

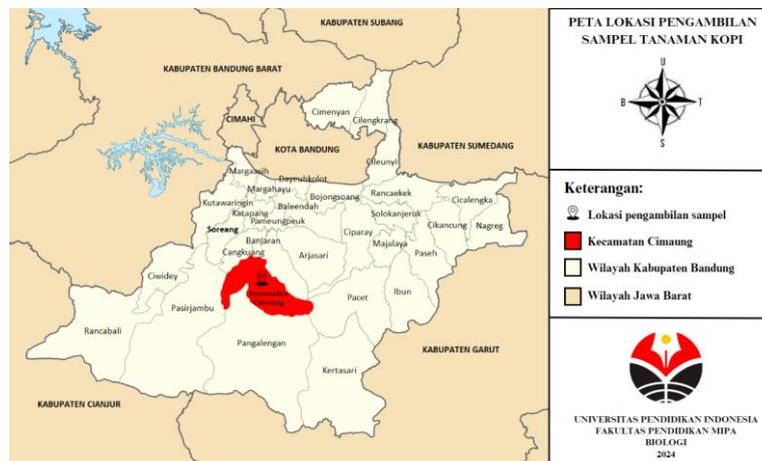
## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

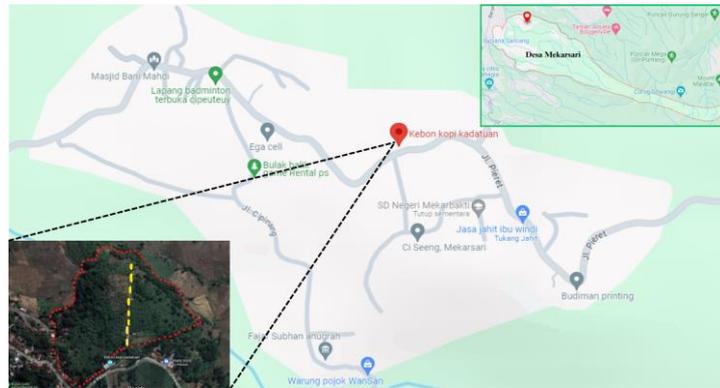
Penelitian terkait profil metabolit daun kopi ini merupakan jenis penelitian deskriptif. Penelitian ini hanya memberikan gambaran hasil analisis menggunakan instrumen *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS) terkait kandungan metabolit yang ditemukan dalam ekstrak daun kopi arabika dan robusta dengan perbedaan posisi daun. Menurut Zellatifanny & Mudjiyanto (2018), penelitian deskriptif bertujuan menggambarkan secara apa adanya suatu variabel, gejala, atau keadaan dan tidak dimaksudkan untuk menguji suatu dugaan atau hipotesis tertentu.

### 3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari hingga Agustus 2024, dimulai dari tahap pengambilan daun kopi hingga tahap analisis data hasil penelitian. Pengambilan daun kopi arabika dan robusta dilakukan di Kebun Kopi Kadatuan, Jalan Pieret, Desa Mekarsari, Kecamatan Cimaung, Kabupaten Bandung, Jawa Barat (Gambar 3.1 dan Gambar 3.2). Persiapan alat dan bahan penelitian serta pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi I Program Studi Biologi FPMIPA UPI (Lampiran 1.). Analisis kandungan metabolit dalam penelitian ini dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik (Puslabfor) Bareskrim Polri, Sentul, Kabupaten Bogor, Jawa Barat menggunakan instrumen *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS).



Gambar 3.1. Peta Lokasi Pengambilan Daun Kopi



Gambar 3.2. Lokasi Kebun Kopi Kadatuan  
(Google maps, 2023)

### 3.3 Subjek Penelitian

Dalam penelitian ini, bagian tanaman yang digunakan yaitu daun kopi arabika dan robusta dari tanaman kopi yang dibudidayakan di Kebun Kopi Kadatuan. Tanaman kopi di kebun tersebut berusia delapan tahun. Daun diambil dari posisi yang berbeda yaitu posisi buku ke 3-4 dan buku ke 5-6 dari pucuk.

