

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Eksperimen bersifat uji coba menggunakan ekstrak etanol 96% dari daun kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner) asal Lampung Barat. Variabel bebasnya adalah variasi konsentrasi ekstrak daun kopi robusta, yaitu 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, dan 50%, dengan kontrol positif (Ciprofloxacin). Variabel terikat meliputi identifikasi senyawa metabolit sekunder dan pengujian menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

Identifikasi aktivitas menghambat dilakukan memakai prosedur difusi cakram (Kirby-Bauer) dengan mengukur zona hambat yang terbentuk. Setiap perlakuan sesuai rumus Federer (Hanafiah, 1997:6).

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(10-1)(n-1) \geq 15$$

$$9(n-1) \geq 15$$

$$9n - 9 \geq 15$$

$$9n \geq 15 + 9$$

$$n \geq 2,67$$

Keterangan

t = Jumlah perlakuan

n = Jumlah pengulangan

15 = Tetapan yang telah di tentukan

B. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan ekstrak daun kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner) yang berasal dari Kenali, Kecamatan Belalau, Kabupaten Lampung Barat, Provinsi Lampung. Ekstraksi dilakukan dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi pada variasi konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, dan 50%

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Eksperimen pada Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang. Identifikasi senyawa metabolit sekunder, uji aktivitas hambat bakteri *Streptococcus mutans* dilaksanakan pada Januari – Mei 2025.

D. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa, inkubator, batang pengaduk, hot plate, beaker glass (100ml), oven, spidol, cover glass, cawan petridish, tabung reaksi, autoclaf, jangka sorong digital, beaker glass (500 ml), pipet volume pipet tetes 1 ml dan 2 ml, lampu spiritus, blender, toples kaca, corong glass (75mm), spatula, ose, kaca arloji, labu ukur (10ml), waterbath, rotary evaporator, pinset, neraca analitik, gelas ukur (100ml), cawan porselen, dan erlenmeyer (100ml dan 250ml).

b. Bahan :

Penelitian ini menggunakan bahan berupa 1ml HCl (P), aquadest, 1ml FeCl₃, 1ml pereaksi Meyer, Ekstrak daun kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner), 2ml HCl 2N, 1ml pereaksi Bouchardat, 0,16 gram Nutrient Broth (NB), 1 ml asam asetat anhidrat, 20 disk kosong, 2ml alkohol, 5 disk ciprofloxacin 5 µg, kertas saring, 1 gram Nutrient Agar (NA), 1ml pereaksi Dragendorff, 10,2 gram Muller Hinton Agar (MHA), 20 ml N-Heksan, 1ml BaCl₂ 1%, kapas steril, aluminium foil, 50ml NaCl 0,9% steril, 5 liter etanol 96%, 10ml H₂SO₄ 1%, dan 1ml H₂SO₄ (P), 100 mg serbuk Mg.

2. Prosedur Kerja Penelitian

- a. Daun kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner) telah diidentifikasi di laboratorium botani
- b. Pembuatan Simplicia di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang Diambil daun kopi Robusta sebanyak 1 kg kemudian sampel dipilih dengan kondisi daun yang baik yaitu daun muda yang berwarna hijau dan segar, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan.

Setelah dicuci bersih selanjutnya dilakukan perajangan. Setelah dirajang, daun kopi Robusta dikeringkan memakai oven suