

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Bahan

4.1.1 Pengumpulan bahan

Bahan yang digunakan pada penilitan ini dari tanaman kopi arabika (*Coffea Arabica* L.), yaitu bagian bijinya. Biji kopi Arabika ini diperoleh dari perkebunan kopi yang berasal dari Gunung Puntang, Jawa Barat.

4.1.2 Determinasi

Setelah pengumpulan bahan dilakukan proses determinasi yang bertujuan untuk memastikan identitas dan kebenaran dari jenis tanaman yang akan digunakan sebagai sampel. Proses determinasi ini dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi FMIPA UNPAD, yang mana berdasarkan hasilnya dapat dibuktikan bahwa sampel yang digunakan merupakan tanaman kopi yang memiliki nama latin (*Coffea Arabica* L.) yang berasal dari famili *Rubiaceae*

Pemeriksaan secara makroskopik dilakukan terhadap sampel biji kopi sebelum dan sesudah proses sangrai untuk mengamati perubahan yang tampak secara langsung. Tabel di bawah ini memperlihatkan perbedaan warna dan bentuk biji kopi yang terlihat secara visual akibat proses penyangraian.

Tabel 4.1 Pengamatan Makroskopik

Sampel	Bau	Bentuk	Warna	Rasa
Sebelum penyangraian	Aroma khas asam	Serbuk halus sedikit kasar	Abu kehijauan	Hambar
Sesudah penyangraian	Aroma khas kopi	Serbuk halus	Coklat	Pahit



Gambar 4.1 Pengamatan Makroskopis

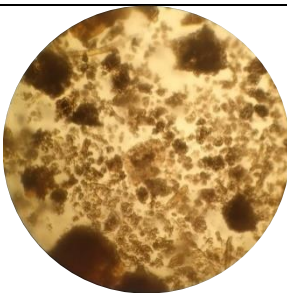
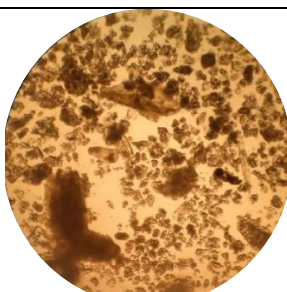
Keterangan : a. Biji kopi utuh sebelum penyangraian, b Serbuk biji sebelum penyangraian, c. Biji kopi utuh sesudah penyangraian, d. Serbuk biji sebelum penyangraian

Berdasarkan hasil pengamatan makroskopik dan uji organoleptik, terjadi perbedaan yang cukup signifikan antara biji kopi sebelum dan sesudah proses penyangraian. Biji kopi sebelum penyangraian memiliki warna abu kehijauan, aroma khas asam, tekstur serbuk sedikit kasar, serta rasa hambar. Sementara itu, setelah penyangraian, biji kopi berubah menjadi berwarna coklat, memiliki aroma khas kopi, serbuk halus, dan rasa yang lebih pahit.

Perubahan warna dan aroma ini disebabkan oleh reaksi Maillard dan karamelisasi selama proses pemanggangan. Reaksi Maillard merupakan interaksi antara asam amino dan gula pereduksi yang menghasilkan senyawa volatil dan pigmen melanoidin penyumbang aroma serta warna khas kopi sangrai. Selain itu, proses penyangraian juga dapat menyebabkan perubahan komposisi senyawa bioaktif seperti asam klorogenat, flavonoid, dan senyawa fenolik lainnya yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan kopi (Mehaya & Mohammad, 2020).

Secara umum, kandungan senyawa antioksidan cenderung mengalami penurunan setelah proses pemanggangan karena sebagian senyawa fenolik mudah rusak oleh panas. Namun, pada tingkat penyangraian tertentu, senyawa turunan hasil degradasi juga dapat memberikan kontribusi terhadap aktivitas antioksidan, meskipun tidak sebesar senyawa awal (Vignoli *et al.*, 2011).

Tabel 4.2 Pengamatan Mikroskopik

Sampel	Hasil Mikroskop	Keterangan
Sebelum penyangraian		Warna yang dihasilkan lebih terang, ukuran partikel lebih seragam dan banyak partikel halus, gumpalan yang merata
Sesudah penyangraian		Warna yang dihasilkan lebih gelap, ukuran partikel lebih besar dan tidak seragam, pecahannya kasar

Pada pemeriksaan mikroskopik dilakukan untuk mengamati morfologi serbuk biji kopi sebelum dan sesudah proses penyangraian. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan tingkat perbesaran tertentu. Hasil pengamatan menunjukkan adanya perubahan warna serta struktur serbuk biji kopi yang disebabkan oleh proses pemanasan selama penyangraian.

4.1.3 Pembuatan Simplisia

Setelah proses determinasi dilakukan pengolahan bahan yaitu biji kopi arabika. Biji kopi yang didapatkan ini merupakan biji kopi mentah atau hijau yang sudah bersih dan siap pakai. Dalam pengolahannya ini biji kopi dibagi menjadi dua perlakuan yaitu biji kopi yang telah melalui proses penyangraian dan yang tidak melalui proses penyangraian. Pada proses penyangraian biji kopi dilakukan menggunakan alat roaster kopi pada suhu 225°C hingga 232°C selama 20 menit. Biji kopi masing-masing ditimbang sebanyak 1 kilogram, dari 1 kilogram biji kopi hijau yang dilakukan penyangraian didapatkan hanya sebanyak 0,980 kilogram hal tersebut karena biji kopi mengalami penyusutan ukuran serta kandungan air yang di

dalamnya berkurang karena adanya pemanasan. Setelah itu kedua sampel biji kopi digiling menggunakan mesin penggiling (*grinding*) hingga menjadi serbuk. Masing-masing sampel yang sudah menjadi serbuk disimpan ditempat yang kedap udara agar tidak mudah ditumbuhi bakteri ataupun kapang.

4.2 Karakteristik simplisia

Proses karakteristik simplisia ini dilakukan dengan tujuan untuk mengevaluasi mutu awal bahan baku sebelum proses ekstraksi dilakukan. Pemeriksaan yang dilakukan antara lain penetapan susut pengeringan, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar abu total, dan penetapan kadar abu tidak larut asam.

Tabel 4.3 Katakterisasi Simplisia

Pengujian	Sebelum penyangraian (%b/b \pm SD)	Sesudah penyangraian (%b/b \pm SD)
Susut Pengeringan	6,50 \pm 0,15	4,72 \pm 0,25
Kadar Sari Larut Air	20,97 \pm 1,16	16,5 \pm 1,92
Kadar Sari Larut Etanol	23,73 \pm 1,60	14,77 \pm 1,40
Kadar Abu Total	8,53 \pm 0,17	5,5 \pm 0,35
Kadar Abu Tidak Larut Asam	2,02 \pm 0,19	0,42 \pm 0,37

Dari hasil yang didapatkan dilihat dari susut pengeringan yang bertujuan untuk memberikan Batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Parameter susut pengeringan pada dasarnya adalah pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C sampai berat konstan yang dinyatakan dalam nilai persen (Depkes RI, 2017). Hasil pengujian menunjukkan bahwa nilai susut pengeringan menurun dari 6,50 \pm 0,145 % menjadi 4,72 \pm 0,25 % setelah penyangraian. Penurunan ini menandakan berkurangnya kandungan air dalam simplisia akibat pemanasan pada suhu tinggi selama proses penyangraian. Penyangraian menyebabkan air yang tersisa dalam jaringan tanaman menguap, sehingga kadar air menurun. Nilai ini masih berada dalam batas menurut Farmakope Indonesia, yakni tidak melebihi 10% untuk simplisia kering (Depkes RI, 2017). Kandungan air yang

rendah penting untuk menghindari pertumbuhan mikroba dan menjaga stabilitas penyimpanan.

