ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) MENGGUNAKAN KLT-DENSITOMETRI

SKRIPSI

Oleh :
Nadha Nofa Diana
NIM. 19040084

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2023

ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) MENGGUNAKAN KLT-DENSITOMETRI

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi

Oleh :
Nadha Nofa Diana
NIM. 19040084

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2023

HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING

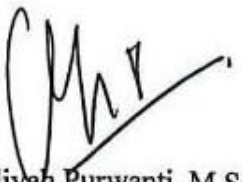
Skripsi ini telah diperiksa oleh pembimbing dan telah disetujui untuk mengikuti seminar hasil Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi

Jember, 01 Agustus 2023

Pembimbing Utama

apt. Lindawati Setyaningrum., M.Farm
NIDN. 0703068903

Pembimbing Anggota



Aliyah Purwanti, M.Si
NIDN. 0709129002

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul "Analisis dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Menggunakan KLT-Densitometri" telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr.Soebandi pada:

Hari : Selasa

Tanggal : 08 Agustus 2023

Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi

Ketua Penguji

Jenie Palupi, S.Kp., M.Kes
NIDN. 401906901

Penguji II

apt. Lindawati Setyaningrum., M.Farm
NIDN. 0703068903

Penguji III

Aliyah Purwanti, M.Si
NIDN. 0709129002

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan,
Universitas dr. Soebandi

apt. Lindawati Setyaningrum., M.Farm
NIDN. 0703068903

HALAMAN PERYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama	: Nadha Nofa Diana
NIM	: 19040084
Program Studi	: Sarjana Farmasi
Fakultas / Asal Instansi	: Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr Soebandi

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi/laporan tugas akhir yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan tulisan atau hasil tulisan orang lain.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi/laporan tugas akhir ini adalah karya orang lain atau ditemukan adanya pelanggaran terhadap etika keilmuan dalam skripsi/laporan tugas akhir ini, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Jember, 01 Agustus 2023

Yang Menyatakan,

(Nadha Nofa Diana)

SKRIPSI

ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR ALAKALOID TOTAL EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) MENGGUNAKAN KLT-DENSITOMETRI

Oleh:

Nadha Nofa Diana
NIM. 19040084

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : apt. Lindawati Setyaningrum., M.Farm

Dosen Pembimbing Anggota : Aliyah Purwanti, M.Si

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahhirrahmanirrahim…

Puji syukur alhamdulillah senantiasa saya panjatkan kepada Allah SWT atas karunia-Nya yang begitu besar dilimpahnya rahmat dan ridho-nya yang senantiasa selalu memberikan kemudahan, kelancaran, petunjuk, dan keyakinan yang luar biasa kepada saya, sehingga saya dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini tepat pada waktunya.

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1) Skripsi ini saya persembahkan kepada kedua orang tua saya, papa Eko Wahyudi dan mama Lestari yang sudah berjasa dalam dalam hidup saya. Terima kasih atas do'a serta dukungan yang tak pernah henti dan selalu memberikan motivasi saya dalam mewujudkan cita-cita saya.
2) Terima kasih kepada semua Dosen dan keluarga Universitas dr. Soebandi yang telah memberikan ilmu pengetahuan, dan memberikan banyak motivasi selama saya duduk di bangku perkuliahan. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan ibu dan bapak dosen.
3) Terima kasih kepada Ibu apt. Lindawati Setyaningrum., M.Farm selaku dosen pembimbing utama, Ibu Aliyah Purwanti, M.Si selaku dosen pembimbing anggota, dan Ibu Jenie Palupi, S.Kp., M. Kes selaku dosen penguji saya yang telah bersedia meluangkan waktunya dalam memberikan bimbingan dan arahan dalam proses penyusunan skripsi ini.

4) Terima kasih kepada sahabat saya Ratna dan Malinda yang telah memberikan dukungan selama penulisan skripsi ini.
5) Kepada Dana dan Lilik teman seperjuangan di lab, terimakasih telah membantu dan mendukung selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
6) Teman–teman seperjuangan 19B Farmasi dan seluruh pihak yang telah membantu dan memberikan masukan yang sangat berarti bagi penyusun.

MOTTO

Sesungguhnya Bersama kesukaran itu ada kemudahan. Karena itu bila kau telah selesai (mengerjakan yang lain) dan kepada Tuhan, berharaplah. (Qs. Al Insyirah: 6-8)

Jangan pergi mengikuti kemana jalan akan berujung. Buat jalanmu sendiri dan tinggalkanlah jejak." – Ralph Waldo Emerson

'Love the life you live. Live the life you love" – Bob Marley

ABSTRAK

Diana, Nadha Nofa *, Setyaningrum, Lindawati **, Purwanti, Aliyah ***, 2023. **Analisis dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Menggunakan KLT-Densitometri.** Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr.Soebandi Jember.

Biji kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki banyak manfaat, diantaranya sebagai antioksidan, antibakteri, stimulasi syaraf pusat, dan antiangiogenesis. Biji kopi robusta (*Coffea canephora*) senyawa kimia salah satunya yaitu senyawa alkaloid. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*).Desain penelitian ini adalah deskriptif laboratorium. Pada penelitian ini akan dilakukan optimasi fase gerak, optimasi panjang gelombang, optimasi konsentrasi dan penetapan kadar alkaloid total menggunakan metode KLT-Densitometri pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini adalah klorofom : etanol (95:5) v/v karena noda pada lempeng KLT sejajar. Konsentrasi standar yang digunakan yaitu 500, 1000, 1250, 1500 dan 2000 ppm, serta konsentrasi sampel yang digunakan yaitu 2000 ppm karena luas area sampel masuk dalam rentang luas area standar. Panjang gelombang optimum adalah 275 nm, karena panjang gelombang ini menghasilkan sensitivitas pengukuran yang baik. Kadar alkaloid total yang diperoleh pada sampel ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yaitu 11,713 % b/b. Kesimpulan pada penelitian ini yaitu kadar alkaloid total pada sampel ekstrak etanol biji kopi robusta *(Coffea canephora)* adalah 11,713% b/b per 10 mg sampel.

Kata Kunci: Biji kopi robusta *(Coffea canephora)*, Alkaloid, KLT-Densitometri
*Peneliti
** Pembimbing Utama
*** Pembimbing Anggota

ABSTRACT

Diana, Nadha Nofa , Setyaningrum, Lindawati *, Purwanti, Aliyah *, 2023. **Analysis and Determination of Total Alkaloid Content of the Ethanol Extract of Robusta Coffee Beans (*Coffea canephora*) Using TLC-Densitometry.** Essay. University of dr. Soebandi Jember Pharmacy Undergraduate Study Program.

Robusta coffee beans (*Coffea canephora*) have many benefits, including as an antioxidant, antibacterial, central nervous stimulation, and antiangiogenesis. One of the chemical compounds in Robusta coffee beans (*Coffea canephora*) is an alkaloid compound. The purpose of this study was to determine the total alkaloid content in the ethanol extract of robusta coffee beans (*Coffea canephora*). The design of this study was laboratory descriptive. In this study, optimization of the mobile phase, optimization of wavelength, concentration optimization and determination of total alkaloid levels using the TLC-Densitometry method will be carried out on the ethanol extract of robusta coffee beans (*Coffea canephora*). The mobile phase used in this study was chloroform : ethanol (95:5) v/v because the stains on the TLC plates were parallel. The standard concentrations used were 500, 1000, 1250, 1500 and 2000 ppm, and the sample concentrations used were 2000 ppm because the sample area falls within the standard area range. The optimum wavelength is 275 nm, as this gives good measurement sensitivity. The total alkaloid content obtained in the sample of robusta coffee bean extract (*Coffea canephora*) was 11.713% w/w. The conclusion in this study was that the total alkaloid content in the ethanol extract sample of Robusta coffee beans (*Coffea canephora*) was 11.713% w/w per 10 mg sample.

Keywords: Robusta coffee beans *(Coffea canephora)*, Alkaloids, TLC-Densitometry
*Researcher
** Main Advisor
*** Member Advisor

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi ini disusun dengan judul "Analisis dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Menggunakan KLT-Densitometri".

Selama proses penyusunan skripsi ini penulis dibantu dan dibimbing oleh berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1) Andi Eka Pratama, S.ST., S.Kep., Ns. M.Kes selaku Rektor Universitas dr. Soebandi
2) apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
3) apt. Dhina Ayu Susanti, S.Farm., M.Kes selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
4) apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm. selaku pembimbing utama
5) Aliyah Purwanti, M.Si. selaku pembimbing anggota
6) Jenie Palupi, S.Kp., M.Kes selaku ketua penguji

Dalam penyusunan skripsi ini penulis menyadari masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan di masa mendatang.

Jember, 01 Agustus 2023

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman Sampul ..... **i**
Halaman Judul ..... **ii**
Halaman Persetujuan Pembimbing ..... **iii**
Halaman Pengesahan ..... **iv**
Halaman Peryataan Oirsinalitas ..... **v**
Halaman Pembimbing Skripsi ..... **vi**
Halaman Persembahan ..... **vii**
Motto ..... **ix**
Abstrak ..... **x**
Abstract ..... **xi**
Kata Pengantar ..... **xii**
Daftar Isi ..... **xiii**
Daftar Tabel ..... **xvi**
Daftar Gambar ..... **xvii**
Daftar Lampiran ..... **xviii**
Daftar Singkatan ..... **xix**
BAB 1 PENDAHULUAN **1**
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 5
1.3 Tujuan Penelitian 5
1.3.1 Tujuan Umum 5
1.3.2 Tujuan Khusus 5
1.4 Manfaat Penelitian 6
1.4.1 Secara Teoritis 6
1.4.2 Secara Praktik 6
1.5 Keaslian Penelitian 7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA **9**
2.1 Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*) 9
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*) 9
2.1.2 Morfologi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*) 10
2.1.3 Kandungan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) 12
2.1.4 Manfaat Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) 13
2.2 Ekstraksi 14
2.2.1 Definisi Ekstraksi 14
2.2.2 Tujuan Ekstraksi 15
2.2.3 Metode Ekstraksi 17
2.3 Pelarut 20
2.3.1 Kloroform 21
2.3.2 N-Heksan 21
2.3.3 Air 21
2.3.4 Metanol 22
2.3.5 Etanol 22

2.4 Senyawa Alkaloid 23
2.4.1 Pengertian Alkaloid 23
2.4.2 Sifat Umum Alkaloid 23
2.4.3 Klasifikasi Alkaloid 25
2.4.4 Sifat-sifat Senyawa Alkaloid 27
2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 28
2.5.1 Pengertian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 28
2.5.2 Kelebihan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 30
2.5.3 Fase Diam 31
2.5.4 Fase Gerak 32
2.5.5 Penetapan Harga R_f 34
2.6 Densitometri 34
BAB 3 KERANGKA KONSEP 37
3.1 Kerangka Konsep 37
3.2 Hipotesis Penelitian 38
BAB 4 METODE PENELITIAN 39
4.1 Desain Penelitian 39
4.2 Populasi dan Sampel 39
4.2.1 Populasi 39
4.2.2 Sampel 39
4.3 Variabel Penelitian 40
4.3.1 Variabel Bebas (*Independent*) 40
4.3.2 Variabel Terikat (*Dependent*) 40
4.4 Tempat Penelitian 40
4.5 Waktu Penelitian 40
4.6 Definisi Operasional 40
4.7 Teknik Pengmpulan Data 43
4.7.1 Pengambilan Sampel 43
4.7.2 Determinasi Tanaman 43
4.7.3 Ekstraksi Sampel 44
4.7.4 Optimasi Kondisi Analisis KLT Densitometri 45
4.7.5 Penetapan Kadar Alkaloid Total Menggunakan KLT-Densitometri 45
BAB 5 HASIL PENELITIAN 48
5.1 Data Umum 48
5.1.1 Determinasi Tanaman Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora)* 48
5.1.2 Ekstraksi Maserasi 48
5.2 Data Khusus 48
5.2.1 Optimasi Kondisi Analisis Kadar Alkaloid Total 48
5.2.2 Penetapan Kadar Alkaloid Total 51
BAB 6 PEMBAHASAN 54
6.1 Teknik Dan Instrumen Pengumpulan Data 54
6.1.1 Determinasi Tanaman Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) 54
6.1.2 Pengambilan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dan Ekstraksi Maserasi 54
6.2 Optimasi Kondisi Analisis Alkaloid Total 57

6.2.1 Optimasi Penentuan Fase Gerak 58
6.2.2 Optimasi Penentuan Panjang Gelombang Optimum 59
6.2.3 Optimasi Penentuan Konsentrasi Larutan 60
6.3 Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) 61
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN 68
7.1 Kesimpulan 68
7.2 Saran 68
DAFTAR PUSTAKA 70
LAMPIRAN 77

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian 7
Tabel 2.1 Komponen Kandungan Kimia Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) 12
Tabel 2.2 Klasifikasi Alkaloid 24
Tabel 2.3 Macam-Macam Fase Diam 33
Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel 42
Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Maserasi Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) 47
Tabel 5.2 Optimasi Fase gerak 47
Tabel 5.3 Data Korelasi Spektrum 51
Tabel 5.4 Data Nilai Area dan Nilai R_f 52
Tabel 5.5 Hasil Perhitungan Kadar Alkaloid Total 53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*) 9
Gambar 2.2 Struktur Senyawa *True Alkaloid* 25
Gambar 2.3 Struktur Senyawa *Protoalkaloid* 26
Gambar 2.4 Struktur Senyawa *Pseudoalkaloid* 25
Gambar 2.5 Kromatografi Lapis Tipis 30
Gambar 3.1 Kerangka Konsep 37
Gambar 5.1 Fase gerak klorofom:etanol (95:5) v/v 50
Gambar 5.2 panjang gelombang maksimum 275 nm..... 51
Gambar 5.3 Kurva Baku Kafein..... 53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Determinasi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*) 73
Lampiran 2. Dokumentasi sertifikat kafein..... 74
Lampiran 3. Dokumentasi penelitian 75
Lampiran 4. Perhitungan ekstraksi maserasi..... 78
Lampiran 5. Perhitungan optimasi konsentrasi kurva baku 79
Lampiran 6. Perhitungan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)..... 80
Lampiran 7. Kurva baku kafein 84
Lampiran 8. Panjang gelombang maksimum 275 nm..... 84

DAFTAR SINGKATAN

%	= Per seratus
C	= *Celcius*
cm	= Sentimeter
FP	= Faktor Pengenceran
HPLC	= *high peRformance liquid chromatography*
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
m	= Meter
mL	= Mililiter
mm	= Millimeter
N	= Normalitas
nm	= Nanometer
ppm	= *Part Per Million*
Puslitkoka	= Pusat Penelitian Kopi dan Kakao
R_f	= *Retention/retardation factor*
rpm	= *Revolution Per Minute*
UV-Vis	= *Ultraviolet-visible*
v	= Volume
µL	= Mikroliter

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan beraneka tanaman yang mempunyai kandungan zat aktif didalamnya, pada zaman terdahulu tanaman tersebut dimanfaatkan sebagai pengobatan tradisional oleh nenek moyang kita yang ditemukan secara tidak sengaja berdasarkan pengalaman yang diturunkan secara turun-temurun dari satu generasi ke generasi berikutnya. Saat ini, mengingat terus meningkatnya harga obat, rekomendasi yang diberikan oleh Departemen Kesehatan untuk kembali mengandalkan obat tradisional merupakan opsi yang sesuai karena bahan-bahannya mudah diperoleh dan harganya ekonomis. Makanan dan minuman yang kita konsumsi tanpa kita ketahui memiliki zat yang memiliki efek menguntungkan yang dapat digunakan sebagai pengobatan untuk penyakit. Sebagai contoh, minuman kopi yang sering ditemui dan dikonsumsi, karena pada prinsipnya, kopi mengandung kafein yang bisa merangsang sistem saraf pusat. (Budiman *et al*, 2014).

Kopi adalah salah satu komoditas utama di Indonesia yang memiliki nilai ekonomi yang signifikan serta memainkan peranan penting sebagai penyokong devisa negara, dan juga sebagai penunjang perekonomian rakyat dengan produksi kopi robusta *(Coffea canephora)* sebesar 80% dan kopi arabika *(Coffea arabica)* 20%. Daerah Kabupaten Jember tergolong sebagai salah satu lokasi produksi kopi, di mana tanaman utamanya adalah jenis kopi robusta *(Coffea canephora)* (Rahardjo, 2012). Lembaga Riset yang mengembangkan kopi di Kabupaten Jember

adalah Pusat Penelitian Kopi dan Kakao (Puslitkoka). Berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 786/Kpts/Org/9/1981, Puslitkoka adalah sebuah institusi riset dan pengembangan dalam skala nasional yang fokus pada kopi dan kakao, yang telah berdiri sejak tanggal 1 Januari 1911 pada zaman penjajahan Belanda. (Sholihah *et al*, 2015).

Kopi robusta *(Coffea canephora)* juga mengandung beberapa senyawa kimia, diantaranya kafein, trigolenin, glukosa, protein, teofilina, asam klorogenat, tanin, mineral serta berbagai komponen volatil (Budiman *et al*, 2014). Kopi juga memiliki berbagai manfaat pada tubuh kita, diantaranya antioksidan, antibakteri, stimulasi syaraf pusat, dan antiangiogenesis (Wulandari & Agustin., 2022; Tanauma., 2016; Maramis *et al*, 2013; Yusuf *et al*, 2020). Sebagai antibakteri, biji kopi robusta *(Coffea canephora)* dapat menghambat beberapa bakteri seperti *Escherichia coli*, *P. Gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa* (Tanauma *et al*, 2016; Chamidah, 2012; Yaqin dan Nurmilawati, 2015; Marsya *et al*, 2021).

Biji kopi robusta *(Coffea canephora)* mengandung beberapa senyawa, diantaranya alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, volatil (aldehida, furfural, keton, alkohol, ester, asam format, dan asam asetat), fenolik (asam klorogenat) dan kafein (Anindya *et al*, 2020; Amiliyah *et al*, 2015). Kafein merupakan salah satu jenis alkaloid yang banyak ditemukan pada biji kopi robusta *(Coffea canephora)* dengan kadar yang cukup tinggi (Zarwinda dan Sartika, 2019).

Alkaloid adalah jenis senyawa metabolit sekunder yang mengandung atom nitrogen (N), ditemukan dalam jaringan tumbuhan dan hewan. Alkaloid hadir dalam berbagai bagian tanaman, termasuk bunga, biji, daun, ranting, akar, dan kulit

batang (Ningrum *et al*, 2016). Dalam praktek medis sebagian besar alkaloid mempunyai nilai tersendiri, disebabkan karena efek farmakologi sebagai antibakteri. Alkaloid memiliki efek antibakteri, karena alkaloid menghambat aktivitas enzim yang mempengaruhi metabolisme bakteri (Fitriani, 2014). Oleh karena itu penelitian ini berfokus pada penetapan kadar alkaloid total pada biji kopi robusta *(Coffea canephora)* yang memiliki potensi sebagai antibakteri.

Salah satu metode yang digunakan untuk menarik senyawa alkaloid dalam biji kopi robusta *(Coffea canephora)* adalah dengan ekstraksi. Ekstraksi merupakan aktivitas penarikan kandungan senyawa organik dari campuran senyawa. Banyak jenis metode ekstraksi yang bisa digunakan seperti maserasi (Wahyuni & Merpaung, 2020), soxhletasi (Setyaningrum & Susanti, 2022), perkolasi (Rahmi., 2021), dan refluks (Kusnadi & Devi., 2017) hingga ekstraksi modern seperti ultrasonik (Ardianti & Kusnadi, 2014) dan *microwave* (Mukhaimin *et al*, 2018). Jika dibandingkan dengan metode ekstraksi yang lain, metode maserasi memiliki kelebihan antara lain Tidak memerlukan instrumen yang kompleks, cukup terjangkau secara finansial, dan bisa menghindari penguapan komponen senyawa karena tidak melibatkan pemanasan (Kiswandono, 2017).

