

Research Article

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION
CYTOTOXIC COMPOUNDS CAFFEINE AND CHLOROGENIC ACID
SEEDS OF LAMPUNG COFFEE ROBUSTA**

Asep Sukohar^{*}, Setiawan^{**}, Firman F. Wirakusumah^{***}, Herry S. Sastramihardja^{****}

^{*}Departement of Pharmacology, Faculty of medicine, Lampung University.

^{**}, ^{***}, ^{****} Faculty of Medicine, Padjadajaran University.

Jl. Prof. Satriobrojonogoro NO:1, Gedung Meneng, Bandar Lampung

asepsukohar@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: Therapeutic use of natural compounds as the active ingredient is a breakthrough anticancer ingredient in pharmaceuticals and medicine. Caffeine and chlorogenic acid have isolated from coffee, there are cytotoxic and contain high antioxidants. **Objective:** to determine cytotoxic and antioxidants effect of caffeine and chlorogenic acid in coffee rubusta Lampung. **Methods:** Research have carried out by several steps including: separation and purification via extraction and fermentation of robusta coffee beans, maceration using methanol solvent, fractionation using n-hexane and water, the purification is done by using various combinations of chromatographic techniques using normal phase and reversed-phase column on an open and press column, the purity of the active compound analysis by performed the method of thin layer chromatography (TLC) and reversed and normal phase high performance liquid chromatography method (HPLC / HPLC), toxicity tests carried out on brine shrimp (*A. salina*), and the antioxidant test using the method trapping of free radicals 1.1 Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). **Result:** Isolates of caffeine has cytotoxic activity against larvae of shrimp with a value of 100% mortality at 1000 ppm, while the smallest 60% mortality at concentrations of 10 ppm with IC50 values for caffeine obtained at 21.41 ppm. Whereas chlorogenic acid has a cytotoxic activity with a value of 100% mortality at concentrations of 100, 300, and 1000 ppm and the smallest 70% mortality at concentrations of 10 ppm with IC50 values of 5.86 ppm. **Conclusion:** Both compounds have a cytotoxic activity with LC50 values of less than 1000 ppm, and chlorogenic acid had higher antioxidant activity compared to caffeine.

Key words: Antioxidants, chlorogenic acid, robusta coffee beans Lampung, cytotoxic.

Research Article

ISOLASI dan KARAKTERISASI SENYAWA SITOTOKSIK KAFEIN dan ASAM KLOOROGENAT DARI BIJI KOPI ROBUSTA LAMPUNG

Asep Sukohar^{*}, Setiawan^{**}, Firman F. Wirakusumah^{***}, Herry S. Sastramihardja^{****}

^{*}Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

^{**}, ^{***}, ^{****}Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

Jl. Prof.Satriobrojonogoro NO:1, Gedung Meneng, Bandar Lampung

asesukohar@yahoo.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Terapi menggunakan senyawa aktif bahan alam sebagai bahan antikanker merupakan terobosan dalam bidang farmasi dan kedokteran. Kafein dan asam klorogenat merupakan isolat kopi bersifat sitotoksik dan mengandung antioksidan yang tinggi. **Tujuan:** untuk mengidentifikasi aktivitas sitotoksik dan antioksidan senyawa kafein dan asam klorogenat dalam kopi rubusta Lampung. **Metode:** Penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan meliputi: pemisahan dan pemurnian melalui ekstraksi dan fermentasi biji kopi robusta, maserasi menggunakan pelarut metanol, fraksionasi dengan menggunakan *n*-heksana dan air, pemurnian dilakukan dengan menggunakan berbagai kombinasi teknik kromatografi menggunakan fasa normal dan fasa terbalik pada kolom terbuka dan kolom tekan, analisis kemurnian senyawa aktif dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (TLC) fasa normal dan terbalik serta metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT/HPLC), uji toksisitas dilakukan terhadap brine shrimp (*A. salina*), dan uji antioksidan dengan menggunakan metode pemerangkapan radikal bebas 1,1 *Diphenyl-2-picrylhidrazyl*(DPPH). **Hasil:** Isolat kafein memiliki aktivitas sitotoksik terhadap larva udang dengan nilai mortalitas 100% pada 1000 ppm sedangkan mortalitas terkecil 60% pada konsentrasi 10 ppm dengan Nilai IC₅₀ untuk kafein diperoleh sebesar 21,41 ppm. Sedangkan asam klorogenat memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai mortalitas 100% pada konsentrasi 100, 300, dan 1000 ppm dan mortalitas terkecil 70% pada konsentrasi 10 ppm dengan nilai IC₅₀ sebesar 5,86 ppm. **Simpulan:** Kedua senyawa memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai LC₅₀ kurang dari 1000 ppm, dan asam klorogenat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kafein.

Kata kunci: Antioksidan, asam klorogenat, biji kopi robusta Lampung, sitotoksik.

Research Article

PENDAHULUAN

Kopi mengandung berbagai macam komponen kimia dengan karakteristik yang berbeda-beda, tetapi masih banyak senyawa kopi yang belum diketahui aktivitas biologi dan manfaatnya bagi manusia.²

Senyawa yang terdapat dalam kopi terdiri dari senyawa volatile dan non-volatil yang mempengaruhi aroma dan mutu kopi. Kopi antara lain mengandung: senyawa kafein yang merupakan *alkaloid xanthin* dan asam klorogenat termasuk golongan senyawa polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan dan kandungan polifenol kopi robusta lebih tinggi dibandingkan kopi arabika ataupun tanaman lain.³

Secangkir kopi 200-550 mg memiliki aktivitas antioksidan sebesar 26% dibandingkan dengan β -karoten (0,1%), tokoferol (0,3%), vitamin C (8,5%) serta antioksidan lainnya.⁴ Antioksidan mampu menghambat oksidasi lemak sehingga dapat menghambat terbentuknya kerusakan bau dan makanan.⁵ Antioksidan terbagi atas tiga golongan yaitu golongan fenol, golongan amin dan golongan amino-phenol.⁶ Antioksidan golongan fenol antara lain asam klorogenat yang mempunyai titik leleh pada 208°C, dan terdapat dalam kopi sebesar 4,5 - 11, 1 %. Kopi mempunyai berbagai macam efek biologis antara lain: menurunkan risiko DM tipe 2, penyakit kardiovaskuler dan risiko kanker. Penelitian *in vitro* kopi dapat melindungi DNA, lipid, protein melalui mekanisme memerangkap radikal bebas sehingga mengurangi risiko terjadinya penyakit kronik.³

Dalam penelitian berkelanjutan sebagai upaya pencarian obat antikanker baru yang berasal dari tumbuhan obat Indonesia, pada penelitian pendahuluan telah diamati bahwa ekstrak metanol biji kopi Robusta Lampung dan produk fermentasinya telah menunjukkan aktifitas antikanker terhadap beberapa sel kanker. Kopi mengandung senyawa kafein dan asam klorogenat yang beraktifitas anti sitotoksik terhadap *artemia salina*, dan metode *artemia salina* merupakan salah satu metode untuk mencari senyawa baru yang beraktifitas anti kanker. Kurnia *et al*, (2008) melaporkan bahwa ekstrak metanol tumbuhan obat dan makro jamur asal Indonesia yang menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap *Brine Shrimp (Artemia salina)* juga mempunyai korelasi aktifitas antikanker.⁷

Penelitian bertujuan untuk mengidentifikasi adanya senyawa kafein dan klorogenat dalam kopi dengan TLC dan NMR, uji aktifitas antioksidan menggunakan metode pemerangkapan DPPH antioksidan, dan uji sitotoksitas dengan *artemia salina*.

Research Article

METODE

Prosedur ekstraksi dan isolasi senyawa

Eksperimental murni yang terdiri dari ekstraksi, fraksinasi dan isolasi senyawa kafein dan asam klorogenat biji kopi Robusta, pengujian aktivitas toksik senyawa terhadap larva *A. salina*, pengujian aktivitas antioksidan senyawa uji pemerangkapan radikal DPPH serta karakterisasi senyawa. Spektrum inframerah (IR) diukur menggunakan alat FT-IR Shimadzu 8400, sedangkan spektrum ultraviolet (UV) diukur dengan spektrofotometer 8452A Diode Array, Spektra NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) diukur dengan spektrometer merk JEOL tipe ECA 500 dengan medan magnet 500 MHz. Geseran kimia ditunjukkan dalam skala δ (ppm) dengan TMS sebagai standar internal. Pemisahan dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi jenis silika gel G₆₀ (Merck; 70-200 dan 230-400 mesh) dan Chromatorex ODS (Fuji Silysia, Japan) dan Wakogel C-200 (Wako Pure Chemical Industries), Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan dengan pelat silika gel 60 F₂₅₄ dan RP-18 F_{254S} (Merck; 0,2 mm), dan noda yang dihasilkan dapat dilihat dengan lampu UV λ 254 dan 365 nm serta H₂SO₄ 10% (v/v) dalam etanol sebagai pereaksi penampak noda yang diikuti dengan pemanasan.

Bahan kopi robusta

Buah kopi robusta segar, berwarna merah, bebas dari gigitan serangga (tidak rusak atau cacat), diambil dari daerah perkebunan rakyat di daerah kabupaten Pesawaran Lampung. Buah, daun dan batang pohon kopi robusta (*Coffea robusta* Lindl. Ex De Will) diidentifikasi di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi, UNPAD Jatinangor. Buah kopi robusta yang digunakan terdiri dari buah kopi yang dipanaskan (*roasting*) dan tanpa pemanasan (langsung diblender dalam kondisi kering).

Isolasi dan pemurnian

Buah kopi robusta sebanyak 500 gram dikeringkan secara alami digiling dan dimaserasi dengan 2L metanol (MeOH) selama 3x24 jam, disaring dan dievaporasi pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$. Ekstrak MeOH (68,49 g) dipartisi dengan 3x350 ml *n*-heksana-H₂O menghasilkan ekstrak *n*-heksana (12,66 g). Fraksi air dipartisi dengan 3x350 ml etil asetat (EtOAc) dihasilkan ekstrak EtOAc (6,40 g) dan fraksi H₂O (40,25 g). Masing-masing fraksi dianalisis dengan KLT (*Kromatografi Lapis Tipis*) fase normal silika dan ODS (*Octadecylsilyl*) silika gel dibandingkan

Research Article

dengan standar. *n*-heksana-EtOAc (3:2), *n*-heksan-aseton (3:2) dan (4:1), kloroform-metanol (4:1), dan metanol- H_2O (7:3). Plat disemprot dengan pereaksi asam sulfat 10% dalam etanol.^{1,14} **Fraksi H_2O** (1,70 g) dimurnikan dengan kromatografi kolom ODS (MeOH- H_2O 10% *stepwise*) diperoleh 11 fraksi dengan **fraksi 2, 3 dan 4**(1.2143 g) mengandung senyawa kafein dan asam klorogenat. Dimurnikan kembali dengan kromatografi kolom ODS (MeOH- H_2O 5% *stepwise*) diperoleh 23 fraksi dengan **fraksi 3** mengandung senyawa kafein dan asam klorogenat. Dimurnikan kembali dengan kromatografi kolom sistem pelarut isokratis sehingga didapatkan dua senyawa murni yaitu kafein dan asam klorogenat, dan diuji toksik terhadap *A. Salina* uji antioksidan terhadap DPPH.⁸

Uji Toksisitas (*brine shrimp lethality test*)

