

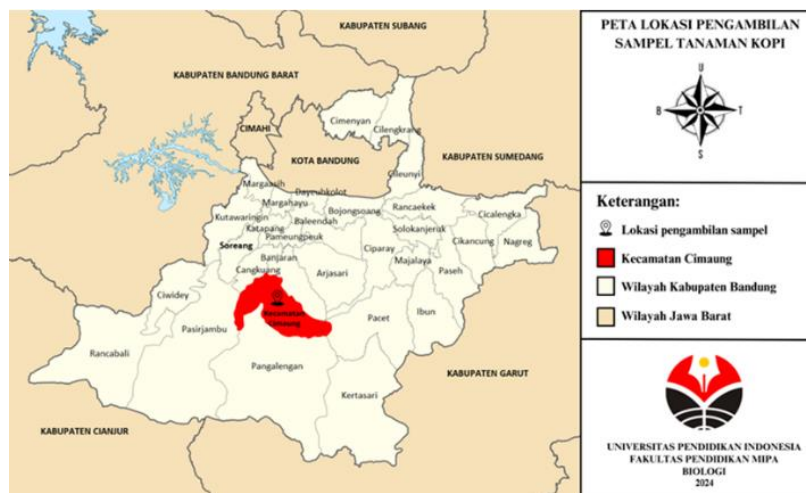
BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

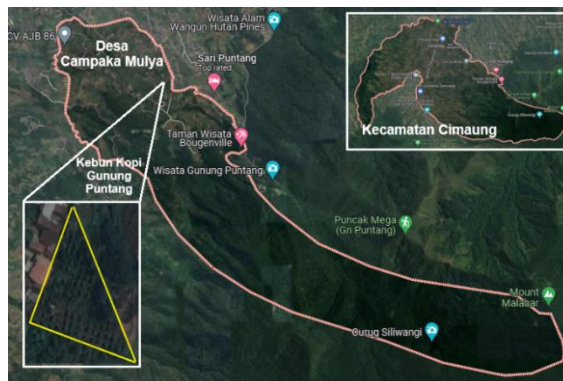
Penelitian yang dilakukan berjenis penelitian deskriptif. Fokus utama dari jenis penelitian ini adalah menguraikan individu, peristiwa, atau kondisi dengan mempelajarinya sebagaimana adanya dan berfokus pada deskripsi yang akurat dari objek yang diteliti sehingga tidak menguji hipotesis tertentu (Siedlecki, 2020). Penelitian ini menunjukkan kandungan metabolit ekstrak *cascara* kedua kultivar dengan dua cara pengeringan berbeda menggunakan analisis GC-MS.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Desember 2023 – Juli 2024 yang mencakup survei lokasi pengambilan sampel hingga analisis data. Lokasi pengambilan *cascara* kopi dilakukan di lahan Kebun Kopi Gunung Puntang, Jalan Raya Gunung Puntang, Desa Campakamulya, Kecamatan Cimaung, Kabupaten Bandung, Jawa Barat (Gambar 3.1 dan Gambar 3.2). Pengeringan *cascara* dilakukan di rumah penulis yang berlokasi di Jalan Jati Jaya, Desa Margaasih, Kecamatan Margaasih, Kabupaten Bandung. Tahapan persiapan dan pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Proses analisis GC-MS dari ekstrak yang telah didapatkan dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik Badan Reserse Kriminal Kepolisian Negara Republik Indonesia, Sentul, Kabupaten Bogor.



Gambar 3.1. Peta Lokasi Pengambilan *Cascara*



Gambar 3.2. Peta Lokasi Kebun Kopi Gunung Puntang (Google Maps, 2023)

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu pengambilan *cascara*, pengambilan data faktor abiotik lingkungan, proses pengeringan *cascara*, pembuatan ekstrak, analisis senyawa metabolit pada ekstrak *cascara* menggunakan GC-MS, dan analisis data metabolit yang dihasilkan.

3.3.1 Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan bagian eksokarp dan mesokarp (*cascara*) pada buah kopi matang (Gambar 3.3) dari tanaman kopi arabika kultivar Typica dan Sunda (Gambar 3.4) yang dibudidayakan di Kebun Kopi Gunung Puntang.