Penetapan kadar sari larut air dan etanol bertujuan sebagai perkiraan banyaknya kandungan senyawa-senyawa aktif yang bersifat polar (larut dalam air) dan bersifat polar – non polar (larut dalam etanol). Pada kopi sebelum disangrai, kadar senyawa larut dalam pelarut air dan etanol masing-masing sebesar $20,97 \pm 1,16 \%$ dan $23,73 \pm 1,61 \%$. Setelah proses penyangraian, kadar senyawa larut tersebut menurun menjadi $16,5 \pm 1,92 \%$ untuk pelarut air dan $14,77 \pm 1,40 \%$ untuk pelarut etanol. Hasil ini menunjukkan adanya penurunan kandungan senyawa aktif dalam biji kopi setelah proses pemanggangan, baik pada pelarut polar maupun semi-polar. Penurunan ini dapat terjadi karena senyawa bioaktif seperti flavonoid, asam fenolat, dan komponen hidrofilik lainnya bersifat tidak stabil terhadap panas. Selama proses roasting, senyawa-senyawa tersebut dapat mengalami degradasi, volatilitas, atau perubahan struktur kimia sehingga menurunkan kelarutannya dalam pelarut. Dalam penelitian Mussatto *et al.*, 2011 menyatakan bahwa proses pemanggangan pada suhu tinggi dapat mengakibatkan kerusakan termal pada senyawa fenolik, flavonoid, dan komponen larut air lainnya.

Penetapan kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral, baik yang berasal dari dalam tanaman maupun dari luar, seperti sisa tanah atau debu selama proses penanganan bahan (Depkes RI, 2017). Pada penelitian ini, kadar abu total biji kopi sebelum disangrai adalah sebesar $8,53 \pm 0,17 \%$, dan setelah disangrai menurun menjadi $5,5 \pm 0,35 \%$. Secara umum, kadar abu total mencerminkan jumlah mineral anorganik yang tersisa setelah bahan organik dibakar. Penurunan kadar abu ini bisa disebabkan oleh adanya komponen mineral yang menguap atau terdegradasi karena suhu tinggi selama proses penyangraian.

Sementara itu, kadar abu tidak larut asam menunjukkan adanya kontaminasi dari mineral yang tidak larut dalam asam, seperti silika, pasir, atau sisa logam berat. Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar abu tidak larut asam menurun dari $2,02 \pm 0,19 \%$ sebelum disangrai menjadi $0,42 \pm 0,37 \%$ setelah disangrai. Penurunan ini menandakan bahwa jumlah kontaminan anorganik, seperti silikat

atau debu mineral, berkurang setelah proses pemanggangan. Menurut Y. P. Utami *et al.*, 2020 kadar abu tidak larut dalam asam yang tinggi bisa menunjukkan adanya kandungan logam atau silikat

4.3 Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat dalam simplisia yang diujikan. Skrining fitokimia merupakan uji kualitatif dari senyawa kimia yang terdapat pada simplisia dengan pengujian senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, kuinon, saponin, dan steroid/triterpenoid.

Tabel 4.4 *Skrining Fitokimia*

Metabolit sekunder	Penyangraian		Keterangan
	Sebelum	Sesudah	
Alkaloid	+	+	Mayer : Endapan Putih
	+	+	Wagner : Endapan Coklat
	+	+	Dragendorff : Endapan Jingga
Flavonoid	+	+	Terdapat cincin merah pada batas larutan
Tanin	+	+	Larutan biru sampai hijau kehitaman
Saponin	-	-	Tidak terbentuk busa
Steroid/Triterpenoid	-	-	Tidak terbentuk warna hijau/biru

Hasil diatas merupakan hasil dari skrining pada simplisia dan ekstrak pada biji kopi sesudah dan sebelum penyangraian. Pengujian senyawa alkaloid pada biji kopi sesudah dan sebelum di sangrai menghasilkan hasil yang positif mengandung senyawa alkaloid ditandai dengan pada pereaksi mayer menghasilkan endapan putih, pada pereaksi wagner menghasilkan endapan coklat, dan pada pereaksi dragendorff menghasilkan endapan warna merah bata. Untuk pengujian senyawa flavonoid pada biji kopi sesudah dan sebelum penyangraian menghasilkan hasil yang positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada batas larutnnya. Pengujian senyawa tanin pada biji kopi

sesudah dan sebelum penyangraian menghasilkan hasil yang positif mengandung tanin dengan terbentuknya warna biru tua pada kopi sebelum penyangraian sedangkan pada kopi sesudah penyangraian berwarna hijau kehitaman. Pada uji senyawa saponin biji kopi sesudah dan sebelum penyangraian menghasilkan hasil yang negative, meskipun sudah di kocok kuat tetapi busa yang ditimbulkan tidak stabil. Pada uji senyawa steroid /triterpenoid biji kopi sesudah dan sebelum penyangraian menghasilkan hasil yang negatif. Dari hasil uji skrining fitokimia pada biji kopi, senyawa yang memberikan hasil positif menunjukkan perbedaan warna antara biji kopi sebelum dan sesudah penyangraian. Setelah mengalami proses penyangraian, hasil uji tetap positif, namun intensitas warnanya terlihat berkurang atau lebih pucat dibandingkan sebelum penyangraian.

4.4 Ekstraksi

Proses ekstraksi pada biji kopi Arabika Gunung Puntang dilakukan dengan metode refluks bertingkat menggunakan tiga jenis pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya, yaitu n-heksan (non-polar), etil asetat (semi-polar), dan etanol 96% (polar). Tujuan penggunaan pelarut berurutan ini adalah untuk memisahkan kelompok senyawa aktif berdasarkan kepolarannya agar diperoleh ekstrak dengan spektrum kandungan senyawa yang lebih lengkap. Setiap pelarut digunakan sebanyak 3 kali pengulangan (refluks triplo) terhadap masing-masing serbuk kopi, baik sebelum maupun sesudah penyangraian, dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:20 (100gram simplisia: 2liter pelarut).

Ekstrak hasil refluks kemudian dikumpulkan dan diuapkan menggunakan rotary evaporator yang dilengkapi dengan pompa vakum. Pompa vakum membuat pelarut menguap pada suhu yang lebih rendah dari titik didih normalnya, sehingga mencegah degradasi senyawa sensitif terhadap panas. Proses penguapan dilakukan pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian disimpan dalam wadah tertutup dan diletakkan pada suhu ruang terlindung cahaya sebelum digunakan dalam uji aktivitas antioksidan. Pemilihan metode ini didasarkan pada prinsip bahwa ekstraksi bertingkat dapat meningkatkan efisiensi perolehan senyawa bioaktif dari simplisia.