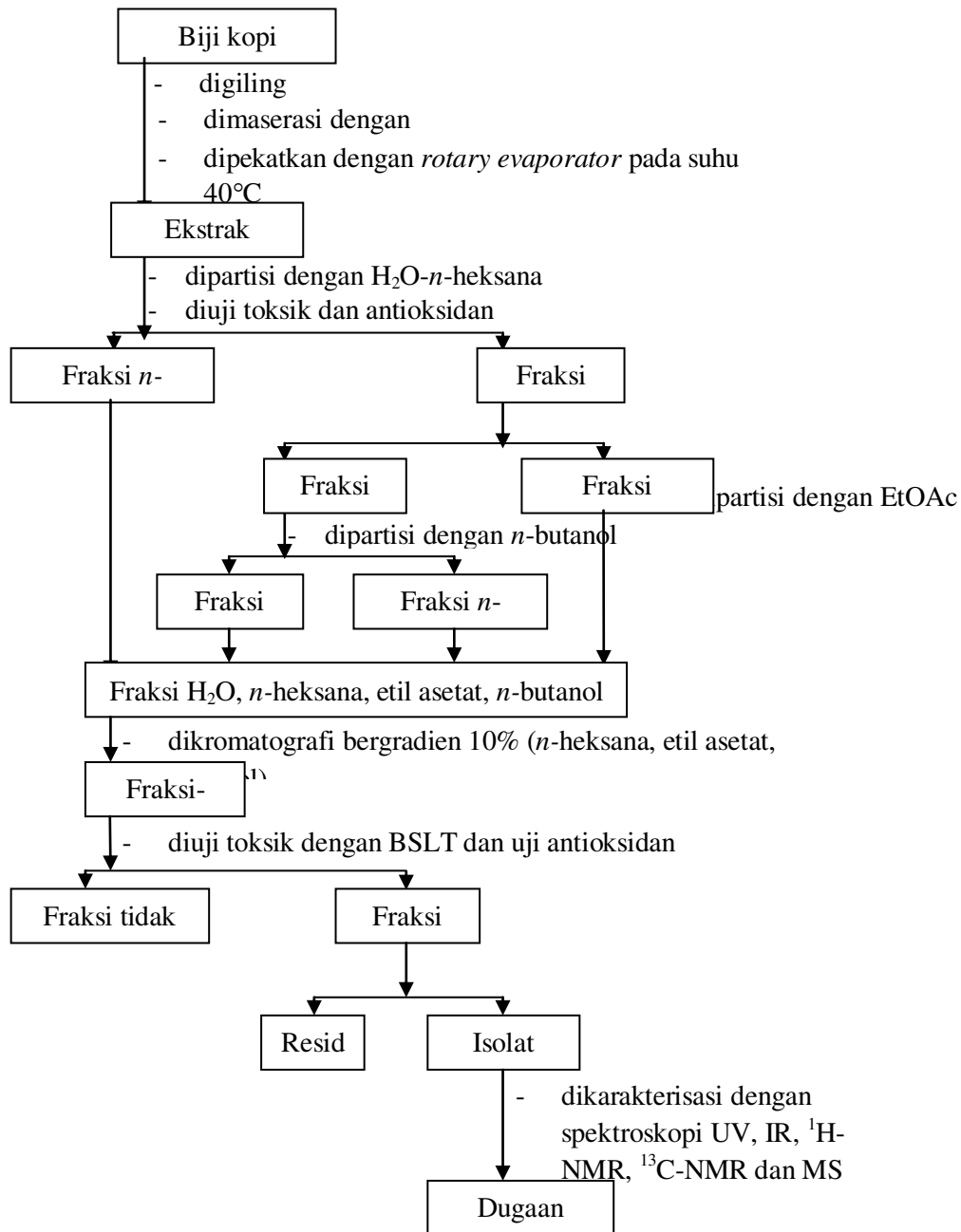
Telur larva udang, yaitu *A. salina* ditetaskan pada medium air laut yang dilakukan dengan metode yang pernah dilakukan oleh Meyer *et al.*¹⁶ (1982). Isolat kafein dan asam klorogenat yang dilarutkan dengan MeOH dengan volume tertentu dimasukkan ke dalam botol vial. Setelah pelarutnya menguap, ditambahkan 2 mL medium air laut beserta larva udang sebanyak 10-15 ekor. Uji hayati ini dilakukan tiga kali pengulangan pada setiap variasi konsentrasi 1000, 300, 100, 30, dan 10 ppm. Setelah 24 jam, jumlah larva udang (*A. salina*) yang mati dihitung pada setiap vial uji.

Uji Antioksidan

Isolat murni yang diperoleh diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (Yeh-Cen, 1995) Sampel dilarutkan dalam metanol (konsentrasi 10-1000 ppm), direaksikan dengan 0,2 mM DPPH, diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm. Aktivitas antioksidan dihitung sebagai persentase inhibisi terhadap DPPH (persentase "scavenging effect"), yaitu : % inhibisi = $[1 - (\text{absorban sampel} / \text{absorban blanko})] \times 100\%$. Nilai IC_{50} adalah konsentrasi sampel yang diperlukan untuk memberikan % inhibisi sebesar 50%.

Research Article

Skema Alur kerja Penelitian



Gambar 1 Prosedur ekstraksi, fraksinasi, uji aktivitas dan karakterisasi senyawa sitotoksik dan antioksidan dari Kopi Robusta

