skripsi ini jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis mengharapkan adanya kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan skripsi ini bermanfaat bagi kita semua dan menjadi sumber informasi, khususnya bagi penulis sendiri.

Jambi, 1 Juli 2021



Penulis

Tri Rizki Saputri

NIM. F1C117003

## DAFTAR ISI

SURAT PERNYATAAN.....	i
RINGKASAN.....	ii
SUMMARY.....	iii
HALAMAN JUDUL.....	iv
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
RIWAYAT HIDUP.....	vi
PRAKATA.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Identifikasi dan Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Kopi Liberika ( <i>Coffea liberica</i> ).....	4
2.2 Antioksidan dan Oksidan (Radikal Bebas).....	5
2.3 Skrining Fitokimia Kopi Liberika.....	6
2.4 Bioaktivitas Kopi Liberika.....	7
2.5 Karakterisasi Senyawa Organik.....	8
2.6 Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Organik.....	10
III. METODOLOGI PENELITIAN.....	16
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	16
3.2 Bahan dan Peralatan Penelitian.....	16
3.3 Metode Penelitian.....	16
3.4 Analisis Data.....	18
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
4.1 Preparasi Sampel Penelitian.....	21
4.2 Ekstraksi Sampel Penelitian.....	22
4.3 Rendemen ekstrak.....	23
4.4 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi.....	25
4.5 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi.....	27
4.6 Hasil Isolasi Senyawa.....	29
4.7 Hasil Karakterisasi Senyawa Isolasi.....	32

4.8 Uji aktivitas antioksidan Senyawa Isolasi .....	35
V. KESIMPULAN DAN SARAN .....	37
5.1 Kesimpulan .....	37
5.2 Saran .....	37
DAFTAR PUSTAKA .....	38
LAMPIRAN .....	42

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Intensitas aktivitas antioksidan .....	6
2. Hasil skrining fitokimia Biji Kopi Liberika ( <i>Coffea liberica</i> ) .....	7
3. Kemampuan antioksidan dari Biji Kopi Liberika ( <i>Coffea liberica</i> ), Biji Kopi Arabika ( <i>Coffea arabica</i> ), dan Biji Kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> ) .....	8
4. Kesesuaian tinggi kolom dan jumlah sampel yang dipisahkan dengan jalan Kromatografi Vakum Cair .....	14
5. Berat biji Kopi Liberika ( <i>Coffea liberica</i> ) sebelum dan sesudah proses roasting .....	21
6. Kondisi Biji Kopi Liberika setelah proses Roasting .....	21
7. Hasil rendemen fraksi Biji Kopi Liberika ( <i>Coffea liberica</i> ) .....	23
8. Hasil skrining fitokimia ekstrak dan fraksi Biji Kopi Liberika ( <i>Coffea liberica</i> ) .....	25
9. Hasil Uji Aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi Biji Kopi Liberika ( <i>Coffea liberica</i> ) menggunakan metode DPPH .....	28
10. Pengelompokan fraksi KVC dari Fraksi Metanol Biji Kopi Liberika ( <i>Coffea liberica</i> ) .....	29
11. Hasil skrining fitokimia isolat F1 metanol .....	32
12. Perbandingan serapan isolat F1 dengan Kafein .....	34
13. Hasil uji aktivitas antioksidan isolat F1 .....	36

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Coffea liberica</i> .....	4
2. Biji Kopi Liberika ( <i>Coffea liberica</i> ) .....	5
3. Reaksi peredaman radikal bebas .....	5
4. Biji Kopi Liberika sebelum proses <i>roasting</i> .....	21
5. Biji Kopi Liberika sesudah proses <i>roasting</i> .....	21
6. Perubahan warna maserat setelah 3 kali pengulangan .....	22
7. Perkiraan interaksi hidrogen antara metanol dan senyawa pada kopi .....	24
8. Reaksi antara alkaloid dengan pereaksi dragendorff .....	25
9. Hasil uji kualitatif antioksidan ekstrak <i>crude</i> metanol, fraksi metanol, fraksi n-heksana, dan fraksi etil asetat (setelah disemprot menggunakan larutan DPPH) .....	27
10. Pola noda hasil kromatografi vakum cair di bawah lampu UV 254 nm pada berbagai botol vial.....	29
11. Uji aktivitas antioksidan secara kualitatif menggunakan penyemprot DPPH terhadap Fraksi Metanol.....	30
12. Gambar kristal F1 Metanol (sebelum dilakukan pemurnian) .....	30
13. Gambar isolat F1 Metanol (setelah dilakukan pemurnian) .....	31
14. Hasil KLT Kristal F1 (Hasil KVC Metanol) menggunakan eluen (dari kiri ke kanan) Metanol:etil asetat = 3:7, Aseton: Etil asetat = 1:9, dan DCM:etil asetat = 2:8. ....	31
15. Spektrum UV-Vis Isolat F1 Metanol.....	32
16. Spektrum UV-Vis Kafein . ....	33
17. Spektrum FT-IR Isolat F1 Metanol .....	34
18. Spektrum FT-IR Isolat Kafein.....	34
19. Dugaan Struktur Senyawa Isolat F1 .....	35

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Penelitian .....	42
2. Roasting dan Grinding .....	43
3. Ekstraksi dan Isolasi .....	44
4. Uji aktivitas antioksidan .....	47
5. Karakterisasi Senyawa .....	48
6. Perhitungan Rendemen Ekstrak dan Antioksidan .....	49
7. Dokumentasi Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Menurut Badan Perpustakaan Nasional, pada tahun 2017 Indonesia merupakan negara yang memiliki luas area perkebunan Kopi sebesar 1.23 juta Ha. Dari seluruh luas area tersebut, didominasi oleh Jenis Kopi Robusta sekitar 81,96 % dan Jenis Kopi Arabika sebesar 18,04 %. Jenis Kopi Liberika masih sangat jarang dibudidayakan karena kualitas buah yang dihasilkan masih rendah dan tidak seragam. Namun saat ini kopi liberika dapat ditemukan di Kuala Tungkal, Tanjung Jabung Barat dengan kondisi tempat hidup berupa tanah gambut. Walaupun kondisi tanah di daerah tersebut cukup asam, Kopi Liberika dapat tumbuh dengan subur.

Kopi dapat dimanfaatkan sebagai pangan fungsional karena kaya akan manfaat pada kesehatan. Menurut Patay *et al.* (2016), kopi memiliki banyak manfaat antara lain dapat berpotensi sebagai antioksidan, pencegah kanker, menurunkan risiko diabetes tipe II, penyakit kardiovaskuler, serta agen antibakteri. Hal ini dikarenakan adanya kandungan berbagai senyawa fitokimia pada kopi. Salah satu kandungan utama pada kopi ialah polifenol yang dapat bertindak sebagai agen antioksidan yang bekerja dengan cara menangkap radikal bebas gugus hidroksil sehingga proses oksidasi lemak, protein dan DNA dalam sel terhambat.

Dewasa ini, kopi yang beredar di pasaran untuk dikonsumsi telah melewati proses pemanggangan (*roasting*) dengan tujuan agar dapat diperoleh aroma dan rasa yang khas serta menghilangkan kadar asam berlebih. Hal yang harus diperhatikan pada proses *Roasting* Biji Kopi ialah pengaturan suhu dan lama waktu pemanggangan. Semakin lama dan semakin tinggi suhu, maka kandungan asam klorogenat akan semakin berkurang (Farhaty dan Muchtaridi, 2016). Mangiwa dan Maryuni (2019), melakukan penelitian tentang pengujian aktivitas antioksidan dari Biji Kopi Sangrai Jenis Arabika pada habitat yang berbeda, yaitu asal Wamena dan Moanemani, Papua. Hasil yang diperoleh ialah  $IC_{50}$  ekstrak metanol biji kopi Sangrai asal Wamena adalah sebesar 107,97 ppm. Sedangkan  $IC_{50}$  pada ekstrak metanol biji kopi Sangrai asal Moanemani adalah sebesar 100,91 ppm. Dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa habitat tanaman dapat mempengaruhi perbedaan aktivitas antioksidan dari jenis Kopi yang sama. Pada penelitian ini akan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan pada Fraksi Metanol jenis Kopi yang berbeda dari referensi yang dirujuk sebelumnya, yaitu kopi Liberika yang berasal dari Provinsi Tanjung Jabung Barat. Pemilihan jenis kopi Liberika ialah didasarkan pada terbatasnya referensi terkait penelitian



antioksidan pada jenis Kopi Liberika, terkhusus pada bagian biji Kopi yang telah disangrai (*roasted*). Pemilihan biji kopi Liberika yang telah disangrai ialah untuk mengetahui adanya manfaat antioksidan pada minuman kopi yang sedang marak beredar di khalayak masyarakat, yang mana umumnya diolah dari Biji Kopi yang sudah disangrai. Sedangkan Pemilihan fraksi metanol diharapkan agar dapat diperoleh golongan senyawa polar yang berpotensi sebagai antioksidan.

Penelitian mengenai potensi aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) pada ekstrak diklorometana Biji Kopi Liberika, Biji Kopi Arabika dan Biji Kopi Robusta telah dilakukan oleh Saw *et al.* (2017). Hasil yang diperoleh adalah Biji Kopi (*green beans*) Liberika (*Coffea liberica*) memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai AEAC (*Ascorbic Acid Equivalent Capacity*) sebesar  $0,62 \pm 0,05$  dan nilai TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) sebesar  $0,96 \pm 0,08$ . Pada biji kopi Liberika *roasted*, didapatkan penurunan kandungan asam klorogenat (Mubarak *et al.*, 2019).

Kemampuan antioksidan pada biji kopi sangrai dapat dikaitkan dengan adanya kandungan senyawa fenolik, kafein, trigonelin, dan beberapa senyawa hasil reaksi Mailard (Vignoli *et al.*, 2014). Senyawa heterosiklik yang terbentuk akibat reaksi Mailard pada Biji Kopi yang telah diroasting memiliki kemampuan antioksidan yang setara baik dibandingkan senyawa fenolik dalam biji kopi hijau (Sacchetti *et al.*, 2009). Isolasi yang telah dilakukan pada jenis kopi yang berbeda, yaitu jenis Kopi Robusta yang dilakukan oleh Sukohar *et al.* (2011). Hasil isolat yang diperoleh ialah senyawa Kafein yang merupakan komponen terbesar dari Biji Kopi, dan Asam klorogenat yang merupakan polifenol yang terkandung pada Biji Kopi.

Antioksidan sangat berperan dalam kehidupan manusia dalam menangkal paparan radikal bebas yang dapat diperoleh dari sumber ekstrinsik maupun instrinsik. Sumber instrinsik radikal bebas dapat diperoleh dari proses metabolisme tubuh, sedangkan sumber ekstrinsik cenderung ditemukan dalam bentuk paparan ultraviolet, radiasi, makanan yang dipanaskan berlebih, zat karsinogenik serta polutan lingkungan. Oleh karena itu, pada penelitian ini penulis mengambil judul "**Isolasi Senyawa Antioksidan dari fraksi Metanol Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*)**".

## **1.2 Identifikasi dan Perumusan Masalah**

Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) memiliki berbagai kandungan senyawa aktif. Dilansir dari beberapa penelitian sebelumnya, diketahui Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) memiliki aktivitas antioksidan untuk meredam radikal bebas. Namun, referensi terkait aktivitas antioksidan senyawa yang diperoleh dari Biji

Kopi Liberika (*roasted*) masih terbatas, sehingga pada penelitian ini akan dikaji lebih lanjut mengenai uji aktivitas antioksidan Isolat yang diperoleh dari Fraksi Metanol Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) yang telah mengalami proses penyangraian.

Berdasarkan uraian diatas maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apa saja golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi metanol Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) yang telah mengalami proses penyangraian (*roasting*) ?
2. Bagaimana aktivitas antioksidan fraksi metanol dan isolat Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) yang telah mengalami proses penyangraian (*roasting*) terhadap radikal bebas?

### **1.3 Tujuan**

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi metanol Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) yang telah mengalami proses penyangraian (*roasting*).
2. Mengetahui jenis senyawa yang terkandung pada fraksi metanol Biji Kopi Liberika (*roasted*) yang berperan sebagai antioksidan.
3. Mengetahui aktivitas antioksidan fraksi metanol dan isolat Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) yang telah mengalami proses penyangraian (*roasting*).

### **1.4 Manfaat**

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberikan informasi mengenai senyawa yang berasal dari Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) *roasted* yang berpotensi sebagai antioksidan.
2. Mengembangkan alternatif senyawa antioksidan yang berasal dari Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) *roasted*.
3. Menambah pemanfaatan Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) *roasted*.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kopi Liberika (*Coffea liberica*)

*Coffea liberica* merupakan jenis tumbuhan kopi yang hidup pada iklim tropis di dataran rendah dengan ketinggian 400-600 m di atas permukaan laut. Namun Kopi Liberika tetap dapat hidup pada ketinggian mencapai 1200 m. Kopi Liberika memiliki ciri berdaun lebar dan tebal. Kawasan tanah Kopi Liberika biasanya berada pada lahan gambut. Jika dikonsumsi, Kopi Liberika perlu melewati tahap Penyangraian (*roasting*) pada suhu yang tepat untuk mengurangi kadar asam serta meningkatkan aroma kopi yang khas. Jenis kopi liberika merupakan jenis kopi terlangka jika dibandingkan dengan jenis Kopi Arabika dan Robusta, hal ini dikarenakan kualitas buah yang dihasilkan masih rendah dan tidak seragam (Mpapa, 2019).

Menurut Rahardjo (2012), klasifikasi taksonomi dari *Coffea liberica* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Trachaeobionta
Super divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Rubiales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: Coffea
Species	: <i>Coffea liberica</i> L.

Berikut merupakan gambar dari Kopi Liberika (*Coffea liberica*) :



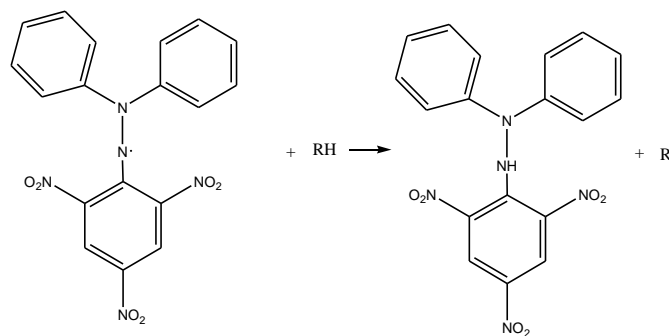
**Gambar 1.** Coffea liberica (Hulupi dan Martini, 2013)



**Gambar 2.** Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) (Sunarharum *et al.*, 2019)

## 2.2 Antioksidan dan Oksidan (Radikal Bebas)

Secara kimia, radikal bebas merupakan senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan, yang kerap mencari molekul lain agar bersifat stabil. Radikal bebas atau oksidan dapat memberikan efek kerusakan sel dalam tubuh manusia akibat adanya reaksi oksidasi (Hasanah *et al.*, 2017). Kerusakan sel pada tubuh manusia berdampak pada timbulnya berbagai jenis penyakit. Sumber radikal bebas dapat bersumber dari sumber eksogen dan sumber endogen. Sumber eksogen meliputi radikal bebas yang berasal dari luar tubuh, seperti zat karsinogenik, polutan udara, sinar ultraviolet, dan radiasi. Sedangkan sumber endogen diperoleh dari hasil metabolisme tubuh manusia yang meliputi proses oksidasi makanan (Yuslianti, 2018). Tahap pembentukan radikal bebas meliputi Inisiasi (Pembentukan awal radikal bebas), Propagasi (Pembentukan atau Perambatan Radikal Baru), dan Terminasi (Pemusnahan atau perubahan radikal bebas menjadi senyawa stabil atau tidak reaktif (Yuslianti, 2018). Reaksi peredaman radikal bebas dapat dilihat melalui gambar 3 :



**Gambar 3.** Reaksi peredaman radikal bebas

Berdasarkan reaksi yang terjadi pada gambar 3, dapat dilihat bahwa antioksidan mendonorkan hidrogen kepada atom nitrogen radikal pada DPPH sehingga terjadi reaksi penetralan dan terbentuk radikal yang bersifat lebih stabil. Antioksidan merupakan substansi yang dapat meredam efek radikal bebas. Cara kerja dari antioksidan ialah dengan mendonorkan suatu atom hidrogen ke radikal hidroksil sehingga terbentuk molekul yang tidak berbahaya, yaitu air (Youngson, 2005). Antioksidan dapat melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas.

Sumber antioksidan dapat diperoleh secara alami maupun sintetis. Sejatinnya, tubuh manusia secara alami memproduksi antioksidan dalam tubuhnya, namun jumlahnya tidak mencukupi untuk meredam radikal bebas berlebih. Oleh karena itu, dibutuhkan sumber antioksidan lain untuk dapat meminimalisir paparan radikal bebas dalam tubuh. Sumber antioksidan alami dapat diperoleh dari senyawa aktif dari makanan yang diperoleh dari tumbuhan tertentu. Senyawa aktif tersebut dapat meliputi golongan fenolik, flavonoid, dan tanin. Selain itu antioksidan alami juga dapat diperoleh dari bahan pangan dan obat seperti asam askorbat, vitamin e, asam amino, dan karotenoid. Antioksidan sintetis diperoleh dari reaksi kimia sintetis, meliputi BHA (Butil Hidroksil Anisol), BHT (Butil Hidroksil Toluen) dan (TBHQ) Tert Butil Hidroksi Quinon (Yuslianti, 2018).