Tabel 4.5 Rendemen Ekstrak

Ekstrak	Rendemen (%b/b)	
	Sebelum Penyangraian	Setelah Penyangraian
N-Heksana	11,92	10,88
Etil asetat	0,58	3,02
Etanol 96%	21,22	17,83

Hasil menunjukkan bahwa pelarut etanol menghasilkan rendemen ekstrak tertinggi, baik sebelum maupun sesudah penyangraian, yaitu 21,22% dan 17,83% secara berturut-turut. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa dalam biji kopi Arabika bersifat polar dan larut baik dalam etanol, seperti senyawa fenolik, flavonoid, dan karbohidrat larut. Meskipun terjadi penurunan setelah penyangraian, nilai rendemen tetap tinggi, yang menunjukkan bahwa etanol merupakan pelarut yang paling efektif dalam mengekstrak senyawa dari biji kopi, baik dalam kondisi mentah maupun setelah proses roasting.

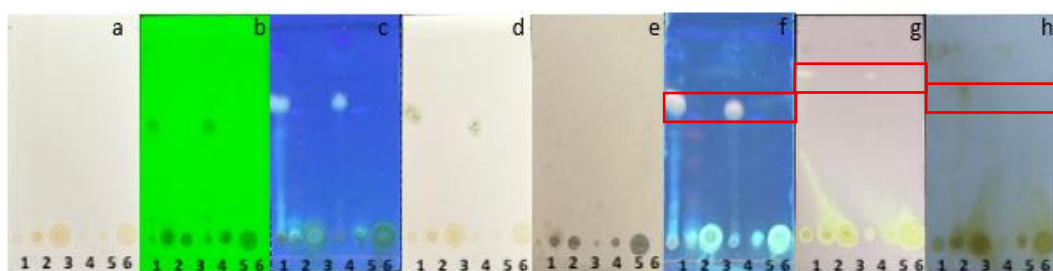
Ekstrak dengan pelarut n-heksana menghasilkan rendemen yang cukup tinggi namun sedikit menurun setelah penyangraian, dari 11,92% menjadi 10,88%. N-heksana mengekstrak senyawa non-polar seperti lipid, wax, dan komponen volatil (Ribeiro *et al.*, 2024). Penurunan ini dapat disebabkan oleh hilangnya sebagian senyawa non-polar selama pemanggangan akibat suhu tinggi, terutama senyawa volatil yang mudah menguap (Dippong *et al.*, 2022).

Sementara itu, rendemen ekstrak etil asetat justru meningkat setelah penyangraian, dari 0,58% menjadi 3,02%. Kemungkinan karena selama proses penyangraian terjadi pembentukan senyawa baru yang bersifat semi-polar, seperti produk hasil reaksi Maillard atau senyawa turunan dari degradasi polifenol, yang lebih mudah larut dalam etil asetat (Antonietti *et al.*, 2022).

4.5 Pemantauan Ekstrak

Pada pemantauan ekstrak ini dilakukan menggunakan cara kromatografi lapis tipis dengan menggunakan plat silica Gel GF254, dengan menggunakan fase gerak n-heksana- etil asetat (8:2), kloroform-metanol (9:1), dan etil asetat-metanol-asam format (7,5:1,5:1) menggunakan penampak bercak seperti DPPH 0,2%, CUPRAC, AlCl_3 5 %, FeCl_3 10% dalam methanol dan H_2SO_4 10%.

Pemantauan ini dilakukan untuk menguji kualitatif untuk melihat ada tidaknya senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan, senyawa fenolat, dan flavonoid. Pemantauan ini dilakukan untuk menganalisa senyawa yang memiliki aktifitas antioksidan tinggi menggunakan penampak bercak DPPH 0,2% serta CUPRAC, adanya senyawa fenolat dengan menggunakan penampak bercak FeCl_3 10%, menganalisa flavonoid menggunakan penampak bercak AlCl_3 5%, dan menggunakan H_2SO_4 10% sebagai penampak bercak universal. Pada pemantauan ini menggunakan tiga jenis fase gerak yang dapat memisahkan bercak yang tingkat kepolarannya berbeda-beda.

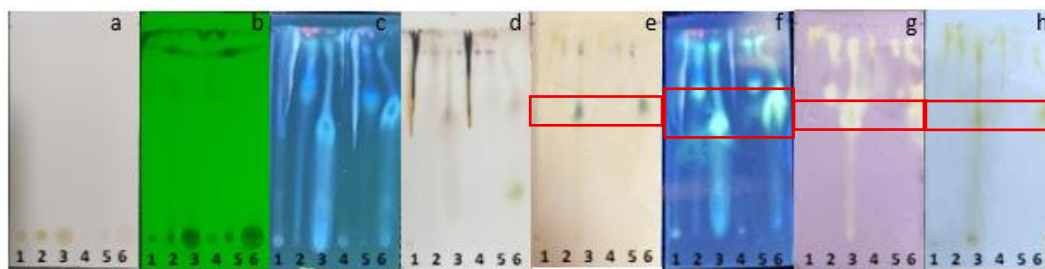


Gambar 4.2 Pemantauan Ekstrak Pelarut Non Polar

Keterangan : 1. Ekstrak n-heksan sesudah sangrai 2. Ekstrak etil asetat sesudah sangrai 3. Ekstrak etanol 96% sesudah sangrai 4. Ekstrak n-heksan sebelum sangrai 5. Ekstrak etil asetat sebelum sangrai 6. Ekstrak etanol 96% sebelum sangrai ; a. Visual, b. Sinar UV 254 nm, c. Sinar UV 366 nm, d. Penampak bercak H_2SO_4 10%, e. Penampak bercak FeCl_3 1%, f. Penampak bercak AlCl_3 5% g. Penampak bercak DPPH, h. Penampak bercak CUPRAC

Berdasarkan hasil kromatogram yang terdapat pada gambar dengan perbandingan pelarut non polar. Pada fase visual tanpa sinar UV, bercak tampak berwarna coklat hingga kuning pucat, menunjukkan senyawa non-polar seperti lipid dan wax (Ribeiro *et al.*, 2024). Bercak lebih tampak pada ekstrak etil asetat dan etanol meskipun menggunakan fase gerak non-polar, mengindikasikan adanya senyawa semi-polar dalam jumlah kecil. Di bawah UV 254 nm, bercak gelap muncul sebagai indikasi senyawa aromatik seperti fenolik. Sinar UV 366 nm memperlihatkan fluoresensi warna ungu, biru, dan hijau, tanda adanya flavonoid yang menurun intensitasnya setelah roasting. Reagen H_2SO_4 menghasilkan bercak coklat-hitam, menunjukkan senyawa organik tak jenuh. FeCl_3 menampilkan bercak hijau keabu-abuan (senyawa fenolik), dan AlCl_3 menunjukkan fluoresensi biru terang (flavonoid), keduanya menurun pasca

penyangraian. Reagen DPPH dan CUPRAC menunjukkan kemampuan reduksi yang lebih tinggi pada ekstrak sebelum roasting.



