

**ISOLASI ASAM KLOOROGENAT DARI EKSTRAK AIR  
BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)**

(Skripsi)

Oleh  
**MENTARI YUNIKA SARI**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2019**

## **ABSTRACT**

### **ISOLATION OF CHLOROGENIC ACID FROM WATER EXTRACT OF ROBUSTA COFFEE SEEDS (*Coffea canephora*)**

**By**

**Mentari Yunika Sari**

Coffee is one of the biggest commodities within the Indonesian plantation sector. Current research and articles have focused on caffeine contained in coffee, whereas other useful compounds such as chlorogenic acid inside coffee have not been widely researched and known to the wider publication. The aim of this study was to isolate and identify chlorogenic acid compounds from Robusta coffee plant seeds (*Coffea canephora*) by comparing the fractionation results to the chlorogenic acid standard. The extraction method uses a redemption technique with aqua DM as solvents, whereas for separation of compounds using MPLC, polyamide column chromatography, silica gel, and ion exchanger resin. Analysis of samples using TLC, FT-IR, and HPLC. As conclusion, chlorogenic acid in this study is not pure, based on the TLC chromatogram of fraction d' resulted from column chromatography with silica adsorbent. The d' fraction is obtained from the fractionation result of the F2' fraction with MPLC. From this fraction also obtained amylose based on the IR spectrum and compared to literature.

**Keywords:** chlorogenic acid, robusta coffee beans, MPLC, extraction.

## **ABSTRAK**

### **ISOLASI ASAM KLOOROGENAT DARI EKSTRAK AIR BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)**

**Oleh**

**Mentari Yunika Sari**

Kopi merupakan salah satu komoditas andalan dalam sektor perkebunan Indonesia. Penelitian dan artikel saat ini banyak berfokus pada kafein yang terkandung dalam kopi, sedangkan senyawa lain yang bermanfaat seperti asam klorogenat di dalam kopi belum banyak diteliti dan diketahui oleh masyarakat luas. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa asam klorogenat dari biji tumbuhan kopi Robusta (*Coffea canephora*) dengan membandingkan hasil fraksinasi dengan standar asam klorogenat. Metode ekstraksi menggunakan teknik perebusan dengan pelarut akua DM, sedangkan untuk pemisahan senyawa menggunakan MPLC, kromatografi kolom poliamida, silika gel, dan resin penukar ion. Analisis asam klorogenat menggunakan KLT, FT-IR, dan HPLC. Hasil yang diperoleh bahwa asam klorogenat yang diperoleh belum murni berdasarkan kromatogram KLT fraksi d' hasil kromatografi kolom dengan adsorben silika. Fraksi d' diperoleh dari hasil fraksinasi fraksi F2' dengan MPLC. Dari fraksi ini juga diperoleh amilosa berdasarkan spektrum IR yang dibandingkan dengan literatur.

Kata Kunci: asam klorogenat, biji kopi robusta, MPLC, ekstraksi.

**ISOLASI ASAM KLOROGENAT DARI EKSTRAK AIR  
BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)**

**Oleh**

*Mentari Yuniqa Sari*

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS**

**Pada**

**Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2019**

Judul Skripsi : **ISOLASI ASAM KLOOROGENAT DARI  
EKSTRAK AIR BIJI KOPI ROBUSTA  
(*Coffea canephora*)**

Nama Mahasiswa : **Mentari Yúnika Sari**

No. Pokok Mahasiswa : 1517011108

Jurusan : Kimia

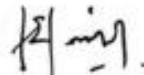
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

**MENYETUJUI**

**1. Komisi Pembimbing**



**Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.**  
NIP 19540510 198803 2 001



**Dra. Husniati, M.Si.**  
NIP 19690116 200212 2 002

**2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA**

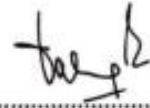


**Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, M.T.**  
NIP 19740705 200003 1 001

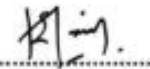
## MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.



Sekretaris : Dra. Husniati, M.Si.



Penguji

Bukan Pembimbing : Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Drs. Suratman, M.Sc.  
NIP. 19640604 199003 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 30 Oktober 2019

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : **Mentari Yunika Sari**  
Nomor Pokok Mahasiswa : **1517011108**  
Jurusan : **Kimia**  
Judul Skripsi : **Isolasi Asam Klorogenat dari Ekstrak Air Biji  
Kopi Robusta (*Coffea canephora*)**

Dengan ini menyatakan bahwa penelitian ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya tidak berisi materi yang telah dipublikasi atau ditulis orang lain atau dipergunakan dan diterima sebagai persyaratan penyelesaian studi pada Universitas atau Institut lain.

Bandar Lampung, 5 November 2019

Yang Menyatakan,



Mentari Yunika Sari  
NPM. 1517011108

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Kota Metro pada tanggal 2 Juni 1997, anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Ngasaroh dan Ibu Eka Ratnawati, S.E. Penulis mengawali pendidikan formal di TK Pertiwi Metro Barat yang diselesaikan pada tahun 2003, kemudian menyelesaikan studi di Sekolah Dasar (SD) Negeri 6 Metro Barat pada tahun 2009, Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 1 Metro tahun 2012, dan Sekolah Menengah Akhir (SMA) Negeri 1 Metro pada tahun 2015.

Penulis kemudian terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN (Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri) pada tahun 2015.

Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah mendapatkan beasiswa Peningkatan Prestasi Akademik (PPA) pada tahun ajaran 2017/2018 dan 2018/2019. Selama menjalani perkuliahan, penulis memperoleh Juara 1 Lomba Karya Tulis Ilmiah di Institut Pertanian Bogor pada November 2018 dan Juara 4 *Speech Contest* oleh *Chemistry English Club* (CEC) FMIPA, Unila pada Oktober 2019. Penulis juga pernah menjadi Finalis PKM-PE pada Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional (PIMNAS) ke-31 di Universitas Negeri Yogyakarta pada September 2018. Penulis menerima *Dean Award* FMIPA 2018 pada dua kategori yaitu “Finalis PIMNAS ke-31” dan “Mahasiswa Peraih Medali Kejuaraan di Bidang Kemahasiswaan”.



Penulis pernah menjadi pemakalah dalam seminar internasional yang diterbitkan dalam prosiding : *The 2<sup>nd</sup> International Conference on Applied Sciences, Mathematics and Informatics* (ICASMI) pada tahun 2018. Selain itu penulis pernah mengikuti pelatihan instrumentasi Desktop SEM oleh PT GeneCraft Labs (2018), LC-MS oleh PT Kromtekindo Utama (2018) dan GC-MS oleh UPT LT-SIT Universitas Lampung (2019). Penulis pernah menjadi asisten praktikum kimia organik jurusan biologi pada semester ganjil dan praktikum organik I pada semester genap tahun ajaran 2018/2019. Selain itu penulis berkesempatan menjadi pemateri dalam beberapa pelatihan penulisan karya tulis ilmiah dan PKM di Jurusan Kimia, Jurusan Biologi, dan Jurusan Fisika, FMIPA, Unila.

Pada tahun 2017, penulis menjadi salah satu inisiator yang memprakarsai Komunitas Lampung Berbagi yang hingga saat ini masih aktif dalam beberapa kegiatan sosial. Selain itu, penulis pernah memperoleh amanah pada organisasi kemahasiswaan diantaranya Kepala Biro Penerbitan Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) pada tahun 2017, Sekretaris *Chemistry English Club* Jurusan Kimia pada tahun 2018, dan Anggota Departemen Kominfo BEM 2016. Penulis juga pernah menjadi delegasi Lampung *Youth Speak Forum* oleh AIESEC pada tahun 2016 dan tergabung dalam Komunitas *Earth Hour* Bandar Lampung tahun 2018.

## **MOTTO**

“Mohonlah pertolongan (kepada Allah) dengan sabar dan sholat.

Sungguh, Allah bersama orang-orang yang sabar”

QS. Al-Baqarah : 153

“Yakinlah ada yang menantimu selepas banyaknya kesabaran yang kau jalani,  
yang akan membuatmu terpana hingga kau lupa betapa pedihnya rasa sakit”

Ali bin Abi Thalib

“Kita boleh kehilangan motivasi tapi kita tidak boleh kehilangan tujuan”

Untuk,

*Mama dan Ayah*

yang selalu memberikan kasih sayang, doa, cinta, motivasi, serta  
pengorbanan demi keberhasilanku.

## SANWACANA

*Assalamualaikum warahmatullahi wabarokatuh.*

*Alhamdulillah* segala puji bagi Allah *subhanahu wa taala* atas rahmat dan ridho-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat senantiasa penulis haturkan kepada Nabi Muhammad ﷺ semoga kita termasuk orang yang mendapatkan syafaatnya di Yaumul Qiyamah kelak. Aamiin.

Skripsi dengan judul “Isolasi Asam Klorogenat dari Ekstrak Air Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)” merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sehingga penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Drs. Suratman, M.Sc. selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.
2. Dr. Suripto Dwi Yuwono, M.T. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
3. Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. selaku pembimbing I yang telah memotivasi, membimbing, dan mengarahkan penulis selama penelitian dan penulisan skripsi.
4. Dra. Husniati, M.Si. selaku pembimbing II atas bantuan, arahan, dan kesabarannya kepada penulis selama menyelesaikan skripsi.

5. Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si. selaku Pembahas yang memberikan masukan dan saran demi terselesikannya skripsi ini.
6. Rinawati, Ph.D. selaku pembimbing akademik yang memberikan banyak masukan positif, semangat serta bimbingan selama perkuliahan.
7. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia yang telah memberikan banyak pengetahuan selama belajar di Universitas Lampung, terima kasih atas ilmu dan pengalaman yang luar biasa.
8. Para Staff dan Laboran, khususnya mbak Wiwit, yang telah memberikan banyak bantuan selama penelitian di Laboratorium Organik.
9. Mama dan Ayah, terima kasih untuk doa, kasih sayang, dan dukungan yang tak pernah berhenti hingga saat ini.
10. Adik-adikku tersayang, Puspa dan Naufal yang telah memberikan keceriaan, semangat, dan motivasi yang tidak ternilai harganya.
11. Sahabatku, Siwi, Zeita, dan Keke terima kasih atas persaudaraan, kebersamaan serta kehangatan dalam suka dan duka yang telah dilewati bersama penulis, semoga persahabatan ini terus terjalin hingga surga kelak.
12. Rekan terbaikku, Randy, yang telah mengajarku bahwa belajar adalah milik siapa pun yang ingin memperbaiki diri.
13. Penghuni Laboratorium Organik yang menjadi tim penelitianku, mbak Laili, Rinda, Zuwita, Isnaini, Eva, Santi, May, Novita, Valen, Tole, Tosa, dan Rizky, terima kasih atas bantuan dan dukungannya kepada penulis.

14. Teman-teman Komunitas Lampung Berbagi, Intan, Aulia, Pila, Mona, Dwi, Jule, Nadya, Icil, Naina, Nurmala, Melina, dan adik-adik penerus LB, atas semangat dan motivasinya kepada penulis, semoga pahala dan kebaikan kalian tidak pernah terputus.
15. Kimia 2015 (Chem15try) khususnya Kimia C atas kebersamaan dan keceriaan yang mewarnai kehidupan kampus.
16. Keluarga besar Himaki 2017, khususnya Pimpinan Bukan Kaleng-Kaleng yang memberikan kebahagiaan dan arti kekeluargaan, pengalaman bersama kalian akan selalu teringat.
17. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Mohon maaf jika penulis tidak menyebutkan satu per satu.