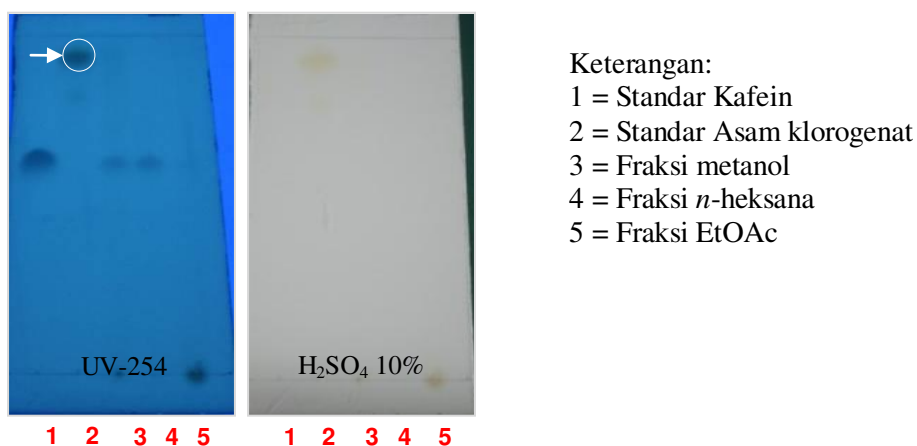
Research Article

HASIL

Isolasi dan Pemurnian Senyawa

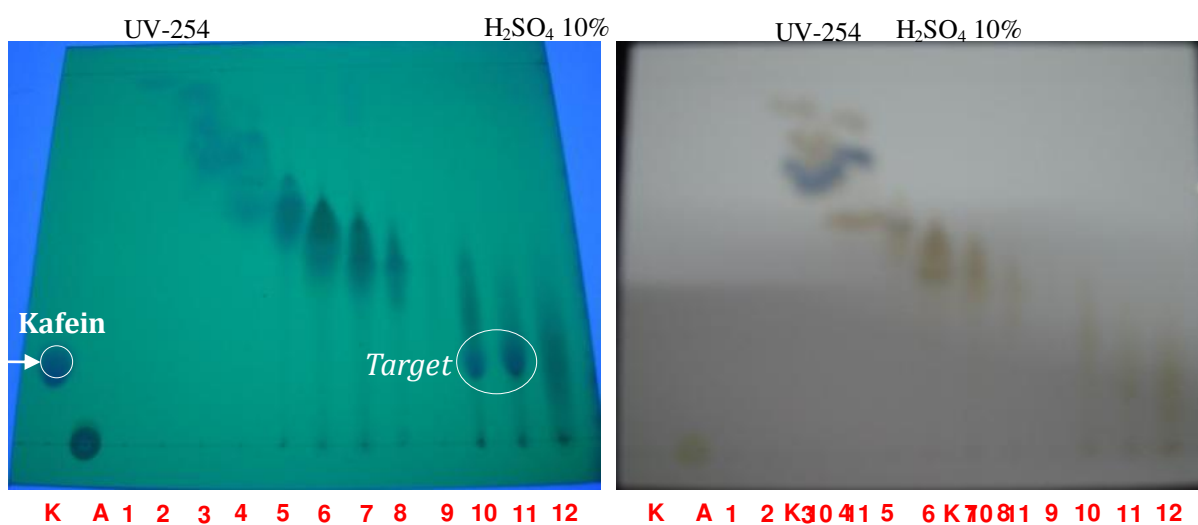
Biji kopi robusta (roasting)

Pola noda senyawa fraksi metanol, *n*-heksana dan etil asetat serta standar kafein dan asam klorogenat kemudian dianalisis menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fasa diam ODS. Hasil analisis fraksi menggunakan metode KLT dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 2 Kromatogram KLT dengan pelarut metanol-air (7:3)

Fraksi *n*-heksana (17,16 g) dipisahkan dan dimurnikan lebih lanjut dengan metode kromatografi kolom terbuka fasa diam silika gel 60 (70-230 mesh) dengan pelarut bergradien 5% (v/v) *n*-heksana-aseton dan diperoleh 23 fraksi. Pola noda dari fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom dianalisis dengan menggunakan metode KLT.



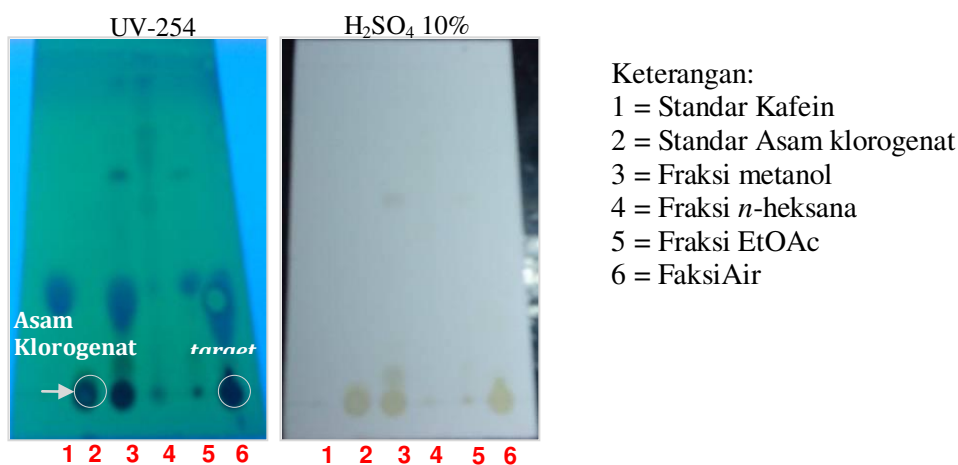
Gambar 3 Kromatogram KLT dengan pelarut , *n*-heksana-EtOAc {(3:2) (A)} dan metanol-air {(7:3) (B)}

Research Article

Berdasarkan Gambar 3, diperoleh informasi tentang pola noda senyawa hasil kromatografi kolom ke-1. Fraksi 4-10 dan 4-11 menunjukkan pola noda yang sama dengan standar kafein. Kemudian kedua fraksi tersebut direkristalisasi dan diperoleh isolat kafein murni dengan massa masing-masing fraksi sebesar 4,5 dan 12,1 mg.

