

PENENTUAN KADAR FENOLIK TOTAL EKSTRAK TERPURIFIKASI KOPI HIJAU ARABIKA (*Coffea arabica* L.) ASAL KABUPATEN TEMANGGUNG

Fitri Nurjanah¹, Rissa Laila Vifta^{2*}, Salsabiela Dwi Yudrisa Suyudi¹, dan Faiqotut Tahta Aunila²

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Ngudi Waluyo

²Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Islam Sultan Agung

^{1*}email korespondensi : rissalailavifta@unissula.ac.id

Abstrak

Penelusuran antioksidan alami semakin intensif seiring meningkatnya kesadaran akan dampak radikal bebas dan kekhawatiran terhadap keamanan antioksidan sintetis. Senyawa fenolik sebagai metabolit sekunder utama berperan krusial sebagai antioksidan alami karena kemampuan mendonasikan hidrogen. Kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) merupakan sumber alami kaya fenolik yang kandungan bioaktifnya terjaga karena belum melalui pemanggangan. Proses purifikasi diperlukan untuk mendapatkan komponen aktif lebih murni dan meningkatkan aktivitas farmakologis. Penelitian ini bertujuan mengetahui kadar fenol total dalam ekstrak kasar dan terpurifikasi kopi hijau Arabika menggunakan variasi pelarut purifikasi (n-heksan, etil asetat, dan campuran keduanya) melalui fraksinasi cair-cair. Ekstraksi dilakukan dengan etanol 96% melalui maserasi, diikuti purifikasi. Kadar fenol total ditentukan menggunakan metode Folin-Ciocalteu dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 755,20 nm menggunakan standar asam galat. Analisis data menggunakan ANOVA dilanjutkan uji *Post Hoc* LSD. Uji fitokimia mengonfirmasi keberadaan flavonoid, alkaloid, tanin, dan terpenoid pada semua ekstrak. Hasil menunjukkan ekstrak kasar memiliki kadar fenol total tertinggi (275,82 mg GAE/g), diikuti ekstrak purifikasi campuran (227,07 mg GAE/g), n-heksan (183,87 mg GAE/g), dan etil asetat (124,97 mg GAE/g). Perbedaan kadar fenol total dipengaruhi oleh jenis pelarut purifikasi yang diketahui dari hasil analisis post hoc LSD dengan signifikansi 0,000 (p-value <0,05).

Kata kunci : Antioksidan, *Coffea arabica* L, Fenolik, Purifikasi

Abstract

The exploration of natural antioxidants has gained momentum due to increased awareness of the effects of free radicals and growing concerns about the safety of synthetic antioxidants. Phenolic compounds, which are the primary secondary metabolites in plants, play an important role as natural antioxidants because of their ability to donate hydrogen. Arabica green coffee (*Coffea arabica* L.) is a rich natural source of phenolics, and its bioactive content remains intact as it has not undergone roasting. Purification processes are essential for isolating purer active components and enhancing their pharmacological effects. This study aims to determine the total phenolic content in both crude and purified extracts of Arabica green coffee using various purification solvents (n-hexane, ethyl acetate, and a mixture of both) through liquid-liquid fractionation. Extraction was carried out using 96% ethanol via maceration, followed by purification. The total phenolic content was measured using the Folin-Ciocalteu method with UV-Vis spectrophotometry at a wavelength of 755.20 nm, with gallic acid serving as the standard. Data analysis was performed using ANOVA, followed by the Post Hoc LSD test. Phytochemical analysis confirmed the presence of flavonoids, alkaloids, tannins, and terpenoids in all extracts. The results showed that the crude extract had the highest total phenolic content (275.82 mg GAE/g), followed by the mixed purified extract (227.07 mg GAE/g), n-hexane extract (183.87 mg GAE/g), and ethyl acetate extract (124.97 mg GAE/g). The differences in total phenolic content were influenced by the type of purification solvent, as determined by post-hoc LSD analysis, with a significant p-value of <0.05.

Keywords: Antioxidants. *Coffea arabica* L, Phenolic, Purification

PENDAHULUAN

Indonesia, sebagai negara tropis, memiliki kekayaan alam yang melimpah, termasuk beragam tanaman yang berpotensi menjadi sumber obat tradisional. Keuntungan menggunakan obat tradisional semakin menarik perhatian masyarakat karena bahan-bahannya mudah ditemukan, sederhana dalam pengolahan, dan harganya terjangkau [1]. Kembalinya tren gaya hidup alami atau kembali ke alam (*back to nature*) mendorong masyarakat untuk lebih memilih pengobatan menggunakan bahan alami, seperti tumbuhan obat herbal, sebagai alternatif pengobatan modern [2]. Salah satu komponen bioaktif yang menjadi fokus dalam penelitian fitokimia adalah senyawa fenolik, yang merupakan kelompok senyawa terbesar dengan sifat antioksidan pada tanaman. Senyawa fenolik terdiri dari satu atau lebih cincin fenol yang memiliki gugus hidroksi, yang memungkinkan senyawa ini mudah teroksidasi dengan menyumbangkan atom hidrogen pada radikal bebas [3].

