

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kopi *Coffea* sp. merupakan salah satu minuman yang banyak digemari dan telah menjadi bagian dari budaya di berbagai belahan dunia, termasuk di Indonesia. Selain dikonsumsi sebagai minuman penyegar, kopi juga berpotensi sebagai bahan baku dalam industri farmasi. Kopi memiliki aroma serta cita rasa khas dibandingkan dengan minuman lainnya yang menjadikan kopi cukup menarik untuk dikaji lebih lanjut (Sholikhati et al., 2023). Kopi terdiri dari beberapa jenis, di antaranya kopi Arabika, Robusta, Liberika, dan Excelsa. Varietas kopi yang banyak dikembangkan di Indonesia adalah Arabika dan Robusta, menyesuaikan dengan kondisi iklim di wilayah pengembangannya (Edowai, 2019). Kopi Arabika *Coffea arabica* L. merupakan salah satu tanaman yang banyak dibudidayakan di Indonesia yang memiliki aroma khas yang menyerupai jeruk serta cita rasa yang lebih dominan asam dibandingkan rasa pahit (Sholikhati et al., 2023). Kopi Arabika *Coffea arabica* L. memiliki berbagai aktivitas farmakologis, seperti sebagai agen antiinflamasi, antihiperlikemik, antiselulit, antihiperurisemia, antimikroba, dan antioksidan (Muharam dan Sriwidodo, 2022). Daun kopi Arabika *Coffea arabica* L. diketahui mengandung senyawa metabolit, salah satunya ialah senyawa flavonoid, yang berpotensi sebagai antioksidan alami dengan kemampuan menghambat radikal bebas (Puspitasari et al., 2017). Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik terbesar yang ditemukan di alam, terdiri dari berbagai jenis seperti antosianidin, biflavan, katekin, flavanon, flavon, dan flavonol. Pada tumbuhan, kandungan flavonoid dapat berperan sebagai zat pengatur tumbuh, dapat mengatur proses fotosintesis, serta memiliki aktivitas sebagai antimikroba, antivirus, dan antiinsektisida (Salim et al., 2021).

Salah satu metode untuk memperoleh metabolit sekunder tanpa harus mengambil tanaman di alam secara langsung dalam jumlah besar adalah melalui teknik kultur jaringan. Kultur jaringan merupakan suatu metode penanaman protoplas, sel, jaringan, atau organ tanaman pada media buatan dalam kondisi aseptik, yang memungkinkan regenerasi menjadi tanaman utuh dengan sifat yang identik dengan induknya (Wahyuni et al., 2020). Keberhasilan suatu kultur jaringan dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain eksplan, media yang digunakan, maupun kondisi lingkungan. Faktor media dipengaruhi oleh komposisi nutrisi yang terkandung di dalamnya. Media tanam menjadi salah satu faktor penting dalam kultur jaringan karena mengandung makronutrien dan mikronutrien dalam bentuk garam anorganik dengan kadar serta perbandingan tertentu, serta dilengkapi dengan sumber karbohidrat, air, asam amino, vitamin, dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang dapat memenuhi kebutuhan eksplan agar dapat bertahan hidup dan berkembang secara optimal. Media kultur jaringan juga mengandung sumber energi, umumnya dalam bentuk glukosa (Apriliyana dan Wahidah, 2021).

Eksplan yang ditanam pada media kultur jaringan dapat mengalami pembentukan kalus. Kalus merupakan kumpulan sel yang bersifat amorf (tidak berbentuk atau belum terdiferensiasi) dan terbentuk melalui pembelahan sel yang berlangsung secara terus-menerus dalam kondisi *in vitro*. Kalus dapat diperoleh dari berbagai bagian tanaman, seperti akar, batang, dan daun. Berdasarkan hasil penelitian, kalus dapat dikategorikan ke dalam tiga kelompok berdasarkan warnanya, yaitu kalus berwarna kekuningan, putih kekuningan, dan putih. Kalus dengan warna kekuningan dan putih kekuningan dikategorikan sebagai kalus embriogenik, sedangkan kalus berwarna putih termasuk dalam jenis kalus non-embriogenik. Proses pembentukan kalus pada eksplan diawali dengan munculnya kalus yang bersifat remah di sekitar area bekas sayatan. Kalus berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butiran pati yang tinggi (Faramayuda et al., 2016). Kultur jaringan memiliki berbagai manfaat, antara lain mempertahankan sifat genetik tanaman induk, memproduksi tanaman bebas virus, serta memungkinkan produksi metabolit sekunder tanpa perlu menunggu tanaman mencapai fase dewasa (Kurnianingsih et al., 2020). Penerapan teknik kultur jaringan memberikan keuntungan dalam produksi flavonoid sebagai metabolit sekunder, karena tidak lagi bergantung pada ketersediaan tanaman sumber di alam. Selain itu, senyawa aktif yang dihasilkan melalui kultur jaringan cenderung lebih murni, karena terbebas dari kontaminasi oleh mikroorganisme