Biji kopi robusta (*non-roasting*)

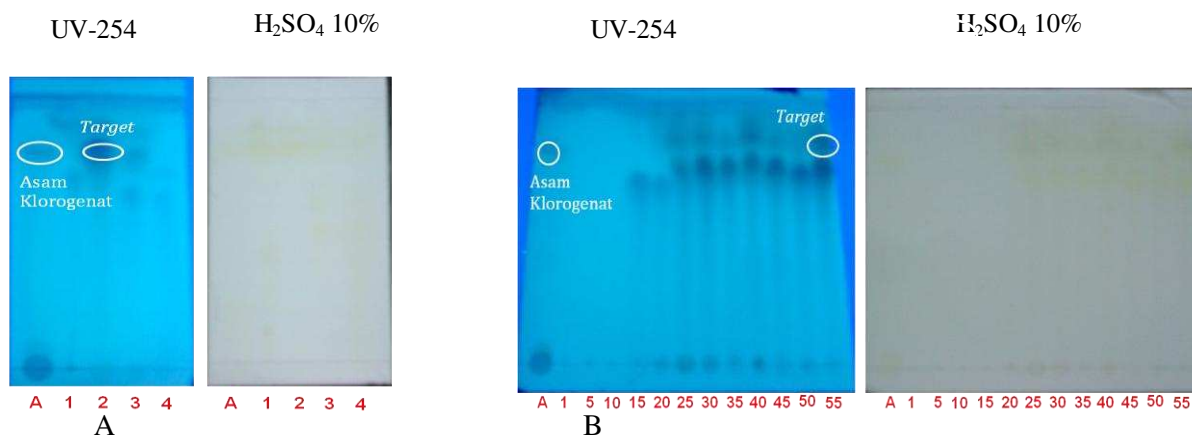
Ekstrak metanol dipatisi dengan air, *n*-heksana dan etil asetat. Pola noda dari Fraksi hasil patisidialisis dengan menggunakan metode KLT dengan fasa diam silika gel G 60 F₂₅₄.



Gambar 4 Kromatogram KLT dengan pelarut *n*-heksana-aseton (3:2)

Fraksi air (1,70 g) dipisahkan dan dimurnikan lebih lanjut dengan metode kromatografi kolom terbuka fasa diam ODS dengan pelarut bergradien 10% (v/v) metanol-air dan diperoleh 11 fraksi. Fraksi H₂O-2 hasil kromatografi kolom dimurnikan lebih lanjut dengan metode kromatografi kolom isokratis dengan silika ODS (H₂O) dan diperoleh 60 fraksi. Pola noda dari fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom dianalisis dengan menggunakan metode KLT.

Research Article



Gambar 5 Kromatogram KLT kromatografi kolom (A) dan isokratis (B) dengan pelarut metanol-air (1;9)

Fraksi 11-2-15 menunjukkan noda tunggal dan diduga isomer dari asam klorogenat. Fraksi 11-2-11~15 digabung dan diperoleh massa sebesar 3,1 mg untuk ditentukan struktur senyawanya dengan NMR. Fraksi 11-2-53-55 digabung dan diperoleh massa sebesar 10,3 mg. Kemudian gabungan fraksi tersebut dikromatografi preparatif dan diduga merupakan isomer kedua dari asam klorogenat dengan massa sebesar 4,3 mg.

Penentuan struktur senyawa Kafein

Isolat murni berwarna putih, IR_{v.maks.} dengan lempeng KBr (cm⁻¹): 3111,28 (kembar, N-H str); 2955,04 (CH str); 1703,20 (C=O); 1546,96 (C-N); 1361,79 (C-H bend); dan 974,08 (C-C). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7,50 (s, H-8); 3,99 (s, H-12); 3,58 (s, H-10); 3,40 (s, H-11), ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ 155,62 (C-6); 151,91 (C-2); 148,55 (C-4); 141,55 (C-8); 107,80 (C-5); 33,79 (C-12); 29,93 (C-10); 28,12 (C-11) dan 2D-NMR pada HMQC : C-8/H-8; C-10/H-10, C-11/H-11, C-12/H-12 didukung dengan HMBC H-8/C-5 dan H-8/C-4; H-12/C-5 dan H-12/C-8; H-10/C-4 dan H-10/C-2 serta H-11/C-2 dan H-11/C-6. Serta dibuktikan dengan perbandingan terhadap kafein standar dan kafein yang telah diisolasi oleh (Verma & Kumar, 2010)¹⁷.

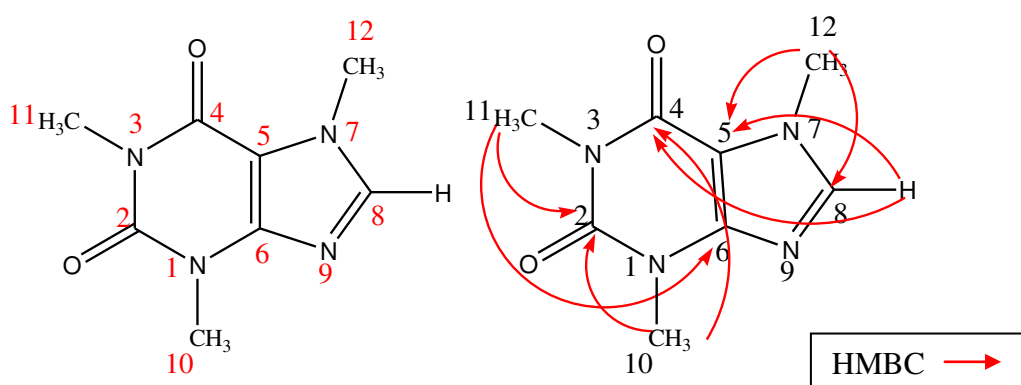
Research Article

Tabel 1 Spektrum FTIR senyawa kafein yang diisolasi dengan kafein standar

Ikatan	Kafein hasil isolasi (cm ⁻¹)	Kafein standar (cm ⁻¹) (Verma & Kumar, 2010)
C=O Str	1703,20	1707,06
C-C Str	974,08	974,08
C-H bend	1361,79	1359,86
C-H Str	2953,12	2955,04
C-N Str	1546,96	1548,89
N-H Str	3111,28.	3111,28

Tabel 2 Perbandingan spektrum ¹H-NMR dan ¹³C-NMR kafein hasil isolasi dan kafein standar