Tanaman menghasilkan senyawa fenolik sebagai bentuk perlindungan terhadap stres lingkungan, serta sebagai pelindung terhadap sinar UV-B dan kerusakan sel. Senyawa ini juga berfungsi untuk menjaga agar DNA tidak mengalami dimerisasi dan kerusakan. Selain itu, senyawa fenolik memainkan peran penting dalam pencegahan dan pengobatan beberapa penyakit, seperti aterosklerosis, gangguan fungsi otak, diabetes, dan kanker [4]. Senyawa fenolik adalah metabolit sekunder yang diproduksi oleh tanaman melalui jalur sikimat dan metabolisme fenilpropanoid. Kelompok ini terbagi menjadi beberapa jenis, termasuk fenol sederhana, kumarin, lignin, tanin terkondensasi, tanin terhidrolisis, asam fenolat, dan flavonoid. Aktivitas antioksidan senyawa fenolik telah diketahui karena sifat redoksnya yang memungkinkan senyawa ini berfungsi sebagai agen pereduksi, pendonor hidrogen, pemadam singlet oksigen, dan pengkkelat logam [5].

Kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) adalah salah satu tanaman yang memiliki potensi besar sebagai sumber senyawa fenolik. Biji kopi hijau adalah biji kopi yang belum melalui proses pemanggangan, sehingga kandungan senyawa bioaktifnya tetap terjaga, menghasilkan rasa yang lebih pahit dan aroma yang lebih kuat [3]. Kopi arabika berasal dari hutan pegunungan di Ethiopia, Afrika, dan tumbuh optimal pada ketinggian 1000-2000 mdpl dengan suhu sekitar 15-24°C. Biji kopi ini mengandung senyawa aktif seperti asam klorogenat, kafein, alkaloid, flavonoid, dan polifenol [6], dengan kandungan asam klorogenat mencapai 6,1-11,3 mg per gram biji kopi. Asam klorogenat dan flavonoid merupakan senyawa fenolik utama yang terdapat dalam kopi dan memiliki peran penting sebagai antioksidan.

Purifikasi atau pemurnian senyawa diperlukan untuk meningkatkan aktivitas bahan aktif senyawa alam, dengan tingkat kemurnian 95-100% [2]. Proses purifikasi bertujuan untuk menghilangkan komponen kimia yang tidak diinginkan, seperti lipid, pigmen (klorofil), plastisiser, dan plumas dari alat. Ekstrak yang telah dipurifikasi menjadi alternatif yang efisien dalam mengurangi massa ekstrak dalam pembuatan sediaan farmasi, karena komponen-komponen yang tidak diinginkan dapat dikurangi, namun tetap mempertahankan kandungan senyawa kimia yang sinergis. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak yang telah dipurifikasi memiliki kadar flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak yang belum dipurifikasi, dan pelarut yang digunakan dapat mempengaruhi hasil kandungan senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak tersebut [7].

Salah satu metode yang sering digunakan untuk mengukur kadar fenolik total dalam ekstrak, adalah metode Folin-Ciocalteu. Metode ini sangat populer karena prosedurnya yang sederhana dan kemampuannya untuk bereaksi dengan senyawa fenolik, menghasilkan larutan yang absorbansinya dapat diukur [8]. Prinsip dasar dari metode ini adalah pengoksidasian gugus fenolik hidroksil, yang mengubah asam heteropoli menjadi kompleks molibdenum-tungsten berwarna biru. Standar yang digunakan dalam metode ini adalah asam galat, senyawa fenolik alami dan stabil, sehingga hasil pengukuran kandungan fenolik total dinyatakan dalam ekuivalen asam galat (*Gallic Acid Equivalent, GAE*). Semakin pekat warna biru yang terbentuk, semakin tinggi konsentrasi senyawa fenolik dalam sampel [8].

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa kopi hijau arabika memiliki kandungan senyawa bioaktif yang bermanfaat, seperti dapat menurunkan berat badan pada pasien obesitas, mengurangi penyerapan glukosa, serta mengatur hormon lipolisis [9]. Selain itu, ekstrak terpurifikasi memiliki kadar fenolik yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak yang belum dipurifikasi, dan pelarut yang digunakan dalam proses purifikasi mempengaruhi kandungan senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak tersebut (2). Meskipun potensi kopi hijau arabika sebagai sumber senyawa fenolik sudah diketahui, penelitian mengenai pengaruh

variasi pelarut purifikasi terhadap kadar fenolik total masih terbatas, dan perlu penelitian lebih lanjut untuk memperoleh data yang lebih lengkap.

