

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BEBERAPA KOPI ROBUSTA
(*Coffea canephora* Pierre.) DI SULAWESI SELATAN
MENGUNAKAN METODE DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil)**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST OF COFFEE ROBUSTA
(*Coffea canephora* Pierre.) IN SOUTH SULAWESI USING
METHOD OF DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil)**

Disusun dan diajukan oleh

**NURFATMASARI
N111 14 323**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR
2021**

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BEBERAPA KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora* Pierre.) DI SULAWESI SELATAN MENGGUNAKAN METODE DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil)

ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST OF COFFEE ROBUSTA (*Coffea canephora* Pierre.) IN SOUTH SULAWESI USING METHOD OF DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil)

SKRIPSI

Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**NURFATMASARI
N111 14 323**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BEBERAPA KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora* Pierre.) DI SULAWESI SELATAN MENGGUNAKAN METODE DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil)

NURFATMASARI

N111 14 323

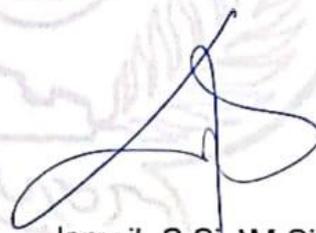
Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pertama,



Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
NIP. 19561011 198603 2 002



Ismail, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19850805 201404 1 001

Pada tanggal 23/09/2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BEBERAPA KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora* Pierre.) DI SULAWESI SELATAN MENGGUNAKAN METODE DPPH (2.2-difenil-1-pikrihidrazil)

ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST OF COFFEE ROBUSTA (*Coffea canephora* Pierre.) IN SOUTH SULAWESI USING METHOD OF DPPH (2.2-difenil-1-pikrihidrazil)

Disusun dan diajukan oleh:

**NURFATMASARI
N111 14 323**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin pada tanggal 23 September 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama



Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
NIP. 19561011 198603 2 002

Pembimbing Pertama



Ismail, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19850805 201404 1 001

**Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin**



Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed., Ph.D., Apt.
NIP : 19820610 200801 1 012

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nurfatmasari

NIM : N111 14 323

Program Studi : Farmasi

Jenjang : S1

Dengan ini menyatakan bahwa karya tulisan saya berjudul Uji Aktivitas Antioksidan Beberapa Kopi Robusta (*Coffea Canephora* Pierre.) di Sulawesi Selatan Menggunakan Metode DPPH (*2,2-Difenil-1-Pikrihidrazi*) adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan orang lain.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 25 September 2021

menyatakan



Nurfatmasari

UCAPAN TERIMAKASIH

Bismillahirrahmanirrahim

الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

Puji syukur kepada Allah Subhanahu Wata'ala dengan segala rahmat dan karunia-nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini, dalam penyusunan skripsi ini semua tidak lepas dari dukungan berbagai pihak, penulis secara khusus mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung. Untuk itu dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih terkhusus kepada :

1. Kepada Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. sebagai pembimbing utama, dan bapak Ismail, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping terima kasih telah meluangkan waktu selama ini untuk memberikan bimbingan, arahan, dorongan dan semangat kepada penulis serta membagi ilmunya, menyumbangkan pikiran dan tenaga dalam membimbing penulis sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Kepada Tim Penguji, Ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. dan Ibu Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt. atas masukan-masukan yang sangat bermanfaat dalam menyelesaikan skripsi ini dan terimakasih atas ilmu yang telah dibagikan kepada penulis.
3. Kepada Dekan, wakil dekan dan dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin terima kasih atas ilmu, nasehat, saran serta pengalaman

yang telah diberikan selama penulis menjalani perkuliahan ini, serta seluruh staff Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang yang tidak bisa disebutkan satu per satu terima kasih atas segala bimbingan dan ilmu serta bantuan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi.

4. Kepada seluruh laboran Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin terkhusus untuk kak Abdi dan kak Dewi yang sangat membantu semua kebutuhan penulis pada saat penelitian.
5. Kepada sahabat yang selama ini selalu memberikan dorongan, sahabat yang selalu ada menemani penulis dari awal perkuliahan hingga saat ini yang selalu memotivasi, memberikan semangat dan membantu penulis hingga sampai ketahap ini yaitu Nurul Ilmi Yusuf S.Si., Apt, Riri Nurfitasari S.Si., Apt, Ika Sartika S.Si., Apt, Hajirah S.Si., Apt, Muhlisa S.Si., Apt, Ridha Amaliah S.Si., Apt dan Chaerunnisa Indra, S.Si, terima kasih untuk kebersamaanya sampai saat ini dan seterusnya.
6. Kepada teman sepeghuni kosan Hamzy Entertainment yang sangat menghibur, selalu memberi dukungan, siap membantu saat dibutuhkan dan selalu menjadi pendengar yang baik yaitu Ekawati, Masrianti, Nurmiati, Ana Nurun Niswah Said, Ulfayanti, Suriyani, Dian Merdeka Sari, Nur Azizah dan Kak Usni.