Analisis kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan melalui teknik kultur jaringan, diperlukan metode ekstraksi yang tepat untuk memperoleh senyawa target, seperti flavonoid, dari daun dan kalus. Ekstraksi dan isolasi senyawa target merupakan tahap yang paling krusial dalam pemrosesan bahan baku tumbuhan (Tzanova dkk., 2020). Pada metode ekstraksi, pemilihan pelarut yang sesuai sangat penting untuk memisahkan senyawa target dari campurannya. Proses ekstraksi akan berlangsung hingga tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dan dalam sampel, setelah itu ekstraksi dihentikan (Sholikhati et al., 2023). Ekstraksi flavonoid dilakukan dengan prinsip yang serupa dengan ekstraksi polifenol. Proses ini umumnya menggunakan pelarut seperti metanol, etanol, asetonitril, aseton, atau kombinasi pelarut tersebut dengan air. Pemilihan pelarut bergantung pada tingkat polaritas flavonoid yang akan diekstrak. Flavonoid dengan struktur kurang polar, seperti isoflavon, flavanon, dan flavon, pelarut yang sesuai meliputi aseton, kloroform, metilen klorida, dan dietil eter. Sementara itu, untuk flavonoid yang lebih polar, umumnya digunakan alkohol atau campuran alkohol dan air sebagai pelarut. Metode ekstraksi umumnya seperti maserasi, refluks, dan ekstraksi Soxhlet (Tzanova et al., 2020).

Setelah proses ekstraksi flavonoid dilakukan, tahap selanjutnya adalah analisis senyawa yang diperoleh untuk menentukan jenis dan kadar flavonoid yang terkandung dalam sampel. Salah satu metode yang umum digunakan untuk analisis ini adalah *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC), yang dikenal karena kemampuannya dalam memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur senyawa dengan presisi tinggi. *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

merupakan metode analisis yang sensitif dan akurat dalam mengidentifikasi serta memisahkan senyawa kompleks. Teknik ini bekerja berdasarkan prinsip pemisahan komponen dalam campuran cairan berdasarkan polaritasnya, dengan menerapkan tekanan tinggi untuk mendorong sampel cairan melalui kolom berisi partikel berukuran kecil. Proses ini memungkinkan pemisahan komponen yang kemudian terdeteksi dan direkam dalam bentuk kromatogram (Hidayah et al., 2024).

Berdasarkan berbagai penelitian yang telah dilakukan, analisis kandungan flavonoid pada daun kopi telah banyak dikaji sebelumnya. Namun, studi yang secara spesifik meneliti kandungan flavonoid pada subkultur kalus kopi Arabika *Coffea arabica* L. masih belum ditemukan. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk memperoleh informasi yang lebih mendalam mengenai perbandingan kandungan flavonoid yang terdapat pada kalus dan kopi Arabika *Coffea arabica* L., sehingga dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan penelitian di bidang ini.

### **1.2 Tujuan**

1. Untuk menganalisis perbandingan kandungan kuersetin antara kalus dan daun kopi Arabika *Coffea arabica* L.
2. Untuk menentukan efektivitas metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dalam mengidentifikasi dan mengukur kandungan senyawa kuersetin pada sampel kalus dan daun kopi Arabika *Coffea arabica* L.

### **1.3 Manfaat**

Penelitian ini memberikan manfaat dalam menambah wawasan ilmiah, baik bagi peneliti maupun masyarakat umum, terkait kandungan kuersetin, pada jaringan kalus dan daun tanaman kopi Arabika *Coffea arabica* L. Informasi yang dihasilkan diharapkan dapat menjadi referensi yang relevan untuk pengembangan penelitian selanjutnya yang berkontribusi dalam pemanfaatan senyawa bioaktif kopi Arabika *Coffea arabica* L. untuk kepentingan farmakologi maupun industri kesehatan.

## **BAB II**

### **METODE PENELITIAN**

#### **2.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-April 2025. Bertempat Di Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Biologi, Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, dan Laboratorium Biofarmaka Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan.

#### **2.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **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, tabung reaksi, botol vial, pipet tetes, micropipet, toples, oven, blender, mortar, handspray, membran filter 0,45  $\mu\text{m}$ , ATK, kolom C-18 serta *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

##### **2.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Kopi Arabika *Coffea arabica* L., kalus tanaman Kopi Arabika *Coffea arabica* 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 saring, kertas label, *cling wrap*, latex, 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. Penelitian ini menggunakan data primer, di mana sampel diperoleh secara langsung di lapangan. 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 cara diangin-anginkan di tempat teduh guna mempertahankan kandungan bahan aktifnya. Adapun sampel kalus yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalus yang telah mengalami proses *browning*.

### 2.3.2 Ekstraksi Sampel Kalus dan Daun Kopi Arabika *Coffea arabica* L.

Ekstraksi serbuk kalus dan daun kopi arabika *Coffea arabica* L. dilakukan menggunakan metode maserasi. Kalus kopi sebanyak 27 g dan daun kopi sebanyak 300 g dikeringkan terlebih dahulu menggunakan oven pada suhu 40–60°C, kemudian masing-masing dihaluskan menggunakan *grinder blending mill*. Sebanyak 17 g serbuk simplisia kalus direndam dengan 85 mL etanol 96%, sedangkan 70 g serbuk simplisia daun direndam dengan 350 mL etanol 96%, masing-masing dengan perbandingan 1:5, hingga seluruh permukaan serbuk terendam sempurna. Campuran tersebut didiamkan selama 3 × 24 jam dalam kondisi terlindung dari cahaya, dengan pengadukan sesekali. Setelah proses perendaman pertama, campuran serbuk daun kopi arabika *Coffea arabica* L. dan etanol 96% disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan larutan ekstrak dari ampasnya. Ampas yang diperoleh kemudian direndam kembali dengan etanol 96% sebanyak 350 mL dan didiamkan selama 3 × 24 jam dengan pengadukan sesekali. Penyaringan kembali dilakukan untuk memperoleh larutan ekstrak tambahan. Selanjutnya, maserat yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh sampel yang pekat (Kurniawati et al., 2024).

### 2.3.3 Uji Kualitatif Menggunakan Metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Uji kualitatif flavonoid 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 (Kurniawati et al., 2024).

### 2.3.4 Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan terdiri dari campuran metanol HPLC *grade* dan *aqua for injection* dengan perbandingan 59:41. Campuran tersebut kemudian difiltrasi menggunakan membran filter 0,45 µm untuk menghilangkan partikel-partikel halus yang dapat mengganggu proses pemisahan. Setelah proses filtrasi, larutan fase gerak selanjutnya disonifikasi menggunakan alat ultrasonik selama 15 menit guna menghilangkan gelembung udara dan memastikan homogenitas larutan sebelum digunakan dalam analisis kromatografi (Husnia dan Budiarti., 2021).

### 2.3.5 Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Sebanyak 10 mg kuersetin ditimbang secara cermat menggunakan timbangan analitik untuk memastikan ketepatan massa yang digunakan. Selanjutnya, kuersetin tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur dengan kapasitas 10 mL. Pelarutan dilakukan dengan menambahkan metanol HPLC *grade* secara bertahap hingga kuersetin larut sempurna, kemudian volume larutan ditambahkan

hingga mencapai tanda batas pada labu ukur. Dengan demikian, diperoleh larutan stok kuersetin dengan konsentrasi akhir sebesar 1000 ppm, yang selanjutnya digunakan sebagai larutan standar dalam analisis (Husnia dan Budiarti., 2021).

### **2.3.6 Pembuatan Kurva Baku**

Pembuatan kurva baku dimulai dengan menyiapkan larutan baku kuersetin 1000 ppm. Selanjutnya, dibuat kurva baku dengan cara memipet 25, 50, 100, 200, dan 400  $\mu\text{L}$  ke dalam labu takar 10 mL, kemudian dilarutkan menggunakan metanol HPLC *grade* hingga tanda batas, sehingga diperoleh deret standar 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm 20 ppm dan 40 ppm. Masing-masing larutan standar disaring menggunakan membran filter 0,45  $\mu\text{m}$  dan disonifikasi selama 10 menit. Sebanyak 2 ml masing-masing larutan baku dimasukkan dalam vial dan selanjutnya dimasukkan dalam *autosampler trays* (Sukmawati et al., 2019).

### **2.3.7 Uji Kuantitatif Menggunakan Metode *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  $\mu\text{m}$ . Setelah itu, sebanyak 1 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam vial lalu ditambahkan 1 mL metanol HPLC *grade* dan didapatkan konsentrasi sampel 500 ppm. 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 pada suhu kolom 30°C. Konsentrasi dapat dihitung dengan menggunakan luas area sampel pada sumbu y dari persamaan regresi  $y = bx + a$  (Husnia dan Budiarti., 2021).

### **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 (mg/g) dengan memasukkan luas area ekstrak sebagai nilai Y ke dalam persamaan (Munthe et al., 2019).