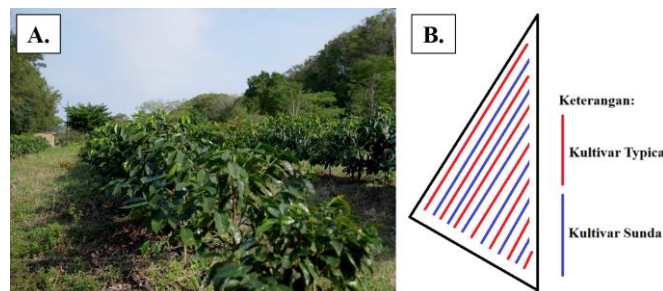
Gambar 3.3. Bagian Buah Kopi Arabika yang Masih Segar

3.3.2 Pengambilan *Cascara*

Kebun Kopi Gunung Puntang (Gambar 3.5) memiliki luas lahan sebesar dua hektar. Jumlah populasi pohon kopi adalah 1680 kultivar Typica dan 1640 kultivar Sunda. Buah kopi didapatkan dari tanaman sampel yang memiliki buah berwarna merah yang sudah siap panen, mencakup sekitar 50% dari populasi masing-masing kultivar. Pengambilan buah kopi dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*). Buah ditempatkan ke dalam wadah terpisah sesuai kultivarnya untuk kemudian dipisahkan *cascara* dari bagian buah lain serta biji kopi.



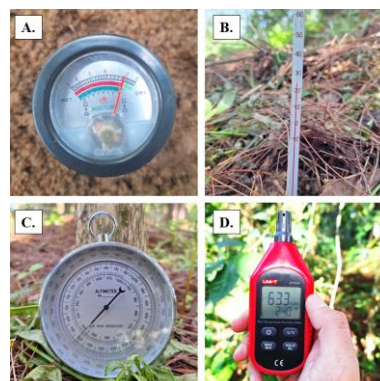
Gambar 3.4. Pohon Kopi Arabika di Kebun Kopi Gunung Puntang Kultivar Typica (A) dan Sunda (B)



Gambar 3.5. Lahan Pengambilan Sampel (A) dan Denah Penanaman Kultivar (B)

3.3.3 Pengukuran Faktor Abiotik

Data faktor-faktor abiotik diukur pada lahan tumbuh dari kultivar kopi arabika yang menjadi sampel. Faktor-faktor yang diukur meliputi faktor edafik yang terdiri dari tingkat keasaman atau pH tanah, kelembapan dan suhu tanah, serta materi organik tanah (MOT), sementara faktor klimatik mencakup ketinggian tempat, suhu udara, dan kelembapan udara. *Soil tester* dilakukan untuk mengukur pH dan kelembapan tanah (Gambar 3.6A). Pengukuran suhu tanah dilakukan menggunakan termometer (Gambar 3.6B). Ketinggian tempat tumbuh tanaman kopi diukur pada lahan tumbuh menggunakan altimeter (Gambar 3.6C). Suhu dan kelembapan udara diukur menggunakan termohigrometer digital (Gambar 3.6D).



Gambar 3.6. Pengukuran Faktor-faktor Abiotik di Kebun Kopi Menggunakan *Soil Tester* (A), Termometer (B), Altimeter (C), dan Termohigrometer (D)

Kandungan materi organik tanah (MOT) dianalisis menggunakan metode Walkley-Black berdasarkan Brower dkk. (1998). Sampel tanah dari kebun kopi dikeringkan menggunakan oven pada suhu 100 °C dengan durasi 24 jam. Tanah kering disaring hingga ukuran 0,2 mm dan ditimbang hingga 0,5 g. Tanah dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer berukuran 500 ml, lalu ditambahkan sebanyak 10 ml $K_2Cr_2O_7$ 1N dan 20 mL H_2SO_4 pekat. Campuran diaduk selama satu menit secara perlahan, lalu dibiarkan selama 30 menit. Pengenceran campuran dilakukan dengan menambahkan akuades hingga 200 mL. Campuran kemudian ditambah dengan 10 mL H_3PO_4 85% dan 0,2 gram NaF, serta 30 tetes indikator difenilamin. Titrasi campuran dilakukan menggunakan ferro amonium sulfat sampai diamati perubahan campuran menjadi warna hijau kristal (Gambar 3.7).