Pelarut yang digunakan dalam studi ini adalah etanol, karena etanol merupakan pelarut yang mudah didapat. Etanol juga dapat menarik sebagian besar senyawa aktif dibandingkan dengan pelarut lainnya (Trifani, 2012). Menurut Kurniawati, *et al* (2016) etanol 96% dipilih karena memiliki konsentrasi lebih tinggi dan lebih pekat dari etanol 80%, pelarut yang pekat akan menarik zat aktif lebih banyak sehingga diperoleh hasil maserasi yang lebih besar. Etanol 96% merupakan pelarut

yang terbaik untuk mendapatkan kadar alkaloid total dibanding dengan konsentrasi 50% dan 70% (Wahyuni & Marpaung, 2020). Setelah dilakukan proses ekstraksi, selanjutnya dapat dilakukan penetapan kadar pada alkaloid.

Penetapan kadar dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai macam metode diantaranya metode spektrofotometri UV-VIS (Wardani, 2021), metode HPLC (Aprilia, 2018), metode gravimetri (Alasa *et al*, 2017), metode spektrodensitometri (Pamungkas & Murrukmihadi, 2015), metode spektrometri visible (Salamah *et al*, 2017), dan metode KLT-Densitometri (Maulana, 2018). Penetapan kadar dalam penelitian ini menggunakan KLT-Densitometri karena mudah dilakukan, reagen yang digunakan bersifat sensitif dan selektif. Metode KLT-Densitometri memiliki keunggulan yaitu spesifikasi yang tinggi, dapat dilakukan dengan mudah dan cepat, biaya operasi relatif rendah, salah satunya karena pelarut yang digunakan sedikit serta membutuhkan waktu yang singkat. Pada penetapan kadar dapat menggunakan kombinasi KLT dan Densitometri (Yuangsoi *et al*, 2008). Prinsip dari metode KLT yaitu memisahkan 2 fase campuran yang terdiri atas fase gerak dan fase diam (Laily, 2016).

Berdasarkan latar belakang di atas peneliti tertarik untuk melakukan penelitian pada penetapan kadar alkaloid total dari ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Metode yang digunakan untuk penetapan kadar alkaloid total yaitu menggunakan KLT-Densitometri.

1.2 Rumusan Masalah

1) Bagaimana kondisi optimum dari analisis penetapan kadar alkaloid total pada ekstrak biji kopi robusta *(Coffea canephora)* dengan pelarut etanol menggunakan KLT-Densitometri?
2) Berapakah kadar alkaloid jumlah keseluruhan ekstrak etanol dari biji kopi robusta (*Coffea canephora)* menggunakan KLT-Densitometri?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum dari analisis penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan metode KLT-Densitometri.

1.3.2 Tujuan Khusus

1) Untuk mengetahui fase gerak terbaik pada analisis penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan KLT-Densitometri.
2) Untuk mengetahui panjang gelombang terbaik pada analisis penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan KLT-Densitometri.
3) Untuk mengetahui konsentrasi larutan terbaik padaa analisis penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan KLT-Densitometri.

4) Untuk mengetahui kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan KLT-Densitometri pada kondisi optimum.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Secara Teoritis

Pada Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi informasi yang berguna dalam bidang ilmu pengetahuan, terkait kondisi optimal untuk menganalisis dan menentukan jumlah total alkaloid dengan ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan KLT-Densitometri.

1.4.2 Secara Praktik

1) Bagi Peneliti

Diharapkan menjadi dasar acuan penelitian lebih lanjut mengenai penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan KLT-Densitometri.

2) Bagi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao

Diharapkan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao dapat meneliti lebih lanjut mengenai penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan KLT-Densitometri.

3) Bagi Institusi Pendidikan

Diharapkan menjadi pedoman untuk melakukan praktikum penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan KLT-Densitometri.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

Peneliti	Tahun Terbit	Judul Penelitian	Hasil Penelitian
Ade Ferdinan, Fitri Sri Rizky, Nunik Rahmawati	2021	Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Ekstrak Etanol Daun Pandan Hutan Jenis Baru (*Freycinetia sessiliflora Rizki*)	Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol daun pandan hutan jenis baru (*Freycinetia sessiliflora Rizki*) yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Penetapan kadar alkaloid menggunakan metode KLT-Densitometri dengan fase gerak untuk senyawa alkaloid yaitu eluen etil asetat : metanol : NH_4OH (85:10:5) dengan nilai R_f rata-rata 0,4.
Muksin Maulana	2018	Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Daun Bidara Arab *(ziziphus spina cristi.L)* Berdasarkan Variasi Pelarut	Hasil penelitian menunjukkan Ekstrak Daun Bidara Arab *(ziziphus spina cristi.L)* diekstraksi dengan etanol menggunakan maserasi lalu fraksinasi menggunakan KLT-Densitometri untuk penetapan kadar alkaloid memperoleh hasil paling baik yang digunakan untuk senyawa alkaloid adalah eluen n-heksan : etil asetat : etanol (30:2:1) dengan R_f 0,31.
Anindita Tri Kusuma Pratita	2017	Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Alkaloid Dari Berbagai Ekstrak Kopi Robusta (*Coffea canephora*)	Hasil penelitian menunjukkan Dari 200 gram bahan tanaman yang digunakan, diperoleh hasil ekstraksi dengan n-heksan sebanyak 35%, ekstrak etil asetat sebanyak 31,26%, dan ekstrak etanol sebanyak 27,68%. Pada uji fitokimia awal terhadap bahan tanaman kopi robusta, terungkap bahwa ekstrak dengan n-heksan, etil asetat, dan etanol, serta bahan tanaman itu sendiri, menunjukkan kehadiran alkaloid, flavonoid, tannin, fenol, monoterpenoid, seskuiterpenoid, kuinon, dan kumarin. Ekstrak etanol juga menunjukkan hasil positif dalam mengandung senyawa-senyawa tersebut. Ekstrak etil asetat juga menunjukkan hasil positif dalam mengandung alkaloid, flavonoid, kuinon, dan

			kumarin. Sedangkan ekstrak dengan n-heksan menunjukkan keberadaan alkaloid, monoterpenoid, seskuiterpenoid, dan kuinon. Ketika dianalisis dengan menggunakan teknik kromatografi lapis tipis (KLT), terlihat bahwa alkaloid pada ekstrak n-heksan memiliki nilai Rf (retardation factor) sebesar 0,23, pada ekstrak etil asetat memiliki nilai Rf sebesar 0,78, dan pada ekstrak etanol memiliki nilai Rf sebesar 0,92
Syarifatul Laily	2016	Analisis Kafein Pada Daun Kopi Arabika *(Coffea arabica)* Dan Robusta (*Coffea canephora*) Menggunakan Metode Kromatografi	Sampel penelitian yang digunakan yaitu ekstrak Daun Kopi Arabika (*Coffea arabica*) dan Robusta (*Coffea canephora*) yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut kloroform. Penetapan kadar kafein menggunakan metode KLT-Densitometri dengan fase gerak terbaik untuk senyawa alkaloid yaitu etil asetat : metanol (2:1) dengan nilai R_f rata-rata 0,6.
Hendra Budiman, Farida Rahmawati, Febriana Sanjaya	2014	Isolasi dan Identifikasi Alkaloid Pada Biji Kopi Robusta Dengan Cara Kromatografi Lapis Tipis	Hasil penelitian menunjukkan biji kopi robusta yang dilakukan dengan metode refluks menggunakan fase diam silika gel F_{254} dan fase gerak $CHCL_3$: etanol (96:4) mengandung alkaloid dengan hasil rendemen rata-rata 0,32% dengan nilai R_f 0,4.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Sumber : (Ilmiana R., 2022)
Gambar 2.1 Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Berikut klasifikasi dari tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) (Riastuti, 2021):

Kingdom	: Plantae
Sub-Kingdom	: Angiosspermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Sub Kelas	: Sympetalae
Ordo	: Rubiales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: Coffea
Sub-Genus	: Eucoffea
Spesies	: *Coffea canephora*

2.1.2 Morfologi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kopi adalah salah satu minuman yang populer di dunia. Tanaman kopi juga tersebar diberbagai negara seperti Brazil, Vietnam, Kolombia, dan Indonesia. Negara-negara tersebut merupakan produsen kopi terbesar di dunia (Harum, 2022). Daun tanaman kopi terdiri atas tiga bagian, yaitu tangkai daun, tulang daun, dan lembaran daun. Mempunyai warna daun yang hijau dan biasanya berukuran lebar sekitar 10-30 cm serta panjang 20-30 cm (Hasbullah *et al*, 2021).

Tanaman kopi mempunyai batang yang tegak lurus ke atas serta beruas pada tiap ruas tumbuh sepasang daun tumbuh saling berhadapan pada setiap ruas, mempunyai dua jenis cabang yaitu cabang orthotrop dan plagiotop pada ruas yang daun telah besar. Terdapat enam variasi jenis percabangan pada batang tanaman kopi, yang meliputi cabang primer, cabang reproduksi, cabang yang tidak berkembang, cabang yang kembali tumbuh ke dalam pohon, cabang berbentuk seperti kipas, dan cabang yang muncul di dekat pertemuan antara batang dan akar (Hasbullah *et al*., 2021).

Tanaman kopi akan berbunga setelah dua tahun. Terdiri dari 4-6 kuntum bunga dalam satu kelompok. Membentuk 2-3 kelompok bunga pada setiap ketiak daun. Ukuran bunga kopi kecil, mahkotanya berwarna putih serta berbau harum. Kelopak memiliki warna hijau dan benang sarinya terdiri dari ukuran 5-7 tangkai yang pendek. Saat bunga telah dewasa maka kelopak dan mahkota akan terbuka akan berkembang menjadi buah (Anshori, 2014).

Buah tanaman kopi mempunyai warna hijau ketika masih muda lalu kulitnya akan berubah menjadi kuning dan menjadi merah tua. Bergantung pada jenis dan pengaruh lingkungan, dibutuhkan waktu sekitar 8-11 bulan sejak bunga terbentuk hingga buah menjadi matang. Buah kopi memiliki struktur yang terdiri dari daging buah dan biji, dengan diameter sekitar 5 mm. Umumnya, dalam setiap buah kopi terdapat dua biji. Ukuran buah kopi robusta bervariasi antara 15 hingga 18 mm. Daging buah kopi yang telah matang sepenuhnya memiliki keberadaan lendir dan senyawa glukosa yang memberikan rasa manis. Tanaman kopi tergolong dalam kelompok angiospermae, yakni tumbuhan yang bijinya dilindungi oleh jaringan dan kelas magnoliopsida (dikotil) tumbuhan yang memiliki biji dengan dua kotiledon. Biji kopi terdiri dari kulit biji dan endosperma. Endosperma, yang juga sering disebut sebagai lembaga, merupakan bagian yang digunakan untuk menyimpan cadangan makanan serta bisa digunakan sebagai bahan untuk membuat minuman kopi. Daging buah terbagi menjadi tiga bagian, yaitu lapisan kulit luar (*eksokarp*), lapisan daging (*mesokarp*), dan lapisan kulit tanduk (*mesokarp*) (Hasbullah et al., 2021).

Akar tanaman kopi adalah akar tunggang sehingga tidak mudah rebah. Tetapi tanaman kopi yang bibitnya berupa bibit sambungan atau okulasi yang mempunyai akar tunggang. Bibit tanaman kopi yang dari setek dan cangkok relatif mudah rebah dan kekeringan pada musim kemarau panjang karena tidak mempunyai akar tunggang (Santoso, 2014).

2.1.3 Kandungan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kopi robusta (*Coffea canephora*) mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kafein dan fenol (Wigati *et al*, 2018). Biji kopi robusta (*Coffea canephora*) secara alami mengandung berbagai jenis senyawa volatil seperti aldehida, furfural, keton, alkohol, ester, asam format, dan asam asetat. Selain senyawa volatil, biji kopi juga mengandung senyawa non volatil seperti kafein, fenolik, trigonelin dan asam klorogenat (Amiliyah *et al*, 2015). Senyawa kimia dalam biji kopi dapat dikategorikan menjadi senyawa volatil dan non volatil. Senyawa volatil adalah senyawa yang mudah menguap, terutama ketika suhu meningkat. Beberapa senyawa volatil yang mempengaruhi aroma kopi meliputi aldehida, keton, dan alkohol. Di sisi lain, senyawa non volatil dalam biji kopi yang berkontribusi terhadap kualitas kopi termasuk kafein, asam klorogenat, hidrokarbon alifatik, tiol, furan, piro, piridin, quinon, trigonelin, fenolik dan amin aromatik (Asti, 2015).

Tabel 2.1 Komponen Kandungan Kimia Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)
Sumber : (Panggabean, 2011)

Komponen	**Biji Kopi**	**Kopi Bubuk**
Mineral	4,0-4,5	4,6-5,0
Kafein	1,6-2,4	~ 2,0
Trigonellin	0,6-0.75	0,3-0,6
Lipid	9,0-13,0	6,0-11,0
Total Asam Klorogenat	7,0-10,0	3,9-4,6
Asam Alifatik	1,5-2,0	1,0-1,5
Oligosakarida	5,0-7,0	0-3.5
Total Polisakarida	37,0-47,0	-
Asam Amino	2,0	0
Protein	11,0-13,0	13,0-15-0
Asam Humin	-	16,0-17,0

2.1.4 Manfaat Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

1) Antibakteri

Biji kopi robusta (*Coffea canephora*) mengandung kafein yang merupakan senyawa alkaloid yang dapat digunakan sebagai antibakteri (Putri *et al*, 2017). Kemampuan senyawa alkaloid dipengaruhi secara signifikan oleh aktivitas biologis yang dihasilkan oleh keberadaan gugus basa yang mengandung nitrogen untuk dapat bereaksi dengan gugus asam amino pada sel bakteri (Yaqin & Nurmilawati, 2015). Berdasarkan penelitian terhadap bakteri *Escherichia coli* biji kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki efektivitas sebagai antibakteri karena terdapat senyawa alkaloid (Tanauma *et al*, 2016). Kandungan tanin pada kulit buah kopi memiliki efek yang efektif sebagai agen antibakteri. Selain itu, biji kopi juga mengandung senyawa polifenol sekitar 0,2% berdasarkan berat biji (b/b) (Rijar *et al*, 2015).

2) Antioksidan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh (Wulandari & Agustin, 2022) biji kopi robusta (*Coffea canephora*) mengandung polifenol yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan guna kesehatan kulit wajah serta melawan radikal bebas yang ada pada tubuh sehingga dapat memperlampat penuaan dini. Senyawa yang dapat berfungsi sebagai antioksidan dapat berperan sebagai peredam radikal bebas adalah kafein, fenol dan asam klorogenat (Asti, 2015).

3) Antiangiogenesis

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh (Yusuf & Alyidrus, 2020) biji kopi robusta (*Coffea canephora*) mengandung senyawa kafein dan asam klorogenat yang berfungsi sebagai Antiangiogenesis.

4) Stimulasi Syaraf Pusat

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh (Maramis et al, 2013) kopi mengandung senyawa kafein yang bekerja sebagai perangsang psioaktif dan mempunyai efek sebagai stimulasi sel syaraf pusat, otot jantung dan meningkatkan diuresis.

2.2 Ekstraksi

2.2.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan dan isolasi zat dari suatu materi dengan menggunakan pelarut tertentu untuk mengeluarkan komponen campuran dari zat padat atau cair (Rezki et al., 2015). Secara umum, ekstraksi dapat dibedakan menjadi dua jenis, yaitu ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair. Dalam ekstraksi cair-cair, senyawa yang ingin dipisahkan terdapat dalam campuran cairan, sementara dalam ekstraksi padat-cair, senyawa yang akan dipisahkan terdapat dalam campuran yang berbentuk padatan. (Ubay, 2011). Ekstraksi dapat dilakukan menggunakan cara dan metode yang berbeda tergantung dari sifat dan tujuan dari suatu ekstraksi. Ekstrak dapat berupa sampel segar atau sampel yang kering. sampel segar digunakan karena sampel segar biasanya penetrasi pelarut lebih cepat dan dengan pengeringan risiko terbentuknya polimer resin atau artefak lain yang mungkin terjadi selama

proses pengeringan dapat berkurang. Sampel yang sudah kering memiliki keunggulan, yaitu kadar air dalam sampel berkurang, sehingga membantu melindungi senyawa dari potensi kerusakan akibat reaksi antimikroba (Marjoni, 2016). Menurut Marjoni (2016), beberapa istilah umum yang terkait dengan proses ekstraksi meliputi:

1) Menstrum : campuran pelarut yang dipakai dalam metode ekstraksi
2) Rafinat : sisa dari suatu proses ekstraksi
3) Artefak : zat tambahan yang didapatkan di samping zat yang ada dalam sampel

2.2.2 Tujuan Ekstraksi

Tujuan dari proses ekstraksi adalah untuk mengambil atau memisahkan senyawa dari simplisia atau campurannya. Senyawa harus diperhatikan pada saat pemilihan metode ekstraksi, pengunaan pelarut serta alat yang tersedia (Syamsul *et al*, 2020). Menurut Marjoni (2016) ada beberapa kondisi yang perlu diperhatikan dan dipertimbangkan dalam menentukan tujuan dari suatu proses ekstraksi :

1) Senyawa kimia yang sudah memiliki identitas

   Proses ekstraksi dapat dikerjakan sesuai prosedur atau sedikit dimodifikasi untuk lebih mengembangkan proses eksraksi.

2) Mengandung kategori senyawa kimia khusus

   Tujuan dari proses ekstraksi adalah untuk dengan mudah mengidentifikasi beberapa kelompok senyawa kimia metabolit sekunder dalam simplisia, seperti alkaloid, flavonoid, dan lain-lain. Sebagai

metode umum, tinjauan pustaka dan hasil yang pasti dapat digunakan untuk mengonfirmasi kelompok senyawa kimia dengan menguji ekstrak secara kimiawi atau melalui kromatografi.

3) Organisme (tumbuhan atau hewan)

Pengobatan tradisional biasanya menggunakan simplisia yang dibuat dengan menggunakan cara yaitu direbus. Dalam hal ini, proses ekstraksi yang dilakukan secara tradisional harus ditiru atau diolah, terutama jika ekstrak akan diteli lebih lanjut, terutama untuk memvalidasi penggunaan obat tradisional.

4) Penemuan senyawa baru

Metode ekstraksi dapat dilakukan secara acak atau berdasarkan penggunaan tradisional untuk mengidentifikasi senyawa kimia dengan aktivitas biologi tertentu. Beberapa aspek yang harus diperhatikan saat melakukan ekstraksi adalah (Marjoni, 2016):

(1) Jumlah bahan tanaman atau simplisia yang akan diekstrak
(2) Derajat kehalusan simplisia
(3) Jenis pelarut yang digunakan dalam ekstraksi
(4) Waktu ekstraksi
(5) Metode ekstraksi
(6) Kondisi proses ekstraksi

2.2.3 Metode Ekstraksi

Pada ekstraksi biji kopi robusta (*Coffea canephora*), terlebih dahulu memilih metode ekstraksi yang sesuai. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada senyawa metabolit aktif yang akan diambil atau disarikan (Chairunnisa *et al*, 2019). Berikut jenis-jenis ekstraksi:

1) Ekstraksi secara dingin

Tujuan metode ekstraksi secara dingin untuk mengekstrak senyawa tanpa merusak komponen kimia yang tidak tahan panas (Putra, 2016). Adapun tahap ektraksi secara dingin dapat dilakukan melalui beberapa metode berikut:

(1) Maserasi

Maserasi merupakan teknik yang sederhana yang melibatkan merendam simplisia dalam campuran pelarut selama jangka waktu tertentu pada suhu ruang serta terhindar dari cahaya (Marjoni, 2016). Maserasi dikerjakan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut sambil beberapa kali diaduk pada suhu ruang. Selama maserasi berlangsung dilakukan pengocokan berulang-ulang. Hal ini untuk memastikan pemerataan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat, Selain itu maserasi adalah metode ekstraksi dimana prosedur lebih mudah, peralatan yang sederhana, dan menjamin zat aktif yang diekstraksi tidak akan rusak (Chairunnisa *et al*, 2019).