Semoga Allah *subhanahu wa taala* membalas kebaikan yang telah diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, akan tetapi penulis berharap agar skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan. Aamiin.

Wassalamualaikum warahmatullahi wabarokatuh

Bandar Lampung, 5 November 2019

Penulis,

*Mentari Yunika Sari*

## DAFTAR ISI

Halaman

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| <b>DAFTAR TABEL</b> ..... | iii |
|---------------------------|-----|

|                            |    |
|----------------------------|----|
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> ..... | iv |
|----------------------------|----|

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>I. PENDAHULUAN</b> ..... | 1 |
|-----------------------------|---|

|                        |   |
|------------------------|---|
| A. Latar Belakang..... | 1 |
|------------------------|---|

|                           |   |
|---------------------------|---|
| B. Tujuan Penelitian..... | 4 |
|---------------------------|---|

|                            |   |
|----------------------------|---|
| C. Manfaat Penelitian..... | 4 |
|----------------------------|---|

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> ..... | 5 |
|-----------------------------------|---|

|                           |   |
|---------------------------|---|
| A. <i>Rubiaceae</i> ..... | 5 |
|---------------------------|---|

|                                                  |   |
|--------------------------------------------------|---|
| B. Kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> )..... | 6 |
|--------------------------------------------------|---|

|                                                 |   |
|-------------------------------------------------|---|
| C. Senyawa Asam Klorogenat dalam Biji Kopi..... | 9 |
|-------------------------------------------------|---|

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| D. Isolasi Senyawa Asam Klorogenat..... | 12 |
|-----------------------------------------|----|

|                   |    |
|-------------------|----|
| 1. Ekstraksi..... | 12 |
|-------------------|----|

|                              |    |
|------------------------------|----|
| a. Ekstraksi Padat-Cair..... | 12 |
|------------------------------|----|

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| b. Ekstraksi Cair-Cair (Partisi) ..... | 13 |
|----------------------------------------|----|

|                      |    |
|----------------------|----|
| 2. Kromatografi..... | 15 |
|----------------------|----|

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| a. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ..... | 17 |
|-----------------------------------------|----|

|                            |    |
|----------------------------|----|
| b. Kromatografi Kolom..... | 18 |
|----------------------------|----|

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| c. <i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i> (MPLC) ..... | 19 |
|--------------------------------------------------------------|----|

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| d. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)..... | 20 |
|--------------------------------------------------------------|----|

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| E. Isolasi Asam Klorogenat menggunakan Resin Poliamida | 21 |
|--------------------------------------------------------|----|

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| F. Isolasi Asam Klorogenat menggunakan Resin Penukar Ion..... | 24 |
|---------------------------------------------------------------|----|

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| G. Identifikasi Senyawa Organik secara Spektroskopi..... | 27 |
|----------------------------------------------------------|----|

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 1. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (FTIR)..... | 27 |
|---------------------------------------------------------------|----|

|                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>III. METODE PENELITIAN.....</b>                                  | <b>30</b> |
| A. Waktu dan Tempat Penelitian .....                                | 30        |
| B. Alat dan Bahan .....                                             | 30        |
| C. Prosedur Penelitian .....                                        | 31        |
| 1. Persiapan Sampel .....                                           | 31        |
| 2. Ekstraksi.....                                                   | 32        |
| 3. Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....           | 32        |
| 4. Partisi (Ekstraksi Cair-Cair).....                               | 32        |
| 5. Fraksinasi Ekstrak Air dengan MPLC .....                         | 33        |
| 6. Pemurnian dengan Kromatografi Kolom .....                        | 33        |
| 7. Analisis HPLC .....                                              | 34        |
| 8. Analisis Spektrofotometri IR.....                                | 36        |
| <b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>                                | <b>37</b> |
| A. Ekstraksi Senyawa Kimia dalam Kopi Robusta .....                 | 37        |
| B. Identifikasi Pendahuluan Senyawa Asam Klorogenat dengan KLT .... | 39        |
| C. Ekstraksi Cair-Cair (Partisi) .....                              | 42        |
| D. Fraksinasi dan Pemurnian.....                                    | 46        |
| 1. Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom.....                        | 46        |
| a. Pemurnian dengan Poliamida .....                                 | 46        |
| b. Pemurnian dengan Silika Gel .....                                | 49        |
| b. Pemurnian dengan Resin Amberlite™ FPA98 Cl .....                 | 51        |
| 2. Fraksinasi dengan MPLC .....                                     | 54        |
| a. Analisis HPLC .....                                              | 56        |
| b. Pemurnian dengan Silika Gel .....                                | 58        |
| c. Analisis Spektrofotometri Inframerah (FT-IR).....                | 60        |
| <b>V. SIMPULAN DAN SARAN.....</b>                                   | <b>62</b> |
| A. Simpulan.....                                                    | 62        |
| B. Saran .....                                                      | 62        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>                                          | <b>63</b> |
| <b>LAMPIRAN.....</b>                                                | <b>68</b> |
| 1. Pembuatan Pereaksi .....                                         | 69        |
| 2. Diagram Alir Penelitian .....                                    | 70        |
| 3. Hasil Determinasi Tumbuhan .....                                 | 72        |



## DAFTAR TABEL

| Tabel                                                                                                                 | Halaman |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1. Kandungan Kimia dalam Biji Kopi .....                                                                              | 8       |
| 2. Karakteristik Frekuensi Uluran Beberapa Gugus Fungsi pada Spektroskopi Inframerah (Banwell dan McCash, 1994) ..... | 28      |
| 3. Konsentrasi Asam Klorogenat pada Fraksi F2-F4.....                                                                 | 58      |

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar                                                                                                                                                                                               | Halaman |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1. Struktur Asam Klorogenat (Zhang <i>et al</i> , 2008) .....                                                                                                                                        | 11      |
| 2. Tahapan Ekstraksi Cair-Cair Berulang .....                                                                                                                                                        | 15      |
| 3. Poliamida Sebagai Fasa Diam dalam Pemisahan Senyawa Fenolik .....                                                                                                                                 | 22      |
| 4. Struktur dari Stirena, Divinilbenzen, dan Co-Stirena-DVB yang<br>Digunakan sebagai Resin Penukar Ion (Harvey, 2016) .....                                                                         | 26      |
| 5. Buah <i>Cherry</i> Merah Kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> ) .....                                                                                                                           | 37      |
| 6. Biji Kopi yang Telah Dipisahkan dari Kulit Tanduknya .....                                                                                                                                        | 38      |
| 7. Hasil KLT Ekstrak Kasar pada Fasa Diam ODS, Fasa Gerak Metanol-Air 3:7<br>di bawah a) Sinar <i>UV</i> 254 nm; b) Sinar <i>UV</i> 366 nm; c) menggunakan<br>pereaksi serum sulfat.....             | 40      |
| 8. Hasil KLT Ekstrak Kasar pada Fasa Diam ODS, Fasa Gerak Metanol-Air 1:1<br>di bawah a) Sinar <i>UV</i> 254 nm; b) Sinar <i>UV</i> 366 nm; c) menggunakan<br>pereaksi serum sulfat.....             | 41      |
| 9. Partisi ekstrak metanol menggunakan pelarut <i>n</i> -heksana (lapisan atas) dan<br>metanol (lapisan bawah) .....                                                                                 | 43      |
| 10. Hasil KLT Fraksi <i>n</i> -heksana pada Fasa Diam ODS, Fasa Gerak Metanol-Air<br>1:1 di bawah a) Sinar <i>UV</i> 254 nm; b) Sinar <i>UV</i> 366 nm; c) menggunakan<br>pereaksi serum sulfat..... | 43      |
| 11. Partisi ekstrak metanol menggunakan pelarut etil asetat (lapisan atas) dan<br>metanol+akua DM (lapisan bawah) .....                                                                              | 44      |
| 12. Hasil KLT Fraksi Etil Asetat pada Fasa Diam ODS, Fasa Gerak Metanol-Air<br>3:7 di bawah a) Sinar <i>UV</i> 254 nm; b) Sinar <i>UV</i> 366 nm; c) menggunakan<br>pereaksi serum sulfat.....       | 45      |

|                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 13. Hasil KLT Fraksi Air pada Fasa Diam ODS, Fasa Gerak Metanol-Air 3:7 di bawah a) Sinar <i>UV</i> 254 nm; b) Sinar <i>UV</i> 366 nm; c) menggunakan pereaksi serum sulfat.....    | 46 |
| 14. Kromatografi Kolom Poliamida .....                                                                                                                                              | 47 |
| 15. Hasil KLT Fraksi Hasil Kolom Poliamida dengan Fasa Diam ODS dan Fasa Gerak Metanol-Air 3:7 di bawah sinar <i>UV</i> 254nm .....                                                 | 47 |
| 16. Hasil Kromatografi Kolom Poliamida; a) Fraksi A yang mengandung asam klorogenat dan b) endapan Fraksi A yang tidak larut dalam metanol .....                                    | 48 |
| 17. Kromatografi Kolom Silika Gel .....                                                                                                                                             | 50 |
| 18. Hasil KLT Fraksi A21 pada Fasa Diam ODS dan Fasa Gerak Metanol-Air 3:7 di bawah a) Sinar <i>UV</i> 254 nm; b) Sinar <i>UV</i> 366 nm; c) menggunakan pereaksi serum sulfat..... | 51 |
| 19. Kromatografi Kolom Amberlite™ FPA98 Cl .....                                                                                                                                    | 52 |
| 20. Hasil KLT Fraksi Aa1 dan Aa2 pada Fasa Diam ODS dan Fasa Gerak Metanol-Air 3:7 di bawah a) Sinar <i>UV</i> 254nm dan b) Sinar <i>UV</i> 366nm .....                             | 53 |
| 21. Kromatogram MPLC.....                                                                                                                                                           | 54 |
| 22. Hasil KLT Hasil KLT F2-F4 pada Fasa Diam ODS, Fasa Gerak Metanol-Air 3:7 di bawah Sinar <i>UV</i> 254 nm.....                                                                   | 56 |
| 23. Endapan F2 dan F3 .....                                                                                                                                                         | 56 |
| 24. Kromatogram HPLC untuk fraksi (a) F2; (b) F3; dan (c) F4.....                                                                                                                   | 57 |
| 25. Kromatografi Kolom Fraksi F2' .....                                                                                                                                             | 59 |
| 26. Hasil KLT Fraksi a'=1-9, b'=10-32, c'=33-68 dan d'=69-70 pada Fasa Diam ODS, Fasa Gerak Metanol-Air 1:1 di bawah Sinar <i>UV</i> 254 nm.....                                    | 59 |
| 27. Spektrum Inframerah a) Senyawa F2 dan b) Amilosa dari Pati Tapoika (Rohaeti dkk., 2003) .....                                                                                   | 60 |
| 28. Struktur Amilosa (Rohaeti dkk., 2003) .....                                                                                                                                     | 61 |

## **I. PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Kopi biasanya diolah menjadi salah satu minuman yang banyak disukai oleh masyarakat Indonesia saat ini. Selain itu, kopi berperan sebagai komoditas andalan dalam sektor perkebunan Indonesia (Chandra dkk., 2013), dengan demikian kopi memiliki peran penting bagi sumber devisa negara dan penghasilan bagi petani kopi. Kopi memiliki berbagai macam jenis, sehingga memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Jenis kopi pertama yang dikembangkan di Indonesia adalah kopi arabika (*Coffee arabica*), namun saat ini 90% kopi yang dibudidayakan di Indonesia adalah kopi robusta (Ardiansyah, 2018). Tidak hanya di Indonesia, banyak masyarakat dunia mengolah kopi menjadi minuman bahkan makanan yang berkualitas dan memiliki harga jual yang tinggi. Hal ini diperkuat dengan pernyataan dari Fujioka dan Shibamoto (2008) bahwa kopi meliputi urutan kedua dari semua komoditas pangan yang dikonsumsi dan diperdagangkan di seluruh dunia. Food and Agriculture Organization (2015) menyebutkan bahwa Indonesia merupakan produsen kopi terbesar ketiga di dunia setelah Brazil dan Vietnam.