7. Kepada Arif Budi Satriawan yang senantiasa menemani, menyemangati dan membantu dalam segala aspek yang diperlukan baik secara langsung maupun tidak langsung.
8. Teman-teman farmasi angkatan 2014 “HIOS14MIN” terima kasih atas kebersamaannya selama di kampus, semoga selamanya akan seperti ini.

Terselesainya skripsi ini tidak ada artinya tanpa adanya dorongan moril maupun materil, semangat, dan doa yang tidak henti-hentinya mengalir dari orang tua tercinta dan keluarga besar. Rasa terima kasih yang teramat dalam penulis ucapkan kepada Ibunda Nurbaya dan Ayahanda Lapatang. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada saudara penulis yang senantiasa memberikan semangat dan doa dalam menyelesaikan skripsi ini.

Serta masih banyak lagi pihak-pihak yang sangat berpengaruh dalam proses penyelesaian skripsi yang tidak bisa penulis sebutkan satupersatu semoga Allah Subhanahu Wata’ala senantiasa membalas semua kebaikan yang telah diberikan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi bagi peneliti umumnya kepada para pembaca.

ABSTRAK

NURFATMASARI. Uji aktivitas antioksidan beberapa kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre) di Sulawesi Selatan menggunakan metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrihidrazil) (dibimbing oleh Prof. Gemini Alam dan Ismail).

Antioksidan adalah senyawa yang memiliki peranan penting dalam menjaga kesehatan karena dapat menangkal radikal bebas sehingga menghambat reaksi oksidasi dalam tubuh yang dapat mengakibatkan berbagai jenis penyakit. Biji kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre) merupakan salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai antioksidan alami karena memiliki aktivitas antioksidan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan aktivitas antioksidan biji kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre) dari berbagai daerah di Sulawesi Selatan. Tahap yang dilakukan yaitu penyiapan sampel, ekstraksi dengan metode maserasi kemudian pengujian kualitatif dan kuantitatif senyawa fenol dan flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-VIS lalu dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Hasil penelitian dari uji kualitatif dan kuantitatif senyawa fenol dan flavonoid yaitu sampel positif mengandung senyawa fenol dan flavonoid. Ekstrak biji kopi robusta Sinjai memiliki kandungan senyawa fenol tertinggi sebanyak 2.526 kemudian Ekstrak biji kopi robusta Bantaeng 1.812 dan Ekstrak biji kopi robusta Toraja 1.756, sedangkan pada Ekstrak biji kopi robusta Bantaeng mengandung senyawa flavonoid tertinggi yaitu sebesar 0.363 kemudian Ekstrak biji kopi robusta Toraja 0.358 dan Ekstrak biji kopi robusta Sinjai 0.138. Pengujian aktivitas antioksidan diukur berdasarkan metode DPPH dengan Trolox sebagai pembanding dan selanjutnya dihitung nilai IC_{50} yang ditentukan dengan analisis probit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak biji kopi robusta dari kabupaten Bantaeng, Toraja, dan Sinjai masing-masing memiliki IC_{50} 23.53 $\mu\text{g/mL}$, 29.39 $\mu\text{g/mL}$, dan 40.27 $\mu\text{g/mL}$. dan didapatkan persen rendemen terbesar pada Ekstrak biji kopi robusta Bantaeng diikuti Ekstrak biji kopi robusta Sinjai dan Ekstrak biji kopi robusta Toraja yaitu 3.51%; 2.83%; dan 2.42%.

Kata Kunci : Antioksidan, DPPH, Biji Kopi Robusta, Fenol, Flavonoid, Spektrofotometri UV-VIS.

ABSTRACT

NURFATMASARI. Antioxidant Activity Test of Coffe Robusta (*Coffea canephora* Pierre.) in South Sulawesi Using Method of DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrihidrazil) (guided by Prof.Gemini Alam and Ismail).

Antioxidants are compounds that have an important role in maintain health because it can prevent free radical, thus inhibit oxidation reactions in the body causes various diseases. Robusta coffee's seed (*Coffea canephora* Pierre) are the one of natural materials that can used to be a natural antioxidant because it has an antioxidant activities. The research aimed is to compare the antioxidant activities of Robusta coffee's seed from various regions in South Sulawesi. The steps are sample preparation, extraction with maceration method, and then qualitative and quantitative test of phenol and flavonoid compounds using spechtrophotocopy UV-Vis and then continued with antioxidant activities test with DPPH method. The result from qualytatif and quantytatif test of phenol and flavonoid compounds were positive that the sample had phenol and flavonoid compounds. Extracts of robusta coffee seed from Sinjai had the highest phenol compounds with 2.526 then extracts of robusta coffee seed from Bantaeng with 1.812 and extracts of robusta coffee seed from Toraja with 1.756. While extracts of robusta coffee seed from Bantaeng had the highest flavonoid compounds with 0.363 then extracts of robusta coffee seed from Toraja with 0.358 and extracts of robusta coffee seed from Sinjai with 0.138. Antioxidant activity based on DPPH methods with Trolox as standard and then calculated IC_{50} value determined by probit analysis. Based on the result of this research, extracts of robusta coffee seed from Bantaeng, Toraja and Sinjai each other have IC_{50} 23.53 $\mu\text{g/mL}$, 29.39 $\mu\text{g/mL}$, and 40.27 $\mu\text{g/mL}$. The highest of yields percent were a extracts of robusta coffee seed from Bantaeng and then extracts of robusta coffee seed from Sinjai, and extracts of robusta coffee seed from Toraja with each other result 3.51%, 2.82%, and 2.42%.

Keywords: Antioxidant, DPPH, Flavonoid, Maceration, Phenol, Robusta Coffee Seed, Spectroscopy UV-VIS.

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	2
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman	4
II.1.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta	4
II.1.2 Morfologi Tanaman Kopi Robusta	4
II.1.3 Kandungan Kimia Tanaman Kopi Robusta	6
II.2 Radikal Bebas	7
II.3 Antioksidan	8
II.4 Ekstraksi	10
II.4.1 Maserasi	11

II.5	Kromatografi Lapis Tipis	12
II.6	Metode Analisis Antioksidan	13
II.6.1	Metode DPPH	14
II.6.2	Metode ABTS	15
II.6.3	Metode FRAP	16
II.7	<i>Microplate Reader</i>	17
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN		19
III.1	Alat dan Bahan	19
III.2	Metode Penelitian	19
III.2.1	Pengambilan dan Pengolahan Sampel	19
III.2.2	Ekstraksi Sampel	20
III.2.3	Uji Kualitatif dan Kuantitatif Senyawa Fenol	20
III.2.3.1	Uji Kualitatif Senyawa Fenol dengan Metode KLT	20
III.2.3.2	Uji Kuantitatif Senyawa Fenol dengan Metode Chun	21
III.2.3.2.1	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	21
III.2.3.2.2	Pembuatan Kurva Baku	21
III.2.3.2.3	Pembuatan Larutan Uji	22
III.2.3.2.4	Pengukuran dengan Spektrofotometer UV-VIS	22
III.2.4	Uji Kualitatif dan Kuantitatif Senyawa Flavonoid	23
III.2.4.1	Uji Kualitatif Senyawa Flavonoid dengan Metode KLT	23
III.2.4.2	Uji Kuantitatif Senyawa Flavonoid dengan Metode Chang	23
III.2.4.2.1	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	23
III.2.4.2.2	Pembuatan Kurva Baku	23

III.2.4.2.3	Pembuatan Larutan Uji	24
III.2.4.2.4	Pengukuran dengan Spektrofotometer UV-VIS	24
III.2.5	Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	25
III.2.5.1	Pembuatan Larutan Uji Sampel	25
III.2.5.2	Pembuatan Larutan DPPH 4 mM	25
III.2.5.3	Pembuatan Larutan Pembanding Trolox	25
III.2.5.4	Penentuan Aktivitas Antioksidan	26
III.2.6	Pembahasan Hasil dan Kesimpulan	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		27
IV.1	Penyiapan Sampel	27
IV.2	Hasil Ekstraksi	27
IV.3	Uji Kualitatif Senyawa Fenol dan Flavonoid	29
IV.4	Uji Kuantitatif Senyawa Fenol dan Flavonoid	32
IV.4.1	Penentuan Waktu Inkubasi	32
IV.4.2	Penetapan Kadar	33
IV.5	Uji Aktivitas Antioksidan	37
IV.5.1	Pengukuran Aktivitas Antioksidan	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		41
V.1	Kesimpulan	41
V.2	Saran	41
DAFTAR PUSTAKA		42
LAMPIRAN		47

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Ekstraksi Biji Kopi Robusta	15
2. Hasil Nilai Rf Noda Pada Profil KLT Fenol dan Flavonoid	31
3. Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan	39
4. Hasil Absorbansi Baku Asam Galat	59
5. Hasil Penentuan Kadar Fenol Total Ekstrak Biji Kopi Robusta	59
6. Hasil Absorbansi Baku Rutin	61
7. Hasil Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Biji Kopi Robusta	61
8. Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Baku Trolox	63
9. Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Sinjai	65
10. Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bantaeng	66
11. Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Toraja	68
12. Hasil Waktu Inkubasi dan Besar Absorbansi Senyawa Fenol	69
13. Hasil Waktu Inkubasi dan Besar Absorbansi Senyawa Flavonoid	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi Buah Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i> Pierre)	4
2. Reduksi DPPH dari Senyawa Peredam Radikal Bebas	14
3. Profil KLT Senyawa Fenol dan Flavonoid	31
4. Hubungan Waktu Inkubasi dan Absorbansi Senyawa Fenol	33
5. Hubungan Waktu Inkubasi dan Absorbansi Senyawa Flavonoid	33
6. Grafik Kurva Baku Asam Galat	34
7. Grafik Kurva Baku Rutin	34
8. Reaksi Reagen Folin Ciocalteau dengan Fenol	35
9. Hasil Pengukuran Kadar Fenol Total dan Flavonoid	36
10. Hubungan Konsentrasi dan % Peredaman DPPH	38
11. Hubungan Antara Konsentrasi dan % Penghambatan dari Trolox	64
12. Hubungan Antara Konsentrasi dan % Penghambatan Ekstrak dari Kabupaten Sinjai	65
13. Hubungan Antara Konsentrasi dan % Penghambatan Ekstrak dari Kabupaten Bantaeng	67
14. Hubungan Antara Konsentrasi dan % Penghambatan Ekstrak dari Kabupaten Toraja	68

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja	47
2. Dokumentasi Penelitian	54
3. Perhitungan	57

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Dalam kehidupan sehari-hari radikal bebas dapat terbentuk secara terus menerus melalui makanan, polusi udara seperti asap kendaraan, asap pabrik, asap rokok dan juga radiasi ultraviolet (UV). Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas yang berlebih dapat memicu timbulnya berbagai macam penyakit, seperti penyakit autoimun, kerusakan sel atau jaringan, penyakit degeneratif, seperti kardiovaskular, kanker, aterosklerosis, dan juga osteoporosis (Winarsi, 2007). Dampak negatif dari radikal bebas dapat dihambat dengan pemberian antioksidan.

Antioksidan di dalam tubuh berfungsi untuk menstabilkan serangan radikal bebas dengan cara melengkapi kekurangan elektron dari radikal bebas sehingga menghambat terjadinya reaksi berantai. Senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan adalah alkaloid, flavonoid dan polifenol. Kebanyakan senyawa tersebut tersebar diseluruh bagian tumbuhan baik di kayu, biji, bunga, buah, daun, akar, maupun serbuk sari (Sarastani dkk, 2002).

Berdasarkan penelitian Camerrer Bettina dan Lothar W. Kroh (2006) menyatakan bahwa salah satu tanaman yang memiliki kandungan

senyawa polifenol tinggi yang berperan penting sebagai antioksidan adalah biji kopi robusta. Selain memiliki aktivitas sebagai antioksidan, polifenol pada kopi juga dapat mencegah penyakit kanker, kardiovaskular dan osteoporosis serta berperan dalam pencegahan penyakit neuro degeneratif dan diabetes mellitus.

Biji kopi robusta yang ditanam di satu daerah dengan daerah yang lainnya memiliki kandungan antioksidan yang berbeda tergantung pada usia tanaman yang digunakan, waktu panen, lingkungan tempat tumbuh atau ekologi dataran tinggi (Da-Matta *et al.*, 2007). Menurut penelitian Avelino *et al* (2005) menyatakan bahwa kopi yang tumbuh pada dataran lebih tinggi mempunyai komponen senyawa kimia lebih banyak dibanding kopi yang tumbuh pada dataran lebih rendah.

Berdasarkan hal tersebut, maka akan dilakukan penelitian mengenai pengujian aktivitas antioksidan yang paling tinggi pada beberapa biji kopi robusta yang dilihat berdasarkan perbedaan daerah pertumbuhannya di Provinsi Sulawesi Selatan terutama di Kabupaten Sinjai, Kabupaten Bantaeng dan Kabupaten Tana Toraja.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut maka muncul permasalahan yang manakah dari ketiga sampel biji kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre) yang memiliki kandungan antioksidan terbesar jika dilihat berdasarkan perbedaan daerah tempat tumbuh menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

I.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk membandingkan aktivitas antioksidan dari biji kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre) berdasarkan perbedaan daerah tempat tumbuh menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman

II.1.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre)

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta / Magnoliophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae / Magnoliopsida
Anak kelas	: Dialypetalae / Asteridae
Bangsa	: Rubiales
Suku	: Rubiaceae
Marga	: Coffea
Jenis	: <i>Coffea canephora</i> Pierre (Rahardjo,2012)



Gambar 1. Morfologi buah kopi robusta (*Coffea canephora*) (Panggabean, 2011)

II.1.2 Morfologi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre)

Tanaman kopi tumbuh tegak, bercabang, dan bila dibiarkan tumbuh dapat mencapai tinggi 12 meter. Secara alami, tanaman kopi memiliki akar tunggang sehingga tidak mudah rebah (Najiyati & Danarti, 2001).