Berdasarkan latar belakang tersebut, pertanyaan yang diajukan dalam penelitian ini adalah apakah terdapat perbedaan kadar fenolik total dalam ekstrak kopi hijau arabika berdasarkan variasi pelarut purifikasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar senyawa fenol total dari ekstrak terpurifikasi kopi hijau arabika dengan menggunakan variasi pelarut ekstraksi cair-cair, termasuk etanol 96%, n-heksan, etil asetat, serta kombinasi n-heksan dan etil asetat. Penelitian ini juga bertujuan untuk membandingkan kadar fenolik total yang dihasilkan dari berbagai metode purifikasi tersebut. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi penting mengenai metode purifikasi yang optimal dalam menghasilkan ekstrak kopi hijau arabika dengan kadar fenolik total tertinggi, yang nantinya dapat dimanfaatkan dalam pengembangan produk nutrasetikal dan farmasi berbasis bahan alam.

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian

Penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental laboratorium. Kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) sebagai subjek penelitian, sebelumnya dideterminasi terlebih dahulu untuk memastikan kebenarannya di laboratorium Universitas Diponegoro. Kopi hijau arabika diekstraksi dengan pelarut etanol 96%, sedangkan purifikasi dilakukan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, campuran etil asetat dan n-heksana. Penentuan kadar fenolik total secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

Subjek penelitian

Subjek dalam penelitian ini menggunakan biji kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) yang di ambil dari daerah Dusun Kruwisan, Kledung, Gunung Sumbing, Kabupaten Temanggung-Jawa Tengah. Karakteristik pemilihan biji yang digunakan yaitu memiliki bentuk yang agak meanjang, bidang cembungnya tidak terlalu tinggi, lebih bercahaya dibandingkan dengan jenis lainnya, ujung biji mengkilap, dan celah tengah dibagian datarnya berlekuk.

Alat dan Bahan

Seperangkat alat ekstraksi dengan metode maserasi, penyaring, Erlenmeyer (Herma), corong pisah, gelas ukur (Iwaki), *rotary vacuum evaporator* (RE100-PRO), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV Mini 1240). Bahan yang digunakan adalah simplisia kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.), etanol teknis 96%, n-heksana dari (Bratachem), etil asetat (Merck®), air panas, reagen Folin Ciocalteau, asam galat, Na₂CO₃, Aquades.

Penyiapan simplisia

Kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) dari pohon dipilih yang warna merah, selanjutnya dilakukan sortasi untuk memilih biji kopi yang paling bagus. Setelah itu, kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) dikeringkan sampai kering selama 2-3 minggu. Kemudian, dipisahkan kotoran-kotoran dan kulitnya. kemudian dihaluskan dengan blender, setelah diblender didapatkan serbuk halus kemudian dilakukan ekstraksi (10).

Ekstraksi kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.)

Pembuatan ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Serbuk kopi hijau arabika sebanyak 300 gram yang telah diblender dan diayak, dilarutkan dalam etanol 96% (1 : 10). Maserasi dilakukan selama 1 hari dan dilanjutkan remaserasi selama 2 hari dalam ruangan yang terlindung cahaya matahari dan dilakukan pengadukan tiap 12 jam. Kemudian ekstrak yang diperoleh dari maserat pertama disaring menggunakan kain flannel. Setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dilakukan remaserasi. Maserat pertama dan maserat kedua yang telah dikumpulkan, selanjutnya diuapkan menggunakan penangas air (*water bath*) dengan suhu 78°C [6].

Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk membuktikan bahwa tidak ada kandungan etanol yang terdapat dalam ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.). Ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak tercium bau khas ester. Ester dihasilkan dari reaksi asam karboksilat dan alkohol ketika dipanaskan bersama dengan bantuan katalis asam di tandai dengan bau khas ester [10].

Purifikasi

Purifikasi ekstrak kopi hijau arabika dilakukan melalui metode fraksinasi cair-cair dengan pelarut yang berbeda. Sebanyak 10 gram ekstrak dilarutkan dalam 200 ml air panas (1:20) dan dimasukkan ke dalam corong pisah. Kemudian ditambahkan 200 ml n-heksan dan digojog sampai memisah. Setelah pengocokan dan pemisahan, lapisan n-heksan yang berada di atas dikumpulkan dan proses diulang hingga lapisan n-heksan menjadi bening, kemudian dievaporasi untuk memperoleh ekstrak terpurifikasi. Proses yang sama dilakukan pada purifikasi dengan pelarut etil asetat dan campuran. Hasil purifikasi dipekatkan sampai membentuk ekstrak kental dan dihitung rendemennya [7].