Dua jenis kopi yang banyak dibudidayakan di Indonesia yaitu *Coffea arabica* yang dikenal sebagai kopi Arabika dan *Coffea canephora* atau kopi Robusta. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik, produksi tanaman kopi perkebunan rakyat di Provinsi Lampung mencapai 116.345 ton dari total 666.992 ton produksi kopi di Indonesia pada tahun 2017. Provinsi Lampung penyumbang kopi terbesar kedua setelah Sumatera Selatan, yaitu sebesar 17,44% produksi kopi di Indonesia. Sehingga dapat dikatakan bahwa kopi merupakan salah satu produk perkebunan andalan di Provinsi Lampung.

Kopi robusta dan kopi arabika memiliki perbedaan di antaranya iklim ideal untuk tumbuh, sifat fisik, dan komposisi kimia yang terkandung di dalamnya. Komponen kimia di dalam kopi seperti kafein, asam klorogenat, polisakarida, protein, lemak, asam amino, asam organik, dan mineral dapat menghasilkan efek yang menguntungkan bagi kesehatan manusia (Hidgon dan Frei, 2006).

Asam klorogenat merupakan salah satu senyawa yang secara alami terkandung di dalam biji kopi dengan kadar yang cukup tinggi. Sebagai salah satu senyawa asam yang dominan pada biji kopi, asam klorogenat memiliki kadar sebanyak 6,1-11,3 gram/100 gram biji kopi hijau robusta dan 4,1-7,9 gram/100 gram biji kopi hijau arabika (Farah, 2012). Kandungan asam klorogenat lebih rendah pada biji kopi sangrai, karena selama penyangraian sebagian besar asam klorogenat terurai menjadi asam kafeat dan asam kuinat (Yusianto, 2014).

Asam klorogenat memiliki gugus ester yang terbentuk dari reaksi esterifikasi asam kuinat dan beberapa asam trans-sianamat, umumnya kafeat, *p*-kumarat, dan asam ferulat (Monteiro *et al.*, 2007). Asam klorogenat dapat melindungi pertumbuhan kopi dari mikroorganisme, serangga dan radiasi UV (Farah, 2012) sedangkan manfaat asam klorogenat bagi kesehatan manusia yaitu sebagai antioksidan dan antivirus (Farah dan Carmen, 2006). Dengan demikian semakin banyak peneliti yang tertarik untuk mengisolasi asam klorogenat dari biji kopi. Salah satu faktor yang memengaruhi tingkat kenikmatan bagi penggemar kopi adalah rasa pahit. Dalam biji kopi, lakton asam klorogenat atau *chlorogenic acid lactones* adalah salah satu senuawa yang memberikan rasa pahit pada kopi. Senyawa ini terbentuk selama proses pemanggangan (*roasting*) (Clifford, 2000).

Ekstraksi senyawa bahan alam dari tumbuhan umumnya menggunakan pelarut organik, seperti metanol, etil asetat, heksan, dan aseton. Namun penggunaan pelarut organik ini dapat menyebabkan kerusakan lingkungan, sehingga diperlukan sebuah proses isolasi senyawa kimia yang ramah lingkungan dengan melibatkan sedikit mungkin bahan-bahan yang berbahaya bagi lingkungan. Fukuda *et al.* (2012) telah mencoba mengekstrak senyawa asam klorogenat dari biji kopi hijau menggunakan pelarut air dengan teknik perebusan, sehingga penelitian ini menggunakan air sebagai pelarut utama dalam proses isolasi. Pelarut air digunakan karena mudah diperoleh dan lebih murah dibandingkan pelarut organik, selain itu tidak memiliki efek samping terhadap kesehatan dan lingkungan.

Metode yang digunakan untuk mengisolasi senyawa asam klorogenat dalam penelitian ini adalah dengan MPLC kromatografi kolom dan dengan beberapa jenis adsorben. Fraksi hasil kromatografi kolom dianalisis menggunakan HPLC untuk mengetahui konsentrasi asam klorogenat dan komponen senyawa lain yang terdapat di dalam sampel. Selain itu analisis FT-IR dilakukan untuk mengkarakterisasi gugus fungsi yang terdapat dalam fraksi murni.

## **B. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian adalah mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa asam klorogenat dari biji tumbuhan kopi Robusta (*Coffea canephora*) dengan membandingkan hasil fraksinasi dengan standar asam klorogenat.

## **C. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan mengenai teknik isolasi asam klorogenat yang terdapat dalam biji tumbuhan kopi Robusta (*Coffea canephora*).

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. *Rubiaceae*

Famili *Rubiaceae* merupakan salah satu suku tumbuhan berbunga. Famili ini terdiri dari atas pepohonan, perdu, liana, atau herbal yang tumbuh di atas tanah. Terdapat sejumlah tumbuhan penghasil alkaloid penting seperti kafeina (dalam kopi yang dihasilkan dari beberapa tumbuhan jenis *Coffea*) dan kinina (dalam kulit batang *Cinchona*). Anggota penting lainnya seperti gambir (*Uncaria*; tanaman aromatik), soka (*Ixora*; tanaman hias), dan mengkudu (*Morinda*; tanaman obat).

Secara keseluruhan famili *Rubiaceae* termasuk kedalam suku tumbuhan berbunga keempat terbesar dengan anggota sekitar 650 genera dan lebih dari 13.000 spesies. *Rubiaceae* memiliki distribusi kosmopolitan, tetapi keragaman spesies terbesar terkonsentrasi di daerah subtropis. Tumbuhan yang termasuk pada famili *Rubiaceae* merupakan tumbuhan yang bentuk daunnya sederhana, daun mahkota bunga simetri radial dan menjadi satu (semipetal) membentuk tabung (tubular) dan ovarium inferior (Stevens, 2015).



## B. Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kedudukan tanaman kopi Robusta dalam taksonomi tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut :

|              |                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------|
| Kingdom      | : <i>Plantae</i> (Tumbuhan)                     |
| Subkingdom   | : <i>Tracheobionta</i> (Tumbuhan pembuluh)      |
| Super Divisi | : <i>Spermatophyta</i> (menghasilkan biji)      |
| Divisi       | : <i>Magnoliophyta</i> (Tumbuhan berbunga)      |
| Kelas        | : <i>Magnoliopsida</i> (Berkeping dua, dikotil) |
| Subkelas     | : <i>Asteridae</i>                              |
| Ordo         | : <i>Rubiales</i>                               |
| Famili       | : <i>Rubiaceae</i> (Suku kopi-kopian)           |
| Genus        | : <i>Coffea</i>                                 |
| Spesies      | : <i>Coffea canephora</i>                       |

Kopi robusta (*Coffea canephora*) berada di Indonesia sejak tahun 1900, kopi ini tidak memerlukan syarat tumbuh dan pemeliharaan yang ringan, sehingga produksinya sangat tinggi. Oleh karena itu kopi ini cepat berkembang dan mendesak kopi-kopi lainnya. Saat ini lebih dari 90% dari areal pertanaman kopi Indonesia terdiri atas kopi Robusta (Prastowo dkk., 2010). Kopi Robusta mampu beradaptasi lebih baik dibandingkan kopi Arabika. Area perkebunan kopi Robusta di Indonesia relatif luas karena dapat tumbuh baik pada daerah yang lebih rendah. Kopi Robusta memiliki karakteristik fisik biji agak bulat, lengkungan tebal dan garis tengah dari atas ke bawah hampir rata (Rukmana, 2014).

Ada 4 jenis kelompok kopi yang dikenal , yaitu kopi Arabika, kopi Robusta, kopi Liberika dan kopi Ekselsa. Kelompok kopi yang dikenal memiliki nilai ekonomi dan diperdagangkan secara komersial yaitu kopi Arabika dan kopi Robusta. Sedangkan, kelompok kopi Liberika dan kopi Ekselsa kurang ekonomis dan kurang komersial (Rahardjo, 2013). Kualitas citra rasa kopi Robusta di bawah kopi Arabika, tetapi kopi Arabika lebih rentan terhadap penyakit. Oleh karena itu, luas areal pertanaman kopi dan produksi kopi terbesar adalah kopi Robusta.

Ciri-ciri kopi Robusta antara lain memiliki rasa seperti coklat, lebih pahit, dan sedikit asam, bau yang dihasilkan khas dan manis. Tanaman kopi Robusta biasanya sudah dapat berproduksi pada umur 2,5 tahun. Umur ekonomis kopi Robusta dapat berproduksi hingga 15 tahun. Namun demikian tingkat produksi kopi Robusta sangat dipengaruhi oleh tingkat pemeliharaannya (Haryanto, 2012).

*C. canephora* merupakan tanaman perdu yang dapat tumbuh baik di daerah tropis ( $15^{\circ}\text{LU} - 12^{\circ}\text{LS}$ ) pada dataran rendah dengan ketinggian sampai 800 dpl serta tumbuh optimum pada temperatur antara  $22-30^{\circ}\text{C}$ . Tanaman kopi tersebut akan mulai berbunga pada umur antara 1 sampai 2 tahun dan melakukan penyerbukan silang dengan bantuan angin atau serangga (Pohlan dan Janssens, 2010). Tidak seperti kopi arabika, kopi jenis ini memiliki tangkai putuk yang menjulang jauh dengan panjang sekitar 3 cm, sedangkan benang sari tertancap diantara petala dengan panjang hanya sekitar 5 mm

(Steenis *et al*, 2008). Oleh karenanya, sewaktu bunga mekar akan sulit untuk melakukan penyerbukan sendiri.