Pada akar tunggang, terdapat beberapa akar kecil yang tumbuh kesamping sering disebut akarlebar yang ditumbuhi oleh akar rambut, bulu-bulu akar, dan tudung akar (Najiyati & Danarti, 2001).

Tanaman kopi umumnya akan mulai berbunga setelah berumur \pm 2 tahun. Setiap ketiak daun menghasilkan 8-24 kuntum bunga yang berukuran kecil. Mahkotanya berwarna putih dan berbau harum semerbak, biasanya terdiri dari 3-8 helai. Kelopak bunga berwarna hijau, pangkalnya menutupi bakal buah yang mengandung dua bakal biji. Benang sarinya terdiri dari 5-7 tangkai yang berukuran pendek (Najiyati & Danarti, 2001 ; Panggabean, 2011).

Buah terdiri dari daging buah dan biji. Daging buah terdiri atas 3 bagian yaitu lapisan kulit luar (eksokarp), lapisan daging (mesokarp), dan lapisan kulit tanduk (endokarp) yang tipis tetapi keras. Buah kopi umumnya mengandung dua butir biji tetapi kadang-kadang hanya mengandung 1 butir biji atau bahkan tidak berbiji sama sekali (Najiyati & Danarti, 2001).

Daun robusta bergelombang di bagian sisinya, berwarna hijau agak terang dan meruncing di bagian ujungnya. Daun tumbuh dan tersusun secara berdampingan di ketiak batang, cabang dan ranting. Sepasang daun terletak di bidang yang sama di cabang dan ranting yang tumbuh mendatar (Kuit *et al.*, 2004 ; Panggabean, 2011).

Berdasarkan umurnya diketahui daun kopi terdiri dari daun muda dan daun tua. Menurut Salgado *et al.* (2008), daun muda adalah daun yang berwarna hijau terang dan teksturnya lembut yang tumbuh pada cabang

plagiotrop yang terletak di bagian tengah pohon kopi. Daun muda terletak pada pasangan pertama daun kopi. Sedangkan, daun tua adalah daun yang berwarna hijau tua dan teksturnya kasar yang tumbuh pada cabang *plagiotrop* yang terletak di bagian tengah pohon kopi.

II.1.3 Kandungan Kimia Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre)

Kopi robusta memiliki banyak kandungan kimia pada bijinya yang memiliki peranan penting untuk menghasilkan aroma pada minuman kopi seperti karbohidrat, senyawa nitrogen (protein, asam amino bebas, kafein, trigonelin), lemak (minyak kopi, diterpen), mineral, dan polifenol (asam klorogenat) (Farah, 2012).

Menurut penelitian Hecimovic *et al* (2011) kandungan mineral pada kopi memberikan hingga 8% dari kebutuhan harian unsur Krom dan merupakan salah satu sumber penting dari unsur Magnesium, yaitu 63,7 mg/cangkir (100 mL).

Selain itu, senyawa polifenol juga paling banyak terkandung pada kopi, diantaranya asam klorogenat dan asam kafeat. Jumlah asam klorogenat mencapai 90% dari total fenol yang terdapat pada kopi (Hecimovic, et al, 2011). Senyawa fenolik yang terkandung dalam biji kopi robusta adalah asam klorogenat sebesar 9,0 gram/100 gram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa asam klorogenat memiliki aktivitas antioksidan yang cukup kuat (Herawati dan Sukohar, 2013), juga bersifat

sebagai antifungi, antivirus, antiinflamasi dan antibakteri (Amiliyah et al., 2015).

II.2 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan senyawa oksigen yang reaktif yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas dibentuk di dalam tubuh yang dapat dipengaruhi dari beberapa faktor salah satunya terjadi kebocoran metabolisme pada komponen makanan yang masuk dalam tubuh dan diubah menjadi energi. Di dalam tubuh, secara terus-menerus radikal bebas terbentuk melalui proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi dan akibat respons terhadap pengaruh dari luar, seperti polusi udara, ultraviolet, asap rokok, dan lain-lain (Winarsi, 2007).

Secara teoritis, radikal bebas dapat terbentuk bila terjadi pemisahan ikatan kovalen. Radikal bebas dianggap berbahaya karena sangat reaktif dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya dan gerakannya yang tidak beraturan dapat membentuk radikal bebas baru dari atom atau molekul yang elektronnya terambil untuk berpasangan dengan radikal bebas sebelumnya sehingga dapat menimbulkan kerusakan di berbagai bagian sel dalam tubuh makhluk hidup (Muhilal, 1991).