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Pengambilan Daun Kopi

Daun kopi arabika dan robusta diperoleh dari tanaman kopi yang dibudidayakan di Kebun Kopi Kadatuan. Total luas lahan budidaya kebun kopi Kadatuan mencapai 8 hektare yang terdiri dari dua lahan dengan luas masing-masing yaitu 6 hektare dan 2 hektare (Gambar 3.3). Pengambilan daun kopi dilakukan menggunakan teknik *random sampling*. Daun kopi diambil pada cabang plagiotrop ke 1-6 dari proksimal batang utama. Daun kopi arabika pada posisi ke 3-4 dari pucuk (A 3-4), posisi ke 5-6 dari pucuk (A 5-6), daun kopi robusta pada posisi ke 3-4 dari pucuk (R 3-4), dan posisi ke 5-6 dari pucuk (R 5-6), masing-masing dikumpulkan sebanyak 1 kilogram dan diletakkan pada setiap wadah yang berbeda.



Gambar 3.3. Lahan Pengambilan Daun Kopi

### 3.4.2 Pengukuran Faktor Abiotik

Pengukuran faktor abiotik meliputi faktor edafik dan klimatik dilakukan di lahan tempat tumbuhnya tanaman kopi (Lampiran 2.). Faktor edafik yang diukur yaitu kelembapan tanah, suhu tanah, derajat keasaman atau pH tanah, dan kandungan materi organik tanah (MOT) sedangkan faktor klimatik yang diukur yaitu kelembapan dan suhu udara (Gambar 3.4). Pengukuran ketinggian tempat atau lokasi pengambilan daun kopi juga dilakukan dengan menggunakan altimeter.

Uji kandungan MOT dilakukan sesuai dengan metode *Walkley-Black* merujuk pada penelitian Michael (1984). Sampel tanah dari lokasi kebun kopi tersebut berwarna coklat – coklat tua dengan tekstur tanah berpasir. Pada tahap awal sebanyak 100 gram sampel tanah yang diambil dari lokasi kebun kopi dioven terlebih dahulu pada suhu 100°C selama 24 jam. Tanah yang telah kering diayak menggunakan saringan berukuran 0,2 mesh kemudian ditimbang sebanyak 0,25 gram sesuai dengan kriteria tanah pada penelitian Michael (1984). Sampel tanah yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Larutan potasium dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) 1 N sebanyak 5 mL ditambahkan ke dalam sampel dan dihomogenkan. Larutan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) pekat juga ditambahkan sebanyak 10 mL ke dalam larutan sampel kemudian dihomogenkan secara perlahan selama satu menit dan dibiarkan sekitar 10-30 menit. Akuades ditambahkan ke dalam larutan sampel hingga volumenya mencapai 100 mL. Larutan sampel ditambahkan 5 mL larutan asam fosfat ( $H_3PO_4$ ) 85%, 0,1 gram NaF, dan 10 tetes indikator difenilamin. Pada tahap selanjutnya larutan sampel tanah dititrasi menggunakan ferro amonium sulfat sampai larutan tersebut mengalami perubahan warna menjadi biru kehijauan (Gambar 3.5). Hasil titrasi dilakukan perhitungan terkait kandungan C-Organik serta materi organik tanah menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{C-Organik (\%)} = \frac{(V \text{ Blanko} - V \text{ sampel}) \times 3 \times Fka}{V \text{ Blanko} - m \text{ sampel}}$$

$$\text{Materi Organik Tanah (\%)} = \% \text{ C Organik} \times 1,73$$

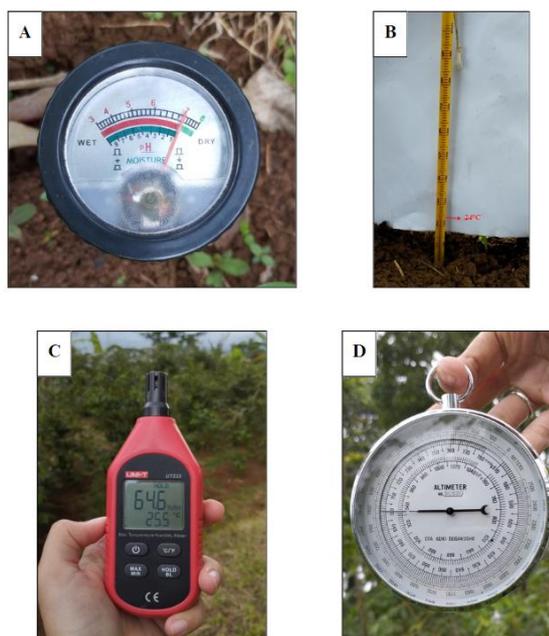
Keterangan:

V Blanko : Volume ferro amonium sulfat untuk titrasi blanko (mL)

V Sampel : Volume ferro amonium sulfat untuk titrasi sampel (mL)

Fka : Faktor koreksi (1,3)

m sampel : Massa sampel tanah (gram)



Gambar 3.4. Pengukuran Faktor Abiotik: A. *Soil tester*; B. Termometer; C. Termohigrometer; D. Altimeter



Gambar 3.5. Uji Kandungan MOT

### 3.4.3 Persiapan Bahan

Daun kopi pada setiap posisi dari kedua jenis kopi yang telah diperoleh dibersihkan terlebih dahulu menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang melekat dibagian permukaan daun. Daun yang telah dicuci bersih kemudian ditiriskan. Proses pengeringan daun dilakukan merujuk pada metode pengeringan oleh Pristiana dkk. (2017). Daun dari masing-masing posisi kemudian ditimbang untuk mengetahui berat basahanya. Daun selanjutnya dikering anginkan pada suhu 20-25°C dalam wadah terbuka selama satu minggu. Daun yang telah kering dipotong berukuran kecil dan dioven pada suhu 40°C hingga mencapai berat konstan (Gambar 3.6). Merujuk pada metode penelitian Susanti dkk. (2015), selama

masa pengeringan dengan oven dilakukan penimbangan secara berkala hingga berat daun konstan dan pengeringan oven dapat dihentikan. Daun yang telah kering dengan berat konstan kemudian diblender dan diayak menggunakan saringan berukuran 100 *mesh*. Hasil pengayakan akan diperoleh serbuk simplisia daun kopi arabika dan robusta (Gambar 3.7). Serbuk simplisia disimpan dalam wadah dan selanjutnya akan digunakan untuk membuat ekstrak.



Gambar 3.6. Hasil Pengeringan Daun Kopi: A. A 3-4; B. A 5-6; C. R 3-4; D. R 5-6



Gambar 3.7. Serbuk Simplisia

#### 3.4.4 Pembuatan Ekstrak Daun Kopi Arabika dan Robusta

Tahapan ekstraksi daun kopi dilakukan menggunakan metode maserasi (Lampiran 3.). Maserasi merupakan metode pemisahan senyawa dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut organik. Serbuk simplisia dimaserasi

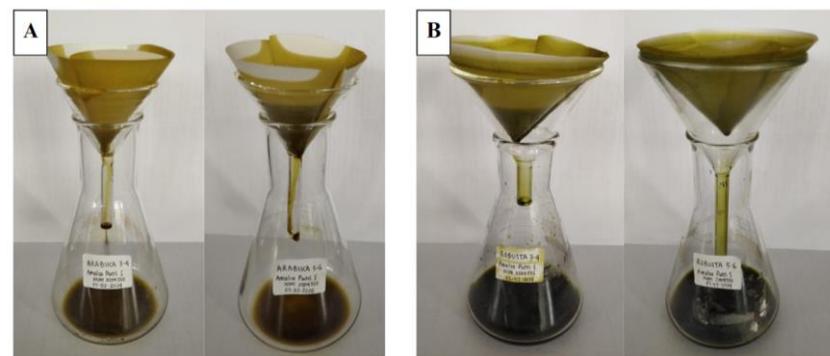
dalam pelarut etanol p.a. 70% dengan perbandingan 1:10 antara serbuk simplisia dengan pelarut. Masing-masing serbuk simplisia daun kopi ditimbang sebanyak 20 gram kemudian dilarutkan dalam 200 mL pelarut etanol p.a. 70% (Gambar 3.8). Metode maserasi tersebut merujuk pada penelitian Taufiq dkk. (2017).



Gambar 3.8. Maserasi Serbuk Simplisia

Maserasi dilakukan selama 5 x 24 jam disertai dengan pengadukan sehari sekali menggunakan *shaker* selama 5 menit dengan kecepatan 150 rpm. Setelah 3 x 24 jam, filtrat dan residu rendaman dipisahkan dengan cara disaring menggunakan kertas saring *Whatman* no.1 sehingga diperoleh filtrat I. Residu serbuk simplisia selanjutnya dimaserasi kembali dalam pelarut etanol 70% p.a sebanyak 50 mL dan dilakukan pengadukan menggunakan *shaker* selama 5 menit. Proses maserasi residu serbuk simplisia dilakukan selama 2 x 24 jam. Selama proses maserasi, labu Erlenmeyer ditutup menggunakan *aluminium foil* untuk mencegah pelarut mengalami penguapan. Metode tersebut merujuk pada penelitian Puspitasari dkk. (2017).