Untuk melakukan ekstraksi biji kopi robusta (*Coffea canephora*) sebelumnya memilih metode ekstraksi yang cocok. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan senyawa metabolit aktif yang akan di ambil apakah mempunyai

sifat tahan terhadap panas atau tidak tahan terhadap panas. Ekstraksi metabolit sekunder yaitu alkaloid dari biji robusta (*Coffea canephora*) dikerjakan secara maserasi. Maserasi memerlukan waktu agar zat aktif bisa terlarut secara sempurna. Waktu ekstraksi maserasi adalah selama 7 hari mendapatkan hasil yang optimal dengan perbandingan waktu 3 hari dan 5 hari (Iswandi, 2022). Langkah- langkah pengerjaan maserasi adalah:

1. Simplisia dimasukkan ke dalam wadah yang inert dan ditutup rapat pada suhu ruangan.
2. Simplisia direndam dalam pelarut selama beberapa hari sambil sesekali diaduk. Pelarut yang digunakan dapat bersifat polar atau pelarut non polar.
3. Setelah proses ekstraksi selesai, dilakukan proses filtrasi untuk memisahkan pelarut dari sampel.

(2) Perkolasi

Perkolasi merupakan sebuah proses ekstraksi simplisia yang telah halus menggunakan pelarut yang sesuai dengan cara melewatkannya secara perlahan melalui kolom. Perkolasi merupakan ekstraksi yang menggunakan pelarut baru, biasannya dikerjakan pada suhu kamar. Prinsip perkolasi adalah memasukkan serbuk simplisia ke dalam wadah berbentuk silinder, yang memiliki sekat berpori pada bagian bawahnya. Proses ini memerlukan durasi yang lebih lama dan memerlukan kuantitas pelarut yang lebih besar. Untuk memastikan bahwa ekstraksi telah optimal, cairan perkolat dapat

diuji untuk adanya metabolit menggunakan pereaksi yang memiliki spesifisitas tertentu. (Hujjatusnaini *et al*, 2021).

2) Ekstraksi secara panas

Metode ekstraksi secara panas dipakai untuk senyawa sederhana yang telah dipastikan tahan terhadap pemanasan (Zahroh, 2021). Metode ekstraksi yang memerlukan panas, yaitu

(1) Seduhan

Metode ekstraksi yang paling sederhana dimana sampel direndam dalam air panas selama 5-10 menit (Marjoni, 2016).

(1) Penggodokan

Metode ekstraksi dengan proses menggodok simplisa menggunakan api langsung kemudian disaring dan hasilnya digunakan untuk memperoleh yang obat baik secara umum, termasuk ampas hasil seduhannya (Marjoni, 2016).

(2) Infusa

Metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara menyari simplisia dengan air yang memiliki suhu 90ºC selama 15 menit (Marjoni, 2016). Pada umumnya membuat infusa dengan menerapkan metode ini cocok untuk simplisia yang memiliki struktur jaringan yang lembut, seperti bunga dan daun. Metode ini sesuai untuk bahan yang mengandung minyak atsiri dan senyawa-senyawa yang sensitif terhadap pemanasan berkepanjangan (Karim, 2014)..

(3) Digestasi

Metode ekstraksi yang menggunakan suhu rendah 30-40ºC (Marjoni, 2016).

(4) Dekokta

Dekokta merupakan ekstraksi dengan cara direbus, menggunakan pelarut air dipanaskan pada suhu 90-95°C selama 30 menit (Dahlia, 2019). Bentuk produk ini bisa disimpan dalam kondisi dingin dengan periode penggunaan yang cukup lama, dengan catatan bahwa tidak ada risiko kontaminasi (Hujjatusnaini *et al*, 2021).

(5) Refluks

Refluks adalah metode ekstraksi dimana sampel dimasukkan kedalam labu dengan Pelarut yang dikoneksikan dengan kondensor. Pelarut tersebut dipanaskan hingga mencapai titik didih, kemudian uapnya dikondensasikan dan mengalir kembali ke dalam labu (Mukhtarini, 2014).

(6) Soxhletasi

Metode ekstraksi yang menggunakan alat khusus berupa ekstraktor soxhlet pada temperatur yang relatif rendah (Marjoni,2016).

2.3 Pelarut

Pelarut merupakan Zat yang terdapat dalam jumlah yang signifikan dalam larutan disebut sebagai pelarut, sementara zat lainnya dianggap sebagai zat terlarut. Penting bagi pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi untuk menjadi yang paling cocok bagi zat aktif dalam sampel dan bahan tanaman. Ini memungkinkan zat aktif untuk dipisahkan dari simplisia serta senyawa lain yang ada dalam bahan

tanaman. Didapatkan ekstrak yang hanya memiliki kandungan sebagian besar dari zat aktif yang dikehendaki pada hasil akhir dari ekstraksi (Marjoni *et al*., 2018). Pada saat proses ekstraksi pemilihan pelarut merupakan faktor yang penting. Pelarut dengan sifat polar hanya akan mampu melarutkan senyawa yang juga bersifat polar, seperti etanol, metanol, dan air. Sebaliknya, pelarut non polar akan mampu melarutkan senyawa yang bersifat non polar juga contohnya kloroform, dan n-heksan (Kasminah, 2016).

2.3.1 Kloroform

Kloroform adalah larutan yang gampang menguap, tidak berwarna, mempunyai bau yang tajam dan menusuk, memiliki rumus molekul $CHCl_3$ Kloroform memiliki berat molekul sebesar 119,38 g/mol, dengan titik didih sekitar 61,20°C, titik lebur sekitar -63,50°C, dan massa jenis sekitar 1,49 g/cm³ (Wiradnyani *et al*, 2014).

2.3.2 N-Heksan

N-Heksan tidak berwarna, berbentuk cair, mudah terbakar, tidak larut dalam air namun larut dalam alkohol. Mempunyai titik didih 69ºC dan masa jenis 0,655 gr/mL (Wiradnyani *et al*, 2014).

2.3.3 Air

Air adalah substansi kimia dengan rumus H_2O yang terdiri dari dua atom hidrogen yang terikat pada satu atom oksigen melalui ikatan kovalen. Air tidak memiliki warna, rasa, bau, dan memiliki titik didih 100ºC dan titik beku 0ºC (Wiradnyani *et al*, 2014).

2.3.4 Metanol

Metanol memiliki rumus kimia CH_3OH mengandung 98%-102% dalam suatu larutan. Mempunyai bau seperti permen, tidak ada warna dan bentuknya serbuk seperti jarum (Farmakope Indonesia Edisi VI).

2.3.5 Etanol

Etanol merupakan campuran etil alkohol serta air. Etanol mengandung antara 94,7 hingga 95,2% berdasarkan volume (v/v) atau sekitar 92,0 hingga 92,7% C2H6O. Etanol adalah zat yang tidak berwarna, jernih, mudah menguap, memiliki aroma karakteristik, rasa sedikit pedas, dan dapat terbakar dengan nyala biru yang bebas dari asap. Etanol sangat larut dalam air, dan mempunyai bobot jenis 0,8119 sampai 0,8139 (Farmakope Indonesia Edisi VI).

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol, karena etanol merupakan pelarut yang mudah didapat. Etanol juga dapat menarik sebagian besar senyawa aktif dibandingkan dengan pelarut lainnya (Trifani, 2012). Menurut Kurniawati, *et al* (2016) etanol 96% dipilih karena memiliki konsentrasi lebih tinggi dan lebih pekat dari etanol 80%, pelarut yang lebih pekat akan menarik zat aktif sehingga diperoleh hasil maserasi yang lebih besar. Etanol 96% merupakan pelarut yang terbaik untuk mendapatkan kadar alkaloid total dibanding dengan konsentrasi 50% dan 70% (Wahyuni & Marpaung, 2020). Setelah dilakukan proses ekstraksi, selanjutnya dapat dilakukan penetapan kadar pada alkaloid.

2.4 Senyawa Alkaloid

2.4.1 Pengertian Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa organik yang paling umum didapati, dikarenakan zat alkaloida sebagian besar berasal dari tumbuhan. Alkaloid umunya memiliki satu atau lebih atom nitrogen dengan sifat basa oleh karena itu disebut alkaloid. Alkaloid berperan sebagai pertahanan tumbuhan terhadap penyakit dan serangan hama, serta sebagai pengatur pertumbuhan. Alkaloid juga dapat bertindak sebagai sumber mineral basa yang mengatur keseimbangan ion dalam tumbuhan. Senyawa alkaloid yang dihasilkan oleh tumbuhan umumnya termasuk dalam kelompok metabolit sekunder. Distribusi alkaloid cenderung berkonsentrasi pada bagian-bagian tertentu dari tumbuhan, seperti akar, biji, buah, daun, dan kulit batang. Beberapa tumbuhan memiliki kandungan dan komponen berkhasiat obat tanpa batas yang jelas, sehingga penggunaan tumbuhan obat perlu diperhatikan untuk menghindari potensi risiko bagi pengguna (Sianipar *et al*., 2017). Alkaloid adalah salah satu jenis senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam jaringan tumbuhan dan hewan, memiliki sifat basa, mengandung atom nitrogen (N), dan memiliki struktur cincin heterosiklik atau aromatik (Wahyuni & Marpaung., 2020).

2.4.2 Sifat Umum Alkaloid

Alkaloid memiliki beberapa sifat yang mencakup kristal yang halus, memiliki rasa pahit dan kadang-kadang asam, serta bentuk bebas dari alkaloid bersifat basa. Alkaloid juga termasuk dalam senyawa aktif yang terdapat pada tanaman yang memiliki efek beracun terhadap manusia tapi bisa dimanfaatkan

untuk obat adalah alkaloid sehingga banyak dimanfaatkan untuk pengobatan, Alkaloid memiliki kemampuan untuk mengatur pertumbuhan tumbuhan serta berfungsi sebagai penghalau dan pemikat serangga. Alkaloid tersebar luas pada berbagai jenis tumbuhan dalam bentuk garam organik. Ekstraksi alkaloid dilakukan dengan merendam bahan tumbuhan dalam air yang diasamkan, kemudian larutan garam alkaloid terbentuk. Sebagian besar alkaloid memiliki aktivitas biologis tertentu, dengan beberapa di antaranya memiliki tingkat toksisitas yang tinggi, sementara yang lain memiliki manfaat medis seperti kuinin, morfin, dan strikhnin. Alkaloid ini dikenal karena efek fisiologis dan psikologis yang dimilikinya. Alkaloid terdapat pada berbagai tumbuhan yang biasanya terdapat didalam kadar yang rendah serta harus dipisahkan dari campuran senyawa kompleks yang berasal dari tumbuhan (Sianipar *et al*, 2017).

Peran alkaloid secara farmakologi dapat mengobati diare, diabetes, malaria dan antimikroba (Wahyuni & Marpaung., 2020). Berdasarkan struktur utama alkaloid yang merupakan Benar, ikatan utama C-N dalam senyawa alkaloid dapat diklasifikasikan menjadi tiga jenis: *true alkaloid, pseudoalkaloid, dan protoalkaloid. True alkaloid* merupakan senyawa hasil sintesis dari asam amino yang mengandung atom nitrogen dalam rangkaian heterosiklik. Jenis lkaloid yang terdapat pada tanaman berupa garam atau N-oksida. Beberapa senyawa yang terlibat meliputi kokain, kuinin, morfin, dan nikotin. *Pseudoalkaloid* merujuk pada jenis kelompok senyawa dengan atom nitrogen dalam rangkaian karbon, tetapi tidak berasal dari prekursor asam

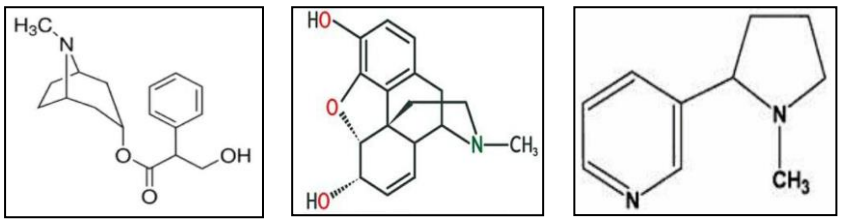
amino seperti asam asetat, geraniol, asam ferulat, adenin, atau guanin. Contoh senyawa dalam kategori ini termasuk xantin (seperti kafein, teofilin, dan teobromin), solasodin, dan kapsaisin. Sementara itu, *protoalkaloid* adalah kelompok alkaloid minor dengan struktur yang relatif sederhana dan atom nitrogen yang tidak berasal dari kerangka heterosiklik asam amino. Beberapa senyawa yang terlibat dalam protoalkaloid termasuk efedrin, meskalin, dan hordenin (Hanani, 2015).

2.4.3 Klasifikasi Alkaloid

Berdasarkan proses biosintetik serta hubungannya bersama asam amino, senyawa alkaloid bisa diklasifikasikan menjadi alkaloid sejati (*true alkaloid*), alkaloid sederhana (*protoalkaloid*) dan alkaloid semu (*pseudoalkaloid*) (Juniarti *et al*, 2016).

1) *True Alkaloid*

Alkaloid ini bercirikan memiliki sifat basa kuat, mempunyai atom nitrogen terkandung dalam cincin heterosiklik, yang merupakan turunan dari asam amino. Peredaran senyawa ini biasanya terbatas, dan kebanyakan terbentuk dalam bentuk garam dan asam organik pada tumbuhan (Juniarti *et al*, 2016). Contohnya : atropin, morfin, nikotin

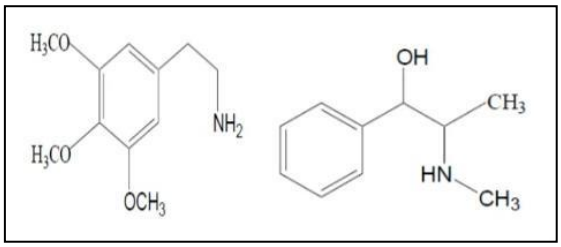


Sumber: (Juniarti *et al*,2016)

Gambar 2.2 Struktur Senyawa *True Alkaloid*

2) *Protoalkaloid*

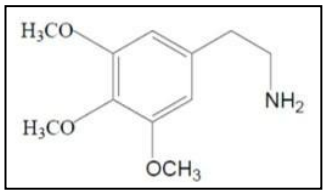
Alkaloid ini ditandai dengan memiliki struktur asam amino yang sederhana, di mana atom nitrogen dari asam amino tersebut tidak terletak dalam cincin heterosiklik. Biosintesis alkaloid ini berasal dari asam amino dan basa, contohnya seperti efedrin dan meskalin. (Juniarti *et al*, 2016).



Sumber: (Juniarti *et al*,2016)
Gambar 2.3 Struktur Senyawa *Protoalkaloid*

3) *Pseudoalkaloid*

Karakteristik dari alkaloid ini tidak berasal dari asam amino dan pada umumnya memiliki sifat basa, seperti halnya kafein. Bersifat basa lemah (Juniarti *et al*, 2016).



Sumber: (Juniarti *et al*,2016)
Gambar 2.4 Struktur Senyawa *Pseudoalkaloid*

Alkaloid juga dapat diklasifikasikan dengan beberapa faktor yaitu berdasarkan jenis cincin heterosiklik, biogenetik, farmakologi, dan jenis tumbuhan. Berikut klasifikasi alkaloid jenis cincin heterosiklik, biogenetik, farmakologi, dan jenis tumbuhan (Musa, 2018) :

Tabel 2.2 Klasifikasi Alkaloid
Sumber: (Musa, 2018)

Jenis Cincin Heterosiklik	Biogenetik	Farmakologi	Jenis Tumbuhan
1) Pirolidin 2) Piperidin 3) Isokuiolin 4) kuinolin 5) Indol	1) Alisiklik 2) Aromatik jenis fenilalanin 3) Aromatik jenis indol	1) Kuinin 2) Morfin 3) Stiknin	1) Alkaloid tembakau 2) Alkaloid amaryllidaceae 3) Alkaloid erythrine

2.4.4 Sifat-sifat Senyawa Alkaloid

1) Sifat Fisik

Sejumlah senyawa alkaloid yang telah diisolasi menunjukkan variasi sifat fisik dan ada yang berbentuk padatan kristal dalam bentuk garam dengan titik lebur tertentu. Sebagai contoh, kokain memiliki titik lebur sekitar 98°C. Namun, beberapa kelompok alkaloid dapat berbentuk tidak teratur (amorf), dan ada juga yang berwujud cair seperti nikotin dan konin. Mayoritas senyawa alkaloid tidak berwarna, meskipun beberapa senyawa alkaloid kompleks seperti berberin yang berwarna kuning dan betanin yang berwarna merah memiliki warna khasnya. Secara umum, alkaloid dalam bentuk basa bebas larut hanya dalam pelarut organik, walaupun beberapa pseudoalkaloid dan protoalkaloid dapat larut dalam air. Garam alkaloid dan alkaloid kuaterner cenderung sangat mudah larut dalam air (Rosamah, 2019).

2) Sifat Kimia

Senyawa alkaloid memiliki sifat dasar sebagai basa, yang tergantung pada keberadaan pasangan elektron bebas pada atom nitrogen. Jika terdapat gugus fungsional yang mendorong elektron dekat dengan atom

nitrogen, seperti gugus alkil, maka elektron pada atom nitrogen akan lebih tersedia, sehingga senyawa tersebut lebih bersifat basa. Hingga trietilamin lebih basa daripada dietilamin dan senyawa dietilamin lebih basa daripada senyawa etilamin. Sebaliknya, jika gugus fungsional yang berdekatan bersifat menarik elektron misalnya gugus karbonil, maka ketersediaan pasangan elektron berkurang dan pengaruh yang ditimbulkan akan menyebabkan alkaloid bersifat netral dan bahkan sedikit asam. Contohnya senyawa yang mengandung gugus amida. Sifat kebasaan alkaloid menyebabkan senyawa ini mudah mengalami pembusukan terutama saat panas dan sinar dengan adanya oksigen. Produk dari reaksi adalah N-oksida. Pembusukan pada senyawa alkaloid selama atau setelah isolasi dapat menimbulkan berbagai masalah jika penyimpanan jangka panjang. Proses pembentukan garam dengan senyawa organik (tartat, sitrat) atau anorganik (asam hidroklorida atau sulfat) sering mencegah pembusukan (Rosamah, 2019).

2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

2.5.1 Pengertian Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

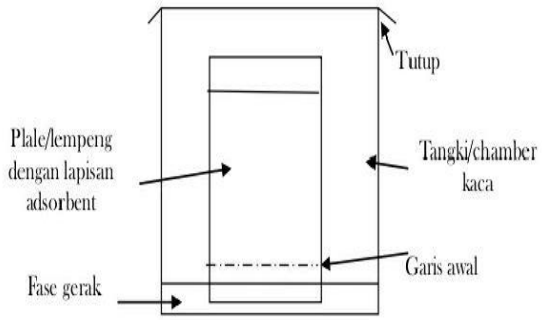
Kromatografi Lapis Tipis adalah salah satu metode yang sangat umum digunakan, karena sederhana. Dalam metode ini, sampel dipisahkan dan dianalisis dengan menggunakan chamber yang tertutup, yang berisi pelarut dan lempeng KLT. Dengan mengoptimalkan metode dan menggunakan instrumen yang tepat, proses pemisahan menjadi efisien dan hasil kuantifikasi dapat menjadi akurat (Wulandari, 2011). Kromatografi adalah metode untuk

memisahkan campuran zat berdasarkan perbedaan dalam kecepatan perpindahan masing-masing komponen. Proses ini melibatkan fase diam yang terletak di bawah pengaruh pelarut dari fase gerak. Kromatografi Lapis Tipis memiliki berbagai tujuan, termasuk memberikan hasil kualitatif, kuantitatif, dan preparatif. Selain itu, metode ini digunakan untuk mempelajari sistem pelarut dalam kromatografi. Analisis melalui KLT dapat membantu menentukan pelarut terbaik yang akan digunakan serta perbandingan antara pelarut yang akan diaplikasikan sebagai fase gerak dalam kromatografi kolom. Dalam KLT, fase diam terdiri dari lapisan tipis adsorben yang dilapisi pada bahan inert sebagai penyangga. (Rosamah, 2019).

Bagian-bagian dari alat kromatografi lapis tipis antara lain (Hujjatusnaini *et al*, 2021):

1) Lempeng kromatografi, biasanya terbuat dari aluminium atau kaca, memiliki ukuran umumnya sekitar 20×20 cm dengan ketebalan lapisan sekitar 0,10-0,25 mm..
2) Rak penyimpanan, yang berfungsi untuk meletakkan lempeng.
3) Bejana Kromatografi, yang berfungsi untuk menempatkan lempeng dalam posisi tegak, lempeng tersebut diletakkan secara datar pada bagian bawah bejana. Bejana ini memiliki sejumlah fase pengembangan yang dapat diatur. Bagian atas bejana dapat ditutup dengan rapat. Ukuran bejana dapat disesuaikan dengan ukuran lempeng yang digunakan. Bejana diisi dengan fase pengembangan untuk memastikan pemisahan yang optimal.