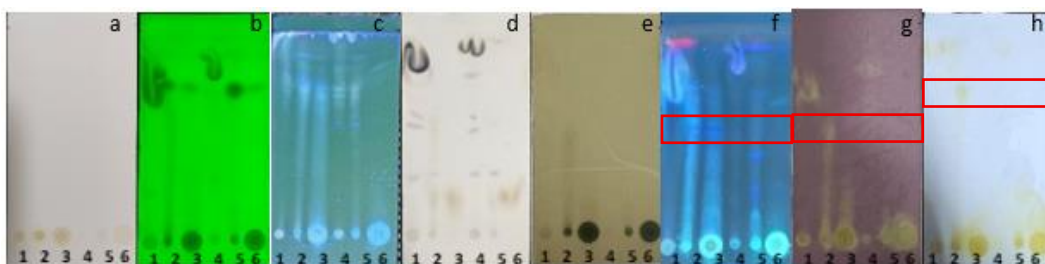
Gambar 4.3 Pemantauan Ekstrak Pelarut Semi Polar

Keterangan : 1. Ekstrak n-heksan sesudah sangrai 2. Ekstrak etil asetat sesudah sangrai 3. Ekstrak etanol 96% sesudah sangrai 4. Ekstrak n-heksan sebelum sangrai 5. Ekstrak etil asetat sebelum sangrai 6. Ekstrak etanol 96% sebelum sangrai ; a. Visual, b. Sinar UV 254 nm, c. Sinar UV 366 nm, d. Penampak bercak H₂SO₄ 10%, e. Penampak bercak FeCl₃ 1%, f. Penampak bercak AlCl₃ 5% g. Penampak bercak DPPH, h. Penampak bercak CUPRAC

Berdasarkan hasil kromatogram yang terdapat pada gambar pada ekstrak dengan perbandingan pelarut semi polar secara visual menunjukkan bercak kekuningan dengan distribusi lebih banyak pasca penyangraian, mengindikasikan pembentukan senyawa baru seperti melanoidin (Antonietti *et al.*, 2022). Reagen H₂SO₄ menghasilkan bercak kehitaman pasca roasting. FeCl₃ menunjukkan penurunan intensitas bercak kehijauan, menandakan penurunan senyawa fenolik. AlCl₃ memperlihatkan fluoresensi kuning yang menurun setelah roasting, menunjukkan degradasi flavonoid. Uji DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan tinggi sebelum roasting. Sebaliknya, pada reagen CUPRAC, intensitas bercak kuning-oranye meningkat setelah penyangraian, diduga berasal dari melanoidin yang terbentuk melalui reaksi Maillard selama proses roasting, serta produk degradasi polifenol yang tetap memiliki kemampuan reduksi. Melanoidin bersifat sebagai donor elektron kuat dan sebagian larut dalam pelarut semi-polar seperti etil asetat, sehingga intensitas bercak pada KLT semakin jelas setelah penyangraian.

Pada hasil plat KLT hasil bercak bergelombang dikarenakan chamber belum cukup jenuh sehingga fase gerak naik tidak merata. Garis start yang kurang rata, perbedaan volume totolan, dan bentuk titik awal yang tidak seragam saat

penotolan manual juga memengaruhi kecepatan migrasi bercak, sehingga jalur tidak lurus (Rifqi Prasetyawan *et al.*, 2024).



Gambar 4.4 Pemantauan Ekstrak Pelarut Polar

Keterangan : 1. Ekstrak n-heksan sesudah sangrai 2. Ekstrak etil asetat sesudah sangrai 3. Ekstrak etanol 96% sesudah sangrai 4. Ekstrak n-heksan sebelum sangrai 5. Ekstrak etil asetat sebelum sangrai 6. Ekstrak etanol 96% sebelum sangrai ; a. Visual, b. Sinar UV 254 nm, c. Sinar UV 366 nm, d. Penampak bercak H₂SO₄ 10%, e. Penampak bercak FeCl₃ 1%, f. Penampak bercak AlCl₃ 5% g. Penampak bercak DPPH, h. Penampak bercak CUPRAC

Berdasarkan hasil kromatogram yang terdapat pada gambar pada ekstrak dengan perbandingan pelarut polar secara visual, ekstrak etanol sebelum penyangraian menunjukkan jumlah dan intensitas bercak tertinggi, menandakan efektivitas etanol dalam mengekstraksi senyawa polar seperti flavonoid dan fenolat. Hasil penyemprotan H₂SO₄ menunjukkan bercak cokelat tua, dan FeCl₃ menunjukkan bercak ungu kehitaman (fenolat). AlCl₃ menampilkan fluoresensi kuning cerah (flavonoid), yang menurun setelah penyangraian. Reagen DPPH menunjukkan bercak kuning, mengindikasikan aktivitas antioksidan tinggi sebelum sangrai. Uji CUPRAC juga menunjukkan bercak kuning pada ekstrak etil asetat setelah penyangraian.

4.6 Uji Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa dalam menetralkan radikal bebas, yang diketahui berperan dalam berbagai kerusakan sel dan penuaan dini. Dalam penelitian ini, aktivitas antioksidan ekstrak biji kopi Arabika Gunung Puntang dievaluasi menggunakan dua metode berbeda, yaitu DPPH dan CUPRAC, dengan pendekatan komparatif antara kondisi sebelum dan sesudah proses penyangraian. Dalam Apak *et al.*, 2007 DPPH dan CUPRAC memiliki prinsip kerja berbeda sehingga hasilnya tidak selalu sejalan. Metode

DPPH bekerja dengan mekanisme *hydrogen atom transfer* (HAT), yaitu mengukur kemampuan senyawa antioksidan untuk memberikan atom hidrogen kepada radikal bebas DPPH. Mekanisme ini membuat DPPH lebih peka terhadap senyawa fenolik sederhana atau flavonoid aglikon yang mudah melepas atom hidrogen. Sementara itu, metode CUPRAC bekerja melalui mekanisme *single electron transfer* (SET), yang mengukur kemampuan antioksidan untuk mereduksi ion Cu^{2+} menjadi Cu^+ . Perbedaan prinsip dan sensitivitas inilah yang dapat menyebabkan nilai aktivitas antioksidan berbeda.

4.6.1 Metode DPPH

Metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) merupakan salah satu teknik yang paling umum digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan dari bahan alam. Metode ini banyak dipilih karena prosedurnya sederhana dan cepat untuk skrining awal kemampuan senyawa dalam menangkap radikal bebas. Selain itu, metode DPPH juga terbukti efektif dan cukup akurat dalam menilai potensi antioksidan suatu bahan (Aryanti *et al.*, 2021).

Penilaian aktivitas antioksidan dilakukan dengan mencermati perubahan warna larutan DPPH, yang awalnya berwarna ungu pekat dan berubah menjadi lebih pucat, kekuningan, atau bahkan tidak berwarna saat radikal DPPH direduksi oleh senyawa dalam sampel. Nilai IC_{50} (Inhibitory Concentration 50) digunakan sebagai indikator kuantitatif untuk menilai aktivitas tersebut, yaitu konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat 50% radikal bebas. Semakin kecil nilai IC_{50} , semakin tinggi aktivitas antioksidan dari senyawa atau ekstrak tersebut (Baliyan *et al.*, 2022)

Sebelum dilakukan pengujian aktivitas antioksidan, dilakukan pembuatan kurva kalibrasi dan penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH. Untuk memastikan adanya hubungan linier antara nilai absorbansi dan konsentrasi larutan DPPH dan menentukan konsentrasi optimal untuk larutan induk dalam uji DPPH. Proses optimasi dilakukan dengan memindai larutan DPPH pada rentang panjang gelombang 400–800 nm dan menggunakan seri konsentrasi, yaitu 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Berdasarkan hasil pengukuran, diperoleh panjang gelombang maksimum (λ maksimum) pada 515 nm. Sementara itu, konsentrasi 40

ppm menunjukkan nilai absorbansi sebesar 0,818 dan dipilih sebagai konsentrasi larutan induk yang digunakan untuk pengujian.

Pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak biji kopi sebelum dan sesudah penyangraian dilakukan pada λ 515 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum pada DPPH yang digunakan. Setelah penentuan panjang gelombang maksimum dan konsentrasi larutan DPPH, tahap selanjutnya adalah pengujian aktivitas antioksidan dengan mereaksikan larutan DPPH 40 ppm dan larutan uji dalam perbandingan volume 1:1. Campuran tersebut kemudian diinkubasi selama ± 30 menit untuk memberikan waktu yang cukup bagi senyawa antioksidan dalam larutan uji untuk mendonorkan proton dan mereduksi radikal bebas DPPH. Setiap konsentrasi larutan uji diuji dalam tiga kali pengulangan (triplo) guna memastikan konsistensi dan validitas hasil pengukuran.

Tahap berikutnya adalah menghitung nilai IC_{50} dari sampel uji dengan menggunakan persamaan regresi linear, yaitu $y = bx + a$, di mana y merupakan persen peredaman DPPH sebesar 50%, dan x adalah nilai IC_{50} yang ingin ditentukan dari larutan uji.

Tabel 4.6 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan DPPH

Sampel	IC_{50} (ppm)	
	Sebelum di sangrai	Sesudah di sangrai
N-heksan	$58,61 \pm 0,08$	$75,82 \pm 0,02$
Etil Asetat	$57,24 \pm 0,07$	$77,92 \pm 0,99$
Etanol	$55,69 \pm 0,58$	$76,65 \pm 0,12$
Vitamin C	$6,86 \pm 0,04$	

Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa ekstrak biji kopi Arabika Gunung Puntang dengan pelarut etanol sebelum proses penyangraian memiliki aktivitas antioksidan tertinggi, ditandai dengan nilai IC_{50} sebesar $55,69 \pm 0,58$ ppm. Nilai ini lebih rendah dibandingkan ekstrak etil asetat $57,24 \pm 0,07$ ppm dan n-heksan $58,61 \pm 0,08$ ppm, yang menunjukkan bahwa pelarut polar seperti etanol lebih efektif dalam mengekstraksi senyawa antioksidan aktif, seperti asam fenolat, flavonoid, dan polifenol lainnya. Hal ini sesuai dengan prinsip bahwa senyawa antioksidan alami umumnya bersifat polar dan cenderung larut dalam pelarut polar.

Setelah proses penyangraian, aktivitas antioksidan pada seluruh jenis ekstrak mengalami penurunan, yang ditunjukkan oleh meningkatnya nilai IC_{50} . Ekstrak etil asetat memiliki nilai IC_{50} tertinggi sesudah penyangraian $77,92 \pm 0,99$ ppm, diikuti oleh etanol $76,65 \pm 0,12$ ppm dan n-heksan $75,82 \pm 0,022$ ppm. Peningkatan nilai IC_{50} ini menandakan bahwa kemampuan ekstrak dalam menangkap radikal bebas DPPH berkurang setelah proses pemanggangannya. Penurunan ini disebabkan oleh degradasi senyawa fenolik dan flavonoid akibat paparan suhu tinggi selama penyangraian, yang dapat merusak struktur kimia, mengurangi gugus hidroksil aktif, dan memicu reaksi oksidatif internal (Hafidz *et al.*, 2022).

Perbedaan nilai IC_{50} DPPH antar pelarut relatif kecil. Hal ini kemungkinan karena metode DPPH hanya mengukur kemampuan senyawa untuk mendonorkan atom hidrogen (*hydrogen atom transfer*, HAT), dan semua ekstrak masih mengandung senyawa yang mampu melakukan reaksi tersebut. Senyawa fenolik sederhana dan flavonoid, meskipun lebih banyak terekstraksi dalam pelarut polar seperti etanol, tetap terdapat dalam jumlah cukup pada ekstrak semi-polar dan non-polar karena sifat kelarutannya yang sebagian tumpang tindih. Selain itu, sensitivitas metode DPPH terhadap variasi kadar senyawa aktif tidak terlalu tinggi jika semua ekstrak masih memiliki konsentrasi antioksidan yang relatif besar (Apak *et al.*, 2007).

Pada uji kualitatif metode DPPH, intensitas perubahan warna sesudah penyangraian tampak lebih pekat kemungkinan dipengaruhi oleh pigmen hasil pemanggangannya seperti melanoidin. Namun, hasil kuantitatif menunjukkan IC_{50} yang lebih tinggi karena kandungan fenolik sederhana yang menjadi donor hidrogen utama telah berkurang akibat degradasi termal.

Pada pengujian ini, vitamin C digunakan sebagai pembanding karena dikenal sebagai antioksidan kuat yang efektif dalam menangkap radikal bebas. Hasil pengujian menunjukkan bahwa vitamin C memiliki nilai IC_{50} sebesar $6,86 \pm 0,04$ ppm, yang menandakan aktivitas antioksidan yang sangat tinggi. Vitamin C dipilih karena merupakan senyawa murni dengan tingkat polaritas yang tinggi akibat keberadaan banyak gugus hidroksil dalam strukturnya. Gugus hidroksil tersebut

berperan penting dalam mendonorkan elektron ke radikal bebas, sehingga mempercepat proses reduksi dan menetralkan aktivitas radikal (Melinda *et al.*, 2024).

Aktivitas antioksidan dilakukan analisis data statistika lanjutan menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*). Pengujian pertama yang dilakukan adalah uji normalitas untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak. Uji yang digunakan adalah Shapiro–Wilk, karena jumlah sampel < 50 (Ismail, 2022). Data dikatakan berdistribusi normal jika nilai signifikansi $> 0,05$. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk melihat apakah varians antar kelompok data sama. Berdasarkan hasil uji homogenitas, data IC_{50} tidak homogen (nilai signifikansi $< 0,05$). Analisis dilanjutkan dengan uji linearitas untuk menilai hubungan antar variabel, namun hasilnya menunjukkan data tidak linear (nilai signifikansi $< 0,05$).

Dengan demikian, data penelitian ini tidak memenuhi homogenitas dan linearitas. Nilai signifikansi homogenitas sebesar 0,002 ($< 0,05$) dan linearitas sebesar 0,000 ($< 0,05$). Oleh karena itu, analisis data dilanjutkan menggunakan uji Kruskal–Wallis, yaitu metode statistik non-parametrik yang digunakan untuk menguji perbedaan antara kelompok pada variabel independen terhadap variabel dependen. Uji ini merupakan alternatif dari ANOVA apabila data tidak terdistribusi normal atau tidak memenuhi asumsi parametrik lainnya.