Salah satu metode pengujian aktivitas antioksidan yang umum digunakan ialah metode DPPH (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil). Metode ini didasarkan pada penangkapan radikal bebas DPPH oleh antioksidan yang memiliki H<sup>+</sup> yang ditandai dengan terjadinya peredaman warna DPPH oleh antioksidan. Untuk mengetahui intensitas aktivitas antioksidan, dapat merujuk pada Jun *et al.*, (2003) pada tabel 1.

**Tabel 1.** Intensitas aktivitas antioksidan (Jun *et al.*, 2003)

Nilai IC <sub>50</sub> (ppm)	Kategori
< 50	Sangat Aktif
50 – 100	Aktif
100 – 250	Sedang
250-500	Lemah
>500	Tidak Aktif

### 2.3 Skrining Fitokimia Kopi Liberika

Skrining fitokimia merupakan tahap awal dalam analisis kimia yang bertujuan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa kimia yang terkandung pada bahan alam. Senyawa yang akan diidentifikasi dengan jalan

skrining fitokimia memiliki aktivitas biologis yang bermanfaat pada tumbuhan tersebut untuk mempertahankan diri. Skrining fitokimia didasarkan pada uji kualitatif berupa pengamatan warna, endapan, dan temperatur yang terjadi akibat reaksi kimia ketika suatu sampel ditambahkan reagen tertentu (Nasyanka *et al.*, 2020).

Senyawa fitokimia adalah senyawa alami yang terdapat pada tanaman, yang dapat berkhasiat sebagai antikanker, antimikroba, antioksidan, antiinflamasi, dan antibiotik (Astawan dan Kasih, 2008). Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi beberapa golongan senyawa fitokimia, seperti golongan flavonoid, steroid, terpenoid/triterpenoid, alkaloid, tanin, fenolik, dan saponin (Gultom dan Siagian, 2019).

Oyeyemi *et al.* (2017), melakukan skrining fitokimia pada Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) (*green beans*) dengan hasil pada tabel 2.

**Tabel 2.** Hasil skrining fitokimia Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) (Oyeyemi *et al.*, 2017)

Senyawa Fitokimia	Hasil
Alkaloid	+
Tanin	+
Saponin	+
Fenolik	+
Flavonoid	+
Steroid	+
Terpenoid	+

Syarat yang harus terpenuhi selama pengujian fitokimia ialah hanya memerlukan peralatan sederhana, berlangsung cepat, spesifik terhadap satu golongan senyawa, dan memiliki LOD (*Limit of Detection*) yang cukup besar dengan kata lain dapat mendeteksi keberadaan senyawa walaupun konsentrasi yang digunakan rendah. Namun, metode penapisan kimia memiliki beberapa kelemahan, antara lain dapat memberikan hasil positif palsu, dan kemungkinan dapat diperoleh warna yang rancu sebagai hasil samping reaksi pada uji fitokimia (Gultom dan Siagian, 2019).

#### 2.4 Bioaktivitas Kopi Liberika

Bioaktivitas adalah kemampuan biologis suatu senyawa aktif yang memiliki banyak manfaat seperti antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, dan antibiotik. Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) diketahui kaya akan senyawa aktif yang memiliki beragam bioaktivitas. Aktivitas yang umum diteliti sebelumnya ialah antioksidan dan antibakteri.

Kopi Liberika diketahui memiliki kemampuan aktivitas antioksidan yang dapat meredam radikal bebas. Salah satu kandungan senyawa bioaktif pada Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) ialah asam klorogenat, merupakan polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan (Mubarak *et al.*, 2019). Namun, asam

klorogenat sedikit ditemukan pada Biji Kopi yang sudah mengalami proses *roasting* karena terkonversi melalui reaksi Maillard.

Telah dilakukan penelitian tentang potensi aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidazil) pada Biji Kopi Liberika, Biji Kopi Arabika, dan Biji Kopi Robusta oleh Saw *et al.* (2017), dengan hasil yang tertera pada tabel 3.

**Tabel 3.** Kemampuan antioksidan dari Biji (*green beans*)Kopi Liberika (*Coffea liberica*), Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*), dan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) (Saw *et al.*, 2017)

Ekstrak volatil	DPPH	
	AEAC	TEAC
<i>Coffea arabica</i>	0,57±0,10	0,89±0,14
<i>Coffea liberica</i>	0,62±0,05	0,96±0,08
<i>Coffea robusta</i>	0,50±0,04	0,78±0,04

Dari tabel 3, dapat dilihat bahwa Jenis Kopi Liberika (*Coffea liberica*) memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dibandingkan dengan kedua jenis kopi lainnya, dimana Biji Kopi Liberika (*green beans*) memiliki nilai AEAC (*Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity*) dan nilai TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) tertinggi.

Kandungan utama kopi adalah kafein. Kafein (1,3,7-trimethylxanthine) memiliki efek fisiologis antara lain stimulasi sistem saraf pusat, peningkatan sirkulasi darah, dan pernapasan. Rasanya agak pahit. 10% kafein dan sekitar 6% asam klorogenat hadir dalam minuman kopi (Sharma, 2020).

Komponen karakteristik pada biji kopi selain kafein ialah asam klorogenat yang membentuk golongan ester antara lain asam kuinat dan asam trans-hydroxycinnamic (misalnya asam caffeic, ferulic dan p-coumaric), dan dari dimethoxycinnamic, trimethoxycinnamic dan asam sinapic (Opitz *et al.*, 2014). Asam klorogenat juga merupakan komponen asam terbanyak yang terkandung pada Kopi.

## 2.5 Karakterisasi Senyawa Organik

Karakterisasi senyawa dilakukan untuk mengetahui karakter dari senyawa tersebut seperti gugus fungsi dan kerangka struktur. Karakterisasi senyawa pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-Vis dan Spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* (FTIR).

### Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis dapat digunakan untuk analisis kuantitatif dan analisis semikualitatif. Secara kuantitatif, spektrofotometer UV-Vis digunakan



untuk menentukan konsentrasi suatu larutan melalui absorbansi yang diperoleh yang kemudian dikonversikan berdasarkan persamaan garis lurus. Dalam hal ini, absorbansi linear atau sebanding dengan konsentrasi. Secara kualitatif, spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya ikatan tidak jenuh (gugus kromofor). Gugus kromofor dapat menyebabkan radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang UV-Vis. Panjang gelombang dari daerah UV-Vis berada pada 400-800 nm (cahaya *visible* / tampak). Prinsip kerja dari spektrofotometer UV-Vis ialah penyerapan sinar tampak akibat interaksi antar cahaya dan materi sehingga terjadi eksitasi elektron pada orbital molekul. Ketika sinar ultraviolet dilewatkan pada kuvet, materi (larutan) akan terbaca serapannya pada panjang gelombang sinar tampak dalam satuan nm. Spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada Hukum Lambert-Beer, yaitu linearitas antara absorbansi dan konsentrasi (Sastrohamidjojo, 2018).

#### ***Fourier Transform Infra Red (FTIR)***

Pada penelitian ini, FTIR digunakan untuk menganalisis gugus fungsi yang terkandung pada suatu senyawa organik. Satuan radiasi yang digunakan pada FTIR ialah bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ). Prinsip dari FTIR ialah vibrasi (getaran) pada molekul organik akibat adanya sinar infra merah pada bilangan gelombang tertentu. Daerah bilangan gelombang FTIR dibagi menjadi 3, yakni daerah dekat ( $14.000 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$ ), daerah tengah ( $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ), dan daerah jauh ( $400 - 4 \text{ cm}^{-1}$ ). Kelebihan karakterisasi senyawa dengan menggunakan FTIR ialah hanya membutuhkan sampel yang sedikit, yaitu dalam satuan miligram ataupun mikrogram dapat terdeteksi (Smith, 2011).

*Fourier Transform Infrared* adalah pengembangan dari Instrumen dispersi inframerah, dimana FTIR memiliki interferometer. Interferometer pada FTIR dapat mempersingkat waktu analisis sampel karena tidak memerlukan dispersi dan sinyal dapat diukur dengan sangat cepat. Prinsip dari FTIR ialah substitusi monokromator dengan interferometer. Interferometer dapat memindai bagian radiasi menggunakan cermin bergerak yang nantinya akan dihasilkan suatu interferogram. Radiasi infra merah akan mengakibatkan timbulnya perbedaan jarak antar cermin, perbedaan ini disebut dengan retardasi. Interferogram ialah hubungan antara intensitas radiasi infra merah terhadap retardasi. Interferogram harus dianalisis menggunakan Fourier Transform untuk memperoleh spektrum infra merah. Spektrum FTIR disajikan dalam bentuk intensitas terhadap bilangan gelombang (Sembiring *et al.*, 2019).

## 2.6 Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Organik

Ekstraksi merupakan penyarian, penarikan atau pemisahan senyawa dari campurannya yang didasarkan pada perbedaan sifat kelarutan. Suatu senyawa akan tertarik sesuai dengan sifat kepolaran dari pelarut yang digunakan. Senyawa aktif yang larut akan terpisah dari komponen campurannya (Saputra, 2020). Oleh karena itu, dalam melakukan ekstraksi, perlu digunakan pelarut yang sesuai untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan.

Ekstraksi dapat dilakukan melalui beberapa cara, antara lain :

### 1. Maserasi

Maserasi merupakan metode universal yang banyak digunakan pada pemisahan senyawa organik. Menurut Mukhriani (2014), metode ekstraksi dilakukan dengan cara memasukkan serbuk simplisia ke dalam pelarut yang sesuai. Wadah maserasi yang digunakan harus bersifat inert agar tidak terjadi reaksi samping. Maserasi dilakukan pada suhu kamar di dalam wadah yang tertutup. Menurut Saputra (2020), maserat yang dihasilkan dilakukan penyaringan terlebih dahulu, selanjutnya maserat dipekatkan agar diperoleh ekstrak kental. Pelarut yang biasa digunakan pada maserasi ialah pelarut polar (air, metanol, etanol, asam asetat), pelarut semi polar (aseton, etil asetat, kloroform), dan pelarut non polar (heksana, eter).

### 2. Perkolasi

Perkolasi merupakan suatu cara ekstraksi senyawa organik menggunakan suatu alat yang dinamakan perkolator. Serbuk simplisia dibasahi secara bertahap dalam wadah perkolator. Pelarut dibiarkan menetes secara perlahan pada bagian bawah kran perkolator. Metode ekstraksi ini merupakan ekstraksi secara berkesinambungan karena simplisia akan teraliri oleh pelarut baru. Metode ini memiliki kelemahan yaitu pelarut sukar menjangkau seluruh permukaan simplisia, membutuhkan banyak pelarut serta waktu yang lama (Mukhriani, 2014).

### 3. Sokletasi

Sokletasi juga merupakan salah satu cara ekstraksi secara berkesinambungan. Ekstraksi dengan cara sokletasi dilakukan melewati beberapa siklus (berulang), simplisia akan dipanaskan dalam pelarut yang sesuai, lalu uap panas akan terkondensasi dan terbentuk cairan. Selanjutnya cairan akan turun melewati selongsong dan mengekstrak simplisia, lalu masuk kembali di labu alas bulat yang berisi batu didih. Proses ini dilakukan secara berulang hingga diperoleh cairan yang tidak pekat (Saputra, 2020).

### 4. Refluks

Refluks adalah suatu cara pemisahan senyawa kimia yang termostabil atau bersifat tahan terhadap panas, selain itu juga biasanya digunakan sampel yang bertekstur keras, seperti biji, buah, akar dan batang. Simplisia dimasukkan dalam pelarut dan dipanaskan di labu alas bulat, uap akan terkondensasi sehingga terbentuk cairan kembali sembari menyari simplisia (Saputra, 2020).

#### 5. Destilasi Uap

Destilasi uap biasanya dilakukan untuk memisahkan senyawa kimia berupa minyak esensial dari campurannya. Uap panas akan terkondensasi dan tertampung di labu alas bulat sebagai destilat. Metode ini memiliki kelemahan pada senyawa yang tidak tahan terhadap panas (termolabil) rentan terdekomposisi (Mukhriani, 2014).

#### 6. Fraksinasi Cair-cair (Partisi)

Fraksinasi cair-cair (partisi) merupakan salah satu cara ekstraksi dengan cara untuk memisahkan komponen kimia pada diantara dua pelarut dengan prinsip perbedaan kelarutan (Sukohar *et al.*, 2011). Partisi dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Hasil partisi berupa filtrat dari berbagai pengulangan dengan intensitas warna yang semakin berkurang dan sama.

### **Kromatografi Lapis Tipis**

Menurut Bele dan Khale (2011), Kromatografi Lapis Tipis adalah suatu cara pemisahan campuran menggunakan selembur alumunium foil yang dilapisi dengan lapisan silika gel atau selulosa. Lapisan silika gel ini berperan sebagai fase diam. Prinsip dari Kromatografi Lapis Tipis ialah distribusi senyawa antar fase diam dan fase gerak. Sampel dalam bentuk cairan ditotolkan menggunakan pipa kapiler, lalu eluen (fase gerak) menarik analit yang berbeda kepolarannya. Fase gerak yang digunakan disesuaikan dengan sifat senyawa yang ingin dipisahkan. Pemisahan dilihat melalui nilai Rf (*retardation factor*), yaitu selisih antara jarak yang ditempuh pelarut dengan jarak yang ditempuh sampel.

Kromatografi Lapis Tipis umum digunakan di ranah Kimia Organik karena membutuhkan waktu yang cepat dalam pemisahannya. Dalam bidang Kimia Organik, Kromatografi Lapis Tipis digunakan untuk :

1. Pemisahan dan Isolasi Senyawa dalam suatu Campuran
2. Memeriksa kemurnian suatu senyawa
3. Identifikasi senyawa Organik
4. Memeriksa suatu reaksi kimia

### **Kromatografi Kolom**

Kromatografi Kolom adalah suatu cara pemisahan senyawa dalam campuran yang didasarkan pada sistem adsorpsi. Prinsip dari Kromatografi Kolom ialah fraksinasi zat terlarut akibat adanya migrasi fase diam dan analit di dalam suatu tabung. Pada kromatografi kolom cair, fasa diam yang digunakan dapat berupa zat cair maupun zat padatan inert. Sedangkan fasa gerak yang digunakan berupa cair. Cara *Packing* (pengemasan) kolom yang umum dilakukan ialah dengan cara basah, yaitu dengan membuat bubuk adsorben dan dituangkan ke dalam kolom. Saat adsorben telah mengendap, kelebihan pelarut dikeringkan lalu dimasukkan kembali bubuk adsorben. Saat dilakukan pengemasan, harus dipastikan tidak ada rongga yang muncul pada fase diam (Ismail dan Nielsen, 2010).

Pada kromatografi kolom, sampel diletakkan di ujung atas kolom, lalu eluen (fase gerak) dialirkan secara kontinu di dalam kolom. Proses pemisahan terjadi akibat eluen melewati kolom dengan bantuan gravitasi atau tekanan tertentu. Pada kromatografi kolom, eluen yang digunakan dimulai dari yang bersifat nonpolar, dan semakin lama kepolarannya dinaikkan secara bergradien. Ketika eluen dialirkan ke dalam kolom, maka terjadi proses adsorpsi dan desorpsi senyawa pada sampel. Proses pemisahan ini disebabkan oleh adanya perbedaan afinitas adsorben dan perbedaan kelarutan senyawa dengan fase gerak dalam kolom. Ketika molekul terbawa menuju dasar kolom, cairan ditampung pada botol vial dan selanjutnya dilakukan analisis Kromatografi Lapis Kertas untuk mendeteksi pemisahan. Adapun kelemahan dari Kromatografi Kolom ialah memerlukan eluen dalam jumlah besar, analisis pemisahan harus dilakukan KLT terlebih dahulu, serta waktu elusi yang diperlukan cukup lama. Namun, kelebihan dari kromatografi kolom ialah dapat menggunakan sampel yang lumayan banyak (beberapa gram). Faktor-faktor yang mempengaruhi proses kromatografi kolom ialah pemilihan adsorben, pemilihan eluen, kecepatan elusi, dan pemilihan dimensi kolom (Kristanti *et al.*, 2008).

Jumlah adsorben yang digunakan disesuaikan dengan jumlah sampel yang ingin dipisahkan. Biasanya, jumlah silika yang digunakan berkisar antara 30-50 gram untuk tiap gram sampel yang akan dipisahkan. Eluen yang digunakan terdiri atas 2 komponen pelarut. Pelarut yang digunakan ditambahkan secara gradien, dimulai dari pelarut yang bersifat nonpolar terlebih dahulu. Hal ini bertujuan untuk mengikat senyawa yang kurang terikat pada adsorben. Ketika proses elusi dilakukan, penambahan kepolaran pelarut bergradien akan menyebabkan senyawa dapat turun secara berurutan

berdasarkan kepolarannya. Pada kromatografi kolom, kecepatan elusi juga sangat berpengaruh, yaitu kecepatan elusi harus dibuat konstan. Sebaiknya, kecepatan elusi dibuat cukup lambat agar senyawa berada dalam kondisi kesetimbangan antar fasa diam dan fasa geraknya. Jika kecepatan elusi terlalu lambat, maka senyawa akan terdifusi ke dalam eluen sehingga pita melebar yang mengakibatkan proses pemisahan tidak berjalan dengan baik. Sebelum dilakukan pemisahan dengan cara kromatografi, sebaiknya dilakukan KLT terlebih dahulu untuk mencari perbandingan eluen terbaik (Kristanti *et al.*, 2008).