Uji flavonoid

Identifikasi flavonoid menggunakan metode *Wilstatter Cyanidin* dengan menambahkan 20 mL etanol pada 10 mg ekstrak, kemudian 10 mL campuran direaksikan dengan 0,5 mL HCl pekat, 3-4 butir magnesium, dan 1 mL amil alkohol. Perubahan warna yang terjadi menunjukkan reaksi positif flavonoid [11].

Uji alkaloid

Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL kloroform, disaring, lalu ditambahkan 0,5 mL H₂SO₄ dan dikocok hingga terbentuk lapisan yang diuji dengan pereaksi Dragendorff dan Mayer. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan kuning jingga pada pereaksi Dragendorff dan endapan putih pada pereaksi Mayer (12).

Uji tanin

Identifikasi tanin dilakukan dengan metode Ferri Klorida, dimana 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 20 mL air panas dan 5 tetes NaCl 10%, kemudian dibagi menjadi dua tabung dengan salah satunya ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1%. Tanin terhidrolisa memberikan warna biru atau biru hitam [6].

Uji terpenoid

Identifikasi terpenoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dalam 2 mL kloroform, ditambahkan 1 mL asam anhidrat dan 1 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung. Adanya triterpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan [6].

Penentuan kadar fenolik total

Kurva baku asam galat dibuat dari larutan induk 1000 ppm yang diencerkan menjadi konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Setiap konsentrasi direaksikan dengan 1,5 mL reagen Folin-Ciocalteu, dikocok dan didiamkan 3 menit, lalu ditambahkan 1,2 mL Na₂CO₃ 7,5%, dihomogenkan, dan dicukupkan dengan aquabidestillata hingga 10 mL. Absorbansi dibaca setelah *operating time* pada panjang gelombang maksimum. Pada penentuan fenolik total sampel, 10 mg ekstrak etanol 96% kopi hijau arabika dilarutkan dalam etanol 96% hingga 10 mL, kemudian 1 mL larutan direaksikan dengan 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu dan 4 mL natrium karbonat 7,5% dengan 3 kali replikasi. Kadar fenolik total dihitung berdasarkan persamaan regresi linear $y = bx + a$ dari kurva baku yang diperoleh [8].

Analisis data

Data dianalisa menggunakan uji statistik SPSS untuk mengetahui kadar fenol total dengan perbedaan pengaruh pelarut purifikasi dilakukan dengan uji ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD (*Least Significance Different*) dengan taraf kepercayaan 95% untuk menguji adanya perbedaan antara perlakuan yang satu dengan yang lain. Uji statistik ini menggunakan program komputer SPSS versi 21.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil identifikasi tanaman biji kopi arabika secara taksonomi menunjukkan bahwa spesimen yang digunakan adalah tanaman *Coffea arabica* L. yang termasuk dalam famili Rubiaceae. Berdasarkan hasil ekstraksi kopi hijau arabika diperoleh rendemen sebesar 21,05% b/b. Proses purifikasi bertujuan untuk menghilangkan komponen non-metabolit sekunder seperti resin, sukrosa, lemak, polisakarida, lipid, dan pigmen yang dapat mengganggu aktivitas biologis ekstrak kopi hijau arabika. Purifikasi dilakukan untuk menghasilkan ekstrak yang lebih murni dengan mengurangi massa ekstrak, namun tetap mempertahankan komponen aktif yang memiliki efek sinergis [2,7]. Dalam proses ini, digunakan metode partisi cair-cair dengan corong pisah untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya. Tiga jenis pelarut yang digunakan untuk purifikasi adalah n-heksan (non-polar), etil asetat (semi-polar), dan campuran n-heksan dan etil asetat, sesuai dengan prinsip "*like dissolves like*" [13]. Proses purifikasi dilakukan dua kali dan

menghasilkan rendemen rata-rata untuk ekstrak terpurifikasi, yaitu etil asetat sebesar 58,3% b/b, n-heksan sebesar 48% b/b, dan campuran n-heksan-etil asetat sebesar 42,1% b/b.

Tabel 1. Hasil Rendemen Ekstrak Terpurifikasi Kopi Hijau Arabika

Purifikasi	Berat Ekstrak Kental	Berat Ekstrak Terpurifikasi	Rendemen (%)
etil asetat	10 gram	90,04 gram	58,3% b/b
n-heksan	10 gram	73,43 gram	48% b/b
n-heksan dan etil asetat	10 gram	87,55 gram	42,1% b/b

Berdasarkan data pada **Tabel 1**, proses purifikasi ekstrak kopi hijau arabika dengan pelarut etil asetat menghasilkan rendemen yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan n-heksan dan campuran n-heksan-etil asetat. Hal ini disebabkan oleh kemampuan etil asetat untuk mengikat pengotor semi-polar yang terdapat dalam ekstrak kopi hijau arabika, sehingga senyawa aktif yang tersisa dalam ekstrak purifikasi etil asetat adalah senyawa yang bersifat non-polar dan polar [14]. Sebaliknya, penggunaan n-heksan hanya mengikat senyawa non-polar, yang menyebabkan pengotor semi-polar dan polar tetap ada dalam ekstrak purifikasi tersebut. Pada purifikasi menggunakan campuran n-heksan dan etil asetat, rendemen yang dihasilkan lebih rendah karena kedua pelarut tersebut menarik senyawa yang bersifat semi-polar dan non-polar, yang pada akhirnya menghasilkan ekstrak yang lebih banyak mengandung senyawa polar.

Uji bebas etanol dilakukan untuk memastikan ekstrak kopi hijau arabika bebas dari etanol yang dapat mempengaruhi hasil pengujian,. Dalam pengujian bebas pelarut etanol ini, ekstrak dilarutkan dengan H₂SO₄ pekat, kemudian ditambahkan asam asetat dan dipanaskan hingga mendidih. Ekstrak dianggap bebas etanol jika tidak tercium bau ester yang terbentuk dari reaksi asam karboksilat dan alkohol dengan bantuan katalis asam [15]. Hasil uji pada **Tabel 2** menunjukkan bahwa semua ekstrak terpurifikasi kopi hijau arabika bebas dari etanol, sehingga ekstrak tersebut layak untuk digunakan dalam tahap pengujian selanjutnya tanpa mengganggu hasil uji yang dilakukan.

Tabel 2. Hasil Uji Bebas Etanol

Sampel	Pereaksi	Hasil	Kesimpulan
Ekstrak kopi hijau arabika	H ₂ SO ₄ pekat + CH ₃ COOH → Dipanaskan	Tidak tercium bau ester	(-)
Purifikasi n-heksan	H ₂ SO ₄ pekat + CH ₃ COOH → Dipanaskan	Tidak tercium bau ester	(-)
Purifikasi etil asetat	H ₂ SO ₄ pekat + CH ₃ COOH → Dipanaskan	Tidak tercium bau ester	(-)
Purifikasi campuran	H ₂ SO ₄ pekat + CH ₃ COOH → Dipanaskan	Tidak tercium bau ester	(-)

Hasil penapisan fitokimia pada **Tabel 3** menunjukkan baik ekstrak kasar maupun terpurifikasi positif mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, dan terpenoid. Uji flavonoid dilakukan dengan mereaksikan ekstrak kopi hijau arabika dalam NaOH, yang menghasilkan perubahan warna hijau kuning atau kuning kecoklatan sebagai tanda positif terbentuknya senyawa asetofenon [11]. Uji alkaloid dilakukan dengan mencampur ekstrak dengan ammonia dan kloroform, kemudian menambahkan HCl dan kocoknya. Lapisan yang terbentuk diuji dengan pereaksi Dragendorff dan Mayer, menghasilkan perubahan warna oranye dan endapan jingga (Dragendorff) serta endapan kekuningan (Mayer), menunjukkan adanya alkaloid [12]. Uji tanin dilakukan dengan menambahkan reagen FeCl₃ 1%, menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tinta sebagai indikasi adanya senyawa tanin [16]. Uji steroid dan terpenoid dilakukan dengan menambahkan kloroform dan H₂SO₄ pekat, menghasilkan warna coklat dan cincin hijau untuk steroid, serta warna merah bata untuk terpenoid [6].

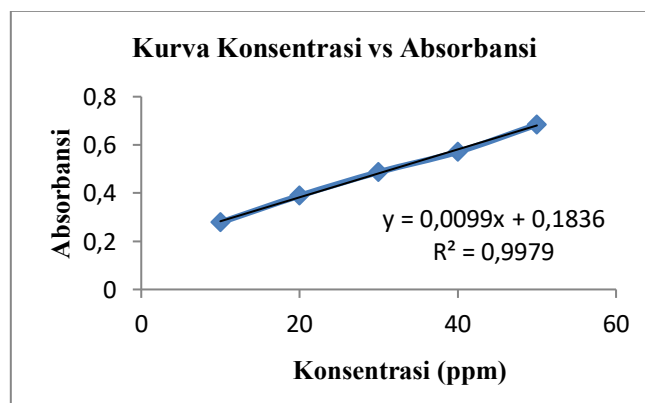
Tabel 3. Hasil Penapisan Fitokimia Secara Kualitatif Kopi Hijau Arabika

Senyawa Metabolit Sekunder	Hasil Positif	Hasil Uji			
		Ekstrak kasar	n-heksan	Etil asetat	Campuran
Flavonoid	Warna kuning kecoklatan	(+)	(+)	(+)	(+)
Alkaloid	Endapan kuning jingga (orange)/ endapan putih	(+)	(+)	(+)	(+)
Tanin	Warna biru/ hitam	(+)	(+)	(+)	(+)
Terpenoid	Cincin kecoklatan atau violet	(+)	(+)	(+)	(+)