Oksigen yang sangat reaktif dan oksidasi dari protein, lemak, dan unsur lain dalam tubuh akan menghasilkan radikal bebas ini. Selain itu, radikal bebas juga disebabkan oleh pengaruh lingkungan seperti produk samping dari industri plastik, ozon atmosfer, asap knalpot kendaraan, dan

asap rokok. Kerusakan sel akibat radikal bebas tampaknya menjadi kontributor utama terjadi penuaan dan berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit jantung, katarak, penurunan sistem kekebalan tubuh, dan disfungsi otak (Percival, 1998 ; Tambayong, 2000).

Untuk meredam aktivitas radikal bebas diperlukan antioksidan yang dapat mendonorkan elektronnya kepada molekul radikal bebas, sehingga menghentikan reaksi berantai radikal bebas (Inggrid dan Santoso, 2014).

II.3 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) yang mampu menginaktivasi reaksi oksidasi dengan mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan berikatan dengan radikal bebas dan molekul yang reaktif, sehingga kerusakan sel yang terjadi akan dihambat. Antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu antioksidan enzimatis dan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis mencegah terbentuknya radikal bebas baru dan merupakan pertahanan primer terhadap stres oksidatif misalnya enzim *superoksida dismutase* (SOD), katalase dan *glutathion peroksidase* (GSH-Px). Sedangkan senyawa non-enzimatis berperan dalam menangkap oksigen serta mencegah terjadinya reaksi berantai. Antioksidan non-enzimatis dibagi dalam 2 kelompok yaitu (Winarsi, 2007) :

1. Antioksidan larut lemak, antara lain: tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, dan bilirubin
2. Antioksidan larut air, antara lain: asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dapat dikelompokkan menjadi tiga bagian, yaitu antioksidan primer atau alami, antioksidan sekunder atau sintetik dan antioksidan tersier (Inggrid dan Santoso, 2014).

1. Antioksidan Primer (Antioksidan Endogenus)

Antioksidan primer meliputi *enzim superoksida dismutase* (SOD), katalase, dan *glutathion peroksidase* (GSH-Px). Antioksidan primer disebut juga sebagai antioksidan enzimatis. Mekanisme kerja antioksidan primer adalah memutus reaksi berantai (polimerisasi) atau dikenal dengan istilah juga *chain breaking antioxidant*. Antioksidan primer memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk berubah menjadi senyawa yang lebih stabil (Winarsi, 2007).

2. Antioksidan Sekunder (Antioksidan Eksogenus)

Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau non-enzimatis. Mekanisme kerja antioksidan sekunder yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya. Akibatnya radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Antioksidan sekunder dapat berupa komponen non-nutrisi dan komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan. Antioksidan sekunder berasal dari senyawa fenolik, seperti asam fenolik (asam kafeat dan asam galat), diterpen fenolik (asam karnosik dan asam karnosol), golongan flavonoid (flavonol, flavon dan flavanon) dan minyak volatil (eugenol dan thymol) (Brewer, 2011 ; Winarsi, 2007).

3. Antioksidan Tersier

Kelompok antioksidan tersier meliputi sistem enzim *DNA-repair* dan *metionin sulfoksida reduktase*. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas (Winarsi, 2007).

II.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses perpindahan massa dari komponen zat padat yang terdapat pada simplisia ke dalam pelarut organik yang digunakan. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan selanjutnya akan masuk ke dalam rongga sel tumbuhan yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan terlarut dalam pelarut organik pada bagian luar sel untuk selanjutnya berdifusi masuk ke dalam pelarut. Proses ini terus berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif antara di dalam sel dengan konsentrasi zat aktif di luar sel (Marjoni, 2016). Tujuan ekstraksi adalah untuk menyari semua komponen kimia yang terdapat dalam simplisia (Mulyati, 2009).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode dan cara yang sesuai dengan sifat dan tujuan ekstraksi itu sendiri. Sampel yang akan diekstraksi dapat berbentuk sampel segar ataupun sampel yang telah dikeringkan. Sampel yang umum digunakan adalah sampel segar karena penetrasi pelarut akan berlangsung lebih cepat. Penggunaan sampel kering juga memiliki kelebihan yaitu dapat mengurangi kadar air yang terdapat di dalam sampel, sehingga dapat mencegah kemungkinan rusaknya senyawa

akibat aktivitas antimikroba (Marjoni, 2016). Adapun pada penelitian ini ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi.

II.4.1 Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dilakukan melalui perendaman serbuk bahan dalam larutan pengeksrak. Metode ini digunakan untuk mengekstrak zat aktif yang mudah larut dalam cairan pengeksrak, tidak mengembang dalam pengeksrak, serta tidak mengandung benzoin. Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya mudah ditemukan dan pengerjaannya sederhana (Hargono dkk., 1986).