Pada saat dilakukan pengisian kolom menggunakan, harus dilakukan secara hati-hati dan diusahakan tidak ada gelembung udara pada adsorben. Permukaan adsorben juga harus horizontal dan merata, untuk mengoptimalkan proses elusi, sehingga tercapai proses pemisahan yang baik. Menurut Kristanti *et al.* (2008), pengisian adsorben pada kolom dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu sebagai berikut :

#### 1. Pengisian dengan cara Basah

Pengisian dengan cara basah diawali dengan pelarutan adsorben yang paling nonpolar yang akan digunakan untuk proses elusi. Pembuatan campuran ini dilakukan dengan cara menambahkan adsorben secara perlahan ke dalam pelarut, hingga diperoleh kekentalan seperti suspensi dan bisa dituang ke dalam kolom. Jika proses pembuatan campuran dilakukan dengan cara menambahkan pelarut ke dalam adsorben (cara sebaliknya), maka panas yang dihasilkan akan mendidihkan pelarut sehingga terbentuk gumpalan dalam campuran. Setelah adsorben merata berada di dalam kolom, kran pada bagian bawah dibuka agar eluen dapat keluar secara perlahan. Setelah terbentuk suspensi adsorben-pelarut, maka proses elusi dapat dimulai dengan syarat eluen yang berada di dalam kolom harus selalu tercukupi, hal ini ditandai dengan adanya cairan di atas permukaan adsorben.

#### 2. Pengisian dengan cara kering

Pengisian kolom dengan cara kering diawali dengan memasukkan pelarut yang paling bersifat nonpolar terlebih dahulu. Selanjutnya, dimasukkan serbuk adsorben secara bertahap. Ketika dilakukan penambahan adsorben, dinding kolom perlu diketuk secara pelan agar tidak terbentuk rongga atau gelembung udara. Jika lapisan adsorben 2 cm sudah terbentuk, maka kran pada bagian bawah dibuka agar eluen dapat keluar secara perlahan. Ketika lapisan suspensi adsorben-pelarut sudah terbentuk secara optimal, maka proses elusi dapat dimulai.

### Kromatografi Vakum Cair

Kromatografi Vakum Cair merupakan salah satu kromatografi kolom yang menggunakan adsorben berupa silika gel sebagai fasa diam. Silika gel yang digunakan biasanya merupakan Silika Gel<sub>60</sub> (63-200  $\mu\text{m}$ ). Penggunaan pompa vakum diharapkan dapat meningkatkan laju alir sehingga dapat mempercepat proses fraksinasi. Cara mempersiapkan kolom pada Kromatografi Vakum Cair adalah dilakukan dalam keadaan vakum agar didapatkan kerapatan adsorben yang maksimum. Kolom dihisap dengan pompa vakum hingga adsorben kering, lalu proses elusi dapat dilakukan dengan syarat tidak adanya kolom yang retak. Pada pemisahan dengan jalan kromatografi Vakum Cair, proses elusi membutuhkan waktu yang relatif cepat karena adanya bantuan tekanan dari pompa vakum. Biasanya, kolom yang digunakan pada Kromatografi Vakum Cair memiliki diameter yang cukup besar. Hal ini dikarenakan sampel yang digunakan masih berupa ekstrak awal hasil ekstraksi yang memiliki massa cukup besar (Harini *et al.*, 2019).

Pada Kromatografi Vakum Cair, sampel diimpregnasi dengan cara melarutkan sampel dalam pelarut yang sesuai, atau mencampurkan sampel dengan bubuk adsorben hingga homogen. Sampel yang telah diimpregnasi kemudian dimasukkan ke dalam kolom melalui bagian atas secara perlahan lalu dipompa secara perlahan. Proses elusi dimulai dari pelarut nonpolar dan ditambahkan kepolarannya secara bergradien. Seiring berjalannya proses elusi, sesekali dihidupkan pompa agar cairan dapat turun dengan cepat, lalu eluat ditampung di dalam botol vial. Pemisahan dengan menggunakan kromatografi vakum cair biasanya dilakukan sebagai tahap awal pemisahan secara kompleks. Sampel yang dipisahkan dengan jalan kromatografi vakum cair diperoleh dari ekstrak kasar hasil ekstraksi. Bagian atas pada kolom dibiarkan terbuka agar mempermudah proses penggantian eluen (Kristanti *et al.*, 2008).

Tinggi kolom pada Kromatografi Vakum Cair harus disesuaikan dengan banyak sampel yang akan dipisahkan. Semakin banyak sampel yang akan dipisahkan, maka semakin tinggi kolom yang dibutuhkan. Pemilihan tinggi kolom yang tidak sesuai dengan jumlah sampel dapat menyebabkan pita yang diperoleh semakin lebar, sehingga proses pemisahan yang diperoleh tidak optimal. Menurut Maurya *et al.* (2018), tinggi kolom ideal yang dapat digunakan pada beberapa variasi massa sampel tertera pada tabel 4.

**Tabel 4.** Kesesuaian tinggi kolom dan jumlah sampel yang dipisahkan dengan jalan Kromatografi Vakum Cair (Maurya *et al.*, 2018)

Jumlah sampel	Tinggi kolom
< 100 mg	0,5 – 1 x 4 cm
0,5 – 1,0 g	2,5 x 4 cm
1 – 10 g	5 x 5 cm

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Instrumen dan Tugas Akhir Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Jambi. Penelitian dimulai dari Desember 2020 hingga April 2020. Evaporasi maserat dilakukan di Laboratorium Peternakan Universitas Jambi dan di Laboratorium Poltekkes Jambi. Karakterisasi sampel dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan IR bertempat di Laboratorium Universitas Negeri Padang.

#### 3.2 Bahan dan Peralatan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) yang diperoleh dari daerah Tanjung Jabung Barat, Provinsi Jambi. Bahan kimia yang digunakan selama penelitian diantaranya metanol, n-heksana, etil asetat, Diklorometana (DCM), plat Kromatografi Lapis Tipis pada pelat yang berlapis silika gel Merck 60 GF<sub>254</sub> 0,25 mm, aseton, aquades, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, Pereaksi Dragendorff merck KGaA, Pereaksi Mayer merck KGaA, HCl pekat 37% Sigma aldrich, serbuk Mg sigma aldrich, HCl 2N, FeCl<sub>3</sub>, pereaksi Liebermann-Burchard (asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat), silika gel Merck 60 (230 – 400 mesh), dan metanol p.a.. Kontrol positif dan kontrol negatif pada pengujian antioksidan adalah asam askorbat dan 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Sigma Aldrich.

Alat yang digunakan selama penelitian diantaranya seperangkat alat *Rotary Evaporator* IKA RV 10, pompa vakum, kolom kromatografi, oven, botol maserasi, peralatan gelas (gelas ukur, erlenmeyer, labu ukur, gelas kimia), plat tetes, batang pengaduk, tabung reaksi, kaca arloji, pipet tetes, neraca analitik, mikropipet, pinset, botol kaca/vial, pipa kapiler, pembakar spiritus, kaki tiga, kawat kasa, detektor UV  $\lambda$  254 nm, Spektrofotometer UV-Vis 8452 A Diode Array dan FTIR Shimadzu 8400. Selain itu juga dibutuhkan peralatan pendukung lainnya seperti aluminium foil, kertas label, gunting, penggaris, buku catatan, pensil, dan kamera gawai Iphone 6 8 MP.

#### 3.3 Metode Penelitian

##### Preparasi Sampel

Sampel yang akan diteliti adalah bagian biji dari tanaman kopi Liberika (*Coffea liberica*). Sejumlah biji kopi yang telah dikeringkan dilakukan *roasting* (penyangraian atau pemanggangan) menggunakan alat *roaster* pada suhu 180-240°C (Perdana *et al.*, 2018). Setiap 1 kg biji kopi memerlukan waktu selama 21 menit. Selanjutnya biji kopi yang telah dingin dihaluskan menggunakan alat *grinder* hingga diperoleh serbuk kopi yang halus.



### **Ekstraksi Sampel**

Sampel serbuk dari biji kopi liberika dimaserasi dengan pelarut metanol selama 2 hari dan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator*. Selanjutnya ekstrak pekat difraksinasi dengan cara partisi cair-cair menggunakan pelarut n-heksana (nonpolar). Dari proses partisi diperoleh fraksi n-heksana dan fraksi metanol. Selanjutnya dilakukan partisi menggunakan etil asetat (semipolar), diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi metanol. Fraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator*, kemudian fraksi pekat yang diperoleh ditimbang.

### **Skrining Fitokimia**

**Uji Alkaloid.** Sejumlah sampel dilarutkan dalam beberapa tetes asam sulfat 2N, kemudian diuji dengan pereaksi alkaloid yaitu pereaksi Dragendorff. Uji positif dibuktikan dengan timbulnya endapan jingga coklat dengan pereaksi dragendorff (Hanani, 2015).

**Uji Flavonoid.** Sejumlah sampel diteteskan dengan HCl pekat lalu dimasukkan serbuk Mg. Uji positif dibuktikan dengan timbulnya buih dan warna larutan berubah menjadi jingga.

**Uji Saponin.** Sejumlah sampel ditambahkan dengan beberapa tetes air panas, lalu dikocok kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa, dilanjutkan dengan penambahan 1 tetes HCl 2N. Uji positif ditandai dengan adanya busa stabil yang dapat bertahan lama dan tidak hilang (Hanani, 2015).

**Uji Fenol.** Sejumlah sampel ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  lalu dihomogenkan. Uji positif ditandai dengan munculnya warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat (Harbone, 2006).

**Uji Steroid dan Triterpenoid.** Sejumlah sampel ditambahkan dengan pereaksi Liebermann-Burchard (asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat). Timbulnya warna biru atau hijau menandakan adanya steroid. Terbentuknya warna ungu atau jingga menandakan adanya triterpenoid.

### **Pemisahan dan Pemurnian Senyawa**

**Kromatografi Lapis Tipis (KLT).** Disiapkan plat KLT dengan ukuran 1x5 cm, batas bawah 1 cm dan batas atas 0,5 cm dengan jarak tempuh eluen yaitu 3,5 cm. Selanjutnya dibuat eluen bergradien. Ditotolkan ekstrak menggunakan pipa kapiler pada batas bawah plat, selanjutnya dielusikan dengan eluen. Proses elusi dihentikan setelah gerakan sampai pada batas atas. Selanjutnya diamati bentuk noda menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm. Selanjutnya dilakukan uji KLT pada tiap fraksi untuk

melihat komponen noda. Fraksi yang memiliki pola noda yang sama disatukan dan dianalisis kembali.

**Kromatografi Kolom.** Kromatografi kolom vakum cair (KVC) dilakukan menggunakan fase diam silika gel. Sampel diimpregnasi menggunakan silika gel, kemudian dimasukkan ke dalam kolom yang telah berisi fase diam. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksana:etil asetat dan etil asetat:metanol secara bergradien. Fraksi yang diperoleh ditampung dalam botol vial, eluat ditampung berdasarkan tiap pita yang didapat lalu kemudian diuapkan. Hasil dari kromatografi kolom dilanjutkan KLT kembali. Eluat yang memiliki pola noda yang sama digabungkan berdasarkan nilai Rf kromatogram. Eluat yang memiliki satu pola noda kemudian diuji menggunakan 3 eluen berbeda, hasil KLT satu noda menandakan diperolehnya isolat. Isolat dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol. Selanjutnya dilakukan skrining fitokimia, karakterisasi dan uji aktivitas antioksidan.

#### **Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan metode DPPH**

Uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH diadaptasi dari Metode Latief *et al.* (2015).

**Pembuatan Larutan DPPH.** Larutan DPPH dibuat dalam konsentrasi 50  $\mu\text{M}$  dengan cara melarutkan 1,97 mg serbuk DPPH ke dalam 100 mL metanol p.a., terbentuk larutan berwarna ungu tua.

**Pembuatan Larutan Uji Ekstrak.** Larutan uji dibuat dalam variasi konsentrasi 500 ppm, 300 ppm, dan 100 ppm. Pembuatan larutan uji diawali dengan penimbangan ekstrak heksan, etil asetat dan metanol masing-masing sebanyak 0,1 g dan dilarutkan dalam 10 mL labu ukur menggunakan metanol p.a. hingga diperoleh larutan induk 10.000 ppm. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga diperoleh variasi konsentrasi 500 ppm, 300 ppm, dan 100 ppm.

**Pembuatan Larutan Uji Isolat.** Larutan uji dibuat dalam variasi konsentrasi 50 ppm, 30 ppm, dan 10 ppm. Pembuatan larutan uji diawali dengan penimbangan masing-masing isolat sebanyak 0,001 gr dan dilarutkan dalam 10 mL labu ukur menggunakan metanol p.a. hingga diperoleh larutan induk 100 ppm. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga diperoleh variasi konsentrasi 500 ppm, 300 ppm, dan 100 ppm.

**Pembuatan Larutan Kontrol positif.** Kontrol positif yang digunakan ialah larutan asam askorbat dengan variasi konsentrasi 50 ppm, 30 ppm, dan 10 ppm. Untuk membuat larutan induk 100 ppm, ditimbang sebanyak 0,001 g serbuk asam askorbat dan dilarutkan dengan metanol p.a. dalam labu ukur 10

mL. Selanjutnya dipipet sejumlah larutan induk untuk membuat variasi konsentrasi 50 ppm, 30 ppm, dan 10 ppm.

**Kontrol negatif.** Sebagai kontrol negatif digunakan metanol p.a. yang ditambahkan larutan DPPH.

**Pengujian aktivitas antioksidan.** Untuk penentuan aktivitas antioksidan, setiap konsentrasi larutan uji, larutan kontrol negatif dan larutan kontrol positif dipipet sebanyak 0,2 ml dengan menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam botol vial, selanjutnya ditambahkan sebanyak 3,8 mL larutan DPPH 50  $\mu$ M. Campuran larutan dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit ditempat gelap. Campuran larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometri UV-Visible pada panjang gelombang 517 nm. Kemudian dihitung nilai persen inhibisinya yang menunjukkan aktivitas peredaman DPPH dan nilai IC<sub>50</sub>, menyatakan konsentrasi yang menghasilkan 50% inhibisi.

#### **Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi**

**Spektrofotometer UV-Vis.** Sejumlah isolat dimasukkan dalam kuvet dan diamati spektrumnya pada panjang gelombang 200-800 nm untuk diidentifikasi nilai absorbansi senyawa aktif pada panjang gelombang maksimal.

**Spektrofotometer FTIR.** 0,2 g pelet KBr ditambahkan dengan 1 tetes isolat, dikeringkan kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometer FTIR pada bilangan gelombang 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.4 Analisis Data**

#### **Penentuan persentase rendemen ekstrak**

Penentuan persentase rendemen ekstrak dilakukan melalui perhitungan sebagai berikut

$$\% \text{ rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak kental (gr)}}{\text{berat sampel awal (gr)}} \times 100\%$$

#### **Penentuan analisis fitokimia**

Analisis fitokimia dilakukan dengan melihat adanya reaksi yang muncul antar reagen dan sampel. Reaksi tersebut dapat berupa timbulnya perubahan warna, endapan atau terbentuknya lapisan serta temperatur.

#### **Penentuan analisis aktivitas antioksidan**

**Nilai % inhibisi.** Penentuan nilai % inhibisi dilakukan dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan: • Kontrol = larutan kosong (tanpa tambahan sampel)

**Nilai IC<sub>50</sub>.** Untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub> dapat diperoleh dengan memplotkan grafik hubungan konsentrasi sampel dengan % inhibisi. Sumbu x

adalah konsentrasi sampel sedangkan sumbu y adalah % inhibisi. Kemudian dihitung persamaan regresinya  $y = a + bx$  dimana untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  dapat diketahui dari mengganti nilai y pada persamaan regresi dengan nilai 50.

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Preparasi Sampel Penelitian

#### Proses *Roasting* Sampel Biji Kopi Liberika

Tahap awal dalam suatu rangkaian penelitian ialah preparasi sampel yang akan digunakan. Preparasi pada penelitian ini diawali dari *roasting* sampel atau pemanggangan sampel biji kopi liberika. Sampel biji kopi liberika yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 6 kg. Langkah ini diawali biji kopi liberika *diroasting* (proses sangrai atau pemanggangan) dengan menggunakan alat *roasting* (*roaster*). Biji kopi liberika dimasukkan ke dalam *roaster* saat suhu *roaster* sudah mencapai 200°C, untuk setiap 1000 gr biji kopi dipanaskan selama 21 menit (Perdana *et al.*, 2018). Hasil dari proses *roasting* biji kopi liberika (*Coffea liberica*) dapat dilihat pada tabel 5.