*C. canephora* merupakan spesies diploid ( $2n=22$ ) yang memiliki cita rasa yang lebih rendah dibandingkan dengan *C. arabica* sehingga memiliki produktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan *C. arabica*. Dengan demikian, *C. canephora* banyak dibudidayakan di dataran rendah di Indonesia termasuk di daerah Lampung dan sekitarnya. *C. canephora* memiliki banyak varietas dan yang paling terkenal adalah Robusta yang banyak dibudidayakan di Indonesia dan varietas Conilon yang banyak dibudidayakan di Brazil (Pohlan dan Janssens, 2010). Adapun kandungan senyawa kimia yang terdapat di dalam kopi ditunjukkan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Kandungan Kimia dalam biji Kopi

| <b>Kandungan<br/>Kimia</b> | <b>Konsentrasi (g/100g)</b> |         |
|----------------------------|-----------------------------|---------|
|                            | Regular                     | Bold    |
| <b>Sukrosa</b>             | 4,2                         | 1,6     |
| <b>Kafein</b>              | 1,1-1,3                     | 2,4-2,5 |
| <b>Asam klorogenat</b>     | 1,9-2,5                     | 3,3-3,8 |
| <b>Protein</b>             | 6,5-10                      | 7,5-10  |
| <b>Polisakarida</b>        | 3,1-3,3                     | 3,7     |

(Farhaty dan Muchtaridi, 2016)

Biji kopi hijau robusta paling banyak mengandung asam klorogenat dibandingkan dengan biji kopi lainnya (Farah, 2012). Nilai kandungan asam klorogenat pada biji kopi robusta mencapai 6,1-11,3 mg per gram biji kopi.

Namun, perbedaan kandungan asam klorogenat tidak hanya didasarkan pada jenis saja, adanya beberapa faktor seperti pemanasan atau penyaringan biji kopi hijau atau disebut juga “*roasted coffee*”. Selama proses pemanggangan atau penyangraian kopi terjadi perubahan fisik ataupun kimia, begitupun dengan kandung dalam biji kopi.

Proses penyangraian pada suhu di atas 180-200°C dapat menyebabkan perubahan besar dalam komposisi kimia dan aktivitas biologis kopi sebagai akibat dari hasil reaksi Maillard dan Strecker. Efek dari pemanggangan kopi yaitu meningkatkan kepahitan kopi karena adanya pelepasan asam kafein dan pembentukan lakton dari derivatif fenol lain yang bertanggung jawab untuk rasa dan aroma (Belay dan Gholap, 2009). Menurut Farah dan Carmen (2006) pada proses penyangraian asam dikafeoilkuinat mengalami hidrolisis menjadi monoester dan asam kafein namun pada proses ini, fenol yang bersifat volatile meningkat. Sekitar 5,5% asam klorogenat pada kopi Robusta akan berubah menjadi 1,5- $\gamma$ -quinolakton selama proses penyangraian.

### **C. Senyawa Asam Klorogenat dalam Biji Kopi**

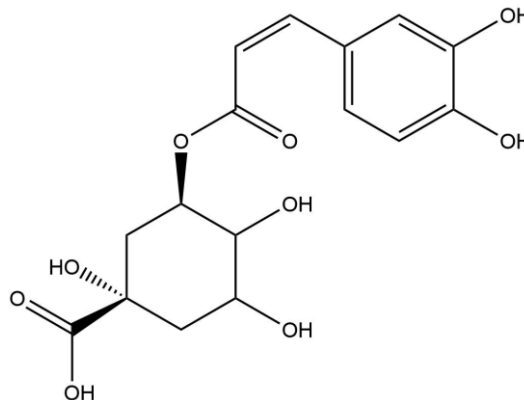
Asam klorogenat pada produk akhir dari kopi memiliki pengaruh penting karena memengaruhi tingkat keasaman dan kepahitan dari kopi tersebut (Ayelign dan Sabally, 2013). Farah *et al.* (2005) menyebutkan bahwa pengolahan kopi dengan cara dipanggang akan meningkatkan kadar lakton asam klorogenat karena semakin banyak prekursor yang terdapat dalam kopi tersebut yaitu asam klorogenat. Kopi yang diproses dengan cara dipanaskan

atau dipanggang akan meningkatkan tingkat kepahitan dari kopi karena proses tersebut dapat menyebabkan terjadinya reaksi Millard.

Biji kopi ataupun pada kopi itu sendiri umumnya mengandung 7-10% senyawa fenolik asam klorogenat (Coffee Intelligence, 2015). Asam klorogenat adalah antioksidan alami yang tersebar luas di berbagai jenis tumbuhan, salah satunya dalam biji kopi. Tergantung pada spesiesnya, biji kopi hijau mengandung sekitar 6–10% asam klorogenat, dengan kadar asam klorogenat yang lebih tinggi dalam biji kopi robusta dibandingkan biji kopi arabika. Asam klorogenat yang paling sering ditemukan adalah asam 5-O-kafeoilkinat (5-CQA), yang biasanya tersedia satu-satunya secara komersial (Mirna *et al.*, 2014). Asam klorogenat menunjukkan sifat antioksidan yang kuat terhadap penyakit degeneratif yang berkaitan dengan usia, membatasi oksidasi lipid yang memiliki densitas rendah dan menghilangkan spesies reaktif beracun (Stalmach *et al.*, 2006; Belay dan Gholap, 2009).

Sebagai salah satu senyawa bioaktif yang banyak terkandung di dalam kopi, asam klorogenat (**Gambar 1**) merupakan senyawa antioksidan, anti-inflamasi, anti-tumor, anti-mutagenik dan agen anti-karsinogenik (Pellati, 2004). Pada biji kopi, konsentrasi asam klorogenat sangat tinggi, dan kandungan asam klorogenat yang mudah larut dalam kopi kering dapat mencapai 12 persen berdasarkan bobot. Asam klorogenat tidak beracun bagi manusia, asam ini terbentuk dalam jumlah yang relatif banyak pada umbi kentang. Oksidasi dari asam klorogenat yang diikuti oleh polimerisasi

(gabungan dari monomer-monomer) menyebabkan pembentukan quinon yang menyebabkan warna coklat pada umbi yang baru terpotong. Reaksi ini tergantung pada enzim polifenol oksidase dengan kofaktor tembaga dan  $O_2$  sebagai donor elektron quinon yang terbentuk oleh karena asam klorogenat memiliki aktivitas fungistatis (menghambat namun tidak membunuh fungi) yang kuat sehingga membantu daya tahan tanaman terhadap penyakit yang disebabkan oleh fungi (Silsbury dan Ross, 1995).



**Gambar 1.** Struktur Asam Klorogenat (Zhang *et.al.*, 2008)

Asam klorogenat termasuk ke dalam kelompok senyawa fenolik, mempunyai sifat yang larut dalam air dan terbentuk dari esterifikasi asam kuinat dan asam trans-sinamat tertentu seperti asam kafein, asam ferulat, dan asam kumarat. Subgroup utama dari isomer asam klorogenat adalah asam kafeoilkuinat (CQA), asam feruloilkuinat (FQA), dan asam dikafeoilkuinat (di-CQA), dan asam p-kumaroilkuinat (p-CQA) pada jumlah yang lebih kecil. Menurut Farah dan Carmen (2006), asam klorogenat pada biji kopi terdiri dari 9 isomer utama diantaranya 3 isomer dari CQA (3-, 4-, dan 5-CQAs), 3 isomer dari di-CQA (3,4-, 3,5-, dan 4,5-di-CQAs), dan 3 isomer dari FQA (3-, 4-, dan 5-FQAs).

## **D. Isolasi Senyawa Asam Klorogenat**

### **1. Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa atau komponen pada suatu sampel menggunakan pelarut yang sesuai, prinsip ekstraksi yaitu didasarkan pada distribusi senyawa yang terlarut (Khopkar, 2003). Pada penelitian ini ekstraksi dua tahapan ekstraksi yaitu ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair.

#### **a. Ekstraksi Padat-Cair**

Ekstraksi padat-cair dilakukan dengan perendaman sampel menggunakan pelarut yang sesuai pada suhu tertentu. Pada penelitian ini dilakukan cara perebusan dengan pelarut, ekstraksi dengan air (*green solvent*) merupakan metode ekstrak yang paling sederhana dan diharapkan dapat mengurangi pencemaran limbah organik di lingkungan. Ekstraksi asam klorogenat menggunakan pelarut air telah dilakukan oleh Fukuda *et al.* (2012) pada suhu 95°C selama 30 menit dengan persen *recovery* asam klorogenat sebesar 80,1%. Pemisahan asam klorogenat dari tanaman kamperfuli (*Lonicera japonica*) juga telah berhasil dilakukan oleh Zhang *et al.* (2008) menggunakan metode konvensional dari ekstrak kasar bunga tumbuhan kamperfuli yang dilakukan dengan ekstraksi padat-cair menggunakan pelarut air pada suhu 60°C selama 30 menit.

Dalam proses ekstraksi padat-cair diperlukan kontak yang cukup lama antara sampel padat dan pelarut yang digunakan. Proses ini sangat

umum digunakan untuk mengisolasi suatu senyawa yang terdapat dalam sampel bahan alam. Sampel bahan alam yang digunakan juga berperan untuk menentukan keberhasilan proses ekstraksi, misalnya ukuran partikel bahan yang dipakai. Bahan yang akan digunakan dalam proses ekstraksi sebaiknya berukuran seragam agar mempermudah kontak antara pelarut dan bahan sehingga proses ekstraksi dapat berlangsung sempurna (Sudarmadji dkk., 1996).

Proses ekstraksi sangat diperlukan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga senyawa metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Lenny, 2006).

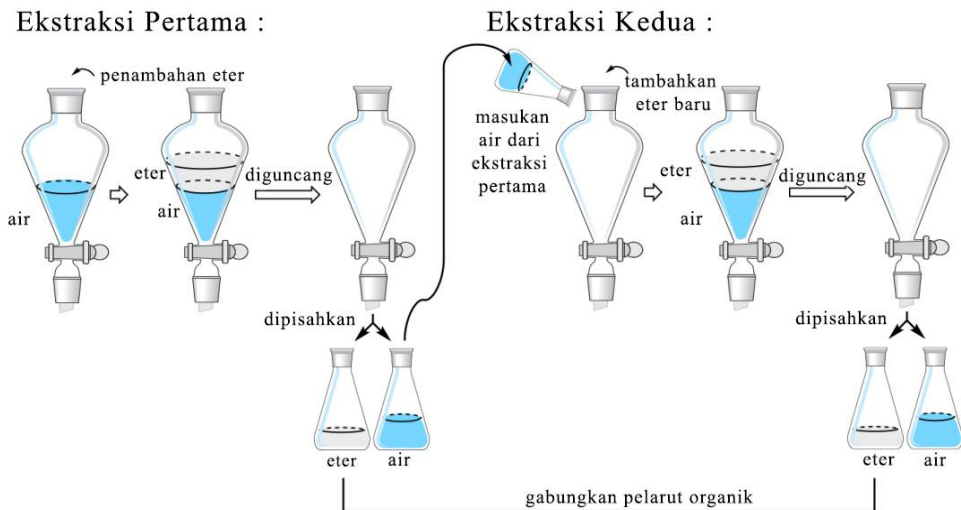
#### **b. Ekstraksi Cair-Cair (Partisi)**

Menurut Khopkar (2003), ekstraksi cair-cair merupakan salah satu metode ekstraksi berdasarkan sifat kelarutan komponen atau senyawa target dan distribusinya dalam dua pelarut yang tidak saling campur. Senyawa polar akan larut dalam pelarut polar, senyawa semipolar akan terlarut dalam pelarut semipolar, dan senyawa non-polar akan larut pada pelarut non-polar. Ekstraksi ini dilakukan secara bertahap dengan corong pisah, campuran dua



pelarut akan membentuk lapisan dengan berat jenis (densitas) lebih besar akan berada pada lapisan bawah.