Berdasarkan hasil uji Kruskal-Wallis, diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,006 ($< 0,05$), yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai IC_{50} dari masing-masing ekstrak. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan terhadap DPPH antara ekstrak biji kopi arabika Gunung Puntang sebelum dan sesudah penyangraian dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol memiliki perbedaan yang signifikan secara statistik. Perbedaan ini mengindikasikan bahwa jenis pelarut serta perlakuan penyangraian berpengaruh terhadap kemampuan ekstrak dalam menangkap radikal bebas DPPH, yang tercermin dari variasi nilai IC_{50} antar kelompok. Kelompok etanol sebelum penyangraian menunjukkan nilai IC_{50} terendah, yang menandakan aktivitas

antioksidan tertinggi, sedangkan etil asetat roasting memiliki IC_{50} tertinggi, yang berarti aktivitas antioksidannya paling rendah di antara kelompok lainnya.

4.6.2 Metode CUPRAC

Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*). Metode ini didasarkan pada reaksi redoks antara senyawa antioksidan dengan ion Cu^{2+} (cupric), yang direduksi menjadi Cu^+ (cuprous) oleh elektron yang didonorkan oleh senyawa antioksidan. Reaksi ini menghasilkan kompleks berwarna antara Cu^+ dan neocuproin yang dapat diamati secara spektrofotometrik maupun visual (Aryanti *et al.*, 2021).

Selama proses pengujian, perubahan warna larutan menjadi indikator kualitatif dari adanya aktivitas antioksidan. Penambahan 1 mL larutan $CuCl_2$ mengubah warna larutan dari hijau pekat menjadi hijau terang. Selanjutnya, dengan penambahan 1 mL larutan neocuproin, larutan berubah menjadi jingga. Setelah ditambahkan 1 mL larutan buffer amonium asetat (NH_4Ac , pH 7), campuran menunjukkan warna kuning hingga jingga yang menandakan terbentuknya kompleks Cu^+ –neocuproin.

Reaksi tersebut berlangsung secara cepat dan stabil, serta cukup selektif terhadap senyawa antioksidan, khususnya senyawa tipe tiol dan fenolik. Warna yang dihasilkan memiliki intensitas yang sebanding dengan konsentrasi senyawa antioksidan dalam sampel, sehingga dapat digunakan untuk penentuan aktivitas secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Optimasi panjang gelombang CUPRAC dan penentuan absorbansi larutan dilakukan pada rentang panjang gelombang 400 sampai 600 nm. Dari hasil pengukuran, panjang gelombang maksimum yang didapatkan yaitu pada λ maksimum 450 nm, dengan absorbansi 0,073. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan terhadap larutan uji yang telah direaksikan dengan reagen CUPRAC, yaitu campuran $CuCl_2$, neocuproin, dan buffer amonium asetat dengan pH 7. Setiap konsentrasi sampel dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali dan dilihat perubahan intensitas warna yang terbentuk, dan absorbansinya diukur pada 450 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Nilai EC_{50} (*Effective Concentration 50*) menggambarkan konsentrasi di mana terjadi reduksi 50% dari ion tersebut. Semakin kecil nilai EC_{50} , semakin tinggi potensi antioksidan ekstrak untuk mereduksi Cu^{2+} secara efektif (Xiao *et al.*, 2020).

Tabel 4.7 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan CUPRAC

Sampel	EC_{50} (ppm)	
	Sebelum Roasting	Sesudah Roasting
N-heksan	$43,57 \pm 0,01$	$41,53 \pm 0,64$
Etil Asetat	$45,78 \pm 0,04$	$31,03 \pm 0,03$
Etnaol	$30,08 \pm 0,12$	$44,01 \pm 0,79$
Vitamin C	$3,92 \pm 0,01$	

Berdasarkan hasil yang diperoleh, aktivitas antioksidan tertinggi sebelum penyangraian ditunjukkan oleh ekstrak etanol, dengan nilai EC_{50} sebesar $30,08 \pm 0,12$ ppm, diikuti oleh n-heksan $43,57 \pm 0,01$ ppm dan etil asetat $45,78 \pm 0,04$ ppm. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa polar yang terlarut dalam etanol memiliki daya reduksi yang lebih kuat dibandingkan senyawa semi-polar dan non-polar. Senyawa seperti flavonoid, polifenol, dan asam klorogenat yang banyak terkandung dalam kopi umumnya bersifat polar dan berkontribusi besar terhadap aktivitas antioksidan.

Setelah proses penyangraian, aktivitas antioksidan yang diukur dengan metode CUPRAC menunjukkan perubahan yang bervariasi antar pelarut. Ekstrak etil asetat mengalami peningkatan aktivitas antioksidan yang signifikan, dengan nilai EC_{50} menurun dari 45,78 ppm menjadi $31,03 \pm 0,03$ ppm. Peningkatan ini diduga disebabkan oleh terbentuknya senyawa baru hasil reaksi Maillard selama proses pemanggangan, seperti melanoidin, yang memiliki sifat antioksidan dan sebagian larut dalam pelarut semi-polar seperti etil asetat (Antonietti *et al.*, 2022). Sebaliknya, ekstrak etanol menunjukkan penurunan aktivitas antioksidan cukup drastis, dari 30,08 ppm menjadi $44,00 \pm 0,79$ ppm, yang menunjukkan bahwa senyawa antioksidan polar lebih rentan terhadap degradasi akibat panas tinggi. Ekstrak n-heksan mengalami sedikit peningkatan aktivitas dari 43,57 menjadi 41,53 ppm.

Pada uji kualitatif CUPRAC menggunakan KLT, intensitas bercak kuning setelah penyangraian tampak lebih pekat dibandingkan sebelum penyangraian. Hal

ini sejalan dengan hasil kuantitatif, terutama pada ekstrak etil asetat, yang menunjukkan peningkatan kemampuan reduksi. Peningkatan intensitas warna ini disebabkan oleh terbentuknya melanoidin dan produk degradasi polifenol yang tetap aktif secara antioksidan, yang lebih mudah terdeteksi pada metode berbasis *single electron transfer* seperti CUPRAC.

Pembandingan yang digunakan pada pengujian ini adalah vitamin C, dan didapatkan nilai EC_{50} sebesar $3,92 \pm 0,01$. Vitamin C digunakan sebagai pembandingan pada pengujian aktivitas antioksidan dengan metode CUPRAC karena vitamin C mempunyai kemampuan menangkal radikal bebas yang sangat baik dan merupakan sumber dari antioksidan.

Aktivitas antioksidan dianalisis lebih lanjut menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*). Berdasarkan hasil uji Shapiro–Wilk terhadap nilai EC_{50} , data memiliki signifikansi $> 0,05$ sehingga memenuhi asumsi normalitas. Namun, hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa data tidak homogen (nilai signifikansi = $0,000 < 0,05$), sehingga tidak memenuhi syarat homogenitas. Selain itu, uji linearitas juga menunjukkan hasil tidak linear dengan nilai signifikansi $< 0,05$.

Karena asumsi homogenitas tidak terpenuhi, analisis dilanjutkan menggunakan uji Kruskal–Wallis. Berdasarkan hasil uji Kruskal–Wallis terhadap data EC_{50} metode CUPRAC, diperoleh nilai signifikansi sebesar $0,006 (< 0,05)$, yang menunjukkan bahwa perlakuan pemanasan dan jenis pelarut memberikan pengaruh nyata terhadap kemampuan reduksi senyawa antioksidan dalam ekstrak biji kopi. Variasi ini tercermin dari peringkat rata-rata, di mana ekstrak etanol non-roasting memiliki peringkat terendah, yang mengindikasikan kemampuan reduksi paling tinggi. Sebaliknya, ekstrak etil asetat sebelum penyangraian memiliki peringkat tertinggi, yang menunjukkan kemampuan reduksi paling rendah. Perbedaan hasil CUPRAC dibandingkan DPPH pada penelitian ini disebabkan oleh perbedaan prinsip kerja kedua metode yang digunakan.