**Tabel 5.** Berat biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) sebelum dan sesudah proses *roasting*

<i>Roasting</i>	Sebelum <i>diroasting</i>	Sesudah <i>diroasting</i>	Pengurangan massa (%)
I	2 kg	1,68 kg	16
II	2 kg	1,74 kg	13
III	2 kg	1,68 kg	16

Pada tabel 5, dapat dilihat hasil massa yang berbeda sebelum biji kopi liberika mengalami proses *roasting*. Adapun hasil massa yang berbeda pada saat sebelum dan sesudah *roasting* dikarenakan kadar air dari biji kopi liberika berkurang selama proses pemanggangan, sehingga berat biji kopi liberika berkurang. Hal ini juga terjadi pada penelitian yang telah dilakukan oleh Thomas *et al.* (2016), pada penyangraian biji kopi Arabika yaitu kadar air dari biji kopi akan semakin berkurang seiring bertambahnya waktu dan suhu penyangraian. Proses *roasting* ini dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan aroma dan rasa yang berhubungan dengan peningkatan kualitas biji kopi. *Roasting* juga dilakukan untuk menyesuaikan kadar asam pada biji kopi liberika yang umumnya akan dikonsumsi oleh khalayak masyarakat (Purnamayanti *et al.*, 2017). Selain ditinjau dari berat sampel, terdapat perubahan fisis pada biji kopi liberika yang telah mengalami proses *roasting*, dapat dilihat pada tabel 6.

**Tabel 6.** Kondisi fisik Biji Kopi Liberika setelah proses *Roasting*

Kondisi	Sebelum <i>roasting</i>	Setelah <i>roasting</i>
Warna	Coklat	Coklat pekat
Bau	Bau khas kopi	Bau semakin pekat

Dapat dilihat pada hasil yang tertera di tabel 6, setelah dilakukan proses *roasting*, biji kopi liberika berubah warna menjadi coklat pekat, hal serupa juga terjadi pada penelitian yang dilakukan oleh Agustina *et al.*, (2019). Selain itu, aroma yang dihasilkan dari biji kopi semakin khas, hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Fadri *et al.*, (2019). Pada kondisi fisik yang tertera di tabel 6, merupakan kondisi yang norma sesuai dengan SNI 01-3542-2004. Adanya perubahan warna dan aroma dari biji kopi yang sudah disangrai dapat disebabkan oleh terjadinya reaksi Mailard. Seiring dengan bertambahnya pemanasan, terbentuk senyawa karamelin yang membuat warna biji kopi sangrai semakin pekat. Warna biji kopi liberika sebelum dan sesudah proses *roasting* dapat dilihat melalui gambar 4 dan 5.



**Gambar 4.** Biji Kopi Liberika sebelum proses *roasting*



**Gambar 5.** Biji Kopi Liberika sesudah proses *roasting*

Setelah dilakukan *roasting*, perlu dilakukan penghalusan sampel biji kopi liberika dengan tujuan untuk memperkecil ukuran sampel sehingga luas permukaan sampel semakin besar. Dengan semakin kecilnya ukuran partikel, hal ini akan mempermudah proses difusi antar pelarut dan zat terlarut dari bahan organik sehingga akan mempermudah proses ekstraksi (Zhang *et al.*,

2018). Penghalusan biji kopi liberika dilakukan ketika biji kopi sudah dingin dengan tujuan untuk menstabilkan uap air yang diperoleh selama proses *roasting*. Penghalusan dilakukan menggunakan alat *grinder* dan diperoleh sampel biji kopi dalam bentuk serbuk.

#### 4.2 Ekstraksi Sampel Penelitian

##### Maserasi Serbuk Biji Kopi Liberika

Setelah dilakukan proses pemanggangan dan penghalusan, biji kopi liberika selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan cara maserasi. Maserasi adalah salah satu jenis ekstraksi yang umum dan sederhana, dilakukan dengan cara merendam simplisia di dalam pelarut yang sesuai, namun tanpa perlu diberikan perlakuan suhu (Saidi *et al.*, 2018). Dengan tidak memerlukan perlakuan suhu, maka akan meminimalisir kerusakan senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam sampel penelitian. Berbeda halnya dengan penyeduhan kopi menggunakan air panas dikarenakan air kurang dapat melarutkan senyawa organik, sehingga dibutuhkan perlakuan suhu saat menyeduh kopi menggunakan air. Pada penelitian ini, maserasi dilakukan menggunakan pelarut metanol. Tujuan penggunaan pelarut berupa metanol ialah dikarenakan metanol merupakan *magic solvent* yang dapat melarutkan sebagian besar senyawa yang terkandung dalam biji kopi liberika (Sukohar *et al.*, 2011). Proses maserasi dilakukan selama 3x24 jam, mengacu pada penelitian terhadap isolasi senyawa Kafein pada Biji Kopi Robusta yang dilakukan oleh Sukohar *et al.* (2011), pemilihan waktu tersebut dapat memaksimalkan proses penyarian pada senyawa bioaktif yang terkandung dalam biji kopi. Setelah dilakukan maserasi selama 3x24 jam, maserat yang dihasilkan telah berkurang intensitas warnanya, dapat dilihat pengurangan warna tersebut pada gambar 6.



**Gambar 6.** Perubahan warna maserat setelah 3 kali pengulangan

Dari pengurangan intensitas warna yang dihasilkan, hal ini mengindikasikan bahwa pelarut metanol telah maksimal dalam melakukan proses penyarian dan menarik senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam biji kopi. Maserat yang dihasilkan selanjutnya disaring menggunakan corong



kaca dan dihasilkan filtrat. Filtrat selanjutnya dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* agar diperoleh ekstrak kental biji kopi liberika yang sudah *diroasting*. Pada tahap ini diperoleh hasil ekstrak kental biji kopi liberika yang sudah *diroasting* sebanyak 229 g dari 5,1 kg sampel biji kopi liberika yang dimaserasi.

#### **Fraksinasi Cair-cair (Partisi)**

Ekstrak kental *crude* metanol dari biji kopi liberika kemudian dilanjutkan ekstraksi dengan cara fraksinasi cair cair (partisi). Partisi dilakukan untuk memisahkan komponen kimia biji kopi liberika diantara dua pelarut dengan prinsip perbedaan kelarutan. Pada penelitian ini, partisi dilakukan menggunakan pelarut heksan, dan etil asetat, dengan tujuan untuk memisahkan komponen senyawa berdasarkan sifat kepolaran pada pelarut tersebut (Sukohar *et al.*, 2011). Partisi dilakukan dengan menggunakan corong pisah, dan dihasilkan filtrat dari berbagai pengulangan dengan intensitas warna yang semakin berkurang dan sama. Dengan berkurangnya intensitas warna pada filtrat, hal ini menandakan bahwa pelarut yang digunakan telah maksimal memisahkan senyawa yang terkandung dalam sampel penelitian. Setelah itu diukur volume hasil dari partisi. Setelah itu, dilakukan evaporasi dan diperoleh ekstrak kental dari hasil partisi (fraksi metanol, fraksi heksan, dan fraksi etil asetat) kopi liberika.

#### **4.3 Rendemen ekstrak**

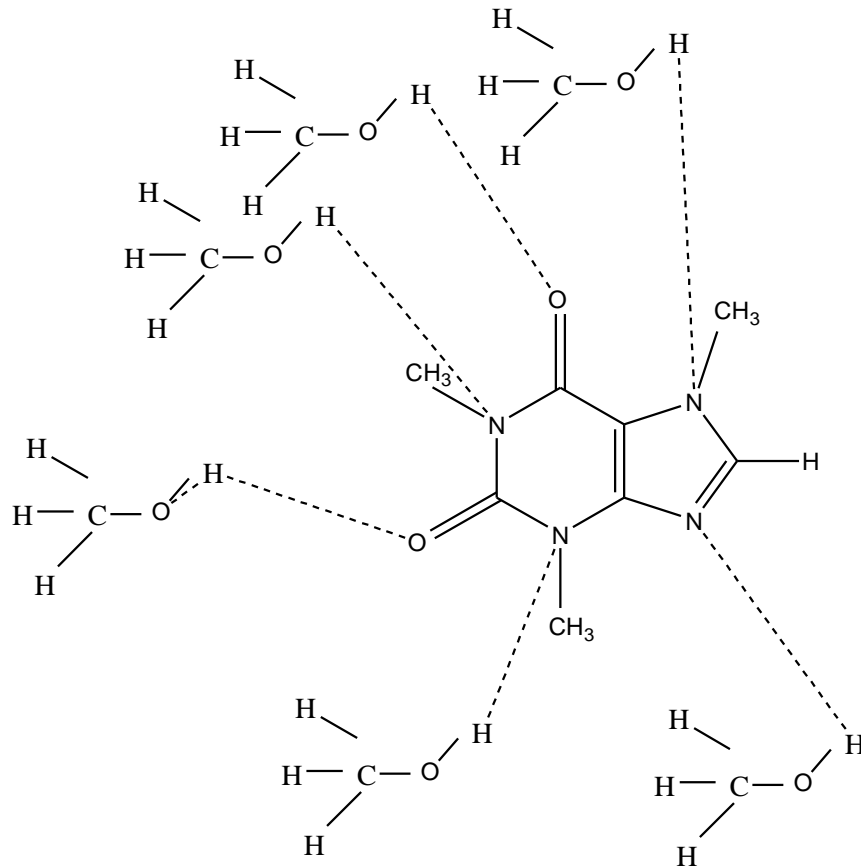
Setelah dilakukan pemisahan dengan cara fraksinasi cair-cair, filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat dan dihitung nilai rendemennya. Perhitungan nilai rendemen bertujuan untuk mengetahui perbandingan berat bahan kering yang dihasilkan dengan berat bahan baku awal. Hasil rendemen berbagai fraksi biji kopi liberika dapat dilihat melalui tabel 7.

**Tabel 7.** Hasil rendemen fraksi Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*)

Fraksi	Berat ekstrak (g)	% rendemen
Fraksi Heksan	21,23	11,6648
Fraksi Etil asetat	31,23	17,1484
Fraksi Metanol	46,53	25,5659

Melalui tabel 7, dapat dilihat hasil rendemen dari beberapa fraksi yang dihasilkan. Pada penelitian ini, digunakan jenis pelarut yang berbeda untuk memisahkan komponen bioaktif yang terdapat pada biji kopi liberika. Dengan digunakannya jenis pelarut yang berbeda, maka akan menghasilkan kuantitas ekstrak yang berbeda pula (Juliantari *et al.*, 2018). Setelah dilakukan pemisahan dengan cara partisi, fraksi metanol menghasilkan rendemen yang

paling besar dengan nilai 25,5659 %. Hal ini menandakan bahwa pelarut metanol bekerja lebih maksimal dibandingkan jenis pelarut lainnya untuk menarik senyawa yang cenderung bersifat polar, sehingga dapat diindikasikan bahwa sebagian besar senyawa yang terkandung pada biji kopi liberika merupakan senyawa yang cenderung bersifat polar. Selain itu, hal ini juga didasarkan oleh adanya interaksi hidrogen pada pearut metanol dengan senyawa yang terkandung pada kopi, seperti dapat diperkirakan pada gambar 7.



**Gambar 7.** Perkiraan interaksi hidrogen antara metanol dan senyawa pada kopi. Pada penelitian ini, hasil rendemen yang diperoleh pada fraksi etil asetat lebih kecil dibandingkan fraksi metanol, namun lebih besar dibandingkan n-heksana. Hal ini dapat mengindikasikan bahwa jumlah senyawa yang cenderung bersifat semi polar lebih sedikit daripada senyawa yang cenderung polar, hal ini juga didasarkan pada prinsip *like dissolve like*, dimana zat pelarut akan menarik zat terlarut yang memiliki kecenderungan sifat yang sama. Pada fraksi n-heksana, diperoleh hasil rendemen sebanyak 11,6648 %, hal ini dapat mengindikasikan bahwa kemungkinan senyawa yang cenderung bersifat non-polar dalam biji kopi liberika lebih sedikit dibandingkan senyawa yang cenderung bersifat polar.

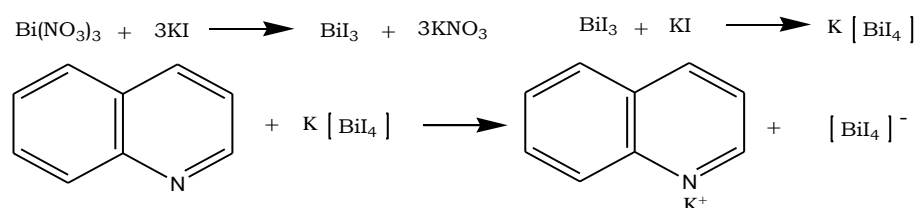
#### 4.4 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi

Pada penelitian ini, skrining fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui informasi awal mengenai profil atau kandungan senyawa fitokimia yang terdapat pada sampel penelitian. Skrining fitokimia meliputi analisis terhadap beberapa golongan senyawa metabolit sekunder, seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, steroid, triterpenoid, dan saponin (Raaman, 2006). Hasil skrining fitokimia pada biji kopi liberika dapat dilihat melalui tabel 8.

**Tabel 8.** Hasil skrining fitokimia ekstrak dan fraksi Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*)

Skrining fitokimia	Crude metanol	Fraksi n-heksana	Fraksi etil asetat	Fraksi metanol	Keterangan
Alkaloid	+	+	+	+	Terbentuk endapan jingga
Fenol	+	+	+	+	Warna biru atau hijau kehitaman
Flavonoid	+	-	-	+	Terbentuk endapan merah atau jingga
Steroid	-	-	-	-	Terbentuk warna hijau/biru
Triterpenoid	-	-	-	-	Terbentuk warna ungu/jingga
Saponin	+	-	-	+	Terbentuk busa yang stabil

Pada penelitian ini pereaksi yang digunakan untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya senyawa golongan alkaloid ialah pereaksi dragendorf dan mayer. Adanya endapan jingga yang terbentuk pada ekstrak metanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol menandakan hasil positif, sesuai keterangan yang tertera pada tabel 8. Endapan jingga ini terbentuk oleh adanya reaksi antara nitrogen yang terkandung pada alkaloid dengan kalium tetraiodobismutat membentuk ikatan kovalen koordinat nitrogen dengan logam  $K^+$  membentuk senyawa kompleks kalium alkaloid (Azizah *et al.*, 2019). Dugaan reaksi yang terjadi pada pengujian alkaloid dapat dilihat melalui gambar 8.



**Gambar 8.** Reaksi antara alkaloid dengan pereaksi dragendorff

Dapat dilihat melalui tabel 8, hasil positif senyawa fenol terdapat pada ekstrak metanol dan semua fraksi. Adanya warna hijau kehitaman disebabkan oleh reaksi antar ion  $Fe_{3+}$  pada pereaksi  $FeCl_3$  1% dengan senyawa fenol membentuk senyawa kompleks berwarna (Azizah *et al.*, 2019).

Pengujian kualitatif senyawa golongan flavonoid pada penelitian ini dilakukan dengan menambahkan HCl pekat pada ekstrak, sehingga HCl pekat dapat menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya. Setelah itu, ditambahkan serbuk Mg untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid, sehingga hasil positif pada pengujian ini ditandai dengan terbentuknya kompleks berwarna merah atau jingga. Pada penelitian ini, hasil positif terbentuk pada ekstrak metanol dan fraksi metanol, hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak metanol dan fraksi metanol mengandung senyawa flavonoid. Sedangkan pada fraksi n-heksana dan etil asetat tidak terbentuk endapan merah/jingga, sehingga dapat diindikasikan bahwa pada fraksi tersebut tidak terkandung senyawa flavonoid.

Untuk mengidentifikasi saponin secara kualitatif, ekstrak sampel ditambahkan air hangat dan dikocok. Hasil positif yaitu berupa timbulnya busa, hal ini diakibatkan karena saponin dapat menurunkan tegangan permukaan pada air, dan adanya senyawa saponin pada sampel dapat merusak ikatan hidrogen antara air dan sampel (Nurzaman *et al.*, 2018). Setelah itu, ditambahkan asam untuk menguji kestabilan buih yang terbentuk pada sampel. Dari tabel 8, dapat diperoleh informasi awal bahwa ekstrak metanol dan fraksi metanol mengandung senyawa saponin karena ketika dikocok dengan air hangat, terbentuk buih yang stabil ketika ditambahkan HCl.

Dari tabel 8, dapat diperoleh informasi awal yang mengindikasikan bahwa ekstrak metanol biji kopi liberika mengandung senyawa golongan alkaloid, fenolik, flavonoid, dan saponin. Hasil yang sama juga diperoleh pada penelitian yang dilakukan oleh Oyeyemi *et al.* (2017), pada skrining fitokimia Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) pada kopi yang belum mengalami proses *roasting*. Pada fraksi n-heksana setelah dilakukan pemisahan dengan cara partisi, kemungkinan senyawa yang terkandung pada fraksi n-heksana dan etil asetat ialah senyawa golongan alkaloid dan fenolik. Sedangkan pada fraksi metanol, terkandung senyawa golongan alkaloid, fenolik, saponin dan flavonoid. Pada fraksi metanol, diperoleh golongan senyawa yang lebih banyak dibandingkan fraksi yang berasal dari pelarut berbeda. Hal ini sesuai dengan hasil rendemen terbesar yang diperoleh pada fraksi metanol, yaitu sebanyak 25,5659 %, sehingga dapat diartikan bahwa pelarut metanol dapat menarik

lebih banyak golongan senyawa pada biji kopi liberika, dan fraksi metanol lebih banyak mengandung senyawa yang cenderung bersifat polar.