Ketika larutan ditempatkan dalam corong pemisah dan diguncang dengan pelarut yang tidak bercampur, pelarut terpisah menjadi kedua lapisan. Komponen dikatakan "partisi" di antara dua lapisan, atau mendistribusikan diri di antara dua lapisan. Ketika kesetimbangan telah terbentuk, rasio konsentrasi zat terlarut di setiap lapisan adalah konstan untuk setiap sistem, dan ini dapat diwakili oleh nilai  $K_D$  (disebut koefisien partisi atau koefisien distribusi). Koefisien partisi ( $K_D$ ) adalah rasio konsentrasi senyawa dalam lapisan organik dibandingkan dengan lapisan air. Biasanya dilakukan beberapa kali ekstraksi untuk mengisolasi senyawa yang diinginkan, karena metode ini lebih efisien daripada ekstraksi tunggal. Dalam prosedur ekstraksi berulang, sejumlah pelarut digunakan untuk mengekstraksi satu lapisan (biasanya pelarut air) beberapa kali berturut-turut (**Gambar 2**). Ekstraksi diulang dua hingga tiga kali, atau mungkin lebih banyak lagi jika senyawa tersebut memiliki koefisien partisi yang rendah dalam pelarut organik (Nichols, 2019).



**Gambar 2.** Tahapan Ekstraksi Cair-Cair Berulang

## 2. Kromatografi

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Istilah kromatografi berasal dari gabungan kata “*chroma*” (warna) dan “*graphein*” (menuliskan). Prinsip pemisahan kromatografi yaitu adanya distribusi komponen-komponen dalam fase diam dan fase gerak berdasarkan perbedaan sifat fisik komponen yang akan dipisahkan. Kromatografi dapat digunakan untuk analisa kualitatif dan kuantitatif. Pada dasarnya semua cara kromatografi menggunakan dua fase yaitu fase diam (*stationer*) dan fase bergerak (*mobile*) (Ardianingsih, 2009). Persyaratan utama kromatografi adalah sebagai berikut :

- Ada fase diam dan fase gerak.
- Fase diam tidak boleh bereaksi dengan fase gerak.
- Komponen sampel (contoh) harus larut dalam fase gerak dan berinteraksi dengan fase tetap (diam).

- Fase gerak harus bisa mengalir melewati fase diam, sedangkan fase diam harus terikat kuat di posisinya.

Pemisahan dengan metode kromatografi dilakukan dengan memanfaatkan sifat-sifat fisik dari sampel, seperti kelarutan, adsorpsi, keasirian dan kepolaran. Kromatografi merupakan metode pemisahan suatu senyawa yang didasarkan atas perbedaan laju perpindahan dari komponen-komponen dalam campuran. Sehingga metode kromatografi ini didefinisikan sebagai pemisahan berdasarkan distribusi senyawa dalam fase gerak dan fase diam (Murniasih, 2003).

Pelarut murni atau sistem pelarut tunggal dapat digunakan untuk mengelusi semua komponen. Selain itu, sistem gradien pelarut juga digunakan. Pada elusi gradien, polaritas sistem pelarut ditingkatkan secara perlahan dengan meningkatkan konsentrasi pelarut ke yang lebih polar. Pemilihan pelarut eluen tergantung pada jenis adsorben yang digunakan dan kemurnian senyawa yang dipisahkan. Pelarut harus mempunyai kemurnian yang tinggi. Keberadaan pengganggu seperti air, alkohol, atau asam pada pelarut yang kurang polar akan mengganggu aktivitas adsorben (Braithwaite dan Smith, 1995).

Kromatografi digunakan pada beberapa teknik pemisahan berdasarkan pada medium migrasi yang berbeda, yaitu distribusinya terhadap fase diam dan fase gerak. Pada teknik ini harus terdapat medium perpindahan tempat, yaitu tempat terjadinya pemisahan. Kemudian harus terdapat gaya dorong agar

spesies dapat berpisah sepanjang medium migrasi dan harus terdapat gaya tolakan selektif. Gaya tolakan selektif ini yang menyebabkan pemisahan komponen dari bahan kimia (Sienko *et al.*, 1984).

**a. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi lapis tipis adalah metode untuk menganalisis campuran dengan memisahkan senyawa dalam campuran berdasarkan kepolaran. Metode ini dapat digunakan untuk menentukan jumlah komponen dalam campuran, identitas senyawa, dan kemurnian senyawa, juga dapat digunakan untuk memantau kemajuan reaksi, serta mengidentifikasi kondisi pelarut yang tepat untuk pemisahan kolom kromatografi. Umumnya dilakukan pada plat Silika-gel F<sub>254</sub> menggunakan eluen butanol: asam asetat: air (BAW 3: 1: 1) sebagai fase gerak (Linda, 1994; Mirna *et al.*, 2014).

Kromatografi lapis tipis merupakan suatu teknik pemisahan komponen-komponen campuran senyawa-senyawa yang melibatkan partisi suatu senyawa di antara padatan penyerap (*adsorben*, fasa diam) yang dilapiskan pada pelat kaca atau aluminium dengan suatu pelarut (fasa gerak) yang mengalir melewati fasa diam. Setelah sampel di-*spot* pada plat KLT, plat diletakan di dalam bejana tertutup rapat (*chamber*) yang berisi larutan organik yang sesuai (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Pengaliran pelarut ini juga dikenal sebagai proses elusi. KLT merupakan teknik analisis yang cepat

dan sederhana, sehingga mempunyai peranan penting dalam pemisahan senyawa-senyawa yang volatilitasnya relatif rendah, baik senyawa organik maupun senyawa anorganik (Khopkar, 2003). Selanjutnya dapat dihitung nilai *Retention factor* (Rf) dengan persamaan :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

#### **b. Kromatografi Kolom**

Ada beberapa jenis kromatografi kolom, seperti pada penelitian ini menggunakan kolom adsorpsi dan penukar ion. Fase diam dengan pemisahan berdasarkan perbedaan adsorpsi ada dua jenis yaitu fasa normal yang bersifat polar dan fase terbalik (*reversed phase*) yang bersifat non polar. Pada fase normal yang kepolarannya paling rendah atau non polar akan keluar (terelusi) paling awal dan yang paling polar akan terelusi paling akhir. Konsep pemilihan fase diam adalah berdasarkan kepolaran komponen-komponen yang akan dipisahkan yaitu fase normal untuk yang polar dan fase terbalik untuk yang non polar.

Kromatografi yang dilakukan dalam kolom besar merupakan metode kromatografi terbaik untuk pemisahan dalam jumlah besar (lebih dari 1 gram). Pada kromatografi kolom, campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita pada bagian atas kolom penyerap yang berada dalam tabung kaca, tabung logam, dan tabung plastik. Pelarut atau fasa

gerak dibiarkan mengalir melalui kolom karena aliran yang disebabkan oleh gaya berat atau didorong dengan tekanan. Pita senyawa pelarut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah, dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari kolom (Firdaus, 2011).

**c. *Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)***

Kromatografi cair tekanan sedang (MPLC) adalah salah satu dari berbagai teknik kromatografi kolom preparatif. Pemisahan di bawah tekanan menghasilkan ukuran partikel yang lebih kecil sehingga kemungkinan dan meningkatkan keragaman fase stasioner yang dapat digunakan. MPLC diperkenalkan pada 1970-an sebagai teknik efisien untuk pemisahan preparatif senyawa organik. MPLC mengatasi salah satu kelemahan utama kromatografi cair tekanan rendah (LPLC), yaitu penggunaan sampel yang terbatas.

Perbedaan antara kromatografi cair tekanan rendah, tekanan menengah dan tekanan tinggi didasarkan pada rentang tekanan yang diterapkan dalam teknik ini. MPLC memungkinkan pemurnian jumlah senyawa yang besar dan, tidak seperti kromatografi kolom terbuka, pemisahan yang lebih cepat dan lebih baik dapat diperoleh. Pengemasan material dengan ukuran partikel yang lebih rendah di bawah tekanan meningkatkan kualitas pemisahan dan terlebih lagi fase padat yang dapat digunakan kembali (Hostettmann dan Terreaux, 2000).

Salah satu detektor yang digunakan pada MPLC adalah Spektrofotometer *UV-Vis*. Serapan spektrum *UV-Vis* asam klorogenat diukur pada panjang gelombang 200-500 nm pada suhu kamar. Wilayah asam klorogenat memiliki 2 titik maksimum yaitu pada puncak pertama pada panjang gelombang 217 nm dan bahu pada  $\lambda_{\text{maks}}$  240 nm dan puncak kedua pada panjang gelombang 324 nm dan bahu pada  $\lambda_{\text{maks}}$  296 nm (Belay dan Gholap, 2009).

**d. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)***

Metode HPLC adalah salah satu alat paling baik yang tersedia untuk aplikasi analisis di banyak bidang, karena keserbagunaannya, batas deteksi rendah, dan aksesibilitas, sehingga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif dan kualitatif. Metode ini populer karena tidak merusak senyawa dan dapat diterapkan pada senyawa yang sensitif terhadap suhu (tidak seperti menggunakan kromatografi gas). HPLC adalah teknik yang sangat sensitif, karena menggabungkan berbagai pilihan metode pendeteksian (Linda, 1994; Mohammed dan Al-Bayati, 2009; Mirna *et al.*, 2014).

Analisis asam klorogenat secara kuantitatif dapat dilakukan dengan menggunakan instrumen HPLC. Tidak hanya HPLC, metode spektrofotometer *UV-Vis* juga dapat digunakan untuk menganalisis asam klorogenat secara kuantitatif dan kualitatif, metode ini dipilih

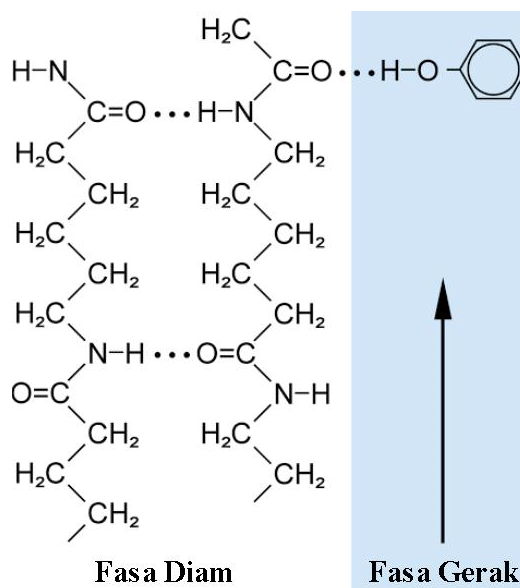
dikarenakan sederhana, cepat dan murah dibandingkan dengan HPLC (Ayelign dan Sabally, 2013).

#### **E. Isolasi Asam Klorogenat menggunakan Poliamida**

Poliamida banyak digunakan untuk pemisahan ekstrak bahan alam yang mengandung senyawa dengan gugus fenolik dan polifenolik. Poliamida memiliki kapasitas adsorpsi tinggi karena sifat penyerapannya jauh lebih tinggi daripada silika gel, alumina, dan sebagian besar adsorben lain yang tersedia saat ini. Kromatografi untuk senyawa fenolik menggunakan poliamida telah sering diterapkan untuk isolasi dan penentuan struktur berbagai produk alami. Asam karboksilat juga berikatan dengan poliamida melalui ikatan hidrogen, sedangkan afinitas untuk monokarboksilat masih rendah (Sorbtech, 2019).

Asam dikarboksilat dan asam aromatik dapat berikatan lebih kuat, terutama jika bagian aromatik dari molekul lebih besar. Poliamida memiliki kepolaran medium atau semipolar sehingga dapat digunakan dengan fase gerak yang lebih polar atau kurang polar. Dalam penggunaannya memungkinkan untuk dipakai dalam dua sistem kromatografi yaitu fase normal maupun terbalik menggunakan fase diam yang sama. Adsorpsi tergantung pada: (1) jumlah komponen polar, (2) tingkat aktivitas ikatan hidrogen, (3) ukuran analit, dan (4) bentuk analit. Dengan demikian, isomer struktural dapat dipisahkan dengan baik pada poliamida (Sorbtech, 2019).





**Gambar 3.** Poliamida Sebagai Fasa Diam dalam Pemisahan Senyawa Fenolik.

Afinitas untuk poliamida meningkat terhadap senyawa fenol jenis resorinol, dan ploroglusinol, namun menurun untuk senyawa fenol jenis pirokatekol dan pirogallol. Dapat dikatakan bahwa gugus hidroksil kedua atau ketiga dalam posisi *meta* atau *para* dari suatu hidrokarbon aromatik meningkatkan daya ikatan pada poliamida, sedangkan pada posisi *orto* daya ikatan berkurang. Dalam resorsinol dan hidrokuinon, jelas kedua kelompok hidroksil dapat secara bersamaan berinteraksi dengan dua ikatan amida berbeda dari poliamida yang menghasilkan retensi senyawa yang lebih kuat dibandingkan dengan fenol. Kelompok hidroksil dari pirokatekol sebaliknya harus bersaing untuk kelompok amida yang sama (Sorbtech, 2019).

Gugus hidroksil kedua meningkatkan afinitas untuk eluen yang mengandung air dan dengan demikian juga menambah kecepatan migrasi. Selain jumlah dan posisi gugus hidroksil dari senyawa aromatik, eluen memiliki efek

penting pada afinitas fenol pada poliamida. Apabila pelarut yang digunakan mampu membentuk ikatan hidrogen intramolekuler, maka pelarut juga dapat bersaing dengan ikatan hidrogen antara poliamida dan fenol, atau, mengembangkan interaksinya sendiri dengan senyawa tersebut dan kemudian desorpsi cepat akan terjadi. Kemampuan desorpsi meningkat dengan urutan berikut: air <metanol <aseton <larutan natrium hidroksida encer <formalamida <dimetilformalamida. Kekuatan elusi yang tinggi dari dimetilformalamida mungkin disebabkan karena senyawa tersebut memiliki gugus -CO-N dengan demikian dapat membentuk interaksi yang sama dengan zat fenolik seperti poliamida, yaitu sebagai akseptor hidrogen terkuat (Sorbtech, 2019).

Struktur penyusun poliamida memiliki sifat akseptor ikatan hidrogen sehingga cocok untuk pemisahan senyawa polifenol seperti asam fenolik, flavonol, dan flavonoid. Pemisahan dicapai dengan adanya campuran pelarut asam asetat dan etanol. Tingkat adsorpsi ikatan hidrogen ditinjau berdasarkan data yang diperoleh dari perilaku elusi dari berbagai zat terlarut polifenolik sederhana. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa polifenol dapat dipisahkan oleh kromatografi adsorpsi pada kolom yang dikemas dengan resin berpori (Gao, 2011; Zhang *et al.*, 2008), gel agarosa yang tertaut silang 12% (Gu, 2006) dan resin poliamida (Bai, 2006).

Hasil studi yang pertama dilakukan oleh Gao (2011) menunjukkan perilaku adsorpsi senyawa polifenol pada kolom resin poliamida yang diperoleh menggunakan komposisi fase gerak asam asetat dan etanol, hasilnya

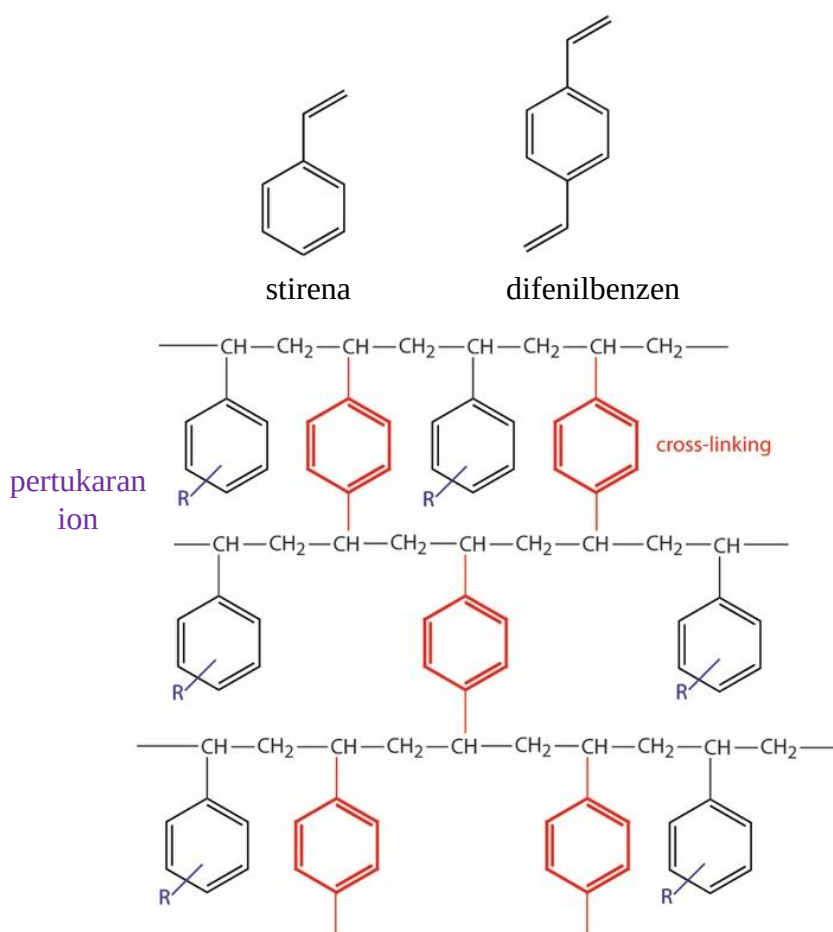
menunjukkan latar belakang utama disebabkan oleh interaksi ikatan hidrogen. Penelitiannya menggunakan resin poliamida (berpori 74-165 mm), sebelum digunakan, partikel poliamida dicuci secara berurutan dengan etanol 95%, 1M HCl, 1M NaOH, 1M asam asetat, air suling dan 20% etanol untuk menghilangkan kemungkinan monomer yang tersisa dan agen porogenik yang terperangkap selama proses sintesis. Kemudian, partikel-partikel itu dikemas dalam kolom dan disetimbangkan dengan etanol 20% diikuti oleh air suling.

#### **F. Isolasi Asam Klorogenat menggunakan Resin Penukar Ion**

Penggunaan resin berpori (*macroporous resin*) saat ini mulai banyak diminati untuk memisahkan senyawa bioaktif dari bahan alam karena sifat adsorpsi unik mereka termasuk struktur pori ideal dan berbagai gugus fungsi permukaan yang tersedia, biaya operasi rendah, konsumsi pelarut yang lebih sedikit dan kemudahan regenerasi (Fu *et al.*, 2007). Resin berpori dapat digunakan secara selektif untuk menyerap konstituen dari larutan melalui gaya elektrostatik, interaksi ikatan hidrogen, kompleksasi, dan berdasarkan ukuran. Resin ini tahan lama dan memiliki variasi kepolaran; non-polar (polistirena), kepolaran menengah (kelompok ester) dan polar (amida, amidosianogen, asilamino polistiren), polimer berpori juga memiliki kapasitas adsorpsi yang tinggi. Beberapa penelitian telah dicoba untuk memisahkan asam klorogenat dari tumbuhan kamperfuli dengan resin berpori (Wang *et al.*, 2006).

Dalam penelitian ini digunakan kromatografi kolom penukar anion, anion karboksilat akan melakukan pertukaran dengan anion  $\text{Cl}^-$  yang terdapat dalam fasa diam. Fasa diam yang digunakan adalah resin Amberlite<sup>TM</sup> FPA98UPS  $\text{Cl}$  yang diperoleh dari *The Dow Chemical Company*, resin ini memiliki ukuran partikel berukuran  $640 \pm 50 \mu\text{m}$  dan matriksnya berupa *copolymer-stirena-divinilbenzen (co-stirena-DVB)*. Struktur *co-stirena-DVB* tersusun dari *cross-linked* senyawa *stirena* yang terpolimerisasi sehingga *co-stirena-DVB* dapat digunakan sebagai media adsorpsi dalam berbagai jenis senyawa organik.

Senyawa *co-stirena-DVB* dimodifikasi sehingga dapat digunakan sebagai resin penukar ion, pada **Gambar 4** dapat dilihat bahwa tempat pertukaran ion ditunjukkan dengan warna biru, sedangkan *cross-linking* ditunjukkan dalam warna merah. Resin yang digunakan dalam percobaan ini memiliki gugus fungsi R berupa amina kuartener yang sebagian besar dalam posisi *para* namun tidak terikat pada semua *stirena*. Gugus fungsi amina kuartener menunjukkan bahwa resin yang digunakan termasuk penukar anion basa kuat. Resin Amberlite<sup>TM</sup> FPA98UPS  $\text{Cl}$  dapat digunakan dalam semua kondisi pH yaitu 0-14 (Rice, 2002).



**Gambar 4.** Struktur dari Stirena, Divinilbenzen, dan Co-Stirena-DVB yang Digunakan sebagai Resin Penukar Ion (Harvey, 2016)

Parameter terpenting yang mempengaruhi kapasitas serapan adalah pH awal larutan pengelusi. Penentuan pH awal larutan pengelusi terkait dengan mekanisme adsorpsi ke permukaan adsorben dan mencerminkan sifat interaksi fisikokimia asam klorogenat dalam larutan. Rasio adsorpsi sangat meningkat untuk asam klorogenat dengan penurunan nilai pH. Tidak ada perubahan yang jelas pada rasio adsorpsi ketika nilai pH lebih rendah dari 3. Pada nilai pH yang lebih rendah, permukaan resin akan dikelilingi oleh ion hidronium yang meningkatkan interaksi gugus hidroksil fenolat dari asam klorogenat dengan resin makroporous oleh kekuatan menarik yang lebih

besar. Pada nilai pH yang lebih tinggi, adsorpsi asam klorogenat pada resin mungkin disebabkan oleh interaksi elektrostatik karena ionisasi asam klorogenat semakin besar dengan peningkatan pH. Selain itu, larutan dengan nilai pH 3 diketahui menguntungkan untuk stabilitas asam klorogenat dalam larutan air dalam penelitian sebelumnya (Gao, 2011).