Menurut Hargono dkk. (1986), ada beberapa variasi metode maserasi, antara lain digesti, maserasi melalui pengadukan kontinyu, remaserasi, maserasi melingkar, dan maserasi melingkar bertingkat. Digesti merupakan maserasi menggunakan pemanasan lemah (40-50°C). Maserasi pengadukan kontinyu merupakan maserasi yang dilakukan pengadukan secara terus-menerus, misalnya menggunakan shaker, sehingga dapat mengurangi waktu hingga menjadi 6-24 jam. Remaserasi merupakan maserasi yang dilakukan beberapa kali. Maserasi melingkar merupakan maserasi yang cairan pengeksrak selalu bergerak dan menyebar. Maserasi melingkar bertingkat merupakan maserasi yang bertujuan untuk mendapatkan pengeksrakan yang sempurna.

Lama maserasi memengaruhi kualitas ekstrak yang akan diteliti. Lama maserasi pada umumnya adalah 4-10 hari (Setyaningsih, 2006). Menurut Voight (1995), maserasi akan lebih efektif jika dilakukan proses

pengadukan secara berkala karena keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Melalui usaha ini diperoleh suatu keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat masuk ke dalam cairan pengekstrak.

II.5 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode kromatografi cair-padat dan merupakan metode pemisahan fisikokimia dimana komponen kimia bergerak mengikuti cairan pengembang karena daya serap adsorben terhadap komponen kimia tidak sama sehingga menyebabkan pemisahan (Gandjar dan Rahman, 2007).

Lapisan yang memisahkan terdiri atas fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan dalam Kromatografi Lapis Tipis merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiennya dan resolusinya. Lapisan tipis yang digunakan sebagai penjerap juga dapat dibuat dari silika yang telah dimodifikasi, resin penukar ion, gel eksklusi, dan siklodektrin yang digunakan untuk pemisahan kiral (Gandjar dan Rohman, 2007).

Fase gerak yang digunakan dalam Kromatografi Lapis Tipis adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut yang sering disebut dengan eluen. Pemilihan eluen didasarkan pada polaritas senyawa dan biasanya merupakan campuran beberapa pelarut yang

berbeda polaritas, sehingga didapatkan perbandingan tertentu. Eluen KLT dipilih dengan cara trial. Kepolaran eluen sangat berpengaruh terhadap Rf (faktor retensi) yang diperoleh (Gandjar dan Rahman, 2007).

Identifikasi dari senyawa-senyawa hasil pemisahan KLT dapat dilakukan dengan penambahan pereaksi kimia dan reaksi-reaksi warna. Tetapi lazimnya untuk identifikasi digunakan harga Rf. Harga Rf dihitung dengan menggunakan perbandingan sebagaimana persamaan sebagai berikut (Gandjar dan Rahman, 2007).

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

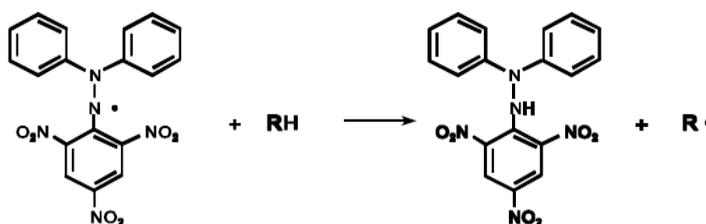
Adapun hasil identifikasi KLT menunjukkan pemisahan yang baik dengan munculnya bentuk spot yang jelas, tidak berekor, dan resolusinya > 1,25. Menurut Wonorahardjo (2013) bahwa nilai resolusi yang tinggi menunjukkan kesempurnaan keterpisahan antara dua buah puncak kromatogram (spot) dengan nilai Rs mendekati 1,25 atau lebih dari 1,25 memberikan hasil pemisahan 2 spot yang sangat baik dan kecil kemungkinan terjadinya tumpang tindih senyawa.

II.6 Metode Analisis Antioksidan

Metode analisis antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya metode DPPH, metode ABTS dan metode FRAP. Adapun metode yang dilakukan pada penelitian ini adalah metode DPPH.

II.6.1 Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

DPPH dalam metode ini berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana DPPH akan ditangkap oleh antioksidan melalui donasi atom hidrogen dari antioksidan sehingga membentuk DPPH-H tereduksi (Molyneux, 2004).



Gambar 2. Reduksi DPPH dari senyawa peredam radikal bebas (Prakash *et al*, 2001)

Reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan menimbulkan perubahan warna yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515-520 nm pada pelarut organik (metanol atau etanol) (Molyneux, 2004). Penambahan antioksidan dengan berbagai konsentrasi akan menghilangkan warna ungu secara bertahap menjadi kuning sesuai besarnya konsentrasi zat antioksidan. Persen penghambatan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi dari ekstrak (Dehpour *et al.*, 2009).