#### 4.5 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi

Pada penelitian ini, uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidazil). Prinsip dari metode ini ialah peredaman atau penangkalan radikal bebas DPPH oleh senyawa antioksidan yang terkandung dalam sampel. Senyawa antioksidan akan mendonorkan elektronnya kepada senyawa radikal sehingga senyawa radikal berubah menjadi senyawa yang cenderung stabil. Pada penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang terkandung dalam sampel, dilakukan melalui dua cara yaitu secara kualitatif dan kuantitatif.

##### Metode Kualitatif

Metode kualitatif dilakukan terhadap ketiga fraksi untuk melihat ada atau tidaknya aktivitas antioksidan yang terkandung pada sampel. Selain itu, juga akan dilihat kuat atau lemahnya aktivitas antioksidan melalui intensitas warna yang dihasilkan. Pengujian secara kualitatif dilakukan dengan cara mengelusi sampel menggunakan eluen yang sesuai pada plat KLT, sehingga diperoleh noda yang naik pada plat. Selanjutnya disemprot menggunakan larutan DPPH dan diperoleh perubahan warna pada jalur plat KLT pada sampel yang mengandung aktivitas antioksidan. Berikut merupakan hasil uji kualitatif antioksidan menggunakan metode DPPH pada ekstrak kasar metanol, fraksi etanol, n- heksana, dan etil asetat.



**Gambar 9.** Hasil uji kualitatif antioksidan ekstrak *crude* metanol, fraksi metanol, fraksi n-heksana, dan fraksi etil asetat (setelah disemprot menggunakan larutan DPPH)

Melalui gambar 9, dapat dilihat bahwa pada ekstrak *crude* metanol, fraksi metanol, fraksi n-heksana, dan fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan. Hal ini ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi warna kuning atau terjadi pengurangan warna ungu pada plat KLT (Muflihunna dan Sarif, 2010). Pada ketiga jenis fraksi yang diuji, dihasilkan perubahan warna yang signifikan pada fraksi metanol jika dibandingkan dengan kedua fraksi lainnya. Hal ini dapat mengindikasikan bahwa fraksi metanol memiliki aktivitas antioksidan terkuat jika dibandingkan dengan fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat. Oleh karena itu, hal ini menjadi pertimbangan untuk mengetahui potensi fraksi yang akan dilakukan isolasi senyawa pada tahap berikutnya. Pertimbangan lainnya ialah bahwa fraksi metanol berpotensi untuk dilakukan isolasi senyawa ialah merujuk pada nilai % rendemen tertinggi yang dihasilkan dan banyaknya senyawa yang terkandung melalui identifikasi skrining fitokimia.

#### Metode Kuantitatif

Setelah dilakukan uji kualitatif, perlu dilakukan uji kuantitatif untuk mengetahui kuantitas aktivitas antioksidan pada fraksi yang berpotensi untuk dilakukan isolasi. Dalam hal ini, fraksi metanol berpotensi untuk dilakukan isolasi dikarenakan memiliki % rendemen tertinggi, banyak mengandung senyawa fitokimia, dan memiliki aktivitas antioksidan terkuat dibandingkan fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat. Pengujian aktivitas secara kuantitatif menggunakan konsentrasi larutan uji yaitu 100 ppm, 300 ppm, dan 500 ppm. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 9.

**Tabel 9.** Hasil Uji Aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) menggunakan metode DPPH

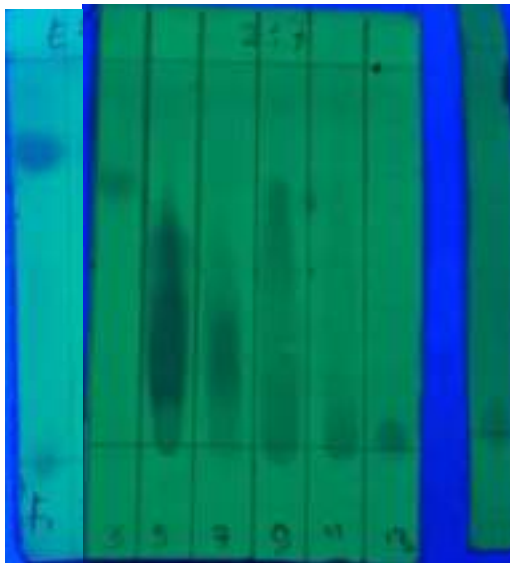
Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		% Inhibisi	Persamaan linear	IC <sub>50</sub> (ppm)
		Blanko (kontrol negatif)	Sampel			
Fraksi metanol	100	0,418	0,2	52,15	$y = 0,1776x + 19,607$ $R^2 = 0,7956$	171
	300		0,032	92,34		
	500		0,027	93,78		

Uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif prinsipnya didasarkan pada pembacaan absorbansi ketika radikal bebas telah diredam oleh senyawa antioksidan yang terkandung pada sampel. Pada tabel 9, dapat dilihat hasil yang diperoleh yaitu nilai IC<sub>50</sub> sebesar 171 ppm masih berada dalam rentang sedang pada tingkat kekuatan antioksidan menurut Jun *et al.* (2003), karena memiliki nilai IC<sub>50</sub> pada rentang (150 – 200 ppm), sehingga fraksi metanol berpotensi untuk dilanjutkan ke isolasi senyawa pada tahap berikutnya.

#### 4.6 Hasil Isolasi Senyawa

Setelah diperoleh hasil bahwa fraksi metanol berpotensi untuk diisolasi merujuk pada besarnya hasil % rendemen yang diperoleh, skrining fitokimia, dan uji aktivitas antioksidan, maka penelitian terhadap fraksi metanol dilanjutkan ke tahap isolasi. Beberapa faktor tersebut dipertimbangkan dengan tujuan agar diperoleh senyawa fitokimia yang memiliki aktivitas antioksidan. Proses isolasi dilakukan secara kromatografi vakum cair. Pemilihan metode ini didasarkan pada prinsip penggunaan pompa vakum yang dapat menekan aliran eluen sehingga dapat mempercepat proses elusi dan pemisahan senyawa berlangsung lebih cepat (Saifudin, 2002).

Sebanyak 15 g ekstrak diimpregnasi menggunakan 15 g silika gel. Fasa diam yang digunakan berupa silika gel sebanyak 40 g. Sampel dielusi menggunakan eluen etil asetat : metanol secara bergradien, kepolarannya dinaikkan 10%. Eluat yang diperoleh ditampung di botol vial dan selanjutnya dimonitor menggunakan Kromatografi Kolom Kertas sehingga diperoleh noda pada senyawa yang dapat dilihat pada gambar 10.



**Gambar 10.** Pola noda hasil kromatografi vakum cair di bawah lampu UV 254 nm pada berbagai botol vial

Pola noda senyawa dikelompokkan menjadi beberapa fraksi yang dapat dilihat melalui tabel 10.

**Tabel 10.** Pengelompokan fraksi KVC dari Fraksi Metanol Biji Kopi *Liberika (Coffea liberica)*

Fraksi	Urutan botol vial	Berat fraksi (g)
1	2	0,0098
2	3-4	4,6
3	5-8	1
4	9-12	1,3
5	13-16	0,2

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan secara kualitatif terhadap semua fraksi yang diperoleh untuk mengetahui intensitas perubahan warna yang dihasilkan. Uji kualitatif diawali dengan elusi fraksi yang diperoleh menggunakan eluen etil metanol perbandingan 7 dan 3 sehingga diperoleh noda pada plat KLT. Selanjutnya plat KLT disemprot menggunakan larutan DPPH untuk melihat perubahan warna yang dihasilkan dan disajikan melalui gambar 11.



**Gambar 11.** Uji aktivitas antioksidan secara kualitatif menggunakan penyemprot DPPH terhadap Fraksi Metanol

Dari gambar 11, dapat dilihat bahwa intensitas warna yang dominan terdapat pada fraksi 1. Selain didasarkan pada pola noda yang dihasilkan, pengelompokkan fraksi 1 juga merujuk pada timbulnya kristal pada dinding vial. Selain itu, dengan didasarkan pada pola noda fraksi 1 yang tidak terlalu berekor, dapat dimungkinkan bahwa fraksi 1 berpotensi mengandung senyawa murni. Oleh karena itu, dilakukan rekristalisasi untuk menghilangkan kontaminan yang terdapat pada sampel.



**Gambar 12.** Gambar kristal F1 Metanol (sebelum dilakukan pemurnian)

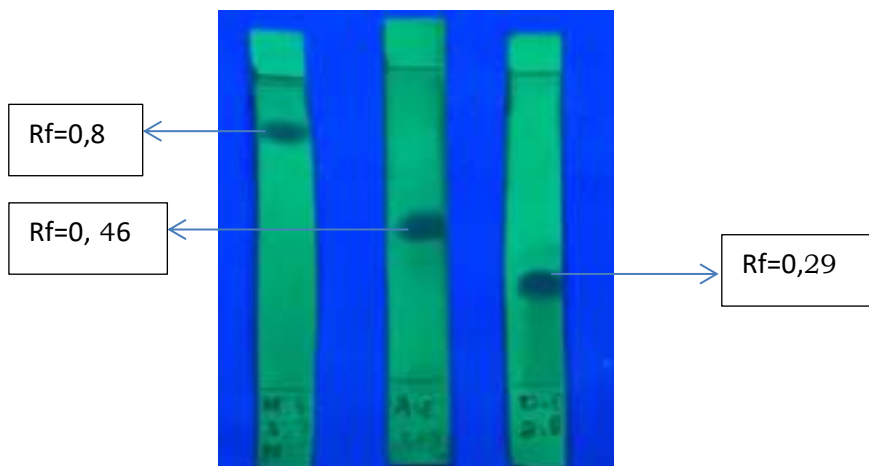


Pemurnian dilakukan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut dari yang bersifat nonpolar (heksan), semi polar (etil asetat), polar dan metanol. Setelah itu dikeringkan dan diperoleh kristal seperti gambar 13.



**Gambar 13.** Gambar isolat F1 Metanol (setelah dilakukan pemurnian)

Kristal dimonitor secara KLT menggunakan eluen yang sesuai (Metanol : etil asetat = 3:7) dan diperoleh noda pada gambar 14.



**Gambar 14.** Hasil KLT Kristal F1 (Hasil KVC Metanol) menggunakan eluen (dari kiri ke kanan) Metanol:etil asetat = 3:7, Aseton: Etil asetat = 1:9, dan DCM:etil asetat = 2:8.

Dari gambar 14, diperoleh noda tunggal pada plat KLT menggunakan eluen Metanol : etil asetat = 3:7. Hal ini mengindikasikan bahwa kristal yang diperoleh sudah murni. Namun untuk memastikan dilakukan monitor lagi secara KLT dengan menggunakan pengembangan eluen yang berbeda (sistem 3 eluen). Eluen yang digunakan ialah Aseton: Etil = 1:9, dan DCM:etil = 2:8, dan dihasilkan noda yang tunggal. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa yang terkandung pada isolat F1 sudah murni.

#### 4.7 Hasil Karakterisasi Senyawa Isolasi

##### Karakterisasi melalui skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui informasi awal mengenai gambaran kandungan senyawa yang terdapat pada isolat F1 dari biji tanaman kopi Liberika (*Coffea liberica*). Hasil uji kualitatif ini dapat dilihat melalui tabel 11.

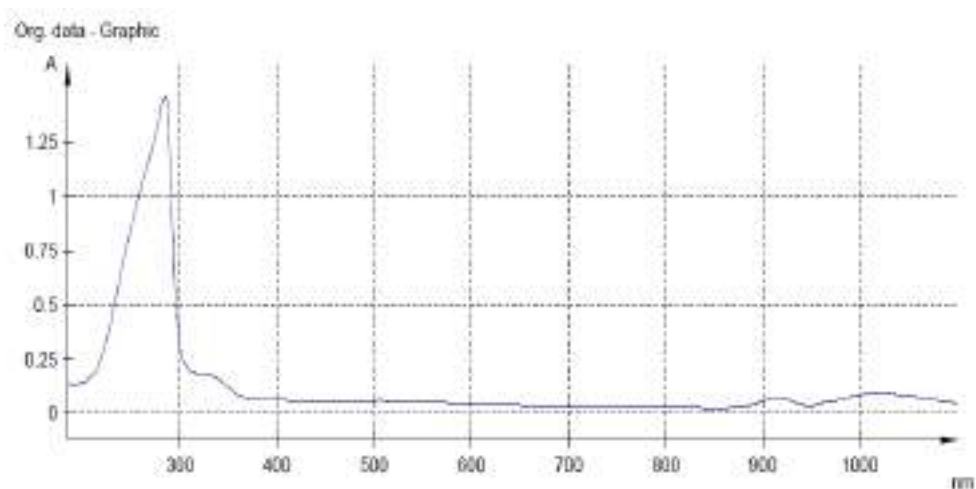
**Tabel 11.** Hasil skrining fitokimia isolat F1 metanol

Skrining fitokimia	Pereaksi uji	Keterangan	Hasil
Alkaloid	Dragendorff	Endapan jingga	+
Fenolik	FeCl <sub>3</sub> 1%	Warna biru kehitaman atau hijau kehitaman	-
Flavonoid	Mg + Hcl	Terbentuk endapan merah	-
Steroid	Lieberman Burchard	Terbentuk warna hijau/biru	-
Triterpenoid	Lieberman Burchard	Terbentuk warna ungu/jingga	-
Saponin	Air panas + HCl	Terbentuk busa yang stabil	-

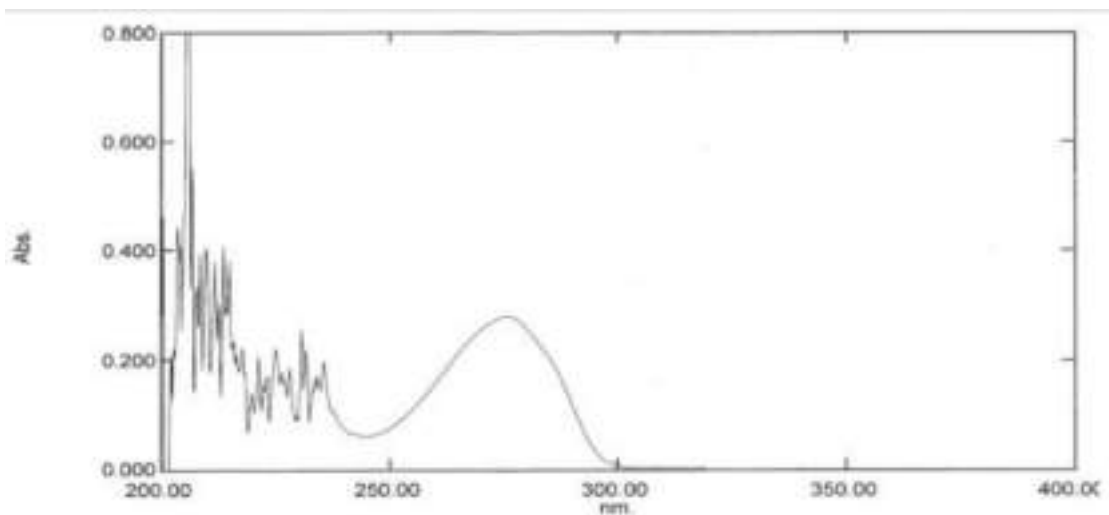
Berdasarkan tabel 11, dapat diketahui bahwa isolat F1 memberikan hasil positif pada pengujian senyawa golongan alkaloid menggunakan pereaksi dragendorff yang ditandai terbentuknya endapan jingga pada sampel. Setelah diperoleh informasi awal terkait senyawa yang terkandung pada isolat, perlu dilakukan karakterisasi secara spektrofotometri pada tahap berikutnya.

##### Karakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Karakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya gugus kromofor pada isolat yang diperoleh. Hasil karakterisasi dapat dilihat pada gambar 15, dan dapat dibandingkan dengan serapan maksimum menurut literatur yang tertera pada gambar 16.



**Gambar 15.** Spektrum UV-Vis Isolat F1 Metanol

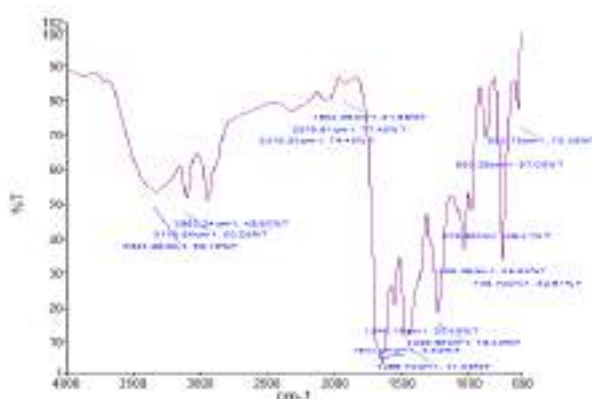


**Gambar 16.** Spektrum UV-Vis Kafein (Misfadhila *et al.*, 2016).

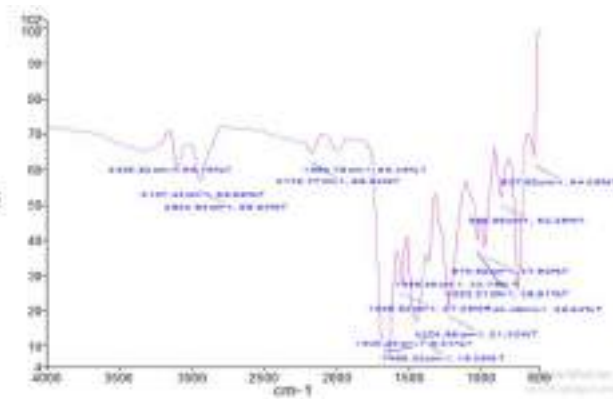
Melalui gambar 15, dapat dilihat serapan maksimum berada pada panjang gelombang 282 nm. Berdasarkan hasil skrining fitokimia yang telah dilakukan pada tahap sebelumnya, informasi awal yang diperoleh mengenai kandungan senyawa pada isolat F1 ialah alkaloid. Menurut Tjandra *et al.* (2020), panjang gelombang 282 nm menunjukkan serapan maksimum pada senyawa alkaloid. Pada panjang gelombang tersebut terjadi transisi  $n \rightarrow \pi^*$  yang menunjukkan adanya eksitasi elektron pada senyawa tersebut. Menurut Suhartati (2017), pada serapan panjang gelombang kisaran 280 nm mengindikasikan adanya gugus C=O. Adanya kemiripan serapan maksimum pada senyawa kafein, yaitu pada panjang gelombang 275,4 nm diperoleh pada penelitian yang dilakukan oleh Misfadhila *et al.* (2016), dimana panjang gelombang yang berbeda dapat disebabkan karena adanya efek pelarut yang menyebabkan pergeseran panjang gelombang. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan Fatoni (2015), bahwa panjang gelombang serapan maksimum kafein berada pada rentang 270-300 nm.

#### **Karakterisasi menggunakan spektrofotometer FT-IR**

Karakterisasi menggunakan spektrofotometer FT-IR pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya gugus fungsi pada isolat yang diperoleh. Hasil karakterisasi dapat dilihat pada gambar 17, dan dapat dibandingkan dengan serapan maksimum menurut literatur yang tertera pada gambar 18.



**Gambar 17.** Spektrum FT-IR Isolat F1 Metanol



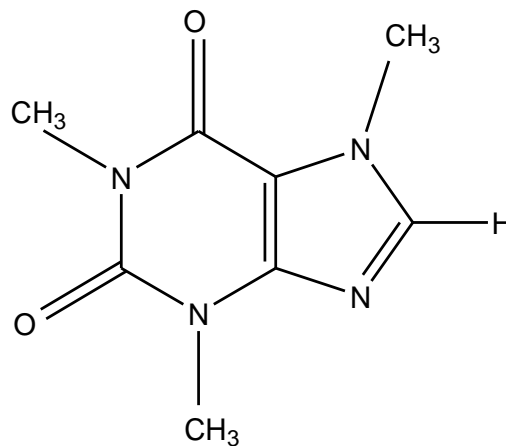
**Gambar 18.** Spektrum FT-IR Isolat Kafein (Misfadhila *et al.*, 2016).

**Tabel 12.** Perbandingan serapan isolat F1 dengan Kafein (Misfadhila *et al.*, 2016)

Bilangan gelombang isolat F1 (cm <sup>-1</sup> )	Bilangan gelombang Isolat Kafein (Misfadhila <i>et al.</i> , 2016) (cm <sup>-1</sup> )	Gugus Fungsi
3341,28	3336,52	N-H
2953,24	2944,94	C-H
1924,55	1992,75	C=O
1644,47	1646,25	C=C
1548,16	1546,53	C-N
1456,73	1456,02	C-H
1255,86	1227,80	C-N
973,20	970,62	C-C

Pada penelitian ini, analisis secara spektrofotometri FT-IR dilakukan untuk menentukan gugus fungsi dari senyawa yang diperoleh dan untuk mengetahui dugaan struktur kimia senyawa yang diperoleh berdasarkan daerah sidik jari pada spektrum FT-IR. Melalui hasil spektrum FT-IR pada gambar 10, dapat dilihat adanya serapan pada bilangan gelombang 3341,28 cm<sup>-1</sup>. Adanya serapan pada bilangan gelombang tersebut menunjukkan regangan gugus N-H (Dachriyanus, 2004). Hal serupa juga terdapat pada penelitian yang dilakukan oleh Misfadhila *et al.* (2016), pada senyawa kafein hasil isolasi yang memiliki serapan pada bilangan gelombang 3336,52 cm<sup>-1</sup>, juga telah sesuai dengan serapan pada kafein standar (Verma dan Kumar, 2010). Serapan bilangan gelombang 2953,24 cm<sup>-1</sup> pada gambar di atas mengindikasikan adanya gugus fungsi C-H pada senyawa yang diperoleh, bilangan gelombang yang berdekatan merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Misfadhila *et al.* (2016) yaitu terdapat pada 2944,94 cm<sup>-1</sup>. Adanya serapan pada 1924,55 cm<sup>-1</sup> mengindikasikan adanya vibrasi C=O (Asnawi *et al.*, 2021). Pada serapan 1644,47 cm<sup>-1</sup> mengindikasikan adanya vibrasi pada C=C (Asnawi *et al.*, 2021), juga serupa dengan senyawa kafein yang dilakukan oleh Misfadhila *et al.* (2016), pada 1646,25 cm<sup>-1</sup>. Adanya serapan pada bilangan gelombang 1548,16

cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya gugus fungsi C-N, sesuai dengan adanya serapan bilangan gelombang 1548,89 cm<sup>-1</sup> merujuk penelitian yang dilakukan oleh Verma dan Kumar, (2010) pada kafein standar, dan juga memiliki serapan serupa pada penelitian yang dilakukan oleh Misfadhila *et al.* (2016), yaitu pada 1546,53 cm<sup>-1</sup>. Pada bilangan gelombang 1456,73 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya serapan yang mengindikasikan adanya ikatan C-H (Dachriyanus, 2004). Serapan pada bilangan gelombang 1225,86 cm<sup>-1</sup> menunjukkan kemiripan serapan pada penelitian yang dilakukan oleh Misfadhila *et al.* (2016), yaitu pada bilangan gelombang 1227,80 cm<sup>-1</sup> mengindikasikan adanya vibrasi C-N. Adanya serapan pada bilangan gelombang 973,20 cm<sup>-1</sup> mengindikasikan adanya regang C-C. Dari karakterisasi spektrofotometri, dapat diketahui bahwa isolat F1 diduga mengandung senyawa alkaloid jenis kafein, berikut merupakan struktur dari kafein :



**Gambar 19.** Dugaan Struktur Senyawa Isolat F1

#### 4.8 Uji aktivitas antioksidan Senyawa Isolasi

Setelah diperoleh isolat murni, dilakukan uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif pada sampel untuk mengetahui nilai aktivitas antioksidan sehingga dapat ditentukan rentang tingkat kekuatan antioksidan pada isolat F1. Uji Aktivitas dilakukan menggunakan metode DPPH menggunakan konsentrasi sampel bervariasi dimulai dari 10 ppm, 30 ppm, dan 50 ppm. Selain itu juga dilakukan pengujian terhadap asam askorbat yang berperan sebagai kontrol positif. Hal ini bertujuan untuk membandingkan kekuatan aktivitas antioksidan pada sampel dengan senyawa murni komersial yang telah umum digunakan sebagai agen antioksidan. Hasil pengujian terhadap isolat F1 dapat dilihat pada tabel 13.

**Tabel 13.** Hasil uji aktivitas antioksidan isolat F1

Sampel	Konse ntrasi (ppm)	Absorbansi		% Inhibisi	Persamaan linear	IC <sub>50</sub> (ppm)
		Blanko (kontrol negatif)	Sampel			
Isolat F1 Metanol	10		0,213	49,0431	y= 1,4238x + 17,395 R <sup>2</sup> = 0,7982	22,89
	30	0,418	0,1305	68,7799		
	50		0,084	79,904		

Unuk menentukan aktivitas antioksidan secara kuantitatif pada suatu sampel, diperlukan persamaan regresi linear untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub>. Dari hasil uji aktivitas antioksidan pada tabel 10 yang dilakukan terhadap isolat F1 dan asam askorbat, diketahui bahwa isolat F1 memiliki nilai IC<sub>50</sub> sebesar 18,4260 ppm. Hal ini menandakan bahwa isolat F1 memiliki tingkat antioksidan yang sangat kuat (Jun *et al.*, 2003). Hal ini diperkuat dengan membandingkan nilai IC<sub>50</sub> isolat dengan nilai IC<sub>50</sub> asam askorbat, dapat diketahui bahwa nilai IC<sub>50</sub> isolat lebih kecil dibandingkan dengan nilai IC<sub>50</sub> asam askorbat, yaitu 22,89 ppm < 32,2 ppm. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> suatu sampel, maka berarti tingkat aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh isolat tersebut lebih kuat. Nilai IC<sub>50</sub> isolat yang diperoleh isolat F1 lebih kecil dibandingkan fraksi metanol, hal ini disebabkan pada fraksi metanol kemungkinan masih mengandung senyawa yang tidak murni serta kontaminannya. Menurut Sukohar *et al.* (2011), pada pengujian aktivitas antioksidan senyawa Kafein hasil isolasi diperoleh nilai IC<sub>50</sub> sebesar 21,41 ppm. Nilai tersebut tidak jauh berbeda dengan nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh pada senyawa kafein yang diperoleh pada penelitian ini, dan sama-sama masih berada pada rentang tingkat antioksidan yang kuat, karena memiliki nilai IC<sub>50</sub> < 50 ppm (Jun *et al.*, 2003).

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan ,dapat disimpulkan bahwa:

1. Fraksi metanol Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) yang telah mengalami proses penyangraian (*roasting*) mengandung golongan senyawa alkaloid, fenolik, dan saponin.
2. Hasil isolasi senyawa yang diperoleh dari fraksi metanol biji kopi liberika (*roasted*) merupakan senyawa golongan alkaloid yang diduga sebagai kafein.
3. Aktivitas antioksidan fraksi metanol dan isolat (diduga senyawa Kafein) Biji Kopi Liberika (*Coffea liberica*) yang telah mengalami proses penyangraian (*roasting*) berturut-turut dinyatakan dalam nilai IC<sub>50</sub> sebesar 171 ppm dan 22,89 ppm.

### 5.2 Saran

Sebaiknya dilakukan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode lain agar dapat diketahui kemampuan antioksidan biji kopi liberika.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, R., D. Nurba, W. Antono, dan R. Septiana . 2019. "Pengaruh suhu dan lama penyangraian terhadap sifat fisika-kimia kopi arabika dan kopi robusta". *Prosiding Seminar Nasional Inovasi Teknologi Untuk Masyarakat*. Vol. 53 (9) : 285–299.
- Astawan, L. dan A. M. Kasih. 2008. *Khasiat Warna Warni Makanan*. Gramedia Pustaka Utama : Jakarta.
- Azizah, Z., Misfadhila, S., dan Oktoviani, T. S. 2019. "Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bubuk Kopi Olahan Tradisional Sungai Penuh-Kerinci Dan Teh Kayu Aro Menggunakan Metode DPPH ( 1 , 1-Difenil-2-Pikrilhidrazil )". *Jurnal Farmasi Higea*. Vol. 11 (2) :105-112.
- Bele, A. A. dan A. Khale. 2011. "An Overview On Thin Layer Chromatography". *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*. Vol. 2 (2) : 256 – 267
- Dachriyanus. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik secara spektroskopi*. Padang : Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas.
- Fadri, R. A., K. Sayuti, N. Nazir, dan I. Suliansyah. 2019. "Review Proses Penyangraian Kopi Dan Terbentuknya Akrilamida Yang Berhubungan Dengan Kesehatan". *Journal of Applied Agricultural Science and Technology*. Vol. 3 (1): 129–145.
- Farhaty, N. dan Muchtaridi. 2016. "Tinjauan Kimia dan Aspek Farmakologi Senyawa Asam Klorogenat Pada Biji Kopi : Review". *Farmaka*. Vol. 14 (1) : 214-227.
- Fatoni. 2015. "Analisa Secara Kualitatif dan Kuantitatif Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk Lokal yang Beredar di Kota Palembang Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis". *Laporan Penelitian Mandiri*. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Bhakti Pertiwi. Palembang. Hal : 11 – 24.
- Gultom, R. B. J. dan H. S. Siagian 2019. Potensial Farmakologis Tanaman "Gynura" Analisis Fitokimia dan Bioaktivitasnya.
- Hanani, E. 2015. *Analisis Fitokimia*. EGC. Jakarta.
- Harbone, J.B. 2006. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan..* ITB Press. Bandung.
- Harini, N., R. Marianty dan V. A. Wahyudi. 2019. *Analisa Pangan*. Zifatama Jawara : Sidoarjo.
- Hasanah, M., B. Maharani, dan E. Munarsih. 2017. "Daya antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Kopi Robusta (*Coffea robusta*) terhadap Pereaksi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)". *IJPST*. Vol. 4 (2) : 42-49.
- Hulupi, R. dan E. Martini. 2013. *Pedoman Budidaya dan Pemeliharaan Tanaman Kopi di Kebun Campur*. World Agroforestry Centre (ICRAF) Southeast Asia Regional Program : Bogor.
- Ismail, B. dan S. S. Nielsen. 2010. "Basic Principles of Chromatography". *Food Analysis*. Vol. 1 (27) : 473 – 498.
- Juliantari, N. P. D., L. P. Wrasati, dan N. M. Wartini. 2018. "Karakteristik Ekstrak Ampas Kopi Bubuk Robusta (*Coffea Canephora*) Pada Perlakuan Konsentrasi Pelarut Etanol Dan Suhu Maserasi Characteristics Of Coffee Grounds Robusta Extract (*Coffea Canephora*) In The Treatment Of Ethanol Solvent Concentration And Macera". Vol. 6 (3): 243–249.