Rendaman residu serbuk kemudian disaring menggunakan kertas saring *Whatman* no.1 hingga menghasilkan filtrat II (Gambar 3.9). Filtrat I dan II dicampur dan disaring kembali dengan kertas saring *Whatman* no.1 sehingga diperoleh filtrat III. Filtrat III selanjutnya diuapkan menggunakan *waterbath shaker* dengan suhu 40°C. Penguapan dilakukan untuk menghilangkan pelarut etanol dalam filtrat sehingga diperoleh hasil akhir berupa ekstrak kental (Gambar 3.10). Metode tersebut merujuk pada penelitian Antari dkk. (2015). Penyimpanan hasil ekstraksi dapat menggunakan wadah yang tertutup dan diletakkan dalam suhu ruang untuk selanjutnya dianalisis kandungan metabolitnya menggunakan instrumen GC-MS.



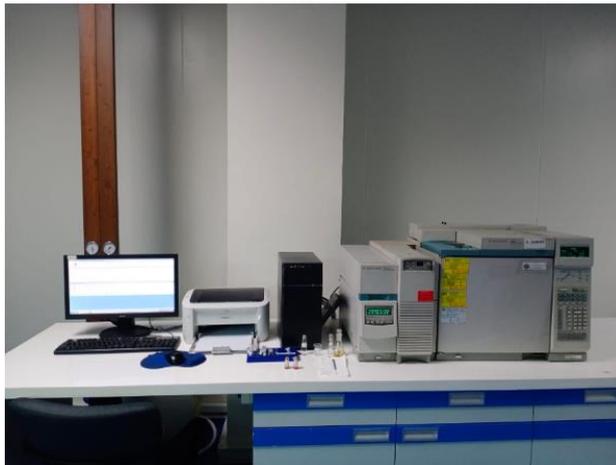
Gambar 3.9. Proses Penyaringan Ekstrak: A. Arabika; B. Robusta



Gambar 3.10. Ekstrak Kental Daun Kopi Arabika dan Robusta

### 3.4.5 Analisis Metabolit dengan GC-MS

Kandungan metabolit dalam ekstrak etanol daun kopi arabika dan robusta dianalisis menggunakan instrumen *Gas Chromatography–Mass Spectrophotometer* (GC-MS). Analisis metabolit tersebut meliputi senyawa volatil yang dapat terdeteksi oleh GC-MS. Instrumen GC-MS yang digunakan untuk menganalisis metabolit dalam penelitian ini memiliki spesifikasi yaitu Agilent GC 6890 dan MS 5973 (Gambar 3.11). Instrumen tersebut memiliki kolom dengan tipe Agilent 19091S-433 HP-5MS dengan ukuran panjang 30  $\mu\text{m}$ , diameter 250  $\mu\text{m}$ , dan ketebalan 0,25  $\mu\text{m}$ . Gas pembawa yang digunakan berupa gas helium yang dialirkan dengan laju konstan yaitu 1 mL/menit. Volume ekstrak yang diinjeksikan ke dalam instrumen GC-MS sebanyak 1  $\mu\text{L}$ . Suhu awal oven diatur pada 60°C kemudian dinaikkan dengan kecepatan 10°C/menit hingga suhu mencapai 290°C. Detektor spektrofotometer massa dioperasikan dengan pemindaian 35-650  $m/z$  dan menghabiskan waktu selama 45 menit untuk *running* GC-MS.