## **G. Identifikasi Senyawa Organik secara Spektroskopi**

### **1. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)***

Spektrum FTIR merupakan nilai serapan dari gugus fungsi pada sampel dengan puncak serapan yang sesuai dengan frekuensi getaran antara ikatan atom yang menyusun material. Karena setiap material yang berbeda adalah kombinasi atom yang unik, tidak ada dua senyawa menghasilkan spektrum inframerah yang sama persis. Manfaat sensitivitas memungkinkan identifikasi bahkan kontaminan terkecil sekalipun. Karena itu, spektroskopi inframerah dapat menghasilkan identifikasi positif (analisis kualitatif) dari setiap jenis material yang berbeda. Selain itu, ukuran puncak spektrum adalah indikasi langsung dari jumlah materi yang ada, dengan algoritma perangkat lunak modern,

FTIR adalah alat yang sangat baik untuk analisis kuantitatif. Fakta bahwa banyak gugus fungsional dapat diidentifikasi dengan karakteristik frekuensi getaran, maka membuat FTIR merupakan metode sederhana, paling cepat dan paling sering diandalkan untuk menetapkan suatu senyawa (William dan Dudley, 1980; Mohammed dan Al-Bayati, 2009).

Penggunaan spektrum inframerah dalam menentukan struktur senyawa organik berada antara  $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ . Daerah di bawah frekuensi  $650\text{ cm}^{-1}$  dinamakan daerah inframerah jauh dan daerah di atas frekuensi  $4000\text{ cm}^{-1}$  dinamakan inframerah dekat (Sudjadi, 1983).

**Tabel 2.** Karakteristik Frekuensi Uluran Beberapa Gugus Fungsi pada Spektroskopi Inframerah

| Gugus               | Frekuensi uluran ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Gugus                                                                                                                        | Frekuensi uluran ( $\text{cm}^{-1}$ ) |
|---------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| $\text{—OH}$        | 3600                                  |                                                                                                                              | 2930                                  |
| $\text{—NH}_2$      | 3400                                  | $\text{—}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}\text{—}$                                                        | 2860                                  |
| $\equiv\text{CH}_3$ | 3300                                  |                                                                                                                              | 1470                                  |
| $\text{Ar—H}$       | 3060                                  | $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—}$                                                          | 1200-1000                             |
|                     | 3030                                  | $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$                                                                                             | 1650                                  |
| $=\text{CH}_2$      | 2870                                  | $\text{H}_2\text{C}=\text{NH}_2$                                                                                             | 1600                                  |
|                     | 1460                                  | $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—}$ | 1200-1000                             |
|                     | 1375                                  |                                                                                                                              |                                       |
| $\text{C—N}$        | 1200-1000                             | $\text{C=O}$                                                                                                                 | 1750-1600                             |

(Banwell dan McCash, 1994).

Daerah antara  $1400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  merupakan daerah khusus yang berguna untuk identifikasi gugus fungsional. Daerah ini menunjukkan absorpsi yang disebabkan oleh vibrasi uluran. Daerah antara  $1400\text{-}700\text{ cm}^{-1}$  (daerah sidik jari) sering kali sangat rumit karena menunjukkan absorpsi yang disebabkan oleh vibrasi uluran dan tekukan (Fessenden dan Fessenden, 1986). Karakteristik frekuensi uluran beberapa gugus molekul ditunjukkan pada Tabel 2.



### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Agustus 2019, bertempat di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung dan Balai Riset dan Standarisasi Industri (Baristand) Bandar Lampung. Sebelumnya telah dilakukan determinasi tumbuhan kopi robusta (*Coffea canephora*) di “Herbarium Bogoriense”, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor, Jawa Barat. Analisis *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) dilakukan di Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas dengan berbagai ukuran, satu set perlengkapan MPLC Büchi, seperangkat alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Kolom (KK), timbangan analitik Kern, lampu UV, pipet kapiler, alat pengukur kadar air *Kern*

*Moisture Analyzer*, spatula, oven, blender, pipet tetes, kertas saring, dan mesin pemutar vakum rotatori evaporator Büchi Pump V-700.

Bahan-bahan yang digunakan adalah biji buah kopi Robusta (*Coffea canephora*) yang diperoleh di Padang Cermin, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dan kromatografi lapis tipis berkualitas teknis yang telah didestilasi. Bahan kimia yang digunakan meliputi *n*-heksana ( $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ ), etil asetat ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), aseton ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), akua DM ( $\text{H}_2\text{O}$ ), serum sulfat ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ), asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), standar asam klorogenat, oktadesil silika (ODS), resin poliamida, resin penukar ion Amberlite™ FPA98 Cl, plat ODS, dan plat silika gel Merck 60 GF 254.

## C. Prosedur Penelitian

### 1. Persiapan Sampel

Sampel buah *cherry* merah tumbuhan kopi robusta (*Coffea canephora*) yang diperoleh dari desa Padang Cermin, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung. Buah kopi merah dikupas kulitnya, kemudian dicuci bersih dengan air. Selanjutnya biji kopi dikeringkan dengan cara pemanasan dengan oven selama beberapa hari. Kadar air dalam kopi diuji dengan *Kern Moisture Analyzer*. Biji kopi yang sudah kering lalu dipisahkan dari kulit tanduknya, kemudian dihaluskan dengan penggiling.

## 2. Ekstraksi

Serbuk halus biji kopi robusta ditimbang sebanyak 100 gram kemudian di ekstraksi menggunakan pelarut air pada suhu 95°C selama 30 menit (Fukuda dkk.,2012). Ekstrak hasil perebusan kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang didapat lalu dipekatkan dengan pemutar vakum rotatori evaporator.

## 3. Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Selanjutnya dilakukan tahap KLT untuk membandingkan pola pemisahan komponen yang terdapat dalam sampel dengan standar asam klorogenat. Uji KLT dilakukan menggunakan beberapa sistem campuran eluen. Setelah dilakukan elusi, hasil kromatogram selanjutnya disemprot dengan larutan serum sulfat  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  untuk menampakkan bercak/noda dari komponen senyawa tersebut, pembuatan pereaksi  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  ada pada Lampiran 1. Noda/bercak hasil KLT dilihat di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, lalu dibandingkan pola yang terbentuk dengan standar asam klorogenat.

## 4. Partisi (Ekstraksi Cair-Cair)

Ekstrak kasar dilarutkan dalam metanol kemudian dilakukan partisi dengan menggunakan 50 mL *n*-heksana sebanyak 3 kali pengulangan, kemudian dipisahkan fraksi *n*-heksana dan fraksi metanol. Fraksi metanol dipartisi kembali dengan 50 mL etil asetat sebanyak 3 kali pengulangan, kemudian dipisahkan antara fraksi etil asetat dan fraksi metanol-air. Fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan fraksi metanol-air dipekatkan menggunakan

pemutar vakum rotatori evaporator. Masing-masing fraksi dipisahkan dan di KLT pada plat ODS untuk melihat pemisahan fasa polar dan non-polar. Hasil akhir tahapan partisi diperoleh 3 fraksi yaitu, fraksi heksana, etil asetat, dan fraksi air.

## **5. Fraksinasi Ekstrak Air dengan MPLC**

Fraksi yang telah diketahui mengandung senyawa asam klorogenat yang dominan, selanjutnya dilakukan fraksinasi menggunakan MPLC.

Fraksinasi pada MPLC menggunakan kolom ODS sebagai fase diam dan metanol–air sebagai fase gerak dengan komposisi 95% methanol dalam air selama 30 menit pada tekanan maksimal 16 mbar. Kecepatan aliran 3,5 mL/menit dan dideteksi dengan detektor UV–Vis. Tiap fraksi yang diperoleh dikumpulkan ke dalam tabung melalui kolektor fraksi dan ditampung berdasarkan puncak yang terdapat pada kromatogram. Fraksi yang telah dikumpulkan dipekatkan dan diuji KLT kembali dengan plat ODS sebagai fase diam.

## **6. Pemurnian dengan Kromatografi Kolom**

Teknik ini menggunakan 3 jenis fase diam yaitu poliamida, silika gel, dan resin penukar ion dengan fasa gerak yang disesuaikan dengan hasil uji KLT. Resin Poliamida dielusi menggunakan fasa gerak berupa campuran larutan metanol dan air dengan kenaikan gradien 10%, sedangkan kromatografi kolom dengan silika gel dielusi dengan fasa gerak yang disesuaikan dengan hasil uji KLT. Fasa diam dimasukkan terlebih dahulu

ke dalam kolom, atur fasa diam hingga rapat (tidak berongga) dan rata. Masing-masing fraksi yang diperoleh di KLT kembali dengan plat ODS dan plat silika gel dengan pereaksi visualisasi spesifik serum sulfat.

Selain itu juga digunakan fase diam berupa resin penukar anion Amberlite<sup>TM</sup> FPA98 Cl yang dielusi dengan fasa gerak berupa larutan asam asetat pH 5,0-6,0. Resin yang telah direndam dimasukkan ke dalam kolom hingga rapat (tidak berongga). Kolom dielusi dengan akuades sehingga seluruh sampel terikat di dalam resin. Kemudian secara berturut-turut, kolom dielusi dengan larutan asam asetat pH 5,0-6,0. Masing-masing fraksi yang diperoleh di KLT dengan plat ODS. Pada saat sampel dimasukkan, diusahakan agar kolom tidak kering/kehabisan pelarut karena akan mengganggu fasa diam yang telah dikemas rapat. Resin yang sudah selesai digunakan dapat diregenerasi menggunakan larutan 10% NaCl + 0,5% NaOH. Fraksi yang menunjukkan adanya keberadaan asam klorogenat kemudian selanjutnya dimurnikan lebih lanjut.

## **7. Analisis HPLC**

Konsentrasi dan kemurnian senyawa hasil kromatografi kolom dianalisis menggunakan metode HPLC. Pembuatan larutan induk asam klorogenat 500 ppm, dilakukan dengan cara menimbang standar asam klorogenat 0,05 gram lalu dilarutkan dengan 100 mL akuades dalam labu ukur 100 mL. Untuk membuat larutan standar, dipipet sebanyak 1 mL, 2 mL, 3 mL,

4 mL, dan 5 mL larutan induk ke dalam labu ukur 25 mL lalu ditambahkan akuades sampai tanda batas, dan diperoleh larutan standar dengan konsentrasi berturut-turut 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm.

Persiapan larutan uji dilakukan dengan cara menimbang 0,1 gram ( $\pm 0,01$ ) sampel kopi lalu dimasukkan dalam Erlenmeyer 100 mL dan dilarutkan dengan  $\pm 25$  mL akuades. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL menggunakan corong, kemudian ditepatkan sampai tanda batas. Sampel diambil secukupnya dan disaring menggunakan *syringe* dengan kertas saring (ukuran pori : 0,4  $\mu\text{m}$ , diameter 13 mm) ke dalam botol vial.

Pelarut yang digunakan sebagai fase gerak dalam pemeriksaan kadar asam klorogenat dengan alat HPLC adalah 80% akuades dan 20% asetonitril. Sebelum digunakan pelarut harus disaring terlebih dahulu dengan menggunakan kertas saring (ukuran pori : 0,45  $\mu\text{m}$ , diameter 47 mm). Larutan standar maupun larutan uji masing-masing sebanyak 10  $\mu\text{L}$  diinjeksikan menggunakan *syringe* 50  $\mu\text{L}$  ke dalam alat HPLC. Kondisi alat pada saat analisis menggunakan kolom ODS C-18 (250 x 4,5 mm) dengan kecepatan aliran 1 mL/menit dan suhu 25 °C.