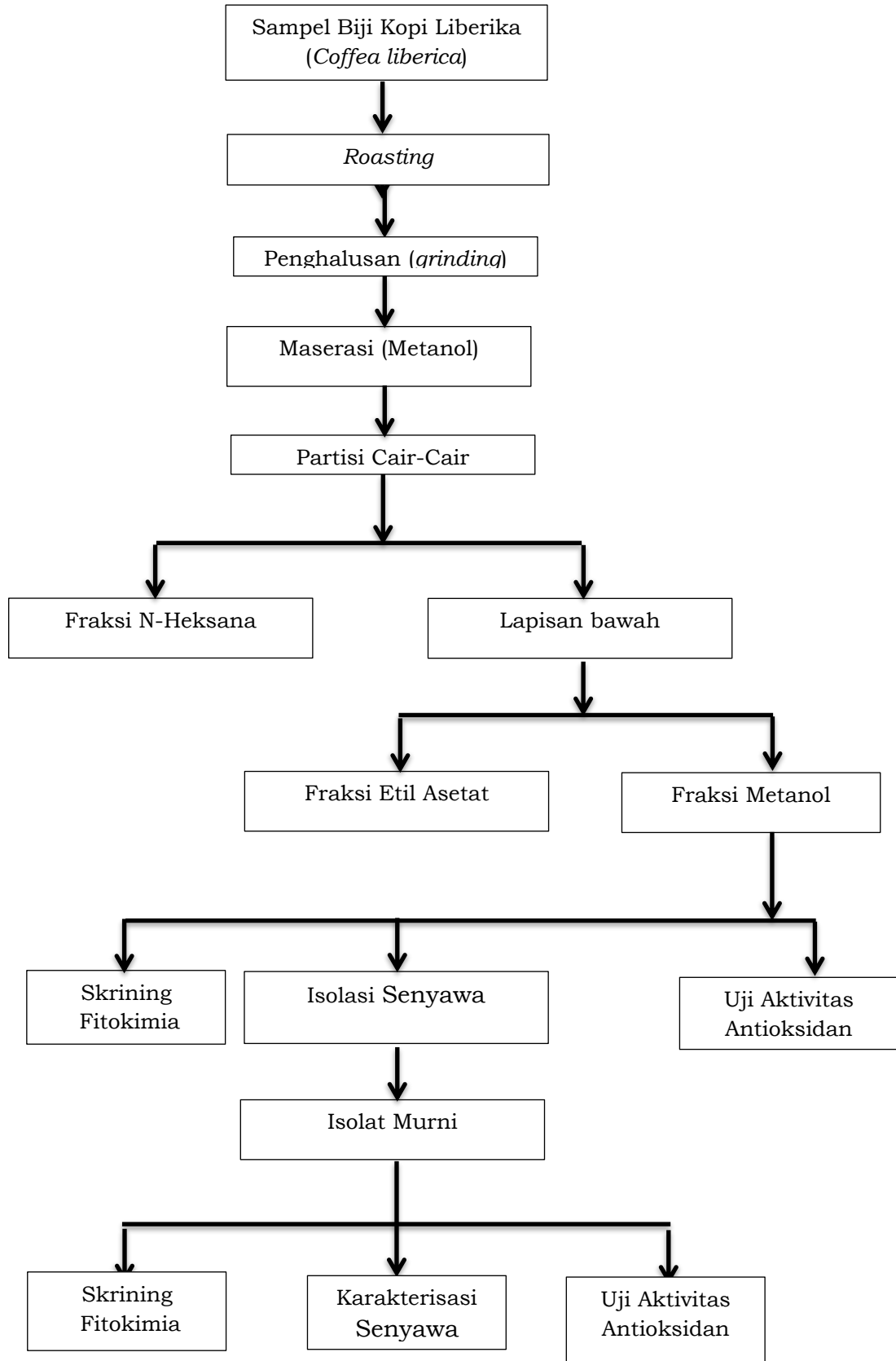
- Jun, M.H.Y., J. X. Fong, dan C.S. Wan. 2003. "Camparison of Antioxidant Activities of Isoflavones Form Kudzu Root (*Pueraria lobata* O)", *Journal Food Science Institute of Technologist*. Vol. 68 (1) : 2117–2122.
- Kristanti, A. N., N. S. Aminah, M. Tanjung, dan B. Kurniadi. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Airlangga University Press : Surabaya.
- Latief, M., Nazarudin dan Nelson. 2015. "Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun dan Buah Prepat (*Sonneratia alba*) Asal Tanjung Jabung Timur Provinsi Jambi". *Prosiding SEMIRATA 2015 bidang MIPA BKS-PTN Barat*. Universitas Tanjungpura. Pontianak : 112-117.
- Mangiwa, S. dan A. E. Maryuni. 2019. "Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Kopi Sangrai Jenis Arabika (*Coffea arabica*) Asal Wamena dan Moanemani, Papua". *Jurnal Biologi Papua*. Vol. 11 (2) ; 103-109.
- Maslebu, G., S. Trihandaru, dan N. A. Wibowo. 2016. "Kombinasi Teknik Kromatografi Kolom Gravitasi-Spektrofotometer Sederhana Sebagai Pemodelan Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (KCKT)". *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Pendidikan Sains VII UKSW*. Universitas Kristen Satya Wicana. Salatiga : 88 – 94.
- Maurya, A., K. Kalani, S. C. Verma, R. Singh, dan A. Srivastava. 2018. "Vacuum Liquid Chromatography : Simple, Efficient, and Versatile Separation". *Organic & Medicinal Chem IJ*. Vol. 7 (2) : 1-6.
- Misfadhila, S., Zulharmita, dan D. H. Siska (2016). *Pembuatan kafein salisilat secara semisintetis dari bubuk kopi olahan tradisional kerinci*. Vol. 8 (2): 175-188.
- Molyneux, P. 2004. "The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity". *Songklanakarinn J. Sci. Technol*. Vol. 26 (2) : 211-21.
- Mpapa, B. L. 2019. *Kopi Saluan : Local Coffee Khas Bungai*. CV Budi Utama : Yogyakarta.
- Mubarak, A., K. D. Croft, C. B. Bondono, dan N. S. Din. 2019. "Comparison of liberica and arabica coffee : chlorogenic acid, caffeine, total phenolic and DPPH radical scavenging activity". *Asian J. Agriculture and Biology*. Vol. 7 (1) : 130 - 36.
- Muflihunna, A. dan L. M. Sarif. 2010. "*Analisis Aktivitas Antioksidan Produk Sirup Buah Mengkudu ( Morinda Citrifolia L .) Dengan Metode Dpph*". Vol. 2 (2) : 97–101.
- Mukhriani. 2014. "Esktraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif". *Jurnal Kesehatan*. Vol. 7 (2) : 361-367.
- Nasyanka, A. L., J. Na'imah dan R. Aulia. 2020. *Pengantar Kimia : D3 Farmasi 2020*. Penerbit Qiara Media : Pasuruan.
- Nurzaman, F., J. Djajadisastra, dan B. Elya. 2018. "Identifikasi Kandungan Saponin dalam Ekstrak Kamboja Merah (*Plumeria rubra* L.) dan Daya Surfaktan dalam Sediaan Kosmetik". *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. Vol. 8 (2):85–93.
- Opitz, S. E. W., S. Smrke, B. A. Goodman, M. Keller, S. Schenker dan C. Yeretziyan. 2014. "Antioxidant generation during Coffee roasting : A comparison and interpretation from three complelentary assays". *Foods*. Vol. 3 (1) : 586 – 604.
- Oyeyemi, S. D., P. O. Tedela, dan O. E. Oyedeji. 2017. "Assessment of the

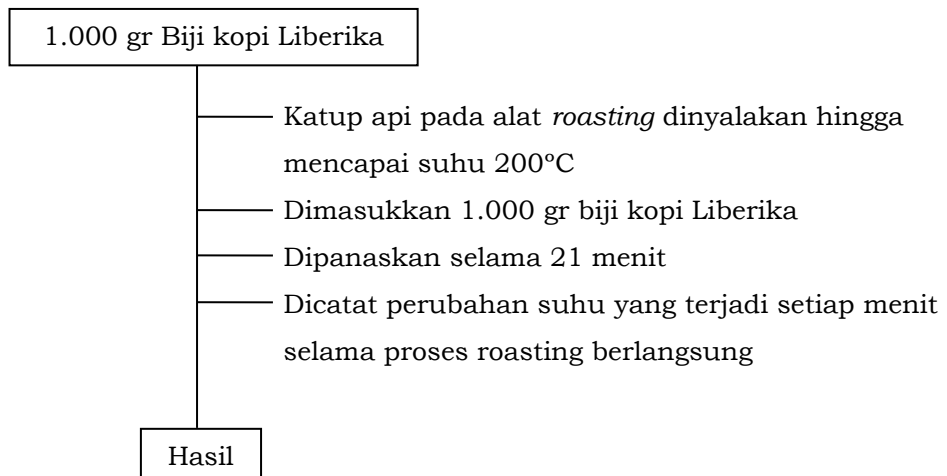
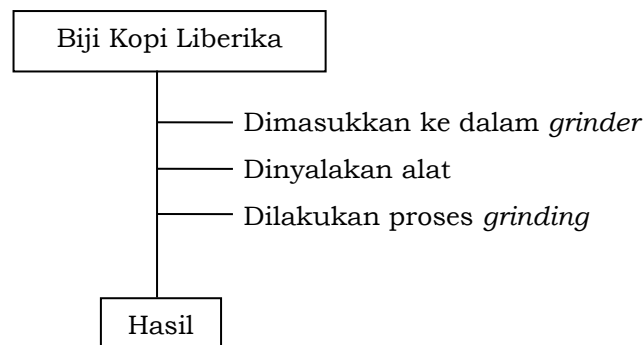
- nutritional potentials of *Theobroma cacao* L. and *Coffea liberica* W. Bull". *Ukrainian Food Journal*. Vol. 6 (2): 258–268.
- Patay, E. B., T. Bencsik, dan N. Papp. 2016. "Pythochemical overview and medicinal importance of Coffea species from the past until now". *Asian Pasific Journal of Tropical Medicine*. Vol. 9 (12) : 1127 – 1135.
- Perdana, B. M., R. Manihuruk, R. Ahsyar, Heriyanti, dan Sutrisno. 2018. "Evaluation of the effect of roasting process on the energy transition and the crystalline structures of Arabica, Robusta, and Liberica coffee from Jambi Indonesia". *IOP Conf. Series : Materials Science and Engineering*. Vol. 345 (1) : 1-11.
- Purnamayanti, N. P. A., I. B. P. Gunadnya, dan G. Arda. 2017. "Pengaruh Suhu dan Lama Penyangraian terhadap Karakteristik Fisik dan Mutu Sensori Kopi Arabika (*Coffea arabica* L)". *Jurnal BETA (Biosistem Dan Teknik Pertanian)*. Vol. 5 (2) : 39–48.
- Zhang, Q. W., L. Lin, dan W. Ye. 2018. "Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review". *Chin Med*. Vol. 13 (20).
- Raaman, N. 2006. *Phytochemical Techniques - Google Books*. India : New India Publishing Agency.
- Romadanu, S. H. Rachmawati, S. D. Lestari. 2014. "Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Lotus (*Nelumbo nucifera*)". Vol. 3 (1) : 1-7.
- Saidi, N. , Binawati, Ginting. dan M. Murniana. 2018. *Analisis Metabolis Sekunder - Google Books*. Aceh : Syiah Kuala University Press.
- Saifudin, Azis. 2002. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder: Teori, Konsep dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta : Deepublish.
- Sastrohamidjojo, H. 2018. *Dasar-dasar Spektroskopi*. Gadjah Mada University Press : Yogyakarta.
- Saw, A. K., W. Yam, K. Wong dan C. Lai. 2015. "A Comparative Study of the Volatile Constituents of Sotheast Asian Coffea arabica, Coffea liberica and Coffea robusta Green Benas and their Antioxidant Activities". *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. Vol. 18 (1) : 64 – 73.
- Sembiring, T., Dayana, I., Riana, M. 2019. *Alat Penguji Material*. Guepedia : Bogor.
- Sharma, H. 2020. *A Detail Chemistry Coffee and Its Analysis*.
- Smith, B. C. 2011. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press : London.
- Sugianti, C., N. Pratiwi, D. Suhandy, M. Telaumbanua, S. Waluyo, dan M. Yulia. 2016. "Studi Penggunaan Uv-Vis Spectroscopy Untuk Identifikasi Campuran Kopi Luwak Dengan Kopi Arabika Studies On The Use Of Uv-Vis Spectroscopy For Identification". Vol. 5 (31), 167–176.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri Uv-Vis Dan Spektrometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Anugrah Utama Raharja.
- Sukohar, A., S. Setiawan, F. Wirakusumah, dan H. Sastramihardja. 2011. "Isolasi dan karakterisasi senyawa sitotoksik dan asam klorogenat dari biji kopi robusta lampung". *Jurnal Medika Planta*. Vol. 1(4): 11–25.
- Sunarharum, W. B., K. Febrianto, S. S. Yuwono, dan M. Nur. 2019. *Sains Kopi Indonesia*. UB Press : Malang.
- Thomas E, B., R. Edison, dan D. S. Made. 2016. "Jurusan Budidaya Tanaman Perkebunan dan Pengajar Jurusan Budidaya Pengaruh Suhu dan Lama

- Penyangraian". *Jurnal Agro Industri Perkebunan*. Vol. 4 (1): 31–40.
- Tjandra, R.F. . Fatimawali, O S. Datu 2020. "Analisis Senyawa Alkaloid dan Uji Daya Hambat Ekstrak Buah Sirih (*Piper betle* L) terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*". *EBiomedik*. Vol. 8(2) : 173–179.
- Verma, R., dan Kumar, L. 2010. "*Characterization of Caffeine Isolated from Camellia Sinensis Leaves*". Vol. 2 (4) :194–198.
- Vignoli J. A., M. C. Viegas, D. G. Bassoli, dan M. T. Benassi. 2014. "Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of Arabica and Robusta coffees". *Food Res*. Vol. 61 : 279-285.
- Yuslianti, E. R. 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Deepublish : Yogyakarta.
- Youngson, R. 2005. *Antioksidan : Manfaat Vitamin C dan E Bagi Kesehatan*. Arcan : Jakarta.

## LAMPIRAN

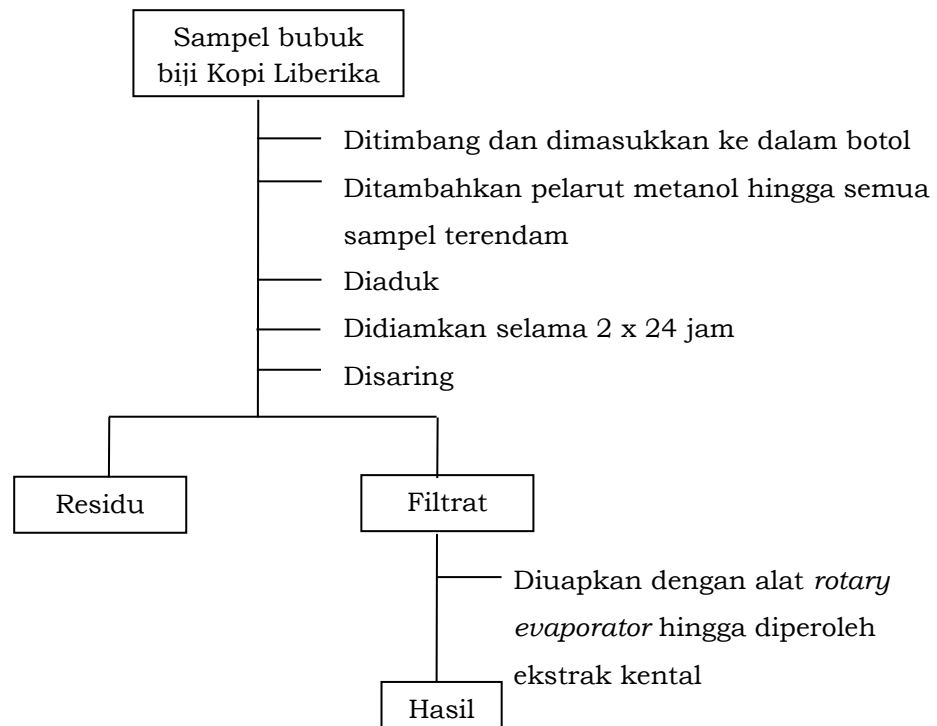
Lampiran 1. Skema Penelitian



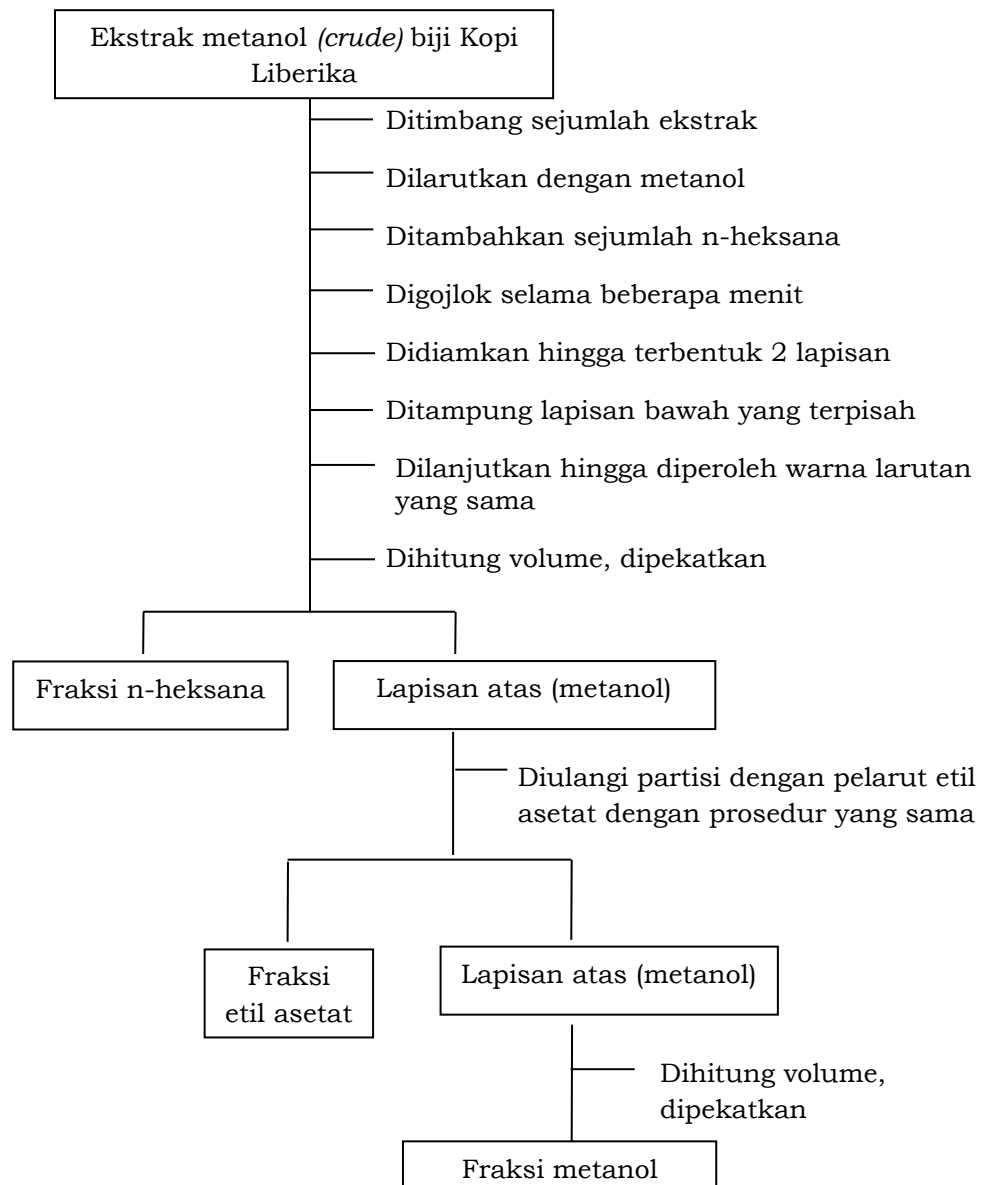
**Lampiran 2.** Roasting dan Grindinga. *Roasting*b. *Grinding*