4) Pipet mikro digunakan untuk mengalirkan larutan bahan uji dan larutan pembanding dalam jumlah yang diinginkan.
5) Alat penyemprot pereaksi atau larutan deteksi, umumnya terbuat dari kaca, serta dimanfaatkan untuk menyemprotkan pereaksi ke permukaan lempeng..
6) Lampu ultraviolet dimanfaatkan untuk melakukan pengamatan lempeng panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.



Sumber: (Rosamah, 2019)
Gambar 2.5 Kromatografi Lapis Tipis

2.5.2 Kelebihan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT-Densitometri memiliki sejumlah keunggulan yang mencakup spesifikasi yang tinggi, hasil yang dapat diandalkan, serta kemudahan dan kecepatan dalam penggunaan. Metode ini juga memiliki fleksibilitas yang tinggi dalam memilih fase gerak, serta memerlukan jumlah pelarut yang sedikit, biaya yang dibutuhkan ringan, dan waktu yang diperlukan singkat (15-60 menit). KLT-Densitometri dapat digunakan untuk mengukur kadar senyawa aktif, baik yang berasal dari bahan alam maupun senyawa kimia hasil sintesis. (Savitri & Megantara., 2019).

2.5.3 Fase Diam

Fase diam adalah lapisan tipis yang terbuat dari bahan padat, diterapkan pada permukaan datar penyangga dengan menggunakan bahan pengikat. Beberapa bahan yang digunakan sebagai fase diam dalam kromatografi lapis tipis adalah silika gel, alumina, kieselguhr, dan selulosa. Penting bagi fase diam untuk memiliki sedikit kandungan air mungkin, karena air dapat mengisi semua tempat penyerapan dan mengganggu proses pemisahan. Sebelum digunakan, lempeng KLT sebaiknya diaktifkan dengan memanaskannya pada suhu 110ºC selama 30 menit (Marjoni, 2016).

1) Silika Gel

Silika gel merupakan asam lemah**,** kita dapat mengunakannya untuk membedakan steroid, asam amino, alkohol, hidrokarbon, lemak, vitamin dan alkaloid. Jika menggunakan silika gel pada kromatografi lapis tipis maka ukuran partikelnya harus mempunyai diameter rata-rata 5-10 mikrometer (Rosamah, 2019). Semakin kecil diameter, maka kecepatan aliran fase gerak akan menjadi lebih lambat, yang pada gilirannya akan mempengaruhi kualitas pemisahan. Silika gel F_{254} adalah yang paling populer serta telah direkomendasikn untuk berbagai pemisahan seluruh industri dan lembaga penelitian (Wulandari, 2011).

2) Alumina

Alumina adalah sorben sintetis yang terbuat dari 3 derajat keasaman permukaan, yaitu asam-netral-basa. Alumina lebih reaktif secara kimiawi daripada silika gel, dan ini dapat menimbulkan masalah pada berbagai jenis

sampel. Reaksi kimia dapat terjadi di permukaan lempeng penyerap, yang dapat menyebabkan analatit akan hilang pada saat kromatografi. Alumina sekarang turun dalam penggunaannya (Wulandari, 2011).

3) Selulosa

Selulosa digunakan untuk pemisaha asam amino, tidak memerlukan pengikat serta penggunaan selulosa menurun dikarenakan telah beralih menggunakan metode lain yaitu silika gel (Wulandari, 2011).

4) Kieselguhr

Kieselguhr mengandung silikon dioksida, dan jumlah oksida lain seperti alumunium, besi, titanium, magnesium, natrium, kalium dan kalium oksida, hidroksida dan karbonat. Variabilitas ukuran pori dan luas permukaan pada kieselguhr mebatasi penggunaan untuk kromatografi lapis tipis yang berkualitas dan presisi yang tinggi (Wulandari, 2011).

2.5.4 Fase Gerak

Fase gerak atau eluen dapat terdiri dari satu hingga lebih pelarut dengan komposisi tertentu. Pelarut dapat menggunakan pelarut polar dan pelarut non polar berdasarkan pada zat yang akan dilarutkan. (Marjoni, 2016). Fase gerak memiliki peran penting dalam KLT-Densitometri, yaitu memindahkan zat terlarut dari adsorben sehingga zat terlarut dapat dibawa dalam fase gerak melewati lempeng KLT (Rosamah, 2019).

Dalam pemilihan fase gerak dapat dilakukan dengan cara membaca pustaka yang mendukung maupun dengan metode mencoba-coba sendiri atau *trial and error* (Gandjar dan Rohmah, 2007). Pemilihan fase gerak sangat

penting dalam KLT-Densitometri. Di bawah ini adalah beberapa panduan untuk memilih dan mengoptimasi fase gerak:

1) Menggunakan pemurnian yang tinggi terjadi karena KLT merupakan suatu teknik yang sangat sensitif.
2) Menggunakan lebih dari satu pelarut
3) Pelarut harus mampu membasahi lapisan lempeng KLT
4) Ketika menggunakan fase diam polar seperti silika gel untuk pemisahan, polaritas fase gerak akan memengaruhi kecepatan migrasi solut yang pada akhirnya juga menentukan nilai R_f. Penambahan pelarut polar seperti etanol ke dalam pelarut non-polar seperti kloroform akan menyebabkan peningkatan yang signifikan pada nilai R_f.

Komponen pelarut dalam urutan peningkatan kekuatan elusi, semakin kuat elusi pada fase gerak maka ditabel akan semakin kebawah.

Tabel 2.3 Urutan Pelarut Berdasarkan Kekuatan Elusi
Sumber : (Aljamali *et al*, 2015)

	Pelarut	**Kecepatan koefisien (mm^2/s)**
Kekuatan elusi rendah	n-Heksana	14,6
	Toluena	11,0
	Klorofom	11,6
	Dietil eter	15,3
	Asetonitril	15,4
	Etil asetat	12,1
	Aseton	16,2
Kekuatan elusi tinggi	Etanol	4,2
	Metanol	7,1
	Piridin	8,0

Berdasarkan tabel diatas kekuatan elusi pelarut berhubungan dengan pemisahan komponen pada lempeng KLT. Suatu pelarut yang memiliki

kekuatan elusi semakin tinggi maka komponen akan terpisah dengan baik. Pemisahan ini ditandai dengan bercak noda pada lempeng KLT.

Kecepatan koefisien adalah kecepatan perpindahan komponen oleh pelarut yang melewati lempeng KLT. Semakin cepat waktu perpindahan komponen oleh pelarut maka semakin besar nilai kecepatan koefisiennya.

2.5.5 Penetapan Harga R_f

Nilai R_f atau faktor retensi Merupakan perilaku karakteristik suatu senyawa dalam KLT yang ditandai oleh nilai yang dikenal sebagai Rf, juga dikenal sebagai pecahan desimal. Nilai Rf dapat dihitung dengan membagi jarak perpindahan senyawa dari posisi awalnya dengan jarak perpindahan pelarut dari posisi awal (depan pelarut) (L. Wulandari, 2011). Nilai R_f yang optimal yaitu berada pada rentang 0,2-0,8 (Husa & Mita, 2020).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

2.6 Densitometri

Densitometri adalah sebuah metode analisis instrumental yang berbasis pada interaksi radiasi elektromagnetik, menggunakan analit yang terdapat dalam bentuk bercak pada lempeng KLT. Metode densitometri lebih menitikberatkan pada analisis kuantitatif konsentrasi analit yang rendah, dengan KLT digunakan untuk pemisahan. Dalam KLT-Densitometri, penentuan kuantitatif analit dilakukan dengan membandingkan luas area bercak analit dengan luas area bercak standar pada fase diam yang memiliki konsentrasi yang diketahui. Alat densitometri dilengkapi dengan sumber cahaya yang bergerak di atas bercak pemisahan pada

lempeng kromatografi untuk mengukur kadar komponen. Lempeng KLT digerakkan sepanjang jalur cahaya yang berasal dari sumber cahaya tersebut. Bercak yang memiliki ukuran kecil dan intensitas yang tinggi akan menghasilkan puncak kurva absorbsi yang tajam dan sempit, sementara bercak yang lebih lebar akan menghasilkan puncak kurva absorbsi yang lebih lebar dan tumpul (Sudjadi, 1988).

Spesifikasinya yang tinggi, hasil yang diperoleh dapat diandalkan, kemudahan dan kecepatan pelaksanaan, serta aspek ekonomis karena menggunakan fase gerak yang sedikit merupakan keunggulan dari metode Densitometri. Optimasi pemisahan dapat dilakukan dengan teknik yang bervariasi. Penetapan kadar dengan metode KLT-Densitometri memungkinkan penetapan kadar secara simultan serta jika semua faktor telah terpenuhi maka hasilnya dapat dipertanggungjawabkan dengan valid (L. Wulandari, 2011). Menurut Estetika (2017) Komponen Densitometer adalah:

1) Detektor

Pada alat TLC Scanner 3 CAMAG menggunakan detector berupa *photomultipliers*. *Photomultipliers* memiliki komponen yaitu Tabung vakum photomultiplier dilengkapi dengan katoda logam yang terbuat dari bahan metal multi alkali, struktur dynode yang berbentuk cekungan, dan anoda dengan kemampuan sensitivitas spektral antara 185 hingga 850 nm. Permukaan logam pada katoda disinari oleh suatu cahaya yang mengakibatkan pelepasan sejumlah elektron dari permukaan tersebut. Fenomena ini dikenal sebagai efek

fotoelektrik, dan biasanya terjadi dalam kondisi hampa udara di dalam tabung merupakan prinsip kerja dari *photomultipliers.*

2) Monokromator

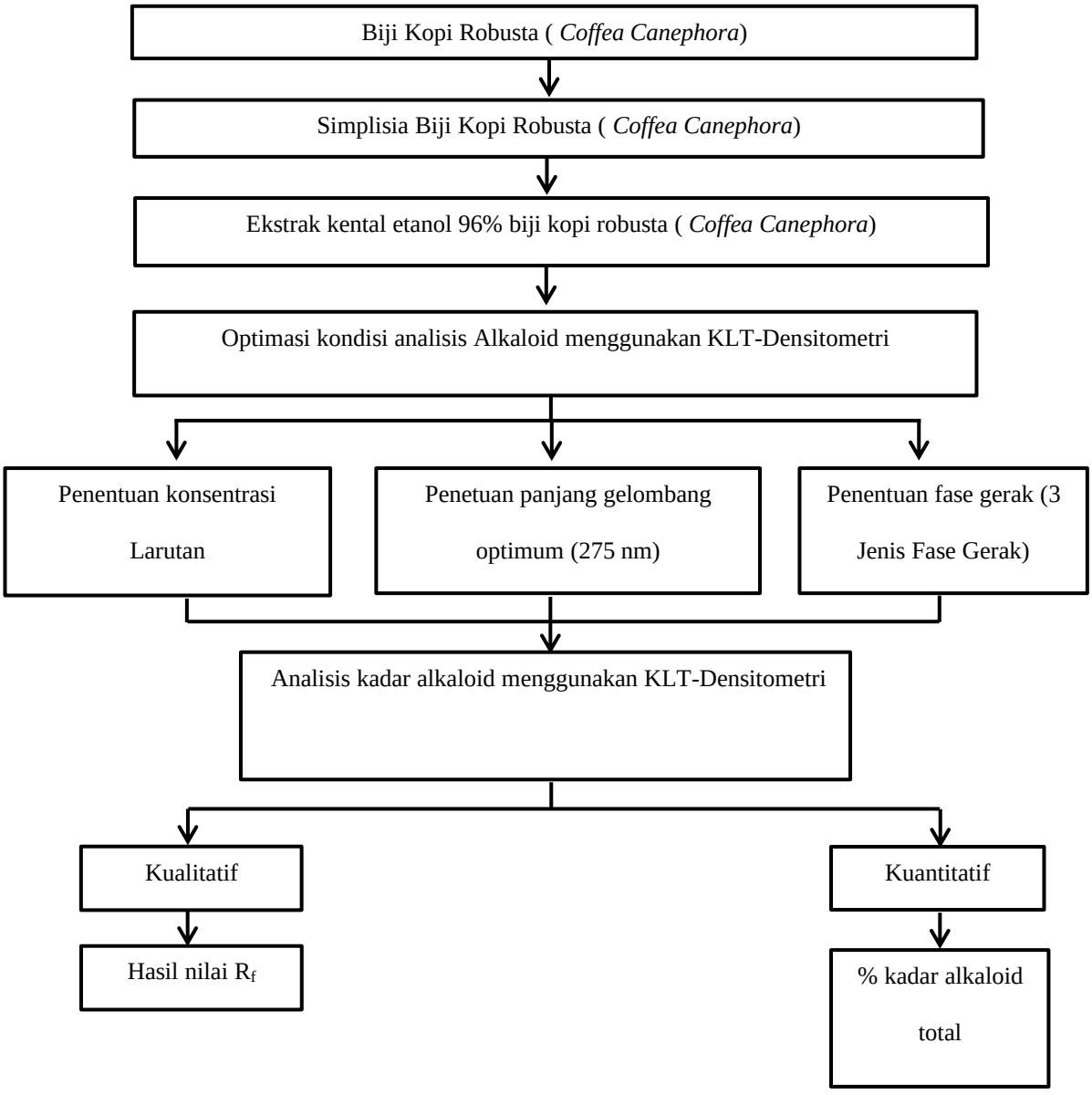
Monokromator merupakan perangkat yang paling sering digunakan untuk menghasilkan sinar radiasi pada panjang gelomban tunggal. Monokromator untuk ultraviolet, sinar tampak dan inframerah serupa dikarenakan memiliki celah, lensa, cermin dan prisma. Monokromator terbagi menjadi 2 yaitu, monokromator prisma Bunsen yang berfungsi sebagai pemisahan sinar polikromatis menjadi sinar monokromatis yang berasal dari sumber cahaya. Jika seberkas cahaya melewati prisma, cahaya tersebut akan mengalami dispersi sehingga terurai menjadi berbagai warna seperti merah, jingga, hijau, biru, dan lain-lain., serta monokromator grating czerney-turney.

3) Absorbansi

Penyerapan terjadi hanya disaat Energi foton yang masuk sama dengan energi yang diperlukan untuk mengangkat elektron dari keadaan dasar ke keadaan tereksitasi, yaitu dari pita valensi ke pita konduksi dalam padatan. Cahaya yang ditransmisikan menggunakan spektroskopi memungkinkan untuk mengetaui level atau pita energi dari atom atau molekul zat padat. Ketika seberkas radiasi elektromagnetik melewati sampel kimia, sebagian dari energi tersebut akan diserap. Energi elektromagnetik yang ditransfer ke molekul dalam sampel meningkatkan tingkat energinya. Molekul-molekul dalam sampel tertarik pada panjang gelombang yang mengalami absorpsi..

BAB 3 KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis Pembuatan hipotesis dalam penelitian bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengevaluasi hubungan atau pengaruh yang mungkin terjadi antara variabel bebas (variabel *independent*) dengan variabel terikat (variabel *dependent*). Hipotesis adalah suatu jawaban sementara terhadap permasalahan penelitian, yang dirumuskan berdasarkan pertanyaan-pertanyaan dalam permasalahan penelitian (Sugiyono, 2017). Dalam konteks penelitian ini, hipotesisnya adalah bahwa terdapat kandungan alkaloid total pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang memenuhi syarat nilai R_f yaitu 0,2-0,8.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain Penelitian merujuk pada rencana yang disusun untuk menjawab serangkaian pertanyaan penelitian. Ini mencakup kerangka kerja yang melibatkan metode dan prosedur yang digunakan untuk mengumpulkan, menganalisis, dan menginterpretasi data (McCombes, 2019). Dalam konteks penelitian yang sedang dilakukan, desain penelitian yang diterapkan adalah penelitian deskriptif laboratorium secara kualitatif dan kuantitatif. Penelitian deskriptif kaboratorium merupakan penelitian yang dilakukan di Laboratorium untuk mendeteksi kandungan dan kadar bahan atau sampel (Meiryani, 2021)

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi mengacu pada keseluruhan elemen yang akan diselidiki, yang memiliki karakteristik yang serupa, termasuk individu dari suatu kelompok, peristiwa, atau objek yang akan diteliti (Handayani, 2020). Dalam konteks penelitian yang sedang dilakukan, populasi yang digunakan adalah tanaman kopi robusta *(Coffea canephora)* yang didapat dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jenggawah, Jember.

4.2.2 Sampel

Sampel merujuk pada sebagian dari total elemen dan karakteristik yang ada dalam populasi, atau segmen kecil dari anggota populasi yang diambil dengan prosedur tertentu untuk mewakili populasi tersebut (Siyoto & Sodik,

2015). Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan adalah bagian biji dari tanaman kopi robusta *(Coffea canephora)* yang didapat dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jenggawah, Jember.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas merupakan faktor yang memiliki pengaruh atau menjadi penyebab dari perubahan atau timbulnya variabel terikat (Sugiyono, 2019). Dalam konteks penelitian ini, variabel bebas yang diamati adalah optimasi kondisi analisis yang terdiri atas penentuan konsentrasi, penentuan panjang gelombang optimum dan penentuan fase gerak.

4.3.2 Variabel Terikat (*Dependent*)

Variabel terikat adalah faktor yang dipengaruhi atau menjadi hasil, sebagai konsekuensi dari adanya variabel bebas (Sugiyono, 2019). Dalam kerangka penelitian ini, variabel terikat yang dianalisis adalah kadar alkaloid total yang diukur mengunakan KLT Densitometer yang terdiri atas hasil nilai R_f dan nilai kadar alkaloid total.

4.4 Tempat Penelitian

Tempat penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Universitas dr. Soebandi.

4.5 Waktu Penelitian

Waktu Penelitian ini dilaksanakan mulai pada periode bulan Maret-Mei 2023.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam hal ini merujuk pada penguraian atau penjelasan

tentang makna suatu variabel melalui spesifikasi kegiatan, implementasi, atau pelaksanaan tertentu yang diperlukan untuk mengukur, mengklasifikasikan, atau mengendalikan variabel tersebut. Definisi operasional memberikan informasi kepada pembaca laporan penelitian mengenai langkah-langkah yang harus diambil untuk menjawab pertanyaan penelitian atau menguji hipotesis yang diajukan (Sutama, 2016). Berikut adalah definisi operasional dari penelitian ini:

Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel Bebas (*Independent*)					
Penentuan Fase Gerak	Suatu tindakan dalam membandingkan komposisi dan volume eluen terbaik sehingga diperoleh hasil pemisahan yang maksimal	KLT-Densitometri	Mencampur fase gerak sesuai dengan perbandingan volume. Kemudian menjenuhkan fase gerak didalam *chamber* dan memasukkan lempeng KLT yang sudah ditotolkan larutan standar dan larutan sampel ke dalam *chamber*. Setelah itu melihat hasilnya di sinar UV 254 nm	Satuan hasil berupa perbandingan komposisi dan volume (mL)	Ratio
Penentuan Konsentrasi	Suatu tindakan dalam memperkirakan kandungan alkaloid total dalam sampel biji kopi robusta (*Coffea canephora*)	KLT-Densitometri	Membuat larutan stok kafein 5000 ppm yang kemudian diencerkan menjadi 500, 1000, 1250, 1500 dan 2000 ppm.	Satuan hasil dalam ppm	Ratio

			Kemudian larutan ini ditotolkan pada lempeng KLT dan memasukkan ke dalam *chamber*. Setelah itu melakukan *scanning* menggunakan densitometer	
Penentuan Panjang Gelombang Optimum	Suatu tindakan dalam memberikan kepekaan dalam sampel biji kopi robusta (*Coffea canephora*)	KLT-Densitometri	Penentuan panjang gelombang ini menggunakan larutan standar kafein dengan 5 konsentrasi yang berbeda, yaitu 500, 1000, 1250, 1500 dan 2000 ppm yang melakukan *scanning* menggunakan densitometer	Satuan hasil Ratio dalam nm
Variabel Terikat (*Dependent*)				
Nilai R_f	Suatu pemisahan dalam menentukan adanya perbedaan senyawa dalam ekstrak biji kopi robusta *(Coffea canephora*	KLT Densitometri	Menotolkan larutan standar kafein dan sampel pada lempeng KLT menggunakan alat penotol yaitu mikropipet. Kemudian mengelusi lempeng KLT pada *chamber* dan melakukan *scanning* dengan densitometer	Nilai R_f Ratio (0,2-0,8)
Nilai % kadar alkaloid total	Suatu perhitungan dalam menetapkan jumlah alkaloid total dari ekstrak etanol biji kopi robusta	KLT-Densitometri	Menotolkan larutan standar kafein dan sampel pada lempeng KLT menggunakan alat penotol yaitu mikropipet. Mengelusi lempeng KLT	% kadar alkaloid total Ratio

	(Coffea canephora	pada *chamber* dan melakukan *scanning* dengan densitometer.