Analisis kadar fenolik dilakukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Langkah pertama adalah menentukan panjang gelombang maksimum untuk mengetahui panjang gelombang di mana larutan memberikan serapan terbesar. Larutan asam galat konsentrasi 40 ppm direaksikan dengan reagen Folin dan ditambahkan natrium karbonat 7,5%. Hasilnya menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 755,20 nm, yang sedikit berbeda dari penelitian lain yang mencatatkan panjang gelombang maksimum pada 757,8 nm dalam rentang 600-800 nm. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh variasi kondisi alat dan pengaruh temperatur saat pengukuran [4]. Ion fenolat terbentuk melalui disosiasi proton senyawa fenolik, yang hanya bisa terjadi dalam kondisi basa, sehingga natrium karbonat digunakan untuk menciptakan kondisi basa tersebut. Warna biru yang dihasilkan menunjukkan jumlah kompleks warna yang terbentuk; semakin banyak fenolik dalam ekstrak, semakin pekat warna biru yang dihasilkan [17,18].

Pada pengukuran, waktu pengoperasian (*operating time*) dapat mempengaruhi kestabilan hasil serapan, karena setelah waktu tertentu, kompleks warna terbentuk dan larutan mencapai kestabilannya. Penentuan waktu optimum pengukuran dilakukan pembacaan absorbansi setiap menit selama 30 menit setelah reaksi antara asam galat dan reagen. Hasilnya menunjukkan bahwa waktu stabil terjadi antara menit ke-10 hingga ke-15. Selanjutnya, dibuat kurva baku menggunakan lima konsentrasi larutan asam galat (10, 20, 30, 40, dan 50 ppm), dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 755,20 nm selama 10 menit. Hasil kurva baku menunjukkan hubungan linier antara konsentrasi dan absorbansi dengan persamaan $y = 0,0099x + 0,1836$ dan koefisien korelasi (r) sebesar 0,99879. Nilai r yang mendekati 1 menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi dan absorbansi sangat linier, artinya semakin tinggi konsentrasi, semakin tinggi pula absorbansi yang dihasilkan.

Kurva baku berfungsi sebagai standar untuk mengukur konsentrasi sampel berdasarkan hubungan yang terukur antara konsentrasi dan absorbansi. Pemilihan kurva baku yang terbaik didasarkan pada koefisien korelasi (r) yang paling mendekati satu, yang menandakan korelasi yang sangat baik antara kadar asam galat dan absorbansi [18]. Metode ini menunjukkan linearitas yang baik, yang berarti semakin tinggi absorbansi yang terukur, semakin tinggi pula kadar fenolik yang terkandung dalam sampel [19]. Kadar fenolik dapat dihitung dengan akurat berdasarkan absorbansi yang terukur menggunakan kurva baku yang ditunjukkan pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Kurva Konsentrasi vs Absorbansi

Penentuan kadar fenolik total dilakukan dengan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang (λ maks) 755,20 nm. Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Reagen Folin Ciocalteu digunakan karena senyawa fenolik dapat bereaksi dengan folin membentuk larutan berwarna yang dapat diukur absorbansinya. Prinsip dari metode folin ciocalteu adalah terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru yang dapat diukur pada panjang gelombang 755,20 nm. Pereaksi ini mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) yang terdapat dalam pereaksi Folin-Ciocalteu menjadi suatu kompleks molybdenum-tungsten. Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu hanya dalam suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi senyawa fenolat. Penambahan natrium karbonat Na_2CO_3 7,5% bertujuan untuk memberikan suasana basa [20]. Gugus hidroksil pada senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu membentuk kompleks molybdenum-tungsten berwarna biru yang dapat dideteksi dengan spektrofotometer. Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli menjadi kompleks molybdenum-tungsten sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat [18,20].

Tabel 4. Hasil Uji Kadar Fenolik Total

Sampel	Rplikasi	Absorbansi	Rata-rata	Kadar Fenolik (mg GAE/g)	Rerata kadar Fenolik (mgQE/g)
Ekstrak Kasar	1	0,454	0,456	273,13	275,82
	2	0,457		276,16	
	3	0,459		278,18	
Purifikasi n-heksan	1	0,362	0,362	180,20	183,87
	2	0,360		178,18	
	3	0,365		183,23	
Purifikasi etil asetat	1	0,307	0,307	124,64	124,97
	2	0,309		126,66	
	3	0,306		123,63	
Campuran	1	0,412	0,407	230,70	227,07
	2	0,407		225,65	
	3	0,404		224,86	

