

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Kopi merupakan salah satu komoditas unggulan sektor perkebunan di Indonesia. Hingga akhir tahun 2023, luas perkebunan kopi nasional mencapai 1,268 juta hektar, meningkat dibandingkan tahun sebelumnya (BPS, 2023). Kopi yang dibudidayakan secara luas di dunia terdiri dari dua spesies utama, yaitu kopi robusta *Coffea canephora* L. dan kopi arabika *Coffea arabica* L. Indonesia merupakan salah satu produsen utama kedua jenis kopi ini, dengan kopi robusta mendominasi sekitar 72,84% dari total produksi nasional, sementara kopi arabika berkontribusi sekitar 27,16% (Foedinatha et al. 2021). Tanaman kopi robusta *Coffea canephora* L. merupakan spesies tanaman berkayu yang tergolong dalam famili Rubiaceae (Latunra, 2011). Keunggulan kopi robusta terletak pada produktivitas tinggi serta ketahanannya terhadap hama dan penyakit (Setiawan et al. 2015).

Seiring dengan meningkatnya permintaan kopi di pasar global, salah satu aspek penting yang perlu diperhatikan adalah regenerasi tanaman kopi unggul. Namun, tantangan utama yang sering dihadapi dalam budidaya kopi adalah keterbatasan ketersediaan bibit kopi robusta *Coffea canephora* L. Untuk mengatasi permasalahan tersebut, diperlukan inovasi dalam teknik perbanyakan tanaman, salah satunya melalui penerapan teknik kultur jaringan (Asmono et al. 2021). Dalam beberapa tahun terakhir, teknik kultur jaringan atau kultur *in vitro* semakin banyak diterapkan pada berbagai jenis tanaman, termasuk tanaman kopi. Teknik ini merupakan metode perbanyakan tanaman secara aseptik dengan cara mengisolasi bagian tertentu dari tanaman dan menumbuhkannya dalam lingkungan steril (Rismayanti et al. 2021). Teknik kultur jaringan tumbuhan didasarkan pada teori totipotensi sel, yaitu kemampuan sel tumbuhan untuk berproliferasi, membentuk jaringan, dan dapat berkembang menjadi individu tanaman utuh dalam kondisi kultur *in vitro*. Sifat ini diwariskan dan tetap ada meskipun sel telah mengalami diferensiasi final (Mastuti, 2017).

Salah satu indikator keberhasilan kultur *in vitro* adalah pembentukan kalus, yaitu kumpulan sel tidak terorganisir yang muncul pada jaringan yang mengalami luka. Proses ini diawali dengan pembengkakan dan pertambahan panjang eksplan, yang terjadi akibat kerusakan sel dan pelepasan senyawa pemicu pembelahan sel (Rismayanti et al. 2021). Meskipun efektif dalam perbanyakan tanaman, kultur jaringan dapat lebih kompleks dibandingkan dengan metode konvensional. Keberhasilannya dipengaruhi oleh faktor genetis, media tanam, dan kondisi lingkungan (Puslitkoka, 2016). Kultur jaringan dapat menghasilkan metabolit sekunder yang bernilai ekonomi tinggi, seperti alkaloid, saponin, cardenolid, antrakuinon, dan polifenol. Namun, penelitian terkait produksi metabolit sekunder pada kultur *in vitro* tanaman kopi masih terbatas. Kalus hasil *in vitro* yang mengalami *browning* sering dianggap sebagai indikator stres atau degradasi jaringan. Pada beberapa kasus, hal ini juga dapat menunjukkan akumulasi metabolit sekunder

seperti flavonoid. Kalus kopi berpotensi sebagai sumber polifenol salah satunya flavonoid yang tinggi, sehingga perlu dikaji lebih lanjut (Ardiyani et al. 2017).

Flavonoid merupakan antioksidan alami yang menetralkan radikal bebas, mencegah peroksidasi lipid, dan berpotensi mengatasi kondisi patofisiologis terkait radikal bebas. Dibandingkan antioksidan sintesis yang dapat bersifat toksik, flavonoid dari tumbuhan lebih aman dan minim efek samping, sehingga ekstraksinya menjadi penting (Nogueira, 2023). Kuersetin merupakan salah satu senyawa utama dari kelompok flavonoid yang dikenal memiliki berbagai aktivitas biologis. Aktivitas tersebut terutama berkaitan dengan sifat antioksidan kuersetin, yakni kemampuannya dalam menetralkan radikal bebas serta spesies oksigen reaktif seperti anion superoksida dan radikal hidroksil. Kuersetin diketahui memiliki potensi sebagai agen antioksidan, antikanker, antialergi, antivirus, serta mampu membantu dalam pengelolaan diabetes, hipertensi, dan peradangan. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa senyawa flavonoid alami lainnya, seperti kaempferol, morin, dan myricetin, memiliki kemampuan perlindungan yang berbeda-beda terhadap penurunan kadar α -tokoferol dalam lipoprotein densitas rendah (LDL). (Sukmawati et al. 2019). Secara fitokimia, daun kopi robusta mengandung berbagai senyawa bioaktif, seperti alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol, yang berpotensi memberikan manfaat fisiologis dan farmakologis (Setiawan et al. 2015). Namun potensi kandungan flavonoid pada kalus kopi masih jarang diteliti. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk membandingkan kadar kuersetin pada daun dan kalus kopi robusta.

Dalam memperoleh kandungan kuersetin, dari sampel daun dan kalus kopi robusta, diperlukan proses ekstraksi yang efektif. Ekstraksi adalah proses pemisahan komponen menggunakan suatu pelarut. Salah satu metode ekstraksi yang paling banyak digunakan adalah maserasi. Maserasi adalah metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam bahan dalam pelarut dan menggunakan prinsip pencapaian kesetimbangan konsentrasi (Fauziyah et al. 2022). Salah satu cara untuk mengukur kadar flavonoid adalah dengan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Prinsip dasar HPLC didasarkan pada proses adsorpsi dinamis, di mana molekul analit bergerak melalui celah berpori dan berinteraksi dengan fase diam dalam kolom, sehingga terjadi pemisahan senyawa. Teknik ini memiliki beberapa keunggulan, seperti waktu analisis yang cepat, kebutuhan sampel yang kecil, kemampuan menganalisis senyawa organik maupun anorganik, serta penggunaan ulang kolom. Keberhasilan analisis dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk komposisi fase gerak, laju alir, dan penambahan asam (Abriyani et al. 2024).

Penelitian mengenai kandungan flavonoid pada daun kopi telah banyak dilakukan, namun studi yang secara khusus menganalisis kadar flavonoid pada kalus kopi Robusta *Coffea canephora* L. masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kadar flavonoid antara daun dan kalus kopi Robusta sehingga dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan riset di bidang ini.

1.2 Tujuan

1. Untuk menganalisis perbandingan kadar kuersetin antara daun dan kalus kopi robusta *Coffea canephora* L.
2. Untuk mengevaluasi efisiensi metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dalam kuantifikasi kuersetin dari daun dan kalus kopi robusta *Coffea canephora* L.

1.3 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini dilakukan untuk menambah wawasan bagi peneliti dan masyarakat serta memberikan informasi ilmiah mengenai kandungan kuersetin pada kalus dan daun kopi robusta *Coffea canephora* L. yang dapat dijadikan referensi untuk penelitian lanjutan di bidang bioteknologi tanaman, fitokimia dan farmakologi.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2024-Maret 2025. Bertempat Di Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Biologi, Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi, dan Laboratorium Biofarmaka Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan adalah botol kultur, rak kultur, timbangan analitik, pinset, pisau dan scalpel, beaker glass, erlenmeyer, corong, gelas ukur, labu ukur, gelas piala, tabung reaksi, botol vial, pipet tetes, micropipet, toples, oven, blender, mortar, handspray, membran filter 0,45 µm, ATK dan kamera, kolom C-18 serta alat *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Kopi Robusta *Coffea canephora* L., kalus tanaman Kopi Robusta *Coffea canephora* L. yang telah mengalami *browning*, larutan kuersetin baku, etanol 96%, metanol HPLC grade, *aqua for injection*, spoit 1 cc, white tip, blue tip, yellow tip, aluminium foil, tissue, kertas label, plastic seal, cling warp, dan plastik sampel.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Lokasi dan Tahap Penyiapan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di Desa Labbo, Kecamatan Tompobulu, Kabupaten Bantaeng, Sulawesi Selatan. Sampel yang digunakan berupa daun yang berada dalam fase pertumbuhan menengah, yaitu daun pada urutan kedua hingga kelima dari pucuk. Kriteria daun yang dipilih adalah daun yang masih dalam kondisi baik, ditandai dengan warna hijau segar, serta tidak mengalami kerusakan atau serangan hama. Sampel daun dipotong menggunakan gunting, kemudian dimasukkan ke dalam plastik sampel. Selanjutnya, sampel dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan debu dan kotoran, lalu dikeringkan dengan menggunakan oven. Adapun sampel kalus yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalus yang telah tersedia di Laboratorium Kultur Jaringan.

2.3.2 Ekstraksi Sampel Daun dan Kalus Kopi Robusta *Coffea canephora* L.

Ekstraksi serbuk daun dan kalus kopi robusta *Coffea canephora* L. dilakukan menggunakan metode maserasi. Sampel daun segar sebanyak 300 gram dan kalus sebanyak 27 gram terlebih dahulu dikeringkan pada suhu 40–60°C menggunakan oven hingga kadar air menurun, kemudian dihaluskan menggunakan grinder untuk memperoleh serbuk simplisia. Sebanyak 70 gram serbuk daun dan 13 gram serbuk

kalus masing-masing direndam dalam etanol 96% dengan perbandingan volume 1:5 (serbuk terhadap pelarut). Proses perendaman dilakukan selama 3×24 jam dalam kondisi terlindung dari cahaya dengan pengadukan sesekali untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi. Setelah perendaman pertama, campuran disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan larutan ekstrak dari ampas. Ampas yang diperoleh kemudian menjalani proses perendaman ulang dalam etanol 96% dengan kondisi yang sama selama 3×24 jam disertai pengadukan sesekali untuk memperoleh ekstrak tambahan. Larutan ekstrak hasil penyaringan kedua digabungkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga volume pekat diperoleh, sehingga menghasilkan maserat ekstrak (Hakim et al. 2023).

2.3.3 Uji Kualitatif dengan dengan Teknik *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Uji kualitatif kuersetin dilakukan dengan metode HPLC berdasarkan retention time (RT). Sampel sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 1000 ppm ditambahkan metanol HPLC grade sebanyak 1 mL ke dalam botol vial berukuran 2 mL. Selanjutnya botol vial dimasukkan ke dalam *autosampler trays* pada alat HPLC kemudian diperhatikan luas area dan retention time (RT) pada layar komputer. Apabila perbandingan antara retention time (RT) baku kuersetin dan sampel berada pada range yang sama atau mendekati maka dapat dipastikan pada terdapat senyawa kuersetin pada sampel (Sukmawati et al. 2019).

2.3.4 Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak disiapkan dengan mencampurkan metanol HPLC grade dan *aqua for injection* dalam rasio 59:41. Campuran tersebut kemudian disaring menggunakan membran filter berukuran $0,45 \mu\text{m}$, lalu dilakukan proses sonikasi selama 15 menit (Sukmawati et al. 2019).

2.3.5 Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Sebanyak 10 mg kuersetin ditakar secara akurat kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu dilarutkan dengan metanol HPLC grade hingga mencapai tanda batas, sehingga diperoleh larutan kuersetin dengan konsentrasi 1000 ppm (Sukmawati et al. 2019).

2.3.6 Pembuatan Kurva Baku

Kurva baku disusun dengan terlebih dahulu menyiapkan larutan stok kuersetin berkonsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, sebanyak 25, 50, 100, 200, dan 400 μL larutan stok diambil dan dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur 10 mL, kemudian diencerkan hingga tanda batas menggunakan metanol HPLC grade untuk menghasilkan larutan standar dengan konsentrasi 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, dan 40 ppm. Setiap larutan standar kemudian disaring menggunakan filter membran berpori $0,45 \mu\text{m}$ dan disonikasi selama 10 menit. Setelah itu, masing-masing 2 mL larutan dimasukkan ke dalam vial dan ditempatkan pada *autosampler trays* (Sukmawati et al. 2019).

2.3.7 Uji Kuantitatif dengan Teknik *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Sebanyak 10 mg sampel ekstrak ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur berkapasitas 10 mL. Selanjutnya, pelarut metanol HPLC grade ditambahkan hingga mencapai tanda batas. Larutan yang diperoleh kemudian disaring menggunakan membran filter 0,45 μm . Setelah itu, sebanyak 1 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam vial lalu ditambahkan 1 mL metanol HPLC grade. Setelah itu, vial dimasukkan dalam *autosampler trays* untuk diuji pada panjang gelombang 370 nm dengan laju alir 1 mL/menit. Fase gerak yang digunakan berupa campuran metanol dan air dengan perbandingan 59:41. Analisis dilakukan menggunakan kolom C-18 dan pada suhu 30°C (Sukmawati et al. 2019). Konsentrasi dapat dihitung dengan menggunakan luas area sampel pada sumbu y dari persamaan regresi $y = bx + a$.

2.3.8 Analisis Data

Hasil pengukuran deret standar dibuat kurva antara konsentrasi larutan standar kuersetin dengan luas area yang diperoleh sehingga akan dihasilkan persamaan regresi linier $y = bx + a$. Persamaan regresi linier ini digunakan untuk menghitung kadar kuersetin ($\mu\text{g/ml}$) dengan memasukkan luas area ekstrak sebagai nilai Y ke dalam persamaan (Sukmawati et al. 2019).