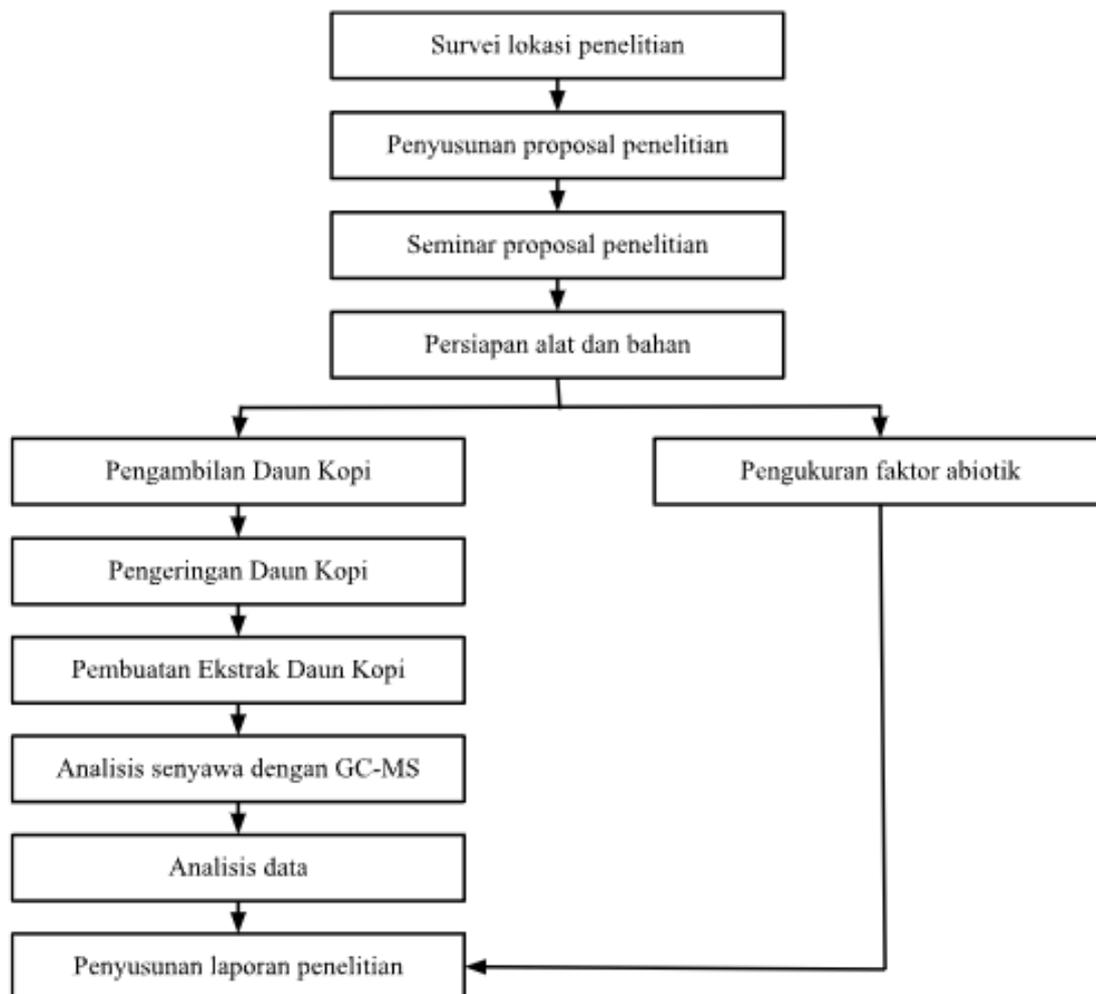
Gambar 3.11. Instrumen Agilent GC-MS  
(Komunikasi Pribadi, 2024)

### 3.4.6 Analisis Data

Data hasil analisis metabolit menggunakan instrumen GC-MS menampilkan grafik dengan intensitas puncak (*peak*) yang berbeda pada setiap senyawa. Data tersebut diidentifikasi berdasarkan indeks kemiripannya (*similarity index*) dengan data pada pustaka *National Institute of Standards and Technology* (NIST) menggunakan *software* WILLEY09TH. Senyawa yang dimunculkan dalam penelitian ini merupakan senyawa dengan indeks kesamaan  $\geq 80\%$ . Informasi mengenai nama umum serta tata nama berdasarkan aturan *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) dari masing-masing senyawa diperoleh melalui hasil pencarian pada situs web PubChem *National Center for biotechnology information* (NCBI). Data yang telah diolah disajikan dalam bentuk *heatmap*, diagram venn, dan tabel. Aktivitas biologis serta potensi yang dimiliki oleh masing-masing senyawa diperoleh melalui hasil studi literatur.

### 3.5 Alur Penelitian

Secara keseluruhan, alur penelitian profil metabolit daun kopi arabika dan robusta dengan perbedaan posisi daun menggunakan GC-MS berdasarkan prosedur penelitian yang telah dijelaskan dapat dilihat sebagai berikut (Gambar 3.12).



Gambar 3.12. Bagan Alur Penelitian