Hasil pada **Tabel 4** menunjukkan serapan yang diperoleh dan kadar fenol total masing-masing sampel. Berdasarkan regresi linier standar asam galat, kadar fenol total untuk ekstrak kopi hijau arabika adalah sebagai berikut: ekstrak kasar 275,82 mg GAE/g sampel, ekstrak purifikasi n-heksan 183,87 mg GAE/g sampel, ekstrak purifikasi etil asetat 124,97 mg GAE/g sampel, dan ekstrak purifikasi campuran 227,07 mg GAE/g sampel. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak purifikasi n-heksan memiliki kadar fenol terbanyak dibandingkan ekstrak purifikasi etil asetat. Hal ini disebabkan karena n-heksan lebih efektif dalam mengikat senyawa pengotor non-polar, menghasilkan senyawa aktif yang lebih murni seperti fenol. Sementara itu, campuran n-heksan dan etil asetat mengandung senyawa aktif non-polar dan semi-polar, sehingga menghasilkan rendemen yang lebih banyak dan kadar fenolik yang lebih tinggi karena senyawa aktif kopi hijau arabika telah terekstraksi oleh kedua pelarut tersebut.

Kepolaran pelarut mempengaruhi rendemen dan kadar senyawa fenol. Pelarut n-heksan optimal untuk menarik senyawa non-polar, sementara etil asetat lebih efektif mengikat senyawa semi-polar dan polar, namun kurang mampu menarik senyawa non-polar. Oleh karena itu, ekstrak purifikasi etil asetat masih mengandung senyawa pengotor yang mengurangi kadar senyawa aktif. Perbedaan ini sejalan dengan prinsip "*like dissolves like*", di mana pelarut polar melarutkan solut polar, dan pelarut non-polar melarutkan solut non-polar [13,21]. Proses purifikasi meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak kopi hijau arabika, yang berpotensi meningkatkan aktivitas farmakologisnya. Selain itu, purifikasi juga meningkatkan kadar flavonoid dalam ekstrak, menghilangkan zat *ballast* dan memberikan ekstrak dengan kadar flavonoid yang lebih tinggi serta kandungan zat *ballast* yang lebih rendah [6].

Analisis statistik menggunakan SPSS menunjukkan perbedaan yang signifikan antara empat sampel ekstrak kopi hijau arabika. Uji independent t-test menunjukkan perbedaan signifikan antara kadar fenolik total

ekstrak kasar, n-heksan, etil asetat, dan campuran. Uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk menghasilkan $p > 0,05$, menunjukkan distribusi data yang normal, sementara uji homogenitas menggunakan Levene Test memberikan nilai p -value 0,591 ($p > 0,05$), menunjukkan data yang homogen. Uji ANOVA mengungkapkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$), dan uji post hoc menunjukkan nilai signifikan 0,000 ($p < 0,05$), yang menandakan adanya perbedaan yang signifikan antara setiap perlakuan. Hasil ini menunjukkan bahwa kepolaran pelarut mempengaruhi baik sifat maupun jumlah senyawa aktif dalam ekstrak kopi hijau arabika.