4.7 Teknik Pengumpulan Data

4.7.1 Pengambilan Sampel

Sampel biji kopi robusta *(Coffea canephora)* diperoleh dari Pusat Penelitan Kopi dan Kakao Jenggawah, Jember.

4.7.2 Determinasi Tanaman

Tujuan dari determinasi biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang dilaksanakan di Politeknik Negeri Jember adalah untuk memastikan keaslian tanaman yang digunakan dalam penelitian. Proses ini penting untuk mencegah adanya kesalahan dalam pengumpulan bahan serta potensi campur tangan bahan dari tanaman lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian (Klau & Hesturini, 2021).

4.7.3 Ekstraksi Maserasi

Metode yang dipakai dalam proses pembuatan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) adalah metode maserasi. Perbandingan yang diterapkan dalam pengolahan ekstrak ini adalah 1:10, yang berarti digunakan 200 gram serbuk biji kopi robusta (*Coffea canephora*) untuk diolah dengan 2000 mL etanol 96%. Proses ekstraksi dilakukan selama 7 hari dengan pengadukan sebanyak 1 kali sehari selama 5 menit. Hasil yang didapatkan dari ekstraksi kemudian dipekatkan dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C (Wardaningrum, 2020).

4.7.4 Optimasi Kondisi Analisis KLT Densitometri

1) Penentuan Fase Gerak

Optimasi fase gerak dilakukan berdasarkan referensi dari penelitian sebelumnya:

(1) Fase gerak n-heksana : etil asetat : etanol (30:2:1) v/v (Maulana, 2018).

(2) Fase gerak etil asetat : metanol (2:1) v/v (Laily, 2016).

(3) Fase gerak $CHCl_3$: etanol (96:4) v/v (Budiman *et al*, 2014).

Fase gerak dicampur sesuai dengan perbandingan volume yang sudah di optimasi dengan mengacu pada penelitian sebelumnya. Kemudian menjenuhkan fase gerak di dalam *chamber* dan memasukkan lempeng KLT yang sudah ditotolkan larutan standar dan larutan sampel ke dalam *chamber*. Apabila fase gerak sudah sampai batas atas lempeng segera diambil dan dilihat di sinar UV 254 nm.

2) Penentuan Konsentrasi Larutan Standar

Konsentrasi uji yang dipilih adalah 500, 1000, 1250, 1500, 2000 ppm. Pemilihan ini untuk memudahkan preparasi sampel karena dibutuhkan tingkat konsentrasi yang cukup tinggi untuk optimasi. Sebelum membuat larutan standar kafein, larutan stok kafein disiapkan terlebih dahulu dengan cara menimbang 125 mg kafein kemudian dilarutkan dengan klorofom sampai tanda batas pada labu ukur 25 mL sehingga didapatkan konsentrasi larutan stok kafein 5000 ppm. Lalu larutan standar kafein dibuat dengan menggunakan pipet, diambil larutan stok kafein sebanyak 0,5 mL, 1 mL, 2,5 mL, 1,5 mL,

dan 2 mL. Kemudian, kloroform ditambahkan ke dalam larutan tersebut sampai tanda batas pada labu ukur 5 mL dan 10 mL pada larutan standar 1250 ppm, sehingga akan mendapatkan konsentrasi 500, 1000, 1250, 1500, dan 2000 ppm. Kemudian larutan ini ditotolkan pada lempeng KLT dan memasukkan ke dalam *chamber*, setelah itu dilakukan *scanning* menggunakan densitometer (Adelima, 2016).

3) Penentuan Panjang Gelombang Optimum

Pada penelitian ini menggunakan panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang ini ditentukan berdasarkan serapan maksimumnya yaitu 275 nm. Penentuan panjang gelombang ini menggunakan larutan standar kafein dengan 5 konsentrasi yang berbeda, yaitu 500, 1000, 1250, 1500 dan 2000 ppm yang kemudian dilakukan *scanning* menggunakan densitometer (Nofriyelli, 2018).

4.7.5 Penetapan Kadar Alkaloid Total Menggunakan KLT-Densitometri

1) Aktivasi Lempeng KLT Silika Gel 60 F_{254}

Aktivasi lempeng KLT dilakukan menggunakan lempeng silika gel 60 F254 berukuran 20x20 cm yang telah disiapkan. Lempeng tersebut kemudian dipotong menjadi ukuran 10x10 cm. Setelah itu, lempeng dicuci menggunakan metanol. Selanjutnya, lempeng KLT diaktifkan dengan memanaskannya dalam oven pada suhu 110^{o}C dengan waktu 30 menit (Rosamah, 2019).

2) Penjenuhan *Chamber*

Pada penjenuhan *chamber,* fase gerak yang akan digunakan dituangkan ke dasar *chamber*. Kemudian, masukkan kertas saring ke dalam fase gerak. *Chamber* selanjutnya ditutup dan fase gerak dibiarkan menguap hingga membasahi kertas saring. Waktu yang diperlukan sekitar 1 jam atau hingga fase gerak mencapai tujuh perdelapan tinggi kertas saring (Farmakope Indonesia V, 2014).

3) Pembuatan Larutan Sampel

Larutan sampel dibuat dengan cara menimbang ekstrak kental etanol 96% biji kopi robusta *(Coffea canephora)* sebanyak 10 mg lalu dimasukkan ke labu ukur 5 mL kemudian dilarutkan menggunakan sedikit etanol 96%, hingga tanda batas, selanjutnya dilakukan 3 replikasi (Farmakope Herbal Indonesia Edisi II, 2017).

4) Penentuan Nilai R_f

Definisi Rf adalah perbandingan antara jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik awal pemisahan dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik awal. Berdasarkan nilai R_f akan menunjukkan berbagai sifat senyawa dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa (Forestryana & Arnida, 2020). Nilai R_f yang optimal yaitu berada pada rentang 0,2-0,8 (Husa & Mita, 2020).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

5) Penentuan Kurva Baku

Larutan standar kafein konsentrasi 500, 1000, 1250, 1500, 2000 ppm, dan 3 kali pengulangan larutan sampel diaplikasikan menggunakan mikropipet berukuran 20 µL sebanyak 20 µL pada lempeng KLT yang telah diaktifkan selama kurang lebih setengah jam. Penotolan dilakukan pada lempeng KLT dengan ukuran 10 x 10 yang sudah diberi tanda batas atas dan bawah sepanjang 1 cm serta jarak antar totolan sepanjang 1 cm sebelum dilakukan penotolan (Agustin, 2022).

6) Analisa Kadar Alkaloid Total Dalam Sampel

Regresi linier dapat dihitung menggunakan data luas area yang diperoleh dari densitometer. Hasil dari persamaan regresi linier dapat dipakai untuk menghitung massa dalam sampel, kadar total alkaloid, selanjutnya dihitung persentase kadar alkaloid total menggunakan rumus: (Alzanado *et al*, 2022).

$$\text{Kadar Alkaloid Total} = \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$$

$$\%\ \text{Kadar Alkaloid Total} = \text{Kadar alkaloid total x } 100\%$$

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Data Umum

5.1.1 Determinasi Tanaman Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora)*

Hasil determinasi yang dilakukan di Politeknik Negeri Jember menunjukkan bahwa bahan yang digunakan adalah biji dari tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) dan hasil dapat dilihat pada lampiran 1.

5.1.2 Ekstraksi Maserasi

Dari proses ekstraksi maserasi yang telah dilakukan pada sampel biji kopi robusta *(Coffea canephora)* mendapatkan hasil seperti pada Tabel 5.1:

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta *(Coffea canephora)*

Hasil Ekstrak Kering	Hasil Penimbangan
Berat serbuk awal	200 gram
Berat botol + ekstrak	37,86 gram
Berat botol kosong	13,21 gram
Berat ekstrak	24,65gram
% Rendemen	12,32%

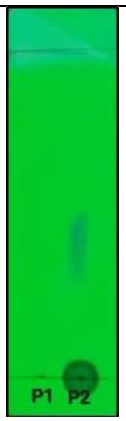
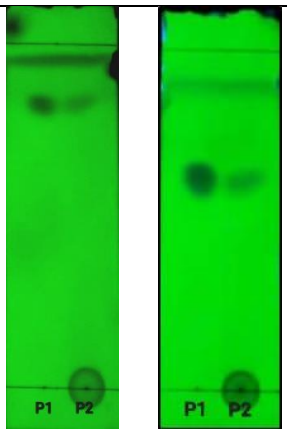
5.2 Data Khusus

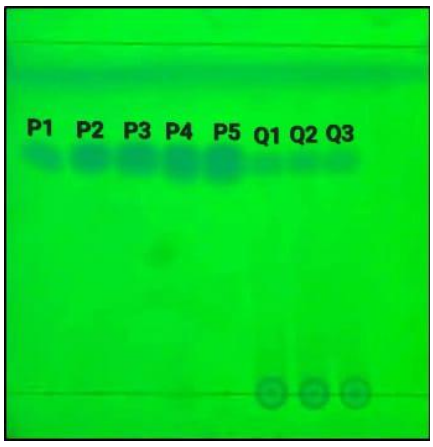
5.2.1 Optimasi Kondisi Analisis Kadar Alkaloid Total

1) Optimasi Fase Gerak

Pada penelitian ini optimasi fase gerak dilakukan dengan berbagai jenis campuran pelarut dan perbandingan volume yang berbeda. Hasil optimasi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 5.2

Tabel 5.2 Optimasi Fase Gerak

	I	II	III	IV
Jenis Fase Gerak	n-heksan:etil asetat:etanol (30:2:1) v/v	Etil asetat:metanol (2:1) v/v	Klorofom:etanol (96:4) v/v	Klorofom:etanol (95:5) v/v
Gambar				
Keterangan	1) P1= Standar kafein 1000 ppm 2) P2= Sampel 1000 ppm	1) P1= Standar kafein 1000 pm 2) P2= Sampel 1000 ppm	1) P1= Standar kafein 1000 ppm 2) P2= Sampel 1000 ppm	1) P1= Standar kafein 1000 ppm 2) P2= Sampel 1000 ppm 3) P1= Standar kafein 2000 ppm 4) P2= Sampel 2000 ppm
Hasil	Noda pada lempeng tidak tampak	Noda tidak sejajar dan tidak memisah dengan sempurna	Noda tidak sejajar dan tidak nampak	Noda nampak dan sejajar



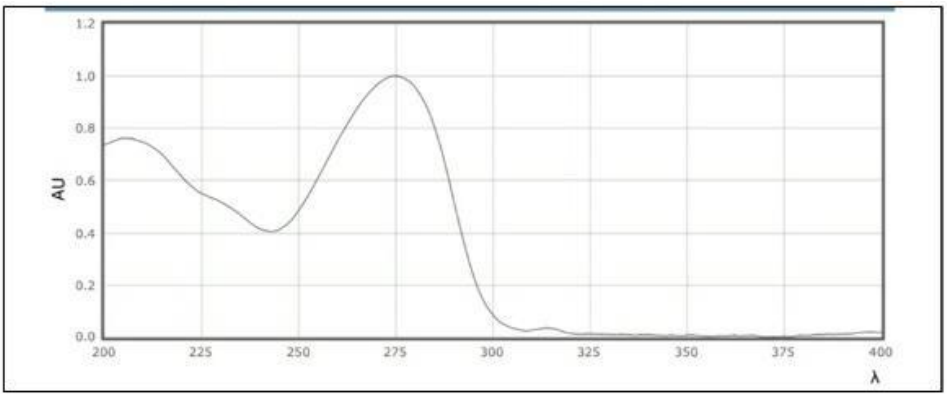
Gambar 5.1 Fase gerak klorofom:etanol (95:5) v/v

Pada fase gerak klorofom : etanol (95:5) v/v diperoleh hasil noda yang sejajar dan memisah secara sempurna serta sesuai dengan rentang nilai R_f yaitu 0,2-0,8. Keterangan Gambar 5.1 sebagai berikut:

1) P1-P5= Standar kafein dengan konsentrasi 500 ppm (P1), 1000 ppm (P2), 1250 ppm (P3), 1500 ppm (P4) , dan 2000 ppm (P5)
2) Q1-Q3= Sampel biji kopi robusta *(Coffea canephora)* 3 kali replikasi dengan konsentrasi 2000 ppm

2) Optimasi Panjang Gelombang

Pada penelitian ini untuk mengetahui panjang gelombang optimum dilakukan dengan memeriksa pembacaan pada rentang panjang gelombang 200-400 nm terlebih dahulu. Setelah itu, dilakukan pengukuran pada spektrum dan identifikasi panjang gelombang maksimumnya. Kemudian diperoleh panjang gelombang optimum yaitu 275 nm. Hasil optimasi panjang gelombang dapat dilihat pada gambar 5.2



Gambar 5.2 Panjang Gelombang Optimum (275 nm)

Panjang gelombang yang dipilih karena ada korelasi antara panjang gelombang (x) dan luas area (y) menunjukkan puncak paling tinggi yaitu 275 nm, sehingga panjang gelombang optimum yang digunakan adalah 275 nm.

Tabel 5.3 Data Korelasi Spektrum

Vial	R_f	Korelasi
Standar 1 (500 ppm)	0.768	0.997236
Standar 2 (1000 ppm)	0.771	0.997236
Standar 3 (1250 ppm)	0.777	0,999958
Standar 4 (1500 ppm)	0.789	0,999930
Standar 5 (2000 ppm)	0.793	0,999641
Replikasi 1 (2000 ppm)	0.769	0,998933
Replikasi 2 (2000 ppm)	0.755	0,997696
Replikasi 3 (2000 ppm)	0.752	0,996434

3) Optimasi Konsentrasi Larutan Standar dan Larutan Sampel

Optimasi konsentrasi larutan standar pada penelitian ini adalah 500, 1000, 1250, 1500, dan 2000 ppm dengan volume penotolan 20 µl dan konsentrasi sampel dengan 3 replikasi menggunakan 2000 ppm dengan volume penotolan 20 µl. Konsentrasi yang dipilih dimaksudkan untuk mendapatkan nilai R_f yang tepat dan memastikan bahwa rentang antara konsentrasi tidak terlalu sempit dengan standar.

5.2.2 Penetapan Kadar Alkaloid Total

1) Hasil Nilai R_f

Dalam penelitian ini menerapkan 5 seri standar dengan 3 kali pengulangan (replikasi) sampel yaitu 2000 ppm, 2000 ppm, 2000 ppm. Kemudian dielusi menggunakan fase gerak klorofom:etanol (95:5) v/v.

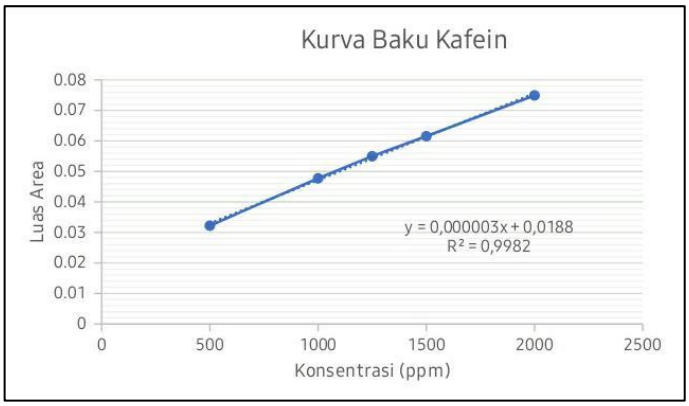
Hasil yang diperoleh berdasarkan pengukuran nilai R_f tersebut, dapat dilihat pada tabel 5.4:

Tabel 5.4 Data Nilai Area dan Nilai R_f

Vial	Luas Area	R_f
Standar 1 (500 ppm)	0,03222	0,768
Standar 2 (1000 ppm)	0,04773	0,771
Standar 3 (1250 ppm)	0,05498	0,777
Standar 4 (1500 ppm)	0,06153	0,789
Standar 5 (2000 ppm)	0,07493	0,793
Sampel Replikasi 1 (2000 ppm)	0,03253	0,769
Sampel Replikasi 2 (2000 ppm)	0,03289	0,755
Sampel Replikasi 3 (2000 ppm)	0,03316	0,752

2) Hasil Kurva Baku

Dalam penelitian ini, digunakan 5 seri standar dengan variasi konsentrasi, yakni 500 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm, 1500 ppm, dan 2000 ppm. Berdasarkan data pengukuran tersebut, telah diperoleh hasil regresi linier yang tampil dalam gambar 5.3:



Gambar 5.3 Kurva Baku Kafein

3) Hasil Penetapan Kadar Alkaloid

Pada penelitian ini didapatkan hasil nilai kadar alkaloid jumlah keseluruhan alkaloid pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) diukur. Hasil penentuan kadar total alkaloid pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terdapat dalam tabel 5.5 berikut ini:

Tabel 5.5 Hasil Perhitungan Kadar Alkaloid Total

Konsentrasi	**Luas Area**	**X (mg)**	**% Kadar Alkaloid Total (b/b)**	**Rata-rata % Kadar Alkaloid (b/b)**	**RSD**
Replikasi 1 (2000 ppm)	0,03253	0,0045766	11,440 %	11,713% ±0,005	4,87 %
Replikasi 2 (2000 ppm)	0,03289	0,0046966	11,740 %		
Replikasi 3 (2000 ppm)	0,03316	0,0047866	11,960 %		

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Determinasi dan Ekstraksi Sampel Biji Kopi Robusta *(Coffea canephora)*

6.1.1 Determinasi Tanaman Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Pengidentifikasian tanaman dalam biji kopi robusta (*Coffea canephora*) bertujuan untuk mengetahui suku serta jenis dari biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Determinasi tanaman merupakan tahap awal yang dilakukan sebelum menuju ke tahap selanjutnya pada proses penelitian. Hasil determinasi biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang dilakukan di Politeknik Negeri Jember menyatakan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian biji dari tanaman kopi robusta (Coffea canephora). Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

6.1.2 Pengambilan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dan Ekstraksi Maserasi

1) Pengambilan biji kopi robusta (*Coffea canephora*)

Sampel tanaman biji kopi robusta (*Coffea canephora*) diperoleh di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, Jember. Pengambilan kopi harus dalam keadaan masak penuh untuk mendapatkan hasil yang bermutu tinggi. Pada kopi robusta diperlukan waktu 8 hingga 11 bulan (Firdaus, 2022).

2) Ekstraksi Maserasi

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada senyawa metabolit aktif yang akan diambil atau disarikan. Maserasi merupakan metode

sederhana yang dikerjakan dengan merendam simplisia dalam campuran pelarut selama waktu tertentu pada suhu ruang serta terhindar dari cahaya (Marjoni, 2016). Maserasi merupakan metode ekstraksi secara dingin untuk mengekstrak senyawa tanpa merusak komponen kimia yang tidak tahan panas (Putra, 2016).Senyawa metabolit pada penelitian ini adalah akaloid. Alkaloid memiliki sifat tidak tahan terhadap panas (Puspitasari, 2018).

Pelarut yang digunakan dalam proses maserasi dipilih berdasarkan efektivitasnya dalam melarutkan senyawa-senyawa dari bahan alam yang akan diekstraksi. Dalam penelitian ini, etanol dipilih sebagai pelarut karena memiliki kemampuan untuk mengekstrak senyawa-senyawa aktif dengan berbagai tingkat polaritas, mulai dari yang tidak polar hingga polar, seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid (Wahyuni & Marpaung, 2020). Pemilihan etanol 96% sebagai pelarut didasarkan pada kemampuannya yang lebih baik dalam meresap ke dalam dinding sel sampel dibandingkan dengan etanol berkonsentrasi lebih rendah (Trifani, 2012).