**Lampiran 3.** Ekstraksi dan Isolasi

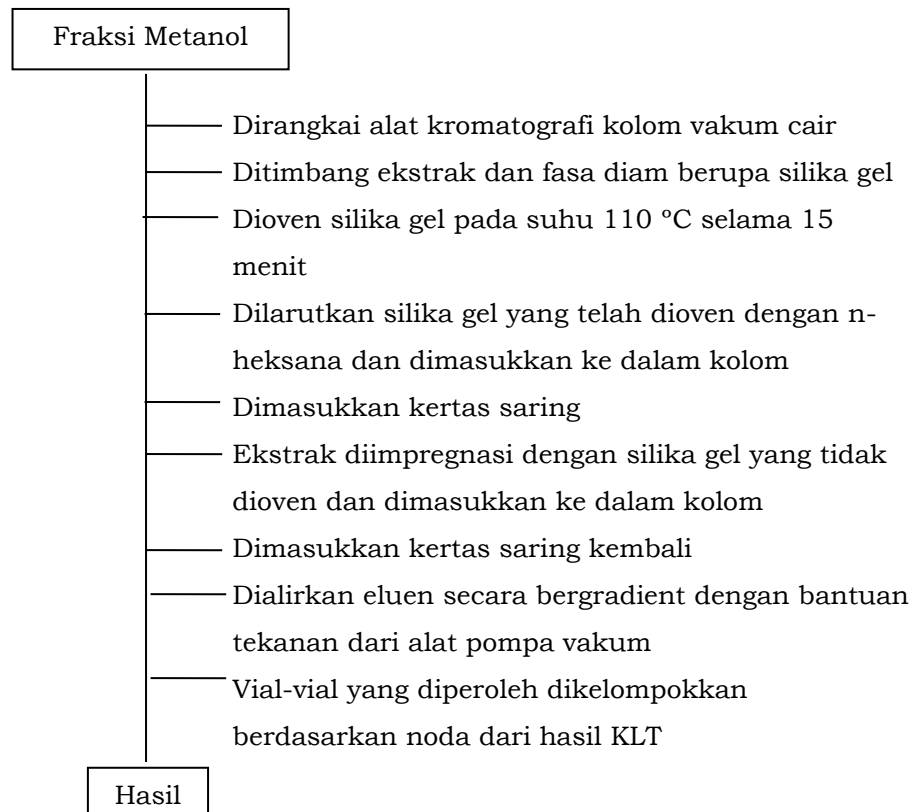
## a. Ekstraksi (Maserasi)



## b. Fraksinasi Cair-Cair



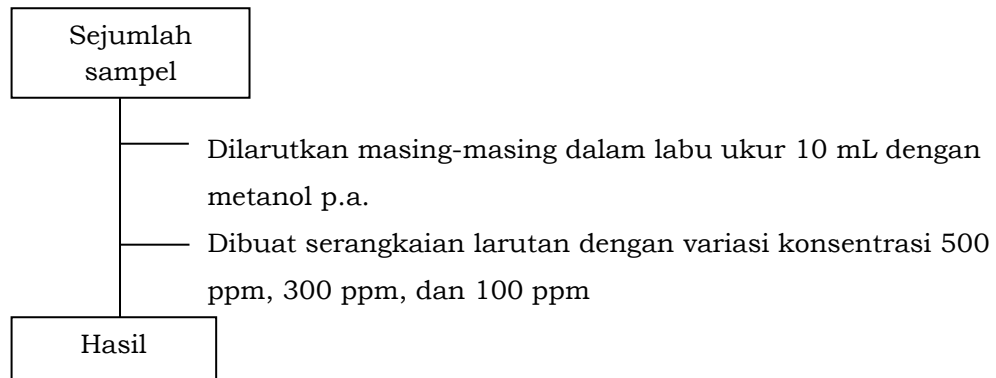
## c. Kromatografi Vakum Cair (KVC)



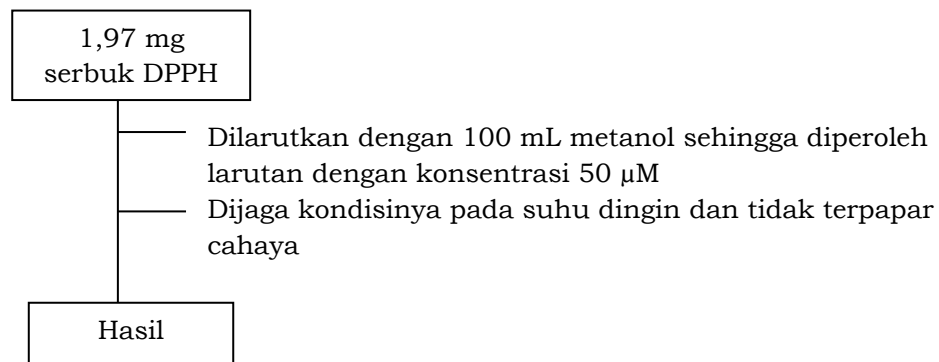


#### Lampiran 4. Uji aktivitas antioksidan

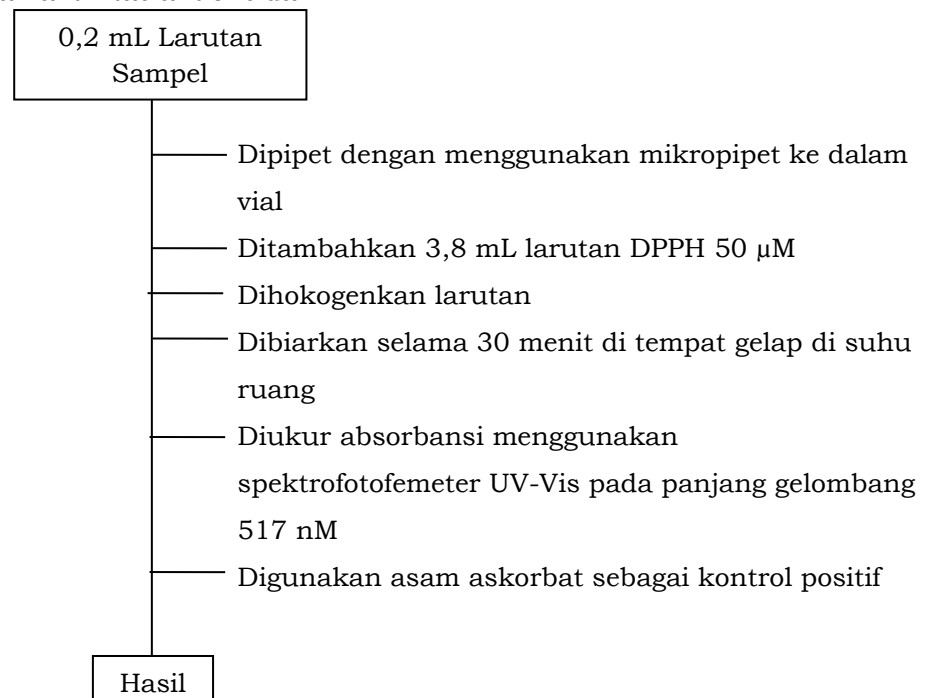
##### a. Pembuatan Larutan Stok



##### b. Pembuatan larutan DPPH

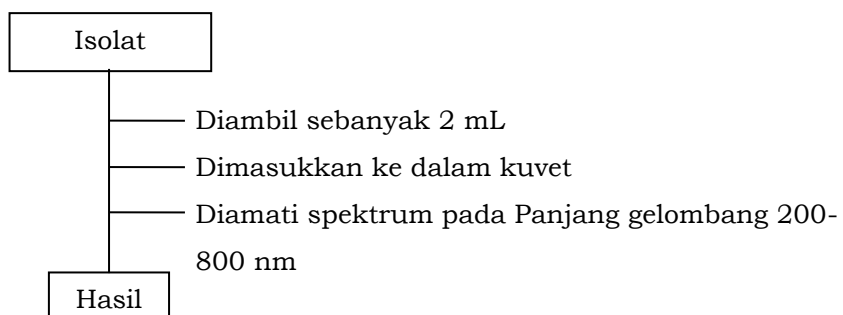


##### c. Penentuan aktivitas antioksidan

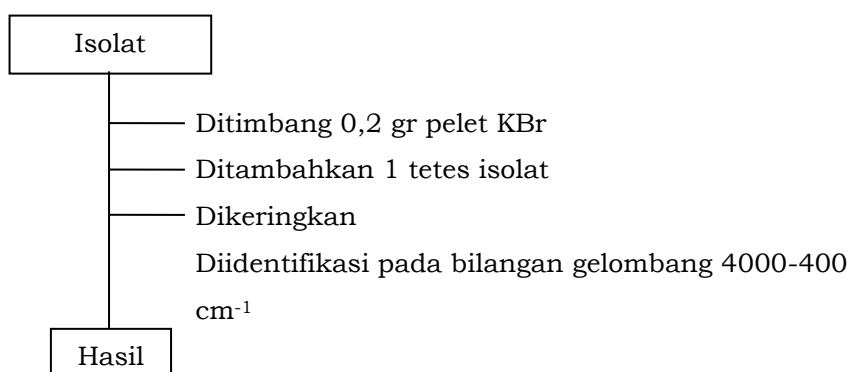


**Lampiran 5. Karakterisasi Senyawa**

## a. Spektrofotometer UV-Vis



## b. Spektrofotometer FTIR



**Lampiran 6.** Perhitungan Rendemen Ekstrak dan Antioksidan

Rendemen Ekstrak pekat metanol crude

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat Ekstrak yang Didapat (g)}}{\text{Berat Simplisia yang Diekstraksi (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{229 \text{ g}}{5010 \text{ g}} \times 100\% = 4,57\% \end{aligned}$$

- Perhitungan % rendemen hasil partisi

**Tabel 12.** Hasil % rendemen fraksi n-heksan, etil asetat dan metanol

Nama Fraksi	Ekstrak kental (g)	%Rendemen
Fraksi n-heksan	21,23	11,6648
Fraksi etil asetat	31,21	17,1484
Fraksi metanol	46,53	25,5659

- Fraksi n-heksan

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak kental (g)}}{\text{berat sampel awal (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{21,23 \text{ g}}{182 \text{ g}} \times 100\% = 11,6648\% \end{aligned}$$

- Fraksi etil asetat

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak kental (g)}}{\text{berat sampel awal (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{31,21 \text{ g}}{182 \text{ g}} \times 100\% = 17,1484\% \end{aligned}$$

- Fraksi metanol

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak kental (g)}}{\text{berat sampel awal (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{46,53 \text{ g}}{182 \text{ g}} \times 100\% = 25,5659\% \end{aligned}$$

**B.** Perhitungan %Inhibisi dan IC<sub>50</sub> dalam antioksidan (biji Kopi liberika)

## 1. Pembuatan larutan DPPH (50 μM)

$$50 \mu\text{M} = 0,05 \text{ mM}$$

$$\text{Mr DPPH} = 394,33 \text{ g/mol}$$

Banyak DPPH yang ditimbang

$$M = \frac{\text{gram}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V \text{ (mL)}}$$

$$0,05 \text{ mM} = \frac{X \text{ (mg)}}{394,33 \text{ g/mol}} \times \frac{1000}{100 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{0,05 \text{ mM} \times 394,33 \text{ g/mol} \times 100 \text{ mL}}{1000}$$

$$X = 1,97165 \text{ mg}$$

Jadi, untuk membuat larutan DPPH 50 μM dibutuhkan massa DPPH sebanyak 1,97165 mg dalam 100 mL metanol p.a

## 2. Pembuatan larutan asam askorbat (vitamin C)

$$100 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{0,001 \text{ g}}{10 \text{ mL}}$$

Jadi, untuk membuat larutan asam askorbat 100 ppm dibutuhkan massa asam askorbat sebanyak 0,001 g dalam 10 mL metanol p.a

## 3. Pembuatan larutan asam askorbat berbagai konsentrasi

- 50 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{50 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$= 5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan asam askorbat 50 ppm diambil sebanyak 5 mL larutan asam askorbat 100 ppm, dilarutkan dalam labu ukur 10 mL.

- 30 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{30 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$= 3 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan asam askorbat 30 ppm diambil sebanyak 3 mL larutan asam askorbat 100 ppm, dilarutkan dalam labu ukur 10 mL.

- 10 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$= 0,1 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan asam askorbat 10 ppm diambil sebanyak 1 mL larutan asam askorbat 100 ppm, dilarutkan dalam labu ukur 10 mL.

## 4. Pembuatan larutan uji berbagai konsentrasi fraksi metanol

- Pembuatan larutan uji 10.000 ppm

$$\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} = \frac{0,1 \text{ g}}{10 \text{ ml}} = 10.000 \text{ ppm}$$

- Pembuatan larutan uji 500 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{500 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{10000 \text{ ppm}}$$

$$= 0,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 10 mL larutan uji 500 ppm diperlukan larutan stok 10.000 ppm sebanyak 0,5 mL.

- Pembuatan larutan uji 300 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{300 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{10000 \text{ ppm}}$$

$$= 0,3 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 10 mL larutan uji 300 ppm diperlukan larutan stok 10.000 ppm sebanyak 0,3 mL.

- Pembuatan larutan uji 100 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{10000 \text{ ppm}}$$

$$= 0,1 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 10 mL larutan uji 100 ppm diperlukan larutan stok 10.000 ppm sebanyak 0,1 mL.

#### 5. Pembuatan larutan uji berbagai isolat F1 metanol

$$100 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{0,001 \text{ g}}{10 \text{ mL}}$$

Jadi, untuk membuat larutan F1 100 ppm dibutuhkan massa isolat F1 sebanyak 0,001 g dalam 10 mL metanol p.a

- 50 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{50 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$= 5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan isolat F1 50 ppm diambil sebanyak 5 mL larutan asam askorbat 100 ppm, dilarutkan dalam labu ukur 10 mL.

- 30 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{30 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$= 3 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan isolat F1 30 ppm diambil sebanyak 3 mL larutan asam askorbat 100 ppm, dilarutkan dalam labu ukur 10 mL.

- 10 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$= 1 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan isolat F1 10 ppm diambil sebanyak 1 mL larutan asam askorbat 100 ppm, dilarutkan dalam labu ukur 10 mL.

## 6. PERHITUNGAN KUANTITAS ANTIOKSIDAN

### 1. ASAM ASKORBAT

		Asam askorbat		
Konsentrasi (ppm)	0	10	30	50
Absorbansi	0	0,327	0,359	0,011
%Inhibisi	0	21,77	14,114	97,368
Regresi Linear		$y = 1,7026x + 4,9957$ $R^2 = 0,7482$		
IC <sub>50</sub>		32,2 ppm		

- %inhibisi

- 100 ppm

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,418 - 0,327}{0,418} \times 100\% = 21,77\%$$

- 300 ppm

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,418 - 0,359}{0,418} \times 100\% = 14,114\%$$

- 500 ppm

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,418 - 0,011}{0,418} \times 100\% = 97,368\%$$

- IC<sub>50</sub>

$$y = bx + a$$

$$50 = 1,7026x + 4,9957$$

$$x = \frac{50 - 4,9957}{1,7026} = 32,2 \text{ ppm}$$

### 2. FRAKSI METANOL

		Fraksi metanol		
Konsentrasi (ppm)	0	100	300	500
Absorbansi	0,418	0,2	0,032	0,027
%Inhibisi	0	52,15	92,34	93,54
Regresi Linear		$y = 0,1776x + 19,607$ $R^2 = 0,7956$		
IC <sub>50</sub>		171 ppm		

- %inhibisi

- 100 ppm

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,418 - 0,2}{0,418} \times 100\% = 52,15\%$$

- 300 ppm

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,418 - 0,032}{0,418} \times 100\% = 92,34\%$$

- 500 ppm

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,418 - 0,027}{0,418} \times 100\% = 93,78\%$$

- $IC_{50}$   
 $y = bx + a$   
 $50 = 0,1776x + 19,607$   
 $x = \frac{50 - 19,607}{0,1776} = 171 \text{ ppm}$

### 3. ISOLAT F1 (KAFEIN)

		Isolat f1			
Konsentrasi (ppm)	0	10	30	50	
Absorbansi	0,418	0,213	0,1305	0,084	
%Inhibisi	0	49,0431	68,7799	79,904	
Regresi Linear		$y = 1,4238x + 17,395$			
		$R^2 = 0,7982$			
$IC_{50}$		22,89 ppm			

- %inhibisi
  - 100 ppm  

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,418 - 0,213}{0,418} \times 100\% = 49,0431\%$$
  - 300 ppm  

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,418 - 0,213}{0,418} \times 100\% = 68,7799\%$$
  - 500 ppm  

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,418 - 0,084}{0,418} \times 100\% = 79,904\%$$
- $IC_{50}$   
 $y = bx + a$   
 $50 = 1,4238x + 17,395$   
 $x = \frac{50 - 17,395}{1,4238} = 22,89 \text{ ppm}$