4.7 Penetapan Kadar Fenolik Total

Penetapan kadar fenolat total memiliki tujuan mengetahui jumlah fenolat yang terdapat pada masing-masing ekstrak biji kopi sebelum dan sesudah

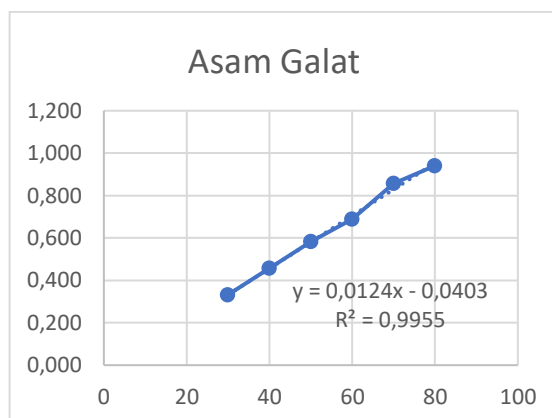
dilakukan penyagraian. Untuk metode penetapan kadar pada senyawa fenolat total ini dilakukan dengan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Pengujian dilakukan dengan cara menambahkan reagen Folin-Ciocalteu kemudian di inkubasi selama 5 menit setelah itu ditambahkan larutan natrium karbonat kemudian dilakukan inkubasi kembali selama 15 menit, lalu setelah itu diukur nilai absorbannya di spektrofotometer UV-Vis.

Penetapan kadar senyawa fenolik total ini menggunakan asam galat sebagai standarnya, asam galat digunakan sebagai standar karena asam galat termasuk dalam kelompok senyawa fenolik sederhana, serta dikenal sebagai standar yang stabil serta mewakili hampir dari seluruh senyawa fenolik yang ada pada tumbuhan. Asam galat akan bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu menghasilkan warna kuning, yang menunjukkan adanya senyawa fenolik. Penambahan NaOH 1% berfungsi menciptakan kondisi basa, sehingga senyawa fenolik dalam sampel dapat bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu dan menghasilkan perubahan warna menjadi biru.

Penetapan kadar fenolik total dilakukan dengan seri konsentrasi pengukuran pada panjang gelombang 765 nm, sesuai dengan prinsip metode Folin-Ciocalteu, di mana terbentuk kompleks berwarna biru yang dapat dideteksi pada panjang gelombang tersebut (Pallawagau *et al.*, 2019). Berikut hasil penentuan kurva baku kuersetin dan pengukuran absorbansinya :

Tabel 4.8 Pengukuran Absorbansi Standar Asam Galat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi λ 765 nm
30	0,332
40	0,456
50	0,583
60	0,688
70	0,857
80	0,941



Gambar 4.5 Kurva Asam Galat

Di dapatkan hasil kurva baku asam galat untuk pengukuran fenolik total adalah $y = 0,0124x - 0,0403$ dengan $R^2 = 0,9955$. Kadar senyawa fenolik ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan metode Folin-Ciocalteu. Pengujian dilakukan secara triplo untuk meningkatkan akurasi, dan nilai absorbansi yang diperoleh dihitung menggunakan persamaan regresi standar asam galat. Hasilnya dinyatakan dalam satuan GAE (*Gallic Acid Equivalent*). Hasil penentuan kadar fenolik total pada ekstrak biji kopi sebelum dan sesudah penyangraian dapat dilihat pada tabel dibawah

Tabel 4.9 Penetapan Kadar Fenolik Total

Sampel	Kadar Fenolik Total (mg GAE/100 mg)	
	Sebelum disangrai	Sesudah disangrai
N-heksan	$9,95 \pm 0,02$	$6,59 \pm 0,02$
Etil Asetat	$11,82 \pm 0,16$	$10,23 \pm 0,06$
Etanol	$6,04 \pm 0,06$	$5,11 \pm 0,05$

Pada sampel sebelum disangrai, kadar fenolik tertinggi diperoleh dari ekstrak etil asetat sebesar $11,82 \pm 0,16$ mg GAE/100 mg, diikuti oleh ekstrak n-heksan $9,95 \pm 0,02$ mg GAE/100 mg dan etanol $6,04 \pm 0,06$ mg GAE/100 mg. Hal ini menunjukkan bahwa etil asetat sebagai pelarut semi-polar memiliki kemampuan lebih baik dalam mengekstraksi senyawa fenolik dari biji kopi sebelum penyangraian. Setelah penyangraian, terjadi penurunan kadar fenolik pada seluruh ekstrak, dengan nilai masing-masing menjadi $6,59 \pm 0,02$ mg GAE/100 mg dan $10,23 \pm 0,06$ mg GAE/100 mg dan $5,11 \pm 0,05$ mg GAE/100 mg.

Perbedaan kadar sebelum dan sesudah proses penyangraian ini menunjukkan adanya pengaruh antara jenis pelarut dan perlakuan panas terhadap kestabilan maupun jumlah senyawa fenolik yang berhasil diekstraksi. Perubahan tersebut mengindikasikan bahwa setiap pelarut merespons suhu pemanasan secara berbeda, baik dari segi pelarutan maupun interaksi dengan senyawa hasil degradasi. Penurunan kadar fenolat setelah penyangraian dapat disebabkan oleh degradasi senyawa fenolik akibat suhu tinggi, sedangkan peningkatan pada ekstrak etanol kemungkinan berasal dari terbentuknya senyawa fenolik baru akibat pemanasan selama proses sangrai (Aytar & Aydin, 2024).

4.8 Penetapan Kadar Flavonoid Total

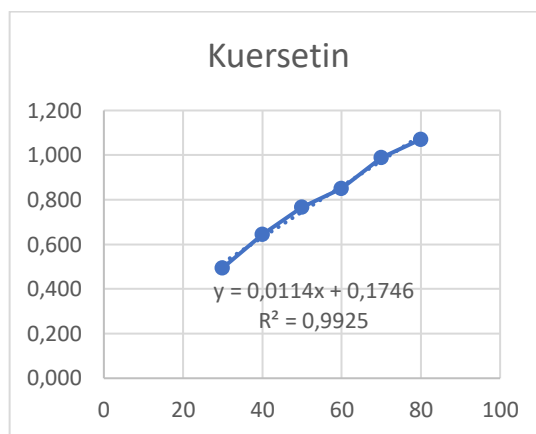
Penetapan kadar flavonoid total dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa flavonoid pada sampel menggunakan metode pereaksi. Penetapan kadar flavonoid total dilakukan melalui pembentukan kompleks antara senyawa flavonoid dalam sampel dengan larutan aluminium klorida (AlCl_3). Reagen ini bekerja dengan membentuk kompleks stabil bersama gugus keton pada posisi C-4 dan gugus hidroksil pada posisi C-3 atau C-5, yang umumnya ditemukan dalam struktur flavon dan flavonol. Selain itu, AlCl_3 juga mampu berinteraksi dengan gugus ortodihidroksil yang terdapat pada cincin A atau B, meskipun kompleks yang terbentuk cenderung kurang stabil.