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara menimbang 200 gram sampel biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dan direndam menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 2000 mL etanol selama 7 hari. Selama proses ekstraksi dilakukan pengadukan yang bertujuan untuk menyeimbangkan konsentrasi bahan ekstraksi di dalam cairan. Setelah di ekstraksi selama 7 hari maka akan dilakukan penyaringan. Kemudian hasil penyaringan

akan di *waterbath* dengan suhu 50ºC dengan tujuan untuk menguapkan pelarut yang tersisa pada ekstrak sekaligus memekatkan ekstrak (Wardaningrum, 2020) . Pemilihan suhu 50ºC dikarenakan titik didih etanol yaitu 78ºC sehingga lebih mudah menguap daripada air (Fahmi *et al*, 2014). Setelah di *waterbath* akan didapatkan ekstrak kental yang nantinya akan dihitung persen rendemen dari ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*).

Penentuan rendemen memiliki tujuan agar mengetahui kadar senyawa yang terlarut dalam pelarut. Rendemen merupakan nilai perbandingan antara berat kering produk yang dihasilkan dan berat bahan baku. Perhitungan rendemen dilakukan dengan membagi berat akhir produk dengan berat awal bahan baku, lalu hasilnya dikalikan 100%. (Sari, 2021). Pada penelitian ini didapatkan hasil rendemen yaitu 12,32%. Rendemen dikatakan baik apabila nilainya jika lebih dari 10% (Wardaningrum, 2019). Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan oleh Walid & Putri (2023) diperoleh hasil rendemen ekstrak kental pada biji kopi robusta *(Coffea canephora)* sebesar 12,59% dengan berat serbuk simplisia 500 gram.

6.2 Optimasi Kondisi Analisis Alkaloid Total

Analisis pemeriksaan secara kualitatif dilaksanakan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) karena metode ini relatif mudah dan sederhana, serta tidak memerlukan jumlah pelarut dan sampel yang besar. Tujuan dari identifikasi kualitatif ini adalah untuk menentukan keberadaan

alkaloid dalam sampel biji kopi robusta (*Coffea canephora*) berdasarkan nilai R_f. Fase diam yang digunakan merupakan silika gel F_{254} nm yang relatif besifat polar. Sebelum lempeng KLT digunakan, lempeng terlebih dahulu dicuci menggunakan metanol selanjutnya di aktivasi menggunakan oven pada suhu 110ºC dengan waktu 30 menit. Tujuan dari aktivasi lempeng adalah untuk menghilangkan pelarut sisa pencucian dan mengaktifkan gugus silanol dan siloksan pada lempeng (Dewi *et al*, 2018).

Standar yang digunakan pada penelitian ini adalah kafein murni. Pemilihan kafein karena merupakan senyawa alkaloid golongan xantina berbentuk kristal dan berasa pahit yang Untuk memenuhi kriteria sebagai standar, suatu senyawa harus bersifat murni atau tunggal, yang berarti senyawa tersebut hanya mengandung satu jenis zat dan memiliki struktur yang identik dengan senyawa yang sedang diuji (Maramis *et al*, 2013).

Dari pemaparan diatas, dilakukan beberapa rangkaian optimasi pada analisis penelitian, diantaranya:

6.2.1 Optimasi Penentuan Fase Gerak

Optimasi dalam penentuan fase gerak bertujuan untuk mencari perbandingan komposisi volume eluen yang optimal guna mencapai hasil pemisahan yang paling efektif. Hasil dari optimasi fase gerak yang dihasilkan pada penelitian ini adalah klorofom:etanol (95:5) v/v. Perbandingan komposisi sangat mempengaruhi hasil dari pemisahan, alkaloid merupakan senyawa polar yang apabila dielusi dengan fase gerak non polar akan menghasilkan noda yang baik. Oleh karena itu, dipilih komposisi klorofom lebih besar daripada etanol

dimana nantinya agar lebih besar interaksinya dengan senyawa alkaloid, sehingga proses pemisahan pada lempeng KLT akan lebih mudah tampak. Penggunaan konsentrasi 2000 ppm dikarenakan pada konsentrasi 1000 ppm didapatkan noda yang sudah sejajar namun masih terlalu dekat dengan batas atas dan terlalu jauh dengan titik awal penotolan. Pemisahan antara standar dan sampel yang baik yaitu tidak melebihi batas atas dan tidak terlalu dekat dengan titik bawah atau penotolan (Maulana, 2018).

Optimasi ini menggunakan *chamber* yang sebelum digunakan akan dijenuhkan terlebih dahulu. Penjenuhan *chamber* dilakukan dengan meletakan fase gerak dan kertas saring ke dalam *chamber*, dan bagian bawah dari kertas saring harus tercelup dalam fase gerak. Kertas saring didiamkan beberapa waktu hingga fase gerak naik membasahi kertas saring. Penjenuhan chamber dilakukan dengan tujuan untuk mengimbangi tekanan uap dari fase gerak yang digunakan, sehingga proses pemisahan dapat berlangsung dengan efektif dan konsisten. Pada saat fase gerak naik maka noda pada lempeng juga akan naik. Pengamatan noda pada lempeng dilakukan dengan sinar UV 254 nm dimana sampel akan berwarna gelap (Dewi *et al*, 2018). Hasil optimasi fase gerak pada penelitian ini adalah klorofom : etanol dengan perbandingan 95:5 v/v. Nilai R_f yang masuk rentang adalah 0,2-0,8 (Husa & Mita, 2020). Hasil nilai R_f pada penelitian ini yaitu dengan R_f rata-rata 0,771, sehingga fase gerak ini baik digunakan pada penelitian ini. Pada penelitian yang dilakukan oleh Ferdinan *et al* (2021) dengan sampel yang berbeda yaitu daun pandan hutan jenis baru *(Freycinetia Sessiliflora Rizki)* tetapi dengan metode yang sama didapatkan

nilai R_f rata-rata yaitu 0,4. Pada penelitian sebelumnya menggunkan sampel yang sama tetapi dengan metode yang berbeda yaitu menggunakan metode HPLC didapatkan R_f rata-rata 0,57 (Sari *et al*, 2019).

6.2.2 Optimasi Panjang Gelombang Optimum

Pemilihan panjang gelombang yang optimal memiliki dampak yang signifikan dalam penelitian ini, karena optimasi pada panjang gelombang tersebut bertujuan untuk mencapai hasil yang paling baik atau optimal untuk mengetahui daerah serapan yang dapat yang dapat dihasilkan nilai absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi larutan adalah yang paling besar (Sukmawati *et al*, 2018). Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan cara membuat 5 seri konsentrasi , yaitu konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm, 1500 ppm, dan 2000 ppm. Penggunaan 5 seri konsentrasi ini bertujuan untuk mengetahui bahwa semua konsentrasi pada seri baku kafein dihasilkan spektrum serapan maksimum yang sama. Panjang gelombang optimum yang diperoleh dari hasil *scanning* yang dilakukan pada rentang 200-400 nm adalah 275 nm, artinya panjang gelombang larutan standar maupun sampel memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang didapat 275 nm. Pada penelitian yang dilakukan oleh Milanda (2021) menggunakan instrumen yang sama yaitu KLT-Densitometri didapatkan panjang gelombang 275 nm.

Pada Densitometer senyawa yang dianalisis adalah yang memiliki gugus kromofor dan auksokrom. Berdasarkan struktur alkaloid yang diuji memiliki gugus kromofor sehingga penyerapan pada sinar UV dengan Panjang gelombang 275 nm dilakukan oleh gugus ini. Hasil penelitian ini didapatkan

Panjang gelombang optimum dari 5 seri konsentrasi yaitu 275 nm dimana artinya pada Panjang gelombang ini menghasilkan sensitivitas pengukuran yang baik (Suartati, 2017).

Hasil rata-rata korelasi yang didapat dari analisis spektrum adalah 0,998383. Koefisien korelasi digunakan untuk menjelaskan hubungan antara variabel, koefesien korelasi berkisar -1 hingga 1. Apabila nilainya mendekati -1 maka hubungan berbanding terbalik atau lemah. Apabila nilai korelasi mendekati 1 maka hubungan berbanding lurus atau kuat (Alvionita, 2017).

6.2.3 Optimasi Penentuan Konsentrasi Larutan Standar dan Larutan Sampel

Optimasi konsentrasi larutan standar memiliki tujuan agar mendapatkan hasil yang dapat memperkirakan kandungan alkaloid dalam sampel biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Optimasi uji dibuat dengan menggunakan 5 seri konsentrasi standar kafein. Hasil optimasi konsentrasi standar kafein yang diperoleh adalah 500 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm, 1500 ppm, dan 2000 ppm serta 3 replikasi konsentrasi sampel yang digunakan yaitu 2000 ppm. Replikasi dilakukan dengan tujuan memeriksa atau mengukuhkan kebenaran hasil dalam penelitian (Abubakar, 2021). Penentuan konsentrasi uji didasarkan pada hasil optimasi eluen, dimana hasil tersebut memberikan perkiraan mengenai kandungan alkaloid dalam ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*). 5 seri konsentrasi standar kafein sudah sesuai karena luas area dari 3 replikasi sampel sudah masuk rentang luas area standar kafein. Hal ini menunjukkan bahwa

didalam sampel biji kopi robusta (*Coffea canephora*) mengandung kadar alkaloid.

Konsentrasi standar kafein pada penelitian sebelumnya menggunakan konsentrasi larutan standar yang berbeda yaitu 400, 600, 800, 1000, dan 1400 ppm (Milanda, 2021). Hal ini karena pada penelitian ini luas area yang diperoleh sampel cukup tinggi sehingga perlu meningkatkan konsentrasi larutan standar agar luas area dari sampel masuk dalam rentang luas area setandar kafein

Pada penelitian ini menggunakan konsentrasi sampel 2000 ppm karena noda pada plat KLT sejajar dengan noda standar kafein. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Agustin (2022) menggunakan konsentrasi sampel yaitu 5000 ppm.

Pembuatan sampel uji dibuat dengan cara menimbang sejumlah tertentu ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) kemudian larutan sampel diencerkan dalam etanol 96%, sementara untuk pembuatan larutan standar, kafein dilarutkan dalam kloroform. Setelah itu, larutan standar dan sampel diaplikasikan ke lempeng KLT dan dilakukan proses eluasi dalam chamber menggunakan eluen dan panjang gelombang yang telah dioptimasi..

6.3 Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Penetapan kadar memiliki tujuan agar melihat kadar senyawa alkaloid total yang ada pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan metode KLT-Densitometri. Alasan pemilihan metode ini karena pada KLT

membutuhkan waktu yang cepat dalam pemisahan dengan hasil yang baik, serta KLT dapat digunakan untuk penetapan kadar salah satunya adalah kadar alkaloid (Wulandari, 2011).

Pada penelitian ini menggunakan 5 seri konsentrasi standar kafein yaitu 500, 1000, 1250, 1500, dan 2000 ppm serta sampel dengan 3 kali replikasi dengan konsentrasi 2000 ppm. Setelah membuat larutan standar dan larutan sampel kemudian melakukan penotolan pada lempeng KLT yang sudah diaktivasi sebelumnya menggunakan oven dengan suhu 110ºC selama 30 menit. Tujuan dari aktivasi lempeng adalah untuk menghilangkan pelarut sisa pencucian dan mengaktifkan gugus silanol dan siloksan pada lempeng (Dewi *et al*, 2018). Fase diam yang digunakan merupakan silika gel F_{254} nm yang relatif besifat polar, mengandung silika dengan gipsum sebagai agen pengikat dan indikator fluoresen yang dapat menghasilkan fluorosensi pada panjang gelombang 254 nm karena adanya gugus kromofor pada noda. Gugus kromofor merupakan gugus yang dapat menunjukkan noda yang berwarna gelap. Pembentukan warna dapat diamati dibawah sinar UV (Husna & Mita, 2020). Standar yang digunakan pada penelitian ini adalah kafein murni. Memilih kafein karena merupakan senyawa alkaloid golongan xantina berbentuk kristal dan berasa pahit yang masuk syarat suatu standar adalah murni atau tunggal yaitu hanya mengandung satu jenis senyawa serta strukturnya sama dengan senyawa yang diuji (Maramis *et al*, 2013).

Kemudian melakukan penotolan dengan volume 20 µl untuk larutan standar kafein dan larutan sampel, kemudian lempeng dielusi dengan menggunakan

fase gerak klorofom:etanol (95:5) v/v sedangkan fase diam berupa silika gel F_{254} dan dilakukan pengukuran pada spektrum 200-400 nm. Kemudian mendapat hasil panjang gelombang optimum 275 nm. Kemudian dianalisa dengan camag densitometer.

Penyarian serbuk kopi dilakukan menggunakan proses maserasi. Pemilihan metode maserasi karena prosedur lebih mudah dan peralatan yang sederhana. Pada penyarian ini dilakukan dengan pelarut etanol dikarenakan biji kopi robusta (*Coffea canephora*) mengandung alkaloid yang dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol (Dewatisari, 2020). Ekstrak hasil maserasi berupa ekstrak kental. Ekstrak etanol sudah dilakukan penguapan di *waterbath* menggunakan suhu 50ºC. Fungsi menjaga suhu adalah untuk menjaga stabilitas kandungan kimia. Apabila menggunakan suhu yang terlalu tinggi dikhawatirkan akan merusak kandungan didalam biji kopi robusta (*Coffea canephora*).

Aktivasi lempeng KLT silika gel F_{254} dilakukan menggunakan oven dengan suhu 110ºC selama 30 menit dengan tujuan menghilangkan kelembapan serta kandungan air pada lempeng KLT. Pada penelitian ini menggunakan *chamber* berupa CAMAG *flat botton chamber* yang berukuran 20x20 cm dengan penutup berupa *stainless steel*. Proses penjenuhan *chamber* dilakukan hingga menguap dan fase gerak membasahi kertas saring hingga tujuh perdelapan bagian (Farmakope Indonesia V, 2014).

Hasil analisis kualitatif menggunakan KLT menunjukkan adanya kandungan alkaloid dalam sampel. Langkah selanjutnya adalah melakukan

analisis kuantitatif dengan menggunakan alat pemindai densitometri pada KLT. Pengukuran dilakukan dengan mengukur serapan analit atau cahaya yang dipantulkan atau diteruskan (Estika, 2017).

Konsentrasi dalam penelitian ini, digunakan 5 seri standar dengan variasi konsentrasi, yaitu 500 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm, 1500 ppm, dan 2000 ppm. setelah melakukan serangkaian optimasi. Pembuatan kurva standar ini bertujuan untuk mendapatkan persamaan regresi linear yang nantinya akan digunakan untuk menghitung konsentrasi alkaloid dalam ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Tiap konsentrasi standar diaplikasikan ke lempeng KLT dengan silika gel F_{254}, menggunakan 20 μL, dan kemudian dielusi dengan eluen optimal yaitu campuran kloroform:etanol (95:5) v/v sampai tanda batas, kemudian dianalisis menggunakan densitometer.

Nilai R_f yang optimal yaitu berada pada rentang 0,2-0,8 (Husa & Mita, 2020). Pada penelitian ini nilai R_f telah memenuhi syarat yaitu dengan rata-rata 0,771. 5 seri konsentrasi standar tersebut dielusi menggunakan fase gerak dan fase diam yang sama seperti saat identifikasi kualitatif. Setelah itu, dilakukan pengukuran *Area Under the Curve* (AUC) dari 5 seri konsentrasi standar pada panjang gelombang 275 nm dengan menggunakan *TLC densitometry scanner*, sehingga mendapatkan data kurva baku berupa luas area di bawah kurva (AUC).

Analisa menggunakan densitometer mendapatkan persamaan regresi linier pada penelitian ini yaitu y=0,000003x + 0,0188, dalam rumusan tersebut, variabel x mewakili massa kafein sedangkan variabel y mewakili luas area

yang diperoleh dari densitometri. Dengan menggunakan 5 titik pada gambar kurva kalibrasi, diperoleh sebuah garis linear. Selain pada daerah yang menghasilkan garis linear, daerah tersebut juga digunakan sebagai daerah uji dalam analisis.

Dari hasil pembuatan kurva baku dan analisis regresi linear, diperoleh nilai R^2 sebesar 0,9982, di mana nilai R^2 yang mendekati 1 dianggap sebagai indikator yang baik. Dalam konteks penelitian ini, ditemukan bahwa persamaan regresi linear yang digunakan adalah y=0,000003x + 0,0188.

Dari hasil penelitian ini, ditemukan bahwa kadar pada replikasi 1 adalah 0,1144 mg, pada replikasi 2 adalah 0,1174 mg, dan pada replikasi 3 adalah 0,1196 mg, dengan nilai rata-rata (*mean*) sebesar 0,1171 mg.Nilai SD pada penelitian ini adalah 0,005, dimana nilai ini memenuhi syarat nilai yang baik yaitu kurang dari 2% (Gunawan, 2019). Pada penelitian ini juga didapatkan nilai RSD (*relative standar deviation*) yaitu 4,87%.

Nilai % RSD (*relative standar deviation*) adalah nilai yang menunjukkan ketelitian dari metode uji. Jika nilai RSD kurang dari 1% maka artinya sangat teliti, jika RSD nya 1%-2% artinya teliti, jika RSD nya 5% maka artinya ketelitian sedang dan jika RSD lebih dari 5% artinya tidak teliti (Riyanto, 2014). Pada penelitian ini didapatkan nilai RSD 4,87 %. Hal ini berarti metode yang digunakan memiliki ketelitian sedang. Pada penelitian sebelumnya dengan menggunakan HPLC dihasilkan nilai % RSD sebesar 1,54% yang artinya menggunakan metode HPLC memiliki tingkat ketelitian sangat tinggi, hal ini dikarenakan pada HPLC fase gerak disaring terlebih dahulu dengan

kertas saring sehingga tingkat ketelitiannya tinggi (Suhendi & Ramly, 2021).

Hasil kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta *(coffea canephora)* yang diperoleh yaitu 11,713% dalam 10 mg ekstrak etanol biji kopi robusta *(coffea canephora).* Kadar senyawa alkaloid total yang terkandung lebih tinggi penelitian ini dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Askiana, 2021) dengan menggunakan spektrofotometri UV-VIS yaitu dalam 10 mg ekstrak kopi robusta tunggal mengandung kadar alkaloid total sebesar 2,45%. Perbedaan ini terjadi kemungkinan dari penggunaan metode yang berbeda. Faktor lain dari sampel yang digunakan menjadi penyebab perbedaan kadar kandungan kimia pada biji kopi robusta *(Coffea canephora)*, diantaranya perbedaan tempat dan ketinggian.

Faktor ketinggian tanah juga menjadi faktor perbedaan kadar kimia pada biji kopi robusta *(Coffea canephora).* Syarat tumbuh yang baik pada biji kopi robusta berada pada ketinggian 400-700 mdpl. Sampel penelitian yang peneliti lakukan menggunakan sampel biji kopi robusta *(Coffea canephora)* yang berasal dari Puslitkoka Jember yang ditanam diketinggian 400 mdpl dengan % kadar alkaloid total sebesar 11,713%, sedangkan pada penelitian sebelumnya menggunakan sampel biji kopi robusta *(Coffea canephora)* tunggal *(Peabery)* yang didapat dari Pagar Alam Palembang yang memiliki ketinggian 1000 mdpl dengan % kadar alkaloid sebesar 2,45% (Askiana, 2021).

Hasil nilai regresi yang diperoleh dari persamaan baku mencapai syarat yang baik karena mendekati nilai 1, yakni 0,9982. Dalam perhitungan, simpangan baku (SD) dari tiga kali pengulangan data yang diambil dari sampel

biji kopi robusta (Coffea canephora) adalah sebesar 0,0057. Selanjutnya, hasil nilai simpangan baku relatif (RSD) adalah 4,87%, yang menunjukkan tingkat presisi keterulangan (reproducibility) yang memadai, yaitu kurang dari 5%.

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian yang sudah dilakukan, yaitu:

1. Fase gerak yang dapat digunakan untuk analisis penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan KLT-Densitometri adalah kloroform : etanol (95:5) v/v.
2. Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan KLT-Densitometri adalah panjang gelombang 275 nm.
3. Konsentrasi yang digunakan untuk analisis penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan KLT-Densitometri adalah konsentrasi standar 500, 1000, 1250, 1500, dan 2000 ppm serta konsentrasi sampel 2000 ppm.
4. Hasil kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kopi robusta *(Coffea canephora)* menggunakan KLT-Densitometri adalah 11,713 % b/b per 10 mg sampel.

7.2 Saran

Saran yang dapat diambil dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bagi Peneliti

   Penelitian selanjutnya disarankan melakukan penelitian mengenai penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora)* menggunakan KLT-Densitometri dengan kondisi optimasi

yang berbeda.

2. Bagi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao

   Disarankan melakukan pelatian dalam pengelolaan sampel kopirobusta yang akan digunakan sebagai sampel penelitian.

3. Bagi Institusi Pendidikan

   Disarankan untuk memperbanyak literatur seperti seminar atau makalah tentang penetapan kadar biji kopi robusta sehingga mahasiswa dapat lebih memahami tentang penetapan kadar pada biji kopi robusta

DAFTAR PUSTAKA

Abubakar, R. 2021. Pengantar Metodologi Penelitian.Farmasi (144).Suk-press

Adelima, S., Darmawati, A., Sudjarwo. 2016. Validasi Metode KLT-Densitometri Untuk Penetapan Kadar Kuarsetin Dalam Sediaan Sirup Daun Sirsak (*Annona muricita Linn*). Berkala Ilmia Kimia Farmasi. 5 (2). 15-19

Agustin,F.A. 2022. Skrining Dan Analisis Klt-Densitometri Untuk Penetapan Kadar Flavonoid Total Pada Fraksi Etil Asetat Daun Afrika *(Vernonia amygdalina*)

Alasa, A. N., Anam, S., & Jamaluddin. 2017. Analisis Kadar Total Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Daun Tamoenju (*Hibiscus surattensis L.) [Analyze Total Level of Secondary Metabolites from Ethanol Extracts of "Tamoenju" Leaves (Hibiscus Surattensis L.)]. Kovalen*, *3*(3), 258–268.

Aljamali,N.M. Thamer, Redha. (2015). *Choosing A Solvent System In Tests Of (TLC)-Technique. International Tecnology and Innovation Research Journl..Vol 1*

Alzanado, R. Yusuf. M., & Tutik . 2022. Analisis Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Bunga Pepaya (*Carica papaya L.*) Secara Spektofotometri UV-Vis. Farmasi Malahayari, 5 (1), 100-120- https://librepo.stikesnas.ac.id/40/

Amiliyah, R., Sumono, A., & Hidayati, L. 2015. Deformasi Plastis Nylon Thermoplastic Setelah Direndam Dalam Ekstrak Biji Kopi Robusta. *Jurnal Pustaka Kesehatan*, *117*(1), 117–121.Ii, B. A. B., Pustaka, T., & Terdahulu, A. H. P. 2021. *Bab ii. tinjauan pustaka*. *2019*, 4–25.

Anshori, M. F. 2014. Analisis Keragaman Morfologi Koleksi Tanaman Kopi Arabika dan Robusta. *Skripsi*, *December*.

Anindya, A., Setiaji, S. and Nuryadi, B. 2020. 'Daya Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Semendo (*Coffea canephora*) Terhadap Pertumbuhan *Bakteri Porphyromonas ingivalis'. Available at: https://repository.unsri.ac.id/35310/.*

Aprilia, F. R., Ayuliansari, Y., Putri, T., Azis, M. Y., Camelina, W. D., & Putra, M. R. 2018. Analysis of the Caffeine Concentration Contained in Traditional Coffee (Kopi Gayo and Kopi Lombok) Using UV/Vis Spectrophotometry and HPLC. *Biotika Jurnal Ilmiah Biologi*, *16*(2), 40.

Asti, S.,P. 2015. Pengaruh Ekstrak Biji Kopi Robusta *Terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Monosit (Penelitian Eksperimental Laboratoris In-vitro).*

Askiana, H. 2021. Uji Kadar Alkaloid dan Kadar Flavonoid Pada Seduhan Biji Kopi Robusta *(Coffea canephora)* Tunggal *(Peaberry)* Greeen Bean Dari Pagar Alam Dengan Metode SpektrofotometriUV-VIS.

Ardianti, A., & Kusnadi, J. 2014. Ekstraksi Antibakteri Dari Daun Berenuk (Crescentia cujete Linn.) Menggunakan Metode Ultrasonik. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, *2*(2), 28–35.

Budiman, H., Rahmawati, F., & Sanjaya, F. 2014. Isolasi dan Identifikasi Alkoloid pada Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta Lindl. Ex De Will*) dengan Cara Kromatografi Lapis Tipis. *Cerata Jurnal Ilmu Farmasi (Journal of Pharmacy Science)*, *1*(1), 54–64.

http://ejournal.stikesmukla.ac.id/index.php/cerata/article/view/11/7
Chamidah, S. 2012. *(Coffea canephora) Terhadap Pertumbuhan Porphyromonas gingivalis*.
Chairunnisa, S., Wartini, N. M., & Suhendra, L. 2019. Pengaruh Suhu dan Waktu Maserasi terhadap Karakteristik Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana L.*) sebagai Sumber Saponin. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, *7*(4), 551. https://doi.org/10.24843/jrma.2019.v07.i04.p07
D., Juniarti, N., Mulya, O. L. A., Istiqamah, N. U. R., Amelia, R., Biologi, J., Matematika, F., Ilmu, D. A. N., Alam, P., & Makassar, U. N. 2016. *" Alkaloid ."*
Extraction, M. A., & Extraction, M. A. 2018. *Antidengue, Anticancer, Antimicrobial, Antiparasitic, Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antidiabetic Activities* . *1*(2), 66–73.
Estetika, D. 2017. Validasi Metode Analisis Metoprorol Dalam Urin Manusia Secara Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri. 53(9),7-10
Fahmi, D., Susilo, B., Nugroho, W. A., Keteknikan, J., Teknologi, P.-F., Brawijaya, P.-U., Veteran, J., & Korespondensi, P. (2014). Pemurnian Etanol Hasil Fermentasi Kulit Nanas (*Ananas comosus L. Merr*) dengan Menggunakan Distilasi Vakum. *Jurnal Keteknikan Pertanian Tropis Dan Biosistem*, *2*(2), 131–137.
Farmakope Indonesia Edisi VI. 2020. Kementrian Kesehatan RI
Farmakope Herbal Indonesia Edisi 3. 2017. Kementrian Kesehatan RI
Ferdinan, A., Rizki, F. Sri & Rahmawati, N. 2021. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Ekstrak Etanol Daun Pandan Hutan Jenis Baru (*Freycinetia Sessiliflora Rizki*) komunitas Farmasi Nasional, 1 (2), 110-120.
FI V. 2014 Farmakope Indonesia V
Fitriani, A. 2014. Aktivitas Alkaloid Ageratum Conizoides L. Terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro.
Forestryana, D., & Arnida, A. 2020. Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Jeruju (*Hydrolea Spinosa L.*). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, *11*(2), 113. https://doi.org/10.52434/jfb.v11i2.859
Hanani, E. 2015. Analisis Fitokimia. Penerbit Buku Kedokteran EGC
Handayani,.2020. Metodologi Penelitian Sosial. Yogyakarta: Trussmedia
Handoyo, D. 2020. The Influence Of Maseration Time (Immeration) On The Vocity Of Birthleaf Extract *(Piper Betle).* Jurnal Farmasi Tinctura, 2(1), 34-41
Hastuti, D. S. 2018. Robusta , Karena Kopi Robusta Rasanya Lebih Pahit , Sedikit Asam Dan Mengandung Kafein Lebih. 9–11.
Hujjatusnaini, N ., Ardiansyah., Indah,B., Afitri,E., Widyastuti,R. 2021. Buku Referensi Ekstraksi
Harum, S. 2022. Analisis Produksi Kopi di Indonesia Tahun 2015-2020 Menggunakan Metode Cobb-Douglass. Jurnal Ilmiah Vol 1, No 2 (2022) p-ISSN 2621-3842e-ISSN 2716-2443
Husa, F., & Mita, S. R. 2020. Identifikasi Bahan Kimia Obat dalam Obat Tradisional Stamina Pria dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Farmaka*, *18*(2), 16–25. https://jurnal.unpad.ac.id/farmaka/article/view/25955
Kartasura: Fairuz Media.

Ilmiana, R. 2022. Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta *(Coffea canephora)* Skripsi Vis Pada Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta.

Juniarti, N., Mulya, O., Istiqamah, N., Amelia R. 2016. Buku Bahan Alam Alkaloid

Kasminah. 2016. Aktivitas Antioksidan Rumput Laut *Halymenia durvillaei* Dengan Pelarut Non-Polar, Semi Polar dan Polar.

Kapondo, G. L., Fatimawali, ., & Jayanti, M. 2020. Isolasi, Identifikasi Senyawa Alkaloid Dan Uji Efektivitas Penghambatan Dari Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis. Jurnal E-Biomedik*, *8*(2), 180–186. https://doi.org/10.35790/ebm.v8i2.28999

Kiswandono, A. A. 2017. Skrining Senyawa Kimia Dan Pengaruh Metode Maserasi Dan Refluks Pada Biji Kelor (*Moringa oleifera, Lamk*) Terhadap Rendemen Ekstrak Yang Dihasilkan. *Jurnal Sains Natural*, *1*(2), 126. https://doi.org/10.31938/jsn.v1i2.21

Klau, M. H. C., & Hesturini, R. J. 2021. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Dandang Gendis (*Clinacanthus nutans (Burm F) Lindau*) Terhadap Daya Analgetik Dan Gambaran Makroskopis Lambung Mencit. *Jurnal Farmasi & Sains Indonesia*, *4*(1), 6–12. https://doi.org/10.52216/jfsi.v4i1.59

Kurniawati, I., Maftuch., Hariati, A, M.2016. Penentuan Pelarut dan Lama Ekstraksi Terbaik Pada Teknik Maserasi *Grecilaria sp.* Serta Pengaruhnya Terhadap Kadar Air dan Rendemen.

Kusnadi, K., & Devi, E. T. 2017. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavanoid Pada Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens L.*) Dengan Metode Refluks. *PSEJ (Pancasakti Science Education Journal)*, *2*(1), 56–67. https://doi.org/10.24905/psej.v2i1.675

Lindawati, N. Y. 2022. Penetapan Kadar Alkaloid Total Pada Ekstrak N- Heksan Dan Etanol Biji Ketumbar (*Coriandrum sativum*) Determination Of Total Alkaloid Levels In N-Hexan And Etanol Extract Of Coriander Seeds (*Coriandrum Sativum)* Using Uv-Vis. 4(3).

Maramis,R., Citraningtyas,G., Wehantouw, F. 2013. Analisis Kafein Dalam Kopi Bubuk Di Kota Manado Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 4(2), 2302-2493

Marjoni, M. R. 2016. Dasar - Dasar Fitokimia Untuk Diploma III Farmasi.

Marjoni, M. R. et al. 2018 'Phenolics compounds, flavonoids, and antioxidant activity methanol extract of arum manis leaves (*Mangifera indica L. Var. Arumanis)', International Journal of Green Pharmacy,* 12(3), pp. S651–S656.

Maulana M. 2018. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina cristi. L)* Berdasarkan Variasi Pelarut. *Bitkom Research*, *63*(2), 1–3.

Maulida, MG. 2022. Pengoperasian Mesin Pengupas Kulit Buah Kopi Dalam Proses Pengupasan Basah Kopi Arabika di Inkubator Usaha Tani Balai Besar Pelatihan Lembang. 07.16.20.040

McCombes, S. 2019. An introduction to sampling methods. Scribbr

Meiryani.(2021). Perbedaan Analisis Kualitatif dan Kuntitatif Dalam Penelitian Ilmiah.

Merangin, K., & Maret, B. (2022). *22957-Article Text-64512-1-10-20221226*. *6*, 192–200.

Milanda, R. D. 2021. Ekstrak Metanol Pada Sampel Teh Hitam Dari PTPN XII Lawang Jawa Timur Menggunakan KLT-Densitometri.

Mukhaimin, I., Latifahnya,A., Puspitasari,E. 2018. Penentuan Kadar Alkaloid Total pada Ekstrak Bunga Pepaya *(Carica papaya L)* dengan Metode Microwave Assisted Extraction. *Chemical Engineering Research Articles,* 1(2), 66-73.

Mukhtarini. 2014. Mukhtarini, "Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif," J. Kesehatan., vol. VII, no. 2, p. 361, 2014. *J. Kesehat.*, *VII*(2), 361. https://doi.org/10.1007/s11293-018-9601-y

Naufalia, A. N. (2021). Validasi Metode Dan Penetapan Kadar Daidzein Edamame *(Glycine max)* Terfermentasi Oleh Rhizopus oligosporus Dengan KLT-Densitometri. In *Digital Repository Universitas Jember* (Issue September 2019).

Naura Mufida Marsya, Hendro Sudjono Yuwono, & Oky Haribudiman. 2021. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Air Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Bakteri *Pseudomonas Aeruginosa*. *Jurnal Riset Kedokteran*, *1*(1), 55–58. https://doi.org/10.29313/jrk.v1i1.317

Ningrum, R., Purwanti, E., Sukarsono. 2016. Alkaloid Compound Identification of *Rhodomyrtus tomentosa* Stem as Biology Instructional Material for Senior High School X Grade. Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia., Volume 2 nomor 3, 2016. p-ISSN: 2442-3750; e-ISSN: 2527-6204, Halaman 231-236.

Nofriyelli, E., 2018. Validasi Metode Analisis Mangiferin Dalam Plasma In Vitro Secara Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri.

Pamungkas, K., & Murrukmihadi, M. 2015. Isolation and Determination of Hibiscus rosa-sinensis L. Flower Ethanolic Extract using spectrodensitometry. *Traditional Medicine Journal*, 20(2)

Pepaya, B., & Extraction, M. A. 2018. *antidengue, anticancer, antimicrobial, antiparasitic, anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetic activities* . *1*(2), 66–73.Pharmaciana, 4(2), 193–200. https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v4i2.1578 Presindo.

Pratita, A. T. K. 2018. Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Alkaloid Dari Berbagai Ekstrak Kopi Robusta (*Coffea canephora*). Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-Ilmu Keperawatan, Analis Kesehatan Dan Farmasi, 17(2), 198. https://doi.org/10.36465/jkbth.v17i2.222

Puspitasari, D. (2019). PENGARUH METODE PEREBUSAN TERHADAP UJI FITOKIMIA DAUN MANGROVE Excoecaria agallocha. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, *6*(1), 423–428. https://doi.org/10.29103/aa.v6i1.1046

Putra, A. 2016. Optimasi Metode Ekstraksi Daun Binahong (*Anredera scandens (L.) Moq*) untuk Mendapatkan Ekstrak yang Terstandar

Putri, S., Hengky, B. A., & Amandhia, D. P. S. 2017. Potensi kopi robusta sebagai antibakteri dan antijamur pada penyakit rongga mulut. *Prosiding the 5th Dentistry Scientific Meeting of Jember*, 22–31. https://repository.unej.ac.id/handle/123456789/89458

Rahardjo, Pudji. 2012. Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta. Jakarta: Penebar Swadaya.

Rahmi, N., Salim, R., & Rizki, M. I. 2021. Aktivitas Antibakteri Dan Penghambatan Radikal Bebas Ekstrak Kulit Kayu Bangkal *(Nauclea subdita)* (The Effect of Solvents and Extraction Methods on Antibacterial and Free Radical Scavenging Activities from Bangkal *(Nauclea subdita*) Bark Extracts). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, *39*(1), 13–26.

Rezki, R. S., Anggoro, D., & Mz, S. 2015. Ekstraksi Multi Tahap Kurkumin dari Kunyit *(Curcumadomestica Valet)* Menggunakan Pelarut Etanol. *Jurnal Teknik Kimia USU*, *29*, 29–34.

Riastuti, A., Komarayanti, S., Utomo, A.2021. Karakteristik Morfologi Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Pascapanen di Kawasan Lereng Meru Betiri Sebagai Sumber Belajar SMK dalam Bentuk E-Modul.

Riyanto Ph.D. 2014. Validasi dan Verifikasi Metode Uji Sesuai Dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi.

Rijar, G. Y., Sari, N., Aliah, A. I., Megarezky, U., & Toraja, T. 2022. *Comparison of Percent Value of Erythema and Pigmentation Transmission with Maceration and Infusion Method of Robusta Coffee (Coffea canephora Pierre A . Frohner) Derived from the District Tana Toraja Perbandingan Nilai Persen Transmisi Eritema dan Pigme*. *2*(6), 2729–2742.

Rosamah, E. 2019. Kromatografi Lapis Tipis Metode Sederhana Dalam Analisis Kimia Tumbuhan Berkayu

Salamah, M.Sc, Apt., N., Rozak, M., & Al Abror, M. 2017. Pengaruh metode penyarian terhadap kadar alkaloid total daun jembirit *(Tabernaemontana sphaerocarpa. BL)* dengan metode spektrofotometri visibel. *Pharmaciana*, *7*(1), 113. https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v7i1.6330

Savitri, A., & Megantara, S. 2019. Metode KLT-Densitometri Sebagai Penetapan Kadar Bahan Aktif Sediaan Farmasi. *Farmaka*, *17*, 455–463.

Santoso, H. 2014. Evektifitas Pemberian Pupuk Custom Bio dan Dosis Pupuk Phospat Pada Media Tanam Terhadap Pertumbuhan Semai Kopi (*Coffea canephora)*

Sari, Y., Syahrul, S., & Iriani, D. (2021). Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan pada Kijing (*Pylsbryoconcha Sp)* dengan Pelarut Berbeda. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pertanian Indonesia*, *13*(1), 16–20. https://doi.org/10.17969/jtipi.v13i1.18324

Sari, M.Y, Suhartati, Husniati. (2019). Analisis Senyawa Asam Klorogenat Dalam Biji Kopi Robusta *(Coffea canephora)* Menggunakan HPLC.*Analitycal and Enviromental Chemistry.Vol.4 No 02*

Sciences, H. 2016. *Tinjau Umum Tumbuhan Halay*. *4*(1), 1–23.

Sholehah, CWM. 2019. Analisa Kadar Kafein Pada Kopi Robusta Dengan Menggunakan Spektrofotometri Ultraviolet

Sianipar, R. H., & Siahaan, M. A. 2017. Pemeriksaan Senyawa Alkaloid Pada Beberapa Tanaman Familia Solanaceae serta Identifikasinya dengan kromatografi Lapis Tipis (KLT). *Jurnal Farmanesia*, *4*(1), 1.

Siyoto,S., Sodik,A. 2015. Dasar Metodologi Penelitian

Sugiyono. 2019. Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan R&D. Bandung :

Sugiyono, 2017 “Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R & D" Bandung, Penerbit CV.

Sulistyaningtyas, A. (2017). Pentingnya Pengolahan Basah (*Wet Processing)* Buah Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Untuk Menurunkan Resiko Kecacatan Biji Hijau Saat Coffe Grading. *Prosiding Seminar Nasional Publikasi Hasil Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat*, *9*(06), 90–94. https://jurnal.unimus.ac.id/index.php/psn12012010/article/view/2845/2765

Sudjadi, 1988, Metode Pemisahan, cetakan pertama, Penerbit Kanisius,Yogyakarta, pp.167-175.

Sutama. 2016. Metode Penelitian Pendidikan Kuntitaif, kualtatif, PTK, dan R&D.

Suhendi,A., Ramly, E. 2021. Validasi Metode Analisis Kapsul Rifampicin Dengan HPLC. Farmasi Sains. Vol 8 no 1

Stanley, A. 2018. Validasi Metode *Thin-Layer Cromatography (Tlc)- Densitometri* Pada Penetapan Kadar Kafein. 83

Syamsul, E. S., Anugerah, O., & Supriningrum, R. (2020). Penetapan Rendemen Ekstrak Daun Jambu Mawar *(Syzygium jambos L. Alaton)* Berdasarkan Variasi Konsentrasi Etanol Dengan Metode Maserasi.*Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, *2*(3), 147–157. https://doi.org/10.33759/jrki.v2i3.98

Tanauma, H. A., Citraningtyas, G., & Lolo, W. A. (2016). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Bakteri Escherichia Coli. *Pharmacon*, *5*(4), 243–251.