No	Kafein Hasil Isolasi			Kafein Standar (Verma & Kumar, 2010)	
	δ C-NMR	δ H-NMR	HMBC	δ C-NMR	δ H-NMR
2	151,91	-	-	151,52	-
4	148,55	-	-	148,53	-
5	107,80	-	-	107,39	-
6	155,62	-	-	155,21	-
8	141,55	7,50 (s)	H-8/C-5,C-4	141,28	7,51 (s)
10	29,93	3,58 (s)	H-10/C-4,C-2	29,54	3,59 (s)
11	28,17	3,40 (s)	H-11/C-2, C-6	27,72	3,41 (s)
12	33,29	3,99 (s)	H-12/C-5,C-8	33,39	4,00 (s)



Gambar 6 Dugaan Struktur Isolat yaitu Kafein

Penentuan struktur asam klorogenat

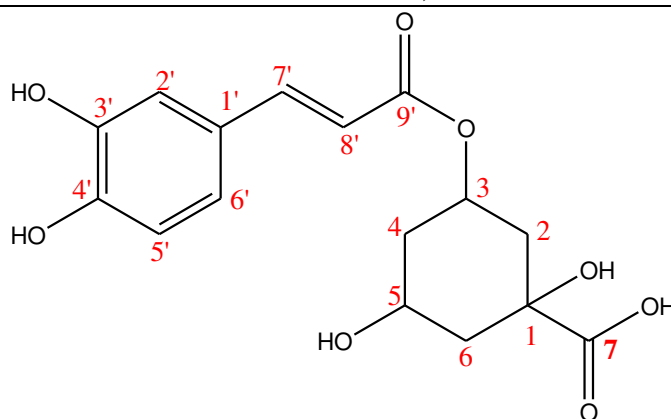
Isolat murni berwarna putih dengan IR ν_{maks} . dengan lempeng KBr (cm⁻¹): 3359 (Lebar, regang OH), 1765 (regang C=O), 1591 (Regang O-C-O ester), 1514 (Regang O-C-O karboksilat), 1460 (ikatan C-H) dan 1266 (Ikatan C-C). ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) : δ 7,55 (d, J = 7,7 Hz, H-7'); 7,55 (d, J = 0,9 Hz, H-2'); 6,94 (dd, J = 3,88, 0,87 Hz, H-6'); 6,77 (d, J = 3,8 Hz); 6,25 (d, J =

Research Article

7,7 Hz H-8'); 5,33 (m, H-3); 4,16 (m, H-5); 3,72 (dd, $J = 4,22; 1,62$ Hz, H-4); 2,21 (m, H-2); dan 2,05 (m, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) : δ 177,12 (C-7); 168,74 (C-9'); 149,66 (C-4'); 147,16 (C-3'); 146,88 (C-7'); 127,87 (C-1'); 123,07 (C-6'); 116,55 (C-5'), 115,33 (C-5'), 115,25 (C-8'), 76,21 (C-1), 73,55 (C-4), 72,06 (C-3), 71,37 (C-3), 38,85 (C-2) dan 38,29 (C-6). Serta dibuktikan dengan perbandingan terhadap kafein standar (Shoeb et al, 2007)¹⁸.

Tabel 3 Perbandingan spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ asam klorogenat hasil isolasi dan asam klorogenat standar

No	Asam klorogenat hasil isolasi		Asam klorogenat standar	
	δ C-NMR	δ H-NMR	δ C-NMR	δ H-NMR
1	76,21	-	69,2	-
2	38,85	2,21 (m)	39,2	2,42 (m), 1,92 (m)
3	72,06	5,33 (m)	73,3	5,08 (m)
4	73,55	3,72 (dd, $J = 4,2; 1,6$ Hz)	74,0	3,68 (dd, $J = 9,6 ; 3,2$ Hz)
5	71,06	4,16 (d, $J = 8,0$ Hz)	71,9	4,11 (m)
6	38,29	2,05 (m)	38,3	2,02 (m), 1,98 (m)
7	177,12	-	176,8	-
1'	127,87	-	126,2	-
2'	115,33	7,04 (d, $J = 0,9$ Hz)	115,4	7,00 (d, $J = 2,0$ Hz)
3'	147,16	-	146,3	-
4'	149,66	-	149,1	-
5'	116,55	6,77 (d, $J = 3,8$ Hz)	116,5	6,70 (d, $J = 8,0$ Hz)
6'	123,07	6,94 (dd, $J = 3,8 0,8$ Hz)	121,9	6,91 (dd, $J = 8,0; 2,0$ Hz)
7'	146,88	7,55 (d, $J = 7,7$ Hz)	145,3	7,38 (d, $J = 15,6$ Hz)
8'	115,26	6,25 (d, $J = 7,7$ Hz)	115,2	6,16 (d, $J = 15,6$ Hz)
9'	168,74	-	166,9	-



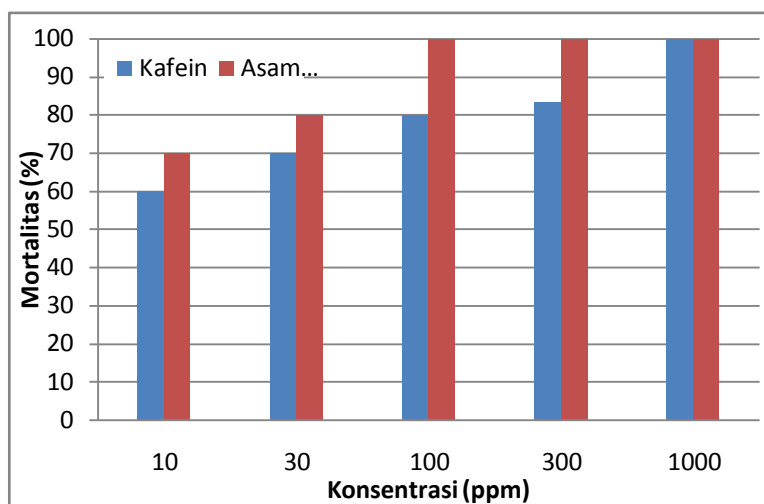
Gambar 7 Dugaan Struktur Isolat yaitu Asam Klorogenat

Research Article

Hasil Uji Aktivitas

Uji Sitoksisitas

Uji sitotoksik Isolat kafein memiliki aktivitas sitotoksik terhadap larva udang dengan nilai mortalitas 100% pada 1000 ppm sedangkan mortalitas terkecil 60% pada konsentrasi 10 ppm dengan Nilai IC_{50} untuk kafein diperoleh sebesar 21,41 ppm. Sedangkan asam klorogenat memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai mortalitas 100% pada konsentrasi 100, 300, dan 1000 ppm dan mortalitas terkecil 70% pada konsentrasi 10 ppm. dengan nilai IC_{50} sebesar 5,86 ppm.