Gambar 3.7. Titrasi Uji Materi Organik Tanah (MOT)

3.3.4 Persiapan *Cascara*

Buah kopi dari kedua kultivar masing-masing dicuci bersih menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan bahan asing lainnya. Pengupasan *cascara* (eksokarp dan mesokarp buah kopi) dilakukan menggunakan mesin pengupas kulit kopi sehingga terpisah *cascara* dan biji kopi (Gambar 3.8A). Bagian lain yang masih melekat pada *cascara*, seperti tangkai buah dan sisa biji dipisahkan secara manual. Berat basah *cascara* kemudian ditimbang (Gambar 3.8B). Sebanyak 1 kilogram *cascara* untuk masing-masing kultivar dan proses pengeringan disimpan di tempat tertutup pada suhu -20 °C hingga pengeringan dilakukan.

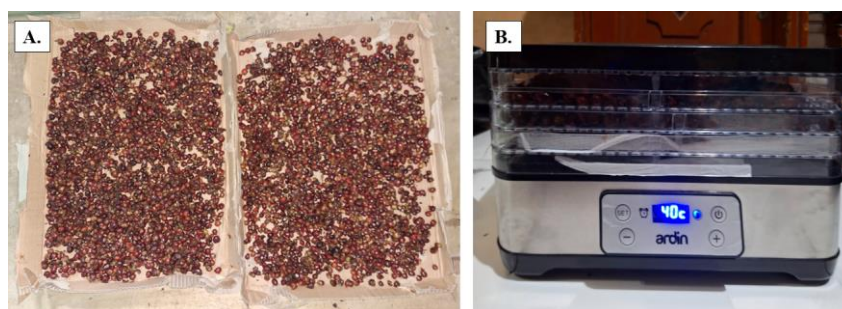


Gambar 3.8. Persiapan *Cascara*
Pemisahan Biji Kopi (A) dan Penimbangan Berat Basah *Cascara* (B)

3.3.5 Pengerinan

Pengerinan *cascara* kopi menggunakan dua metode pengerinan berbeda hingga didapatkan berat konstan. Penentuan kondisi pengerinan untuk masing-masing metode dilakukan melalui studi literatur. Pengerinan oleh sinar matahari didasarkan pada penelitian Hu dkk. (2023). *Cascara* disebar secara merata di atas baki yang ditempatkan di bawah paparan matahari tanpa penghalang dengan durasi harian 10 jam (07.00–17.00 WIB) (Gambar 3.9A). Suhu dan kelembapan udara serta intensitas cahaya pada saat pengerinan diukur sebanyak tiga kali sehari dengan interval 5 jam. Setiap pengerinan harian selesai, *cascara* ditimbang beratnya lalu dipindahkan ke tempat tertutup, sebelum dilanjutkan pengerinan pada hari selanjutnya hingga berat kering konstan.

Pengerinan dehidrator dilakukan menggunakan alat dengan spesifikasi ARD-PM99, 300W, 220V, rentang suhu operasi 35–60 °C. Prosedur pengerinan dilakukan menurut penelitian Indrayani dkk. (2022). *Cascara* disebar merata pada setiap *tray* dehidrator, lalu suhu dijaga konstan pada 40 °C menggunakan setelan alat hingga didapatkan berat konstan (Gambar 3.9B). Penimbangan berat dilakukan setiap 12 jam, diikuti dengan pemindahan *tray* agar kekeringan merata. Masing-masing *cascara* kering dihaluskan menjadi bubuk simplisia menggunakan *blender*, lalu disaring menggunakan saringan berukuran 100 *mesh*. Bubuk simplisia kering kemudian disimpan di dalam wadah kedap udara dan kondisi gelap.



Gambar 3.9. Pengerinan *Cascara* Menggunakan Matahari Langsung (A) dan Dehidrator (B)

3.3.6 Ekstraksi

Simplisia kering dari *cascara* diekstraksi menggunakan metode maserasi. Proses ekstraksi dengan maserasi dilakukan menurut penelitian Lestari dkk. (2023) dan Utami dkk. (2022). Pelarut yang digunakan adalah etanol p. a. 70% dengan rasio 1:10 antara gram berat simplisia dan mililiter volume etanol. Serbuk kering

simplisia sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, lalu ditambahkan 200 mL etanol 70% (Gambar 3.10). Larutan diaduk, kemudian labu ditutup rapat dan dibungkus dengan *aluminium foil* untuk menghindari cahaya. Maserasi dilakukan dengan durasi 7 x 24 jam. Proses pengadukan campuran maserasi menggunakan *shaker* 150 rpm dilakukan setiap 24 jam (Gambar 3.11).

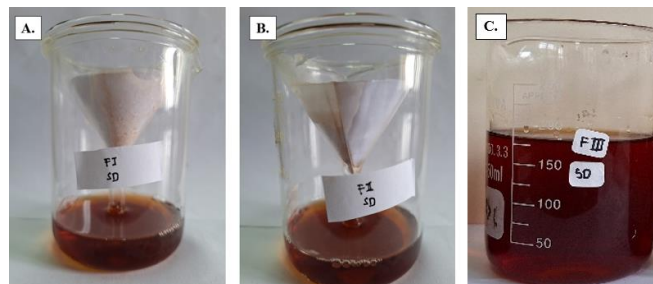


Gambar 3.10. Campuran Serbuk Simplisia dengan Pelarut Etanol P. A. 70%



Gambar 3.11. Maserasi dan Pengadukan Menggunakan *Shaker*

Proses filtrasi dilakukan berdasarkan penelitian Chairunnisa dkk. (2019). Penyaringan larutan hasil ekstraksi dilakukan menggunakan kertas saring dengan spesifikasi Whatman No. 1 (Gambar 3.12) sehingga mendapatkan filtrat pertama dan ampasnya. Sebanyak 50 ml etanol p.a. 70% ditambahkan untuk melarutkan ampas, lalu dicampur menggunakan *shaker* selama 5 menit, serta disaring kembali dengan kertas saring dengan spesifikasi yang sama untuk mendapatkan filtrat kedua. Kedua filtrat dicampur dan kembali disaring oleh kertas saring berspesifikasi serupa sehingga filtrat terakhir didapatkan. Proses penguapan filtrat didasarkan pada penelitian Hassan dkk. (2022). Filtrat diuapkan menggunakan *water bath* bersuhu 40 °C hingga memperoleh ekstrak pekat dengan konsistensi seperti pasta. Hasil ekstrak lalu disimpan di dalam botol tertutup (Gambar 3.13) pada suhu 4 °C hingga proses analisis GC-MS dilakukan.



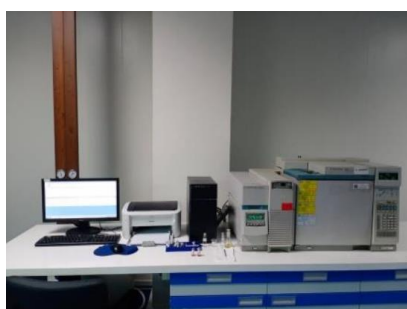
Gambar 3.12. Filtrasi Ekstrak *Cascara* pada Tahap Pertama (A) dan Kedua (B), serta Hasil Filtrat Terakhir (C)



Gambar 3.13. Ekstrak Kental *Cascara*

3.3.7 Analisis *Gas Chromatography – Mass Spectroscopy* (GC–MS)

Analisis metabolit dilakukan di Puslabfor Bareskrim Polri menggunakan alat GC–MS dengan merek Agilent 5973 (Gambar 3.14). Spesifikasi kolom yang digunakan adalah tipe Agilent 190915-433UI HP-5MS, dengan dimensi panjang 30 m, ketebalan 0,25 μm , serta diameter 250 μm . Jenis gas pembawa pada analisis ini adalah helium yang memiliki laju aliran 1 mL/menit. Ekstrak etanol *cascara* sebanyak 1 μL diinjeksikan ke dalam alat. Temperatur diatur pada rentang 60 $^{\circ}\text{C}$ sampai 290 $^{\circ}\text{C}$ yang memiliki laju peningkatan 15 $^{\circ}\text{C}/\text{menit}$. Instrumen pendeteksi dari spektrofotometer massa diatur pada rentang 35-650 m/z.