Trifani.2012.Ekstraksi pelarut caircair.http://awjee.blog.com/2012/11/24/ekstraks-pelarut-cair-cair/

Ubay. 2011. Isolasi Pektin Dari Kulit Pisang Kepok (*Musa Balbisiana Abb*) Dengan Metode Refluks Menggunakan Pelarut Hcl Encer. Manajemen Pengembangan Bakat Minat Siswa Di Mts Al-Wathoniyyah Pedurungan Semarang, 2–3.

Ulfiati, R., Purnami, T., Karina, RM. 2017 Faktor Yang Mempengaruhi Presisi Dan Akurasi Data Hasil Uji Dalam Menentukan Kompetensi Laboratorium. Vol.51, No. 1. April 2017: 6-7.

Wahyuni, S., & Marpaung, M. P. 2020. Penentuan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Akar Kuning *(Fibraurea chloroleuca Miers)* Berdasarkan Perbedaan Konsentrasi Etanol Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Dalton : Jurnal Pendidikan Kimia Dan Ilmu Kimia*, *3*(2), 52–61. https://doi.org/10.31602/dl.v3i2.3911

Wardani, A. D. 2021. Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Spektrofotometri Uv-Vis Di Desa Kemiri.

Wardaningrum,R.Y. 2020.Perbandingan Aktivita Antioksidan Ekstrak Etanol Terpurifikasi Ubi Jalar Ungu *(Ipomoea batatas)* Dengan Vitamin E, Skripsi. Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan,Universitas Ngudi Walyo. Ungaran

Wigati EI, Pratiwi E, Nissa TF, Utami NF.2018. Uji karakteristik fitokimia dan aktivitas antioksidan biji kopi robusta (*Coffea canephora Pierre*) dari Bogor,Bandung dan Garut dengan metode DPPH (1,1-Diphenyl-2 Picrylhydrazyl). JurnalIlmiah Farmasi 8(1): 53-59.

Wijaya, H., Novitasari, & Jubaidah, S. (2018). Perbandingan Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen Ekstrak Daun Rambui Laut *(Sonneratia caseolaris L. Engl). Jurnal Ilmiah Manuntung*, *4*(1), 79–83

Wiradnyani, N., Wartini, N., Admadi, B. 2014, Composition of the Constituent Compound of Sinom Beverage *(Curcuma domestica Val.-Tamarindus indica L.)* Media Ilmiah Teknologi pangan. Vol. 1, No 1,10-23,2014.

Wulandari, L., Retnaningtyas, Y., & Mustafidah, D. 2013. Development and Method Validation Densitometry Thin Layer and Ephedrinehydrochloride In Tablet. Jkti, 15(1), 15–21.

Wulandari, Lstyo. 2011.Kromatografi Lapis Tipis. Jember: PT Taman Kampus. ISBN: 978-979-17068-1-0

Wulandari, S., & Agustin,Y 2022. Biji Kopi Robusta Peaberry Green Bean : Skrining Fitokimia, Formulasi Herbal Lotion. *Journal of Pharmaceutical and Sciences* , 5(2), 355-363

Yaqin, M., & Nurmilawati, M. 2015. Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta (*Coffea robusta)* sebagai Penghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS, 867–872. https://media.neliti.com/media/publications/173819-ID-none.pdf

Yuangsoi, B., O, J., N, A. & P, T., 2008. Validated TLC-densitometric Analysis For Determination OF Carotenoids in fancy carp *(Cyprinus carpio)* serum and the application for pharmocokinetic parameter assessment. Songklanakarin J Sci. Technol, Volume 30, pp. 693-700.

Yusuf, M., & Alyidrus, R. 2020. Uji Antiangiogenesis Secara In Vivo Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta *(Coffea Robusta)* dengan Metode Chorio Allantoic Membrane (CAM). *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, *6*(1), 63–69. https://doi.org/10.22487/j24428744.2020.v6.i1.14975

Zahroh,H. 2022. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bijikopi Robusta (*Coffea canephora*) Dengan Metode Dpph (1,1-Diphenyl-2-picryl-hidrazyl)

Zarwinda, I. and Sartika, D. 2019. 'Pengaruh Suhu Dan Waktu Ekstraksi Terhadap Kafein Dalam Kopi', Lantanida Journal, 6(2), p. 180. doi:10.22373/lj.v6i2.3811.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Determinasi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0

KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
UPA. PENGEMBANGAN PERTANIAN TERPADU
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax.(0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : http//www.Polije.ac.id

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 53/PL17.8/PG/2023

Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi Sarjana Farmasi No: 1197/FIKES.UDS/U/III/2023 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPA. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Nadha Nofa Diana
NIM : 19040084
Jur/Fak/PT : Prodi Sarjana Farmasi/ Universitas dr. Soebandi

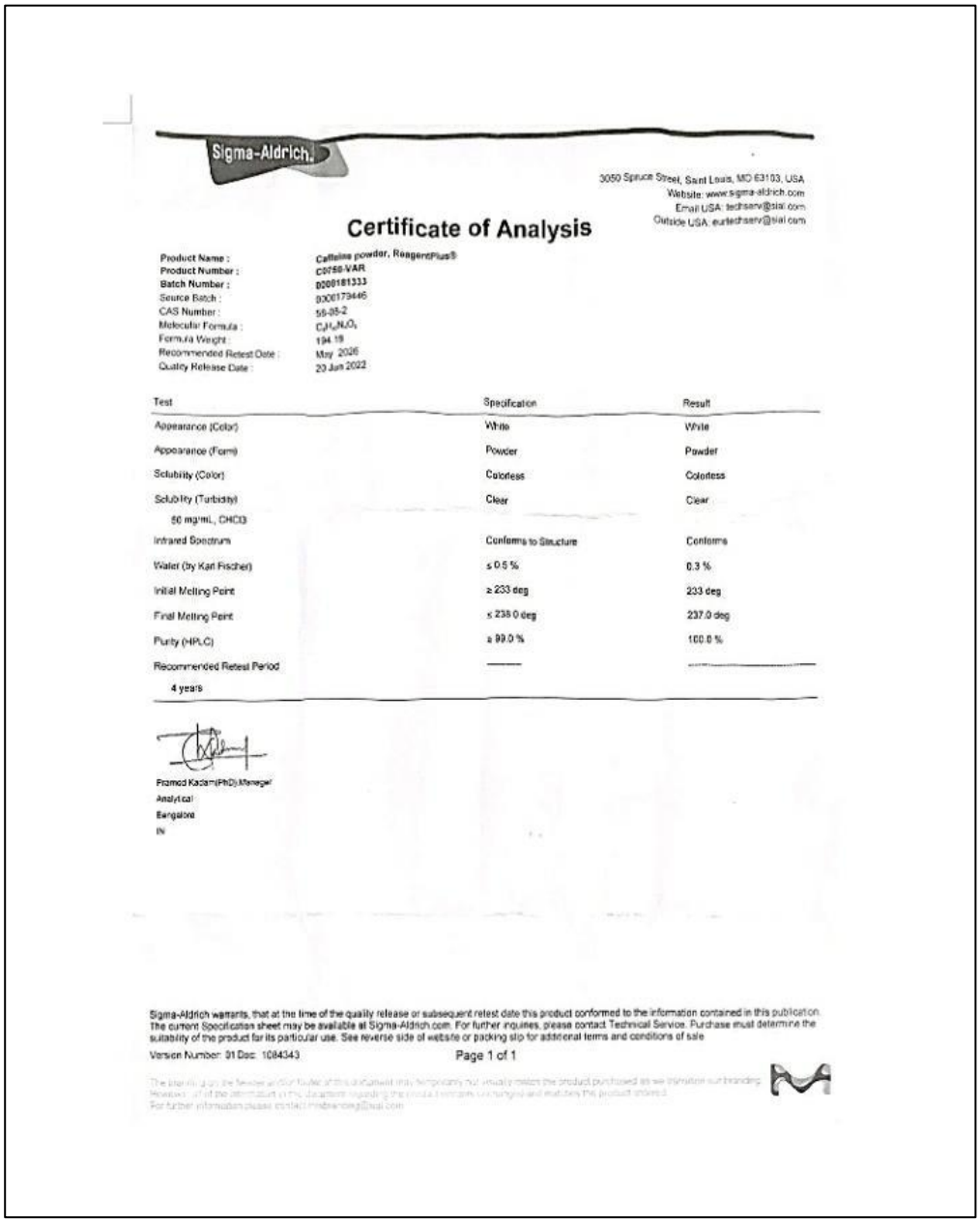
maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah: *Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio:Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub Kelas: Asteridae; Ordo:Rubiales; Famili: Rubiaceae; Genus: Coffea; Spesies:Coffea canephora*, Pierre.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 20 Maret 2023
Ka.UPA. Pengembangan Pertanian Terpadu

Ir. Budi Prasetyo, S.Pt, MP, IPM
NIP. 197106212001121001

Lampiran 2. Sertifikat kafein



Sigma-Aldrich.

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigma-aldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name :	Caffeine powder, ReagentPlus®
Product Number :	C0750-VAR
Batch Number :	0000181333
Source Batch :	0000173446
CAS Number :	58-08-2
Molecular Formula :	$C_8H_{10}N_4O_2$
Formula Weight :	194.19
Recommended Retest Date :	May 2026
Quality Release Date :	20 Jun 2022

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless	Colorless
Solubility (Turbidity) 50 mg/mL, CHCl3	Clear	Clear
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Water (by Karl Fischer)	≤ 0.5 %	0.3 %
Initial Melting Point	≥ 233 deg	233 deg
Final Melting Point	≤ 238.0 deg	237.0 deg
Purity (HPLC)	≥ 99.0 %	100.0 %
Recommended Retest Period 4 years	———	———

Pramod Kadam(PhD),Manager
Analytical
Bangalore
IN

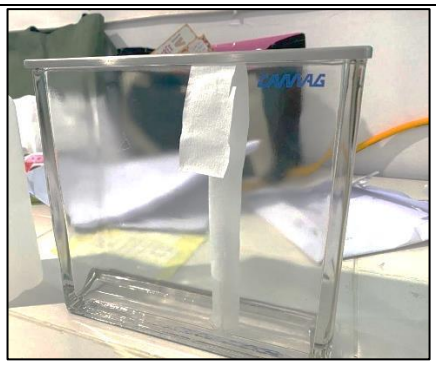
Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of website or packing slip for additional terms and conditions of sale

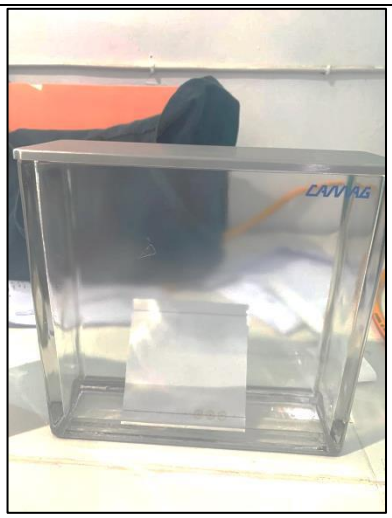
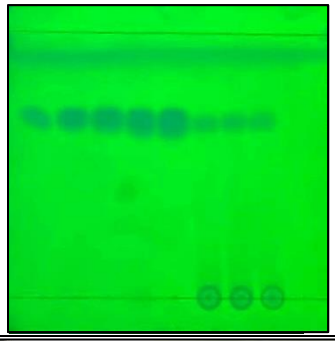
Version Number: 01 Doc: 1084343 Page 1 of 1

Lampiran 3. Dokumentasi penelitian

Gambar	Keterangan
	Sampel yang digunakan yaitu biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember
	Proses ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol
	Ekstrak kental etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*)

	Larutan Stok dan Pengenceran
	Larutan Sampel

	Fase Gerak sebanyak 10 mL dengan perbandingan 9, mL klorofom dan 0,5 mL etanol
	Penjenuhan *chamber*
	Aktivasi Lempeng KLT

	Lempeng dielusi di dalam *chamber*
  	Lempeng dilihat pada sinar UV 254 nm
	Lempeng dianalisis menggunakan Densitometer

Lampiran 4. Perhitungan ekstraksi maserasi

Hasil Ekstrak Kering	Hasil Penimbangan
Berat serbuk awal	200 gram
Berat botol + ekstrak	37,86 gram
Berat botol kosong	13,21 gram
Berat ekstrak	24,65gram
% Rendemen	12,32%

Lampiran 5. Perhitungan Konsentrasi Larutan Stok, Pengenceran Larutan Stok, Larutan Sampel, dan Persamaan Regresi Linier

1.Larutan Stok

$\frac{125\ mg}{25\ mL}$ x 1000 ppm = 5000 ppm

2.Pengenceran Larutan Stok

Digunakan rumus pengenceran => V_1 x M_1= V_2 X M_2

1. 500 ppm > V_1 x 5000 ppm = 5 mL x 500 ppm

   V_1 = 0,5 mL

2. 1000 ppm > V_1 x 5000 ppm = 5 mL x 1000 ppm

   V_1 = 1 mL

3. 1250 ppm > V_1 x 5000 ppm = 10 mL x 1250 ppm

   V_1 = 2,5 mL

4. 1500 ppm > V_1 x 5000 ppm = 5 mL x 1500 ppm

   V_1 = 1,5 mL

5. 2000 ppm > V_1 x 5000 ppm = 5 mL x 2000 ppm

   V_1= 2 mL

3.Larutan sampel

1. $\frac{10\ mg}{5\ mL}$ x 1000 ppm = 2000 ppm
2. $\frac{10\ mg}{5\ mL}$ x 1000 ppm = 2000 ppm
3. $\frac{10\ mg}{5\ mL}$ x 1000 ppm = 2000 ppm

4.Perhitungan persamaan regresi yang didapat

a = 0,0188

b = 0,000003x

R^2 = 0,9982

y = bx + a

y = 0,000003x + 0,0188

Lampiran 6. Perhitungan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

1) Sampel Replikasi 1

y1 = 0,03253

y = 0,000003x + 0,0188

0,03253 = 0,000003x + 0,0188

$x = \frac{0,03253-0,0188}{0,000003}$

= 4.576,6 ng

= 0,0045766 mg

- Konsentrasi alkaloid total dalam volume penotolan 20 µL (0,02 mL)

  $= \frac{0,0045766\ mg}{0,02\ mL}$ 0,0045766

  = 0,22883 mg/mL

- Massa alkaloid total dalam volume larutan sampel

  = 0,22883 mg/mL x 5 mL

  = 1,144 mg

- Kadar alkaloid total

  $= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$

  $= \frac{1,144\ mg}{10\ mg}$

  = 0,1144 mg

- % Kadar alkaloid total

  $= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$ x 100 %

$= \frac{1{,}144\ mg}{10\ mg}$ x 100 %

= 11,440 % b/b

2) Sampel Replikasi 2

y1 = 0,03289

y = 0,000003x + 0,0188

0,03289 = 0,000003x + 0,0188

$x = \frac{0{,}03289 - 0{,}0188}{0{,}000003}$

= 4.696,6 ng

= 0,0046966 mg

- Konsentrasi alkaloid total dalam volume penotolan 20 µL (0,02 mL)

  $= \frac{0{,}0046966\ mg}{0{,}02\ mL}$

  = 0,234833 mg/mL

- Massa alkaloid total dalam volume larutan sampel

  = 0,234833 mg/mL x 5 mL

  = 1,174 mg

- Kadar alkaloid total

  $= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$

  $= \frac{1{,}174\ mg}{10\ mg}$

  = 0,1174 mg

- % Kadar alkaloid total

  $= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$ x 100 %

$= \frac{1{,}174\ mg}{10\ mg}$ x 100 %

= 11,740 % b/b

3) Sampel Replikasi 3

y1 = 0,03316

y = 0,000003x + 0,0188

0,03316= 0,000003x + 0,0188

$x = \frac{0{,}03316 - 0{,}0188}{0{,}000003}$

= 4.786,6 ng

= 0,0047866 mg

- Konsentrasi alkaloid total dalam volume penotolan 20 µL (0,02 mL)

  $= \frac{0{,}004786\ mg}{0{,}02\ mL}$

  = 0,239333 mg/mL

- Massa alkaloid total dalam volume larutan sampel

  = 0,239333 mg/mL x 5mL

  = 1, 196 mg

- Kadar alkaloid total

  $= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$

  $= \frac{1{,}196\ mg}{10\ mg}$

  = 0,1196 mg

- % Kadar alkaloid total

  $= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$ x 100 %

$= \frac{1{,}196\ mg}{10\ mg}$ x 100 %

= 11,960 % b/b

- Rata-rata kadar alkaloid total = $\frac{0{,}1144\ \text{mg} + 0{,}1174\ \text{mg} + 0{,}1196\ \text{mg}}{3}$

= 0,117133 mg

- Rata-rata % kadar alkaloid total = $\frac{11{,}44\% + 11{,}74\% + 11{,}96\%}{3}$

= 11,713 % b/b

SD = $\sqrt{\frac{(0{,}1144-0{,}117)^2+(0{,}1174-0{,}117)^2+(0{,}1196-0{,}117)^2}{3-1}}$

$= \sqrt{\frac{0{,}00006 + 0{,}0000001 + 0{,}000006}{2}}$

$= \sqrt{\frac{0{,}00006}{2}}$

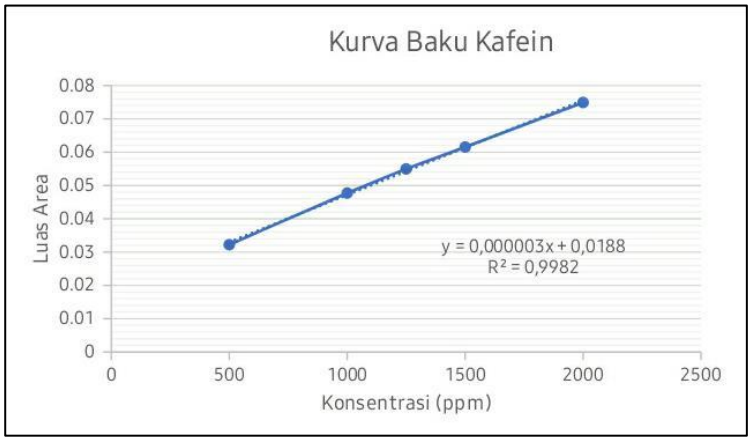
$= \sqrt{0{,}000033}$

= 0,005

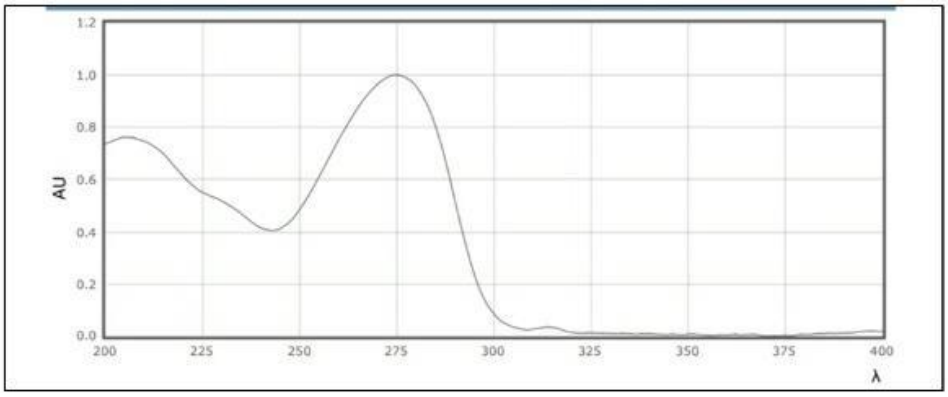
RSD = $\frac{0{,}0057}{0{,}117}$ x 100 %

= 4,87 %

Lampiran 7. Kurva baku kafein



Lampiran 8. Panjang gelombang maksimum 275 nm



Lampiran 9. Nilai Luas Area, Nilai R_f, dan Nilai Korelasi

Vial	R_f	Korelasi
Standar 1 (500 ppm)	0.768	0.997236
Standar 2 (1000 ppm)	0.771	0.997236
Standar 3 (1250 ppm)	0.777	0,999958
Standar 4 (1500 ppm)	0.789	0,999930
Standar 5 (2000 ppm)	0.793	0,999641
Replikasi 1 (2000 ppm)	0.769	0,998933
Replikasi 2 (2000 ppm)	0.755	0,997696
Replikasi 3 (2000 ppm)	0.752	0,996434