Nilai % IC (*Inhibitor Concentration*) menunjukkan persen penangkapan DPPH oleh sampel uji. Aktivitas dihitung dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan penurunan konsentrasi larutan DPPH. Penurunan serapan tersebut dikarenakan oleh bereaksinya molekul *difenil pikrilhidrazil* (DPPH) dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh satu molekul komponen bahan uji,

sehingga terbentuk senyawa *difenil pikrihidrazin* yang berwarna kuning dan bersifat stabil (Molyneux, 2004).

IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50 %. IC₅₀ ini menunjukkan kekuatan antioksidan. Semakin kecil IC₅₀ maka semakin besar kekuatan antioksidan. IC₅₀ dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier.

Intensitas	Nilai IC ₅₀
Sangat kuat	< 50
Kuat	50 -100
Sedang	100 - 250
Lemah	250 – 500
Tidak Aktif	> 500

Sumber. Zuhra *et al* (2008)

Kelebihan dari metode DPPH adalah secara teknis simpel, dapat dikerjakan dengan cepat dan hanya membutuhkan spektrofotometer UV-Vis (Karadag *et al.*, 2009). Menurut Prakash (2001), metode DPPH ini mudah digunakan, cepat, cukup teliti, dan baik digunakan dalam pelarut organik.

II.6.2 Metode ABTS (2.2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat)

Metode ABTS merupakan metode uji untuk mengukur kapasitas antioksidan dengan menggunakan senyawa (2.2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat) sebagai sumber penghasil radikal

bebas yang secara langsung bereaksi atau meredam radikal kation ABTS yang dihasilkan dari reaksi kimia (Antolovich *et al.*, 2001)

ABTS merupakan radikal dengan pusat nitrogen dengan karakteristik warna biru kehijauan yang ketika tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk nonradikal yang tidak berwarna. Metode ini berdasarkan penghambatan pembentukan kation radikal ABTS dengan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 734 nm dengan spektrofotometer (Shivaprasad *et al.*, 2005).

II.6.3 Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

FRAP merupakan metode analisis yang biasa digunakan untuk mengukur kekuatan antioksidan dalam mereduksi Fe(III)-TPTZ menjadi Fe(II)-TPTZ dan terjadi perubahan warna dari kuning ke biru. TPTZ sendiri adalah *colorants* dan Fe(III) merupakan radikal bebas (Karadag *et al.*, 2009).

Pada pengujian FRAP idealnya sampel yang digunakan >3000 μ M dan dilarutkan pada air ataupun ethanol, dan dilakukan uji pengulangan dengan pengenceran bertahap untuk pengukuran nilai FRAP. Proses pengujian dilakukan pada pH asam dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 593 nm, menggunakan *diode-array spectrophotometer* (Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014).

Metode ini sendiri dianggap dapat mengukur kombinasi efek antioksidan dari molekul biologi bukan enzim. Selain itu juga memberikan indeks kemampuan untuk mengurangi efek oksidatif dari radikal bebas.

Biasanya uji digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan pada plasma dan fenol yang terekstraksi pada fasa aqueous atau methanol (Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014).

Sama seperti metode pengujian lain, pengujian ini menggunakan antioksidan standar yang sudah diketahui kemampuannya sebagai pembanding atau kombinasi interaksi antar keduanya. Contohnya adalah asam askorbat, α -tocopherol, dan bilirubin (Karadag *et al.*, 2009).

II.7 Microplate Reader (Elisa Reader)

Microplate reader adalah suatu spektrofotometer khusus yang disusun untuk membaca lempeng mikro (*microplate*). *Microplate reader* menggunakan prinsip spektrofotometri yang sama seperti metode konvensional, tetapi menghasilkan peningkatan jumlah sampel yang dapat dianalisis (Heredia, dkk, 2006).

Perbedaan dengan spektrofotometer konvensional yaitu *microplate reader* memiliki filter atau kisi-kisi difraksi yang membatasi rentang panjang gelombang yang digunakan dalam ELISA, umumnya antara 400 sampai 750 nm (nanometer). Beberapa *microplate reader* bekerja dalam rentang ultraviolet dan melakukan analisis antara 340-700 nm. Sistem optik yang dimanfaatkan oleh banyak produsen menggunakan serat optik untuk menyuplai cahaya untuk sumur lempeng mikro yang berisi sampel. Berkas cahaya yang melewati sampel memiliki diameter yang berkisar antara 1 sampai 3 mm. Suatu sistem deteksi mendeteksi cahaya yang berasal dari sampel, menguatkan sinyal dan menentukan absorbansi sampel.

Selanjutnya suatu sistem pembacaan mengubahnya menjadi data yang memungkinkan interpretasi hasil pengujian. Saat ini beberapa *microplate reader* menggunakan sistem berkas cahaya ganda (World Health Organization, 2008).