Gambar 3.14. Alat *Gas Chromatography – Mass Spectrometry* Agilent 5973 (Komunikasi Pribadi, 2024)

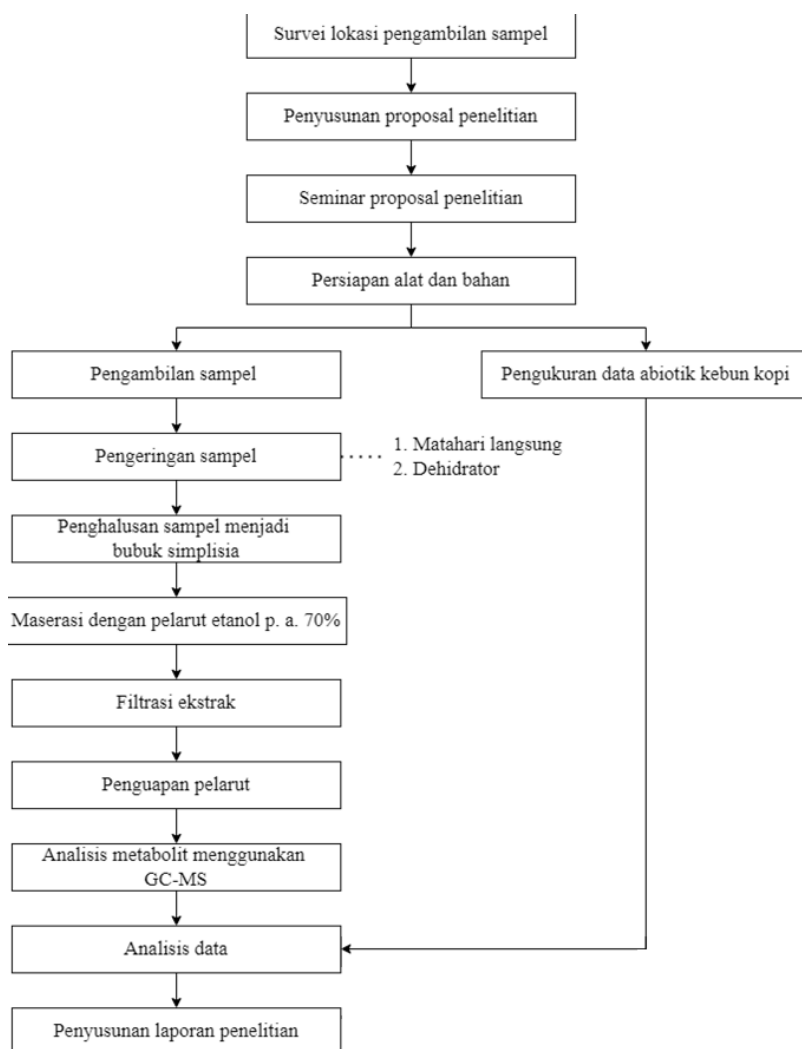
3.3.8 Analisis Data Metabolit

Hasil analisis metabolit menggunakan GC-MS menghasilkan data berbentuk grafik kromatogram yang menampilkan jenis senyawa dan intensitas puncak, yang mencerminkan luas area deteksi metabolit. Identifikasi metabolit dilakukan dengan

membandingkan kemiripan (*similarity index*) data dengan pustaka WILEY 9TH tahun 2008 dan *National Institute of Standards and Technology* (NIST) 2.0 tahun 2011, dengan batas minimal indeks kesamaan 80%. Klasifikasi golongan dan nama IUPAC dari setiap senyawa didapatkan dari situs PubChem yang dikelola *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Penyajian data yang telah diolah disampaikan dalam bentuk tabel, diagram Venn, serta *heatmap*. Informasi mengenai sifat bioaktif serta manfaat setiap senyawa diambil dari studi literatur.

3.4 Alur Penelitian

Berdasarkan metode penelitian yang telah dipaparkan, dapat dirumuskan alur penelitian ini seperti pada Gambar 3.15.



Gambar 3.15. Bagan Alir dari Alur Penelitian