KESIMPULAN

Ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) menunjukkan kadar fenol total tertinggi dibandingkan dengan ekstrak hasil purifikasi. Kadar fenol total ekstrak kasar tercatat sebesar 275,82 mg GAE/g sampel, sedangkan ekstrak purifikasi campuran memiliki kadar 227,07 mg GAE/g sampel, ekstrak purifikasi n-heksan sebesar 183,87 mg GAE/g sampel, dan ekstrak purifikasi etil asetat dengan kadar terendah yaitu 124,97 mg GAE/g sampel. Kadar fenolik pada ekstrak kopi hijau arabika dipengaruhi oleh proses purifikasi, jenis, dan sifat kepolaran pelarut yang digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Toni.S RM, Apriana M, Huda MC, Kamal MC, Allahuddin, Septiani RA, *et al.* Artikel Review: Studi Fitokimia Dan Farmakologi Parijoto (*Medinilla magnifica*). *J Buana Farma*. 2022;2(3):36–46.
- [2]. Januarti IB, Wijayanti R, Wahyuningsih S, Nisa Z. Potensi Ekstrak Terpurifikasi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) Sebagai Antioksidan Dan Antibakteri. *JPSCR J Pharm Sci Clin Res*. 2019;4(2):60.
- [3]. Reza M, Herawati D, Kusnandar F. Perbandingan Asam Fenolat dan Total Fenolik Kopi Arabika Bogor dari Pengolahan Pascapanen dan Tingkat Sangrai Berbeda. *J Mutu Pangan Indones J Food Qual*. 2023;10(2):93–9.
- [4]. Nurhamidah W, Mindawati E, Geralda AY, Abriyani E. Aplikasi Penggunaan Spektroskopi Infrared dan Spektrofotometri UV-Vis Dalam Identifikasi Senyawa Bioaktif Ekstrak Tumbuhan : Literature Review Article. *J Soc Sci Res*. 2024;4(1):3612–22.
- [5]. Sadeq O, Mechchate H, Es-Safi I, Bouhrim M, Jawhari FZ, Ouassou H, *et al.* Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of pollen extracts from *Micromeria fruticosa*, *Achillea fragrantissima*, and *Phoenix dactylifera*. *Plants*. 2021;10(4).
- [6]. Vifta RL, Mafitasari D, Rahman E. Skrining Antioksidan dan Aktifitas Antidiabetes Ekstrak Terpurifikasi Etil Asetat Kopi Hijau Arabika (*Coffea arabica* L.) Secara Spektrofotometri UV-Vis. *J Zarah*. 2020;8(2):62–8.
- [7]. Luhurningtyas FP, Susilo J, Yuswantina R, Widhihastuti E, Ardiyansah FW. Aktivitas Imunomodulator dan Kandungan Fenol Ekstrak Terpurifikasi Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum). *Indones J Pharm Nat Prod*. 2021;4(1):51–9.
- [8]. Eroğlu AY, Çakir Ö, Sağdıç M, Dertli E. Bioactive Characteristics of Wild *Berberis vulgaris* and *Berberis crataegina* Fruits. *J Chem*. 2020;2020.
- [9]. Malik A, Ahmad AR, Najib A. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Terpurifikasi Daun Teh Hijau Dan Jati Belanda. *J Fitofarmaka Indones*. 2017;4(2):238–40.
- [10]. Maulina SN, Zebua NF, Salsabila D. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Dalam Sediaan Serum Dengan Metode DPPH. *J Pharm Sci*. 2022;5(2):372–80.
- [11]. Ramadhani MA, Hati AK, Lukitasari NF, Jusman AH. Skrining Fitokimia Dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Serta Fenolik Total Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) Dengan Maserasi Menggunakan Pelarut Etanol 96 %. *Indones J Pharm Nat Prod*. 2020;3(1):8–18.
- [12]. Vifta, RL., Shutiaawan, M.A., Maulidya, A., Yuswantina R., Skrining Flavonoid Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) Asal Kabupaten Kudus Dan Semarang Dengan Pembanding Kuersetin Dan Rutin. *Media Inf Penelit Kabupaten Semarang*. 2021;4(1):3–13.
- [13]. Dian Puspitasari A, Pramono S. Comparison Of Methods Of Producing Bee Propolis Purified Extract Based On Total Flavonoid Content Using Rutin As Standard Perbandingan Metode Pembuatan Ekstrak Terpurifikasi Bee Propolis Dari Lebah Madu (*Apis mellifera*) Berdasarkan Kadar Flavonoid Total. *Tradit Med J*. 2015;20(2):2015.

- [14]. Erwiyani AR, Gultom DSR, Oktianti D. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu* L.) Menggunakan Metode $AlCl_3$. *Indones J Pharm Nat Prod*. 2021;4(1):1–7.
- [15]. Vifta RL, Trinadi KS, Suratno S. Potential of Flavonoid Content from *Clitoria ternatea* Flowers Extract as Natural Antioxidant Candidate and Its Correlation. *1st Int Conf Heal Fac Heal*. 2022;1(1):53–60.
- [16]. Haryani S, Aisyah Y, Yunita I. Kandungan senyawa kimia dan aktivitas antioksidan ekstrak daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) : pengaruh jenis pelarut dan metode ekstraksi. *Pros Semin Nas BKS PTN Wil Barat Bid Ilmu Pertan 2016*. 2016;4(2006):hal 464-473.
- [17]. Hanin NNF, Pratiwi R. Kandungan Fenolik, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Paku Laut (*Acrostichum aureum* L.) Fertil dan Steril di Kawasan Mangrove Kulon Progo, Yogyakarta. *J Trop Biodivers Biotechnol*. 2017;2(2):51.
- [18]. Sayakti PI, Hidayatullah M. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Etil Asetat Buah Okra Hijau (*Abelmoschus esculentus* L.). *J Islam Pharm*. 2023;8(2):56–61.
- [19]. Munte L, Runtuwene MR, Citraningtyas G. Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Daun Prasman (*Eupatorium triplinerve* Vahl.). *PHARMACON J Ilm Farm*. 2015;4(3):41–50.
- [20]. Kautsari SN, Humaedi A, Wijayanti DR, Safaat M. Kadar Total Fenol dan Flavonoid Ekstrak Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Melalui Metode Ekstraksi Microwave. *Alchemy J*. 2021;17(1):96.
- [21]. Jauharotus DS, Vifta RL, Susmayanti W. Potensi Antioksidan Kombinasi Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var *Rubrum*) dan Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) dengan Metode DPPH. *J Holistics Heal Sci*. 2023;5(2):385–94.