Gambar 8 Grafik uji sitotoksik senyawa kafein dan asam klorogenat terhadap *Artemia Salina*

Uji Antioksidan

Senyawa kafein dan asam klorogenat diuji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH. Nilai IC_{50} untuk kafein diperoleh sebesar 21,41 ppm dan untuk asam klorogenat diperoleh nilai sebesar 5,86 ppm.

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh persamaan linier untuk kafein: $y=2.413x -1.6422$ dengan $R^2=0.9991$ dan persamaan linier untuk asam klorogenat: $y=7.325x + 7.0991$ dengan $R^2=0.9919$.

DISKUSI

Biji kopi robusta *roasting* dan *non-roasting* diisolasi dan dikarakterisasi dengan metode spektroskopi yang meliputi, spektrofotometri ultraviolet (UV), infra merah (IR), 1H -NMR, ^{13}C -NMR, dan Massa. Penggilingan biji kopi dilakukan agar dapat memperbesar luas permukaan dan

Research Article

memecah dinding sel sampel sehingga senyawa-senyawa kimia yang terkandung di dalamnya dapat terekstraksi secara maksimal.

Pengekstraksian dengan pelarut metanol selama 3x24 jam pada suhu ruang dilakukan untuk memaksimalkan ekstraksi sampel karena dengan jangka waktu tersebut filtrat metanol sudah berkurang warnanya, artinya pelarut maksimal dalam mengambil senyawa-senyawa dalam sampel. Penggunaan metanol dalam proses maserasi dikarenakan metanol dapat melarutkan senyawa-senyawa polar dan nonpolar sehingga sangat baik untuk mengekstrak kandungan metabolit sekunder dalam tanaman.⁹ Teknik ekstraksi dengan metode maserasi memiliki keunggulan yaitu dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang tidak tahan panas, namun memiliki kelemahan yaitu membutuhkan waktu yang cukup lama.

Hasil maserasi disaring dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh ekstrak pekat metanol. Teknik penguapan pelarut tersebut dilakukan untuk mendapatkan ekstrak pekat dengan cepat dan efisien karena menggunakan tekanan yang rendah. Pada tekanan yang rendah, suhu untuk menguapkan suatu senyawa menjadi lebih rendah dari suhu didihnya, sehingga waktu yang dibutuhkan untuk menguapkan pelarut menjadi lebih cepat. Selain itu, penguapan dilakukan pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ bertujuan untuk mencegah dekomposisi senyawa yang terkandung di dalamnya.

Sampel dipartisi dalam corong pisah dengan menggunakan pelarut air, *n*-heksana dan etil asetat. Penggunaan metode partisi dengan berbagai pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda dalam isolasi senyawa bertujuan untuk mengklasifikasikan senyawa-senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya.¹⁰ Fraksi metanol, air, *n*-heksana dan etil asetat kemudian dianalisis menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Analisis dengan metode KLT ini dapat dijadikan suatu pedoman atau dasar untuk menentukan komposisi pelarut yang cocok untuk proses pemisahan serta pemurnian berikutnya dan mengetahui pola noda dari fraksi-fraksi tersebut.. Berdasarkan pola noda senyawa pada kromatogram KLT, diperoleh informasi tentang potensi dari komposisi pelarut yang digunakan dalam mengelusi suatu senyawa.

Pada gambar 2 untuk sampel berupa biji kopi robusta *roasting* terlihat bahwa standar kafein memiliki pola noda dan jarak R_f yang sama pada fraksi metanol dan *n*-heksana yang menandakan bahwa fraksi tersebut mengandung senyawa kafein. Sedangkan untuk standar asam klorogenat tidak ditemukan pola noda dan jarak R_f yang sama pada fraksi manapun yang menandakan bahwa asam klorogenat tidak terdapat pada fraksi-fraksi tersebut. Hal ini dikarenakan selama proses penyangraian atau *roasting*, biji-biji dipanaskan hingga suhu 200-240 $^{\circ}\text{C}$ sehingga sebagian besar asam klorogenat akan terhidrolisa menjadiasam kafeat dan asam quinat karena pemanasan.¹¹ Kemudian fraksi *n*-heksana dimurnikan lebih lanjut dengan

Research Article

komatografi kolom dan direkristalisasi sehingga diperoleh isolat kafein murni pada fraksi yang berbeda masing-masing sebesar 7,9 dan 12,1 mg.

Asam klorogenat diperoleh dari sampel biji kopi robusta *non-roasting*. Senyawa asam klorogenat berada di fraksi air dikarenakan sifatnya yang polar dan memiliki 3 isomer. Isomer ialah molekul-molekul dengan rumus kimia yang sama (dan sering dengan jenis ikatan yang sama), namun memiliki susunan atom yang berbeda. Kebanyakan isomer memiliki sifat kimia yang mirip satu sama lain. Pola noda hasil KLT ketiga isomer itupun saling berdekatan, sehingga perlu dilakukan pemisahan berulang. Pemurnian senyawa asam klorogenat menggunakan metode kromatografi kolom dengan sistem pelarut isokratis dan KLT preparatif untuk memisahkan isomer-isomer dari senyawa asam klorogenat dan diperoleh 2 isomer asam klorogenat dengan massa masing-masing sebesar 4,5 dan 3,1 mg.