Sebagai larutan standar, digunakan kuersetin, yaitu senyawa flavonoid yang banyak terdapat dalam tanaman dan memiliki gugus keton serta hidroksil yang berperan dalam aktivitas antioksidan. Kuersetin dipilih karena mampu membentuk kompleks berwarna yang dapat diamati secara spektrofotometrik, sehingga memungkinkan perhitungan kadar flavonoid total pada masing-masing sampel.

Penentuan kurva baku kuersetin dilakukan dengan membuat 6 larutan seri kadar yang dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 415 nm dan dengan waktu inkubasi selama 30 menit. Penggunaan panjang gelombang 415 nm dikarenakan standar yang digunakan adalah kuersetin yang memiliki panjang gelombang maksimum 415 nm (Sudarmin *et al.*, 2022). Berikut hasil penentuan kurva baku kuersetin dan pengukuran absorbansinya

Tabel 4.10 Pengukuran Absorbansi Standar Kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi λ 415 nm
30	0,495
40	0,645
50	0,766
60	0,851
70	0,989
80	1,071

**Gambar 4.6** Kurva Kuersetin

Dari kurva kalibrasi diperoleh persamaan regresi linear yaitu $y = 0,0114x + 0,1746$ dengan $R^2 = 0,9925$. Nilai absorbansi yang diperoleh dari pengujian terhadap sampel kemudian digunakan untuk dimasukkan persamaan regresi dari larutan standar kuersetin, dan hasil kadar flavonoid dinyatakan dalam satuan QE (*Quercetin Equivalent*).

Tabel 4.11 Penetapan Kadar Flavonoid

Sampel	Kadar Flavonoid Total (mg QE/100 mg)	
	Sebelum disangrai	Sesudah disangrai
N-heksan	$8,46 \pm 0,05$	$4,74 \pm 0,05$
Etil Asetat	$9,79 \pm 0,06$	$8,77 \pm 0,05$
Etanol	$4,22 \pm 0,07$	$3,21 \pm 0,05$

Dari hasil menunjukkan bahwa kadar flavonoid dipengaruhi oleh jenis pelarut serta perlakuan penyangraian. Sebelum disangrai, kadar flavonoid tertinggi diperoleh dari ekstrak dengan pelarut etil asetat sebesar $9,79 \pm 0,06$ mg QE/100 mg, diikuti oleh n-heksan $8,46 \pm 0,05$ mg QE/100 mg dan etanol $4,22 \pm 0,07$ mg QE/100 mg. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut semi-polar seperti etil

asetat lebih efektif dalam mengekstraksi senyawa flavonoid dari biji kopi mentah.

Setelah penyangraian, terjadi penurunan kadar flavonoid pada semua kelompok. Penurunan paling drastis terjadi pada ekstrak n-heksan dan etanol, dengan nilai masing-masing menjadi $4,74 \pm 0,05$ mg QE/100 mg dan $3,21 \pm 0,05$ mg QE/100 mg. Sementara itu, ekstrak etil asetat masih mempertahankan kadar flavonoid relatif tinggi yaitu $8,77 \pm 0,05$ mg QE/100 mg, meskipun tetap mengalami sedikit penurunan dibandingkan sebelum disangrai.

Penurunan kadar flavonoid ini kemungkinan disebabkan oleh kerusakan struktur senyawa flavonoid akibat paparan suhu tinggi selama proses penyangraian, yang menyebabkan degradasi senyawa aktif. Tapi pada ekstrak etil asetat menunjukkan bahwa pelarut ini mampu mempertahankan sebagian besar senyawa flavonoid meskipun telah melalui proses pemanasan.

4.9 Hubungan Kadar Fenolik Total, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan

Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antioksidan, kadar fenolik total, dan flavonoid pada ekstrak biji kopi Arabika Gunung Puntang sebelum dan sesudah penyangraian. Rendemen tertinggi diperoleh dari ekstrak etanol, diikuti n-heksan, dan etil asetat. Namun, kadar fenolik total dan flavonoid tidak sebanding dengan rendemen yang dihasilkan. Ekstrak etil asetat justru memiliki rendemen terendah, tetapi kadar fenolik total dan flavonoid tertinggi sebelum penyangraian, masing-masing sebesar $11,82 \pm 0,16$ mg GAE/100 mg dan $9,79 \pm 0,06$ mg QE/100 mg, menunjukkan kemampuan pelarut semi-polar ini dalam mengekstrak senyawa fenolik dan flavonoid dengan kemurnian tinggi.

Kadar fenolik dan flavonoid yang tinggi pada ekstrak etil asetat berkorelasi dengan peningkatan aktivitas antioksidan setelah penyangraian pada metode CUPRAC, dengan nilai EC_{50} menurun signifikan dari $45,78 \pm 0,04$ ppm menjadi $31,03 \pm 0,03$ ppm. Peningkatan ini diduga terkait terbentuknya senyawa hasil reaksi Maillard, seperti melanoidin, yang bersifat reduktor kuat dan sebagian larut dalam pelarut semi-polar. Metode CUPRAC memang lebih peka terhadap senyawa kompleks pereduksi, baik fenolik maupun non-fenolik.

Sebaliknya, pada metode DPPH sebelum penyangraian, aktivitas antioksidan tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak etanol dengan IC_{50} $55,69 \pm 0,58$ ppm dibandingkan etil asetat $57,24 \pm 0,07$ ppm. Hal ini mengindikasikan bahwa metode DPPH lebih sensitif terhadap fenolik sederhana dan flavonoid aglikon yang lebih banyak larut dalam pelarut polar seperti etanol. Setelah penyangraian, nilai IC_{50} meningkat pada semua pelarut, menunjukkan degradasi senyawa fenolik sederhana akibat panas tinggi.

Hasil uji KLT mendukung sebagian temuan kuantitatif ini, meskipun tidak selalu linear. Penampak $FeCl_3$ menunjukkan penurunan intensitas bercak kehijauan setelah penyangraian, menandakan berkurangnya fenolik. Penampak $AlCl_3$ juga menunjukkan penurunan fluoresensi kuning, mengindikasikan degradasi flavonoid. Uji DPPH kualitatif memperlihatkan memudarnya bercak ungu sesudah penyangraian, sejalan dengan penurunan aktivitas pada metode DPPH. Pada reagen CUPRAC menghasilkan bercak kuning-oranye paling kuat pada ekstrak etanol, walaupun secara kuantitatif peningkatan aktivitas terbesar pada metode ini terjadi pada ekstrak etil asetat. Perbedaan ini menunjukkan bahwa intensitas visual pada KLT dapat dipengaruhi oleh distribusi senyawa pada plat dan sifat reagen, sehingga tidak selalu mencerminkan nilai kuantitatif secara langsung.

Dengan demikian, kadar fenolik total dan flavonoid berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan, namun hubungan keduanya tidak selalu linear. Perbedaan sifat pelarut, dampak proses penyangraian, dan sensitivitas metode pengujian dapat memengaruhi arah perubahan aktivitas. Pada metode DPPH, penurunan kadar fenolik sederhana dan flavonoid akibat penyangraian sejalan dengan penurunan aktivitas antioksidan, sedangkan pada metode CUPRAC, peningkatan aktivitas pada ekstrak etil asetat menunjukkan peran penting senyawa non-fenolik seperti melanoidin.