## **8. Analisis Spektrofotometri IR**

Kristal yang diperoleh dari hasil isolasi yang telah murni dianalisis menggunakan Spektrofotometer Inframerah. Kristal yang telah murni dibebaskan dari air kemudian digerus bersama-sama dengan halida anorganik, KBr. Pelet yang dihasilkan tersebut diukur puncak serapannya. Informasi spektroskopi inframerah menunjukkan adanya gugus fungsi dalam suatu molekul (Pavia, 2009).

## **V. SIMPULAN DAN SARAN**

### **A. SIMPULAN**

Berdasarkan pembahasan hasil penelitian dapat diperoleh kesimpulan :  
Isolasi asam klorogenat dari ekstrak air biji kopi robusta menggunakan kromatografi kolom dengan adsorben poliamida, dilanjutkan dengan silika dan amberlite FPA 98 Cl tidak berhasil dilakukan. Sedangkan fraksinasi fraksi F2' dengan MPLC yang dilanjutkan dengan kromatografi kolom silika diperoleh fraksi d' yang mengandung asam klorogenat belum murni dan kafein berdasarkan kromatogram KLT menggunakan ODS. Selain itu dari fraksi F2' ini juga diperoleh amilosa berdasarkan spektrum IR yang dibandingkan dengan literatur.

### **B. SARAN**

Untuk memperoleh isolat senyawa asam klorogenat murni perlu dilakukan tahapan pemurnian lebih lanjut menggunakan fasa diam oktadesil silika (ODS). Selain itu perlu adanya uji antioksidan pada isolat murni untuk menunjukkan adanya potensi pada senyawa asam klorogenat.



## DAFTAR PUSTAKA

- Ardianingsih, R. 2009. Penggunaan HPLC Dalam Proses Analisa Deteksi Ion. *Berita Dirgantara*, **10**(4) : 101-104.
- Ardiansyah, D., Tjota, H., dan Kiyat, W. E. 2018. Review : Peran Enzim dalam Meningkatkan Kualitas Kopi. *Agritek*. **19**(2) : 68-91.
- Ayelign, A. dan Sabally, K. 2013. Determination of Chlorogenic Acid (CGA) in Coffee Beans using HPLC. *Am. J. and R. Comm.*, **1**(2) : 78-91.
- Bai, Y. E., Qi, X. M., Zhao, H., Gao, J. P., dan Li, Q. S. 2006. *Chin. J. Hosp. Pharm.*, **26**(1) : 512-515.
- Banwell, C.N. dan McCash, E.M. 1994. *Fundamental of Molecular Spectroscopy*. Mc Graw-Hill Book Company. London.
- Belay, A. dan Gholap, A.V. 2009. Characterization and Determination of Chlorogenic Acid (CGA) in Coffee Beans by UV-Vis Spectroscopy. *African Journal of Pure Applied Chemistry*., **3**(11) : 234-240.
- Braithwaite, A dan Smith, F. J. 1995. *Chromatographic Methods*. Kluwer Academic Publishers. London.
- Caniawati, R. 2016. Efek Kondisi Ruang Penyimpanan di Puskesmas Kabupaten Purbalingga dan Kondisi Simulasi 6 Hari Penggunaan terhadap Kadar Sirup Parasetamol. *Skripsi*. Fakultas Farmasi, UMP.
- Coffee Intelegence. 2015. *Chlorogenic Acid*. Diakses pada 1 Agustus 2018. <https://www.coffeechemistry.com/chemistry/acid/chlorogenic-acid/>.

- Chandra, D., Ismono, R. H., dan Kasymir, E. 2013. Prospek Perdagangan Kopi Robusta Indonesia di Pasar Internasional. *Jurnal Ilmu-Ilmu Agribisnis (JIIA)*, **1**(1).
- Clifford, M. N. 2000. Chlorogenic Acid and Other Cinnamates, Nature, Occurance, Dietary Burden, Absorbtion and Metabolism. *J. Sci. Food. Agri.* **1043** : 1033-1043.
- Farhaty, N. dan Muchtaridi, M. 2014. Tinjauan Kimia dan Aspek Farmakologi Senyawa Asam Klorogenat pada Biji Kopi. *Jurnal Farmaka.* **14**(1) : 214-227.
- Farah, A., DePaulis, T.L., Trugo, C., dan Martin, P. R. 2005. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. *J. Agri. Food Chem.* **53**(5) : 1505-1513.
- Farah, A. dan Carmen, M.D. 2006. Phenolic Compounds in Cofee. *Braz. J. Plant. Physiology.* **18**(1) : 23-36.
- Farah, A. 2012. *Coffee : Emerging Health Effect and Disease Prevention, First Edition.* Wiley Blackwell Publishing Ltd. New Jersy.
- Fessenden, R.J. dan Fessenden, J.S. 1986. *Kimia Organik Jilid 1.* Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Firdaus. 2011. *Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik.* Laporan Hibah Penulisan Buku Ajar Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Hasanudin. Makassar.
- Food and Agricuture Organization (FAO). 2015. *FAO Statistical Pocketbook.* Food and Agriculture Organization, United Nations. Roma.
- Fu, Y., Zu, Y., Liu, W., Hou, C., Chen, L., Li, S., Shi, X., dan Tong, M. 2007. *J. Chromatogr. A.* **1139**(2) : 206-213.
- Fujioka, K., dan Shibamoto, T. 2008. Chlorogenic Acid and Caffeine Contents in Various Comercial Brewes Coffes. *Food Chemistry.* **106** : 217-221.
- Fukuda, M., Takahashi, H., dan Konishi, A. 2012. Method of Producing Chlorogenic Compositition. *U.S. Patent.* Patent No. US 8.309.150 B2.

- Gao, M., Huang, W., dan Liu, C. Z. 2011. Separation of Scutellarin from Crude Extract of *Erigeron breviscapus* (vant.) by Macroporous Resin. *J. Chromatogr. B*, 858, 22-26.
- Gu, M., Su, Z. G., dan Ouyang, F. 2006. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, **29** : 1503-1514.
- Harvey, D. 2016. *Other Forms of Liquid Chromatography*. <http://chem.libretexts.org/>. Diakses pada 25 Juni 2018.
- Haryanto. 2012. *Prospek Tinggi Bertanam Kopi*. Pustaka Baru. Yogyakarta.
- Hidgon, J.V. dan Frei, B. 2006 Coffee and Health : a Review of Recent Human Research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, **46** : 101-123.
- Hostettmann K. dan Terreaux, C. 2000. *Medium-Pressure Liquid Chromatography*. Academic Press. New York.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Diterjemahkan oleh A. Saptorahardjo. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. Hlm 84-311.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenilpropanida dan Alkaloida*. Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara. Medan. Hlm 7.
- Linda. 1994. Center for Drug Evaluation And Research (CDER) : Reviewer Guidance Validation Of Chromatographic Methods. *US Food and Drug Administration*. Silver Spring. New York.
- Mirna, L. S., Campos, A. A., Alfaro, G. V., Gonzalez-Rios, O.P., Villenenuve, dan Figueroa-Espinoz, M. C.. 2014. Isolation Of Green Coffee Chlorogenic Acids Using Activated Carbon. *Journal of Food Composition and Analysis*. **33**(1) : 55-58.
- Mohammed, M.J. dan Al-Bayati, F.A. 2009. Isolation, Identification And Purification Of Caffeine From Coffee Arabica L. And Camellia Sinensis : A Combination Antibacterial Study. *International Journal of Green Pharmacy* **3**(1) : 52-57.

- Monteiro, M., Farah, A., Perronem, D., Trugo, L.C., dan Donangelo, C. 2007. Chlorogenic Acid Compounds From Coffee are Differentially Absorbed and Metabolized in Human. *J. Nutr.*, **137**: 2198-2201.
- Murniasih, T. 2003. Metabolit Sekunder dari Spons Sebagai Bahan Obat-obatan. *Oseana*. **28**(3): 27-33
- Nichols, L. 2019. *Extraction Theory*. <http://chem.libretexts.org/> . Diakses pada 14 April 2019.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., dan Vyvyan, J.R. 2009. *Introduction To Spectroscopy, 4<sup>th</sup> Edition*. Nelson Education. Canada, US.
- Pellati, F., Benvenuti, S., Magro, L., Melegari, M., dan Soragni, F. 2004. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35** : 289.
- Pohlan, H.A.J., dan Janssens, M.J.J. 2010. Growth Production of Coffee. Dalam : Verheye, W.H (ed). *Soils, Plant Growth and Corp Production*.
- Poole, C. 2009. *Handbook of Method and Instrumentation in Separation Science*. Vol 1. Academic Press. Massachusetts, USA.
- Prastowo, B., Karmawati, E., Rubijo, Siswanro, C., Indrawanto, dan Munarso, S.J. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen : Kopi*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Bogor.
- Rahardjo, M. 2013. Purwoceng Tanaman Obat Aprodisiak yang Langka. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*. **9**(2) : 4-7.
- Rice, D. B., 2002. *Removal for Countercurrent Ion Exchange Systems*. International Water Publisher. Michigan.
- Rukmana, R. 2014. *Hama Tanaman dan Teknik Pengendaliannya*. Kanisius. Yogyakarta.
- Rohaeti, E., Surdia, N. M., Radiman, C. L., dan Ratnaningsih, E. 2003. Pengaruh Variasi Komposisi Amilosa terhadap Kemudahan Biodegradasi Poliuretan. *JMS : Jurnal Matematika dan Sains*. **8**(4) : 157-161.

- Sienko, P. dan Marcus. 1984. *Experimental Chemistry*, 6<sup>th</sup> Edition. McGraw Hill Book Co. Singapore.
- Silisbury, F.B. dan Ross, C.W. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2*. Penerbit ITB. Bandung. Hal : 145-147.
- Sorbtech. 2019. *Material Safety Data Sheet for Polyamide 6*. Sorbent Technologies, Inc. USA.
- Stalmach, A., Mullen, W., Nagai, C., dan Crozier, A. 2006. On-line HPLC Analysis Of The Antioxidant Activity Of Phenolic Compounds In Brewed Paper-Filtered Coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, **18**(1) : 253-262.
- Steenis, C.G.V., DenHoed, G.J., dan Eyma, P.J. 2008. *Flora untuk Sekolah di Indonesia*. PT Pradnya Paramita. Jakarta.
- Stevens, F.A. 2015. Sifat Kimia dan Evaluasi Sensori Bubuk Kopi Arabika. *J. Floratek*. **7** : 66-75.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 1996. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty. Yogyakarta.
- Sudjadi. 1983. *Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Ghalia Indonesia. Jakarta. Hlm 283.
- Wang, F., Liu, X.H., dan Zhao, H.R. 2006. Separation Of Caffeine And Theophylline In Poly (Dimethylsiloxane) Micro Channel Electrophoresis With Electrochemical Detection. *J. Chromatogr A*, **1098**(2) : 172-176.
- William dan Dudley. 1980. *Spectroscopic Methods In Organic Chemistry 3<sup>rd</sup> Edition*. McGraw-Hill. New York.
- Yusianto, D.N. 2014. Mutu Fisik dan Citarasa Kopi Arabika yang Disimpan Buahnya Sebelum di- Pulp. *Pelita Perkebunan*, **30**(20) : 137-158.
- Zhang, B., Yang, R., Zhao, Y., dan Liu, C.Z. 2008. Separation of Chlorogenic Acid From Honeysuckle Crude Extracts by Macroporous Resins. *J. Chromatogr. B*, **867** : 253.