Pengujian sitotoksitas isolat kafein dan asam klorogenat terhadap larva udang (*A. salina*) bertujuan untuk mengetahui aktivitas toksik senyawa tersebut menggunakan parameter LC_{50} (*Lethality Concentration*), yaitu konsentrasi minimum dari suatu senyawa yang dapat mengakibatkan kematian larva udang (*A. salina*) sebesar 50%. Berdasarkan hasil pengujian, menunjukkan senyawa kafein memiliki aktivitas toksik terhadap larva udang dengan nilai mortalitas 100% pada 1000 ppm sedangkan mortalitas terkecil 60% pada konsentrasi 10 ppm. Asam klorogenat memiliki aktivitas toksik dengan nilai mortalitas 100% pada konsentrasi 100, 300 dan 1000 ppm dan mortalitas terkecil 70% pada konsentrasi 10 ppm. Dari data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa senyawa kafein dan asam klorogenat memiliki aktivitas toksik yang besar tetapi karena tidak adanya mortalitas dibawah 50% pada hasil pengujian toksik kedua senyawa tersebut maka nilai LC_{50} tidak dapat ditentukan. Harga LC_{50} kurang dari 1000 ppm dinyatakan aktif.¹²

Senyawa kafein dan asam klorogenat diuji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH. Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisien atau *efficient concentration* (EC_{50}) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan persentasi penghambatan 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga EC_{50} yang rendah.¹³ Nilai EC_{50} untuk kafein diperoleh sebesar 21,41 ppm dan untuk asam klorogenat diperoleh nilai sebesar 5,86 ppm.

Kedua senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, terlihat dari nilai EC_{50} . Tetapi asam klorogenat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kafein karena asam klorogenat memiliki banyak gugus hidroksil yang berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan. Suatu zat mempunyai sifat antioksidan bila nilai EC_{50} kurang dari

Research Article

200 ppm. Bila nilai EC₅₀ yang diperoleh berkisar antara 200-1000 ppm, maka zat tersebut kurang aktif namun masih berpotensi sebagai zat antioksidan.¹⁴

SIMPULAN

1. Asam klorogenat dan kafein dapat diisolasi dari kopi robusta Lampung
2. Kafein dapat diisolasi dari kopi dengan metode *roasting* dan *non roasting*.
3. Asam klorogenat hanya dapat diisolasi dari kopi *non roasting*.
4. Uji sitotoksik dengan metode *A. Salina* diketahui bahwa senyawa kafein dan asam klorogenat memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai
5. Nilai EC₅₀ untuk kafein diperoleh sebesar 21,41 ppm dan untuk asam klorogenat diperoleh nilai sebesar 5,86 ppm, dengan demikian asam klorogenat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kafein

Keterbatasan Penelitian:

Perlu dilakukan uji lanjutan untuk mencari nilai LC50 asam klorogenat dan kafein.

DAFTAR PUSTAKA

1. Villanueva, Cristina M, Cantor, Kenneth P, King, Will D, et al. Total and specific international journal of cancer. 2006 Apr 15;118(8):2040-47. Melalui: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
2. Kummer, Corby. Caffeine and Decaf. Dalam: The Joy of Coffee. New York: Houghton Mifflin; 2003.hlm.160-65.
3. Johnston K L, Clifford M N, Morgan L M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in human. Dalam: Glycemic effect of chlorogenic acid and caffeine. Am J Clin Nutr. 2003 Oct;78(4):728-33.Melalui: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
4. Daglia M, Rachi M, Papetti A, Lanni C, Govoni S, Gazzani G. In vitro and ex-vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. J Agric Food Chem. 2000;48(5):1449-54. Melalui: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
5. Bernardi A, Lopez-Alarcon C, Aspee A, Rech S, Lissp E. Antioxidant activity of flavonoids isolated from hypericum ternum. J. Chil Chem. 2007;52(4):1326-32. Melalui: <http://www.scielo.cl/scielo>
6. Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J Agric Food Chem. 1995;43:27-32.
7. Mackeen MM, Ali AM, Lajis NH, Kawazu K, Hassan Z, Amran M, Habsah M, Mooi LY, Mohamed SM. Antimicrobial, antioxidant, antitumorand cytotoxic activities of different plantpart extracts of Garcinia atroviridis Griff. Ex T. Anders. J Ethnopharmacol. 2000 Oct;72(3):395-402. Melalui: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
8. Fumara F, Garchitorea M. Artemia salina. Recoleccion, descapsulattion y desarrolo. Revista Auamar. 1996;4(3): 22-4.
9. Harborne J B. Metode Fitokimia: penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. Ed. II. Diterjemahkan oleh Padmawinata K, Sudiro I. Institut Teknologi Bandung. Bandung. 1978.hlm. 3-15.
10. Cordell G A. Introduction to alkaloid a biogenetic approach. New York: John Willey and Sons; 1982.hlm. 890-907.
11. Castillo M D, Ames J M, Gordon MH. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. J Agric Food Chem.2002;50(13): 3698-703. Melalui: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
12. Babajide O O, Babajide O O, Daramola A O, Mabusela W T. Flavonols and an oxychromonol from Piliostigma reticulatum. Phytochemistry. 2008 Aug;69(11):2245-50. Melalui: [http:// www.sciencedirect.com/science](http://www.sciencedirect.com/science)
13. Brand Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology. 1995 Jan; 28(1):25-30.Melalui: <http://www.sciencedirect.com/science>
14. Molyneux. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2004;26(2): 211-219.
15. Yen, G.C. dan H.Y. Chen. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. J. Agric. Food. Chem. 1995.hlm.27-32.
16. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putmann, J.E., Jacobson, L.B., Nichols, D.E., & McLaughlin, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.Planta Med. 1982;45: 31-34.

Research Article

17. Verma, R dan Kumar, L. Characterization of caffeine isolated from *Camellia sinensis* leaves of Sikkim Himalayan region. *L. Chem. Pharm.* 2010;2(4):194-198.
18. Shoeb, M., Jaspars, M., MacManus, S.M., Celik, S., Hanar, L., Kong-Thoo-Lin, P., dan Sarker, S.D. Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae). *J. Mat. Med.* 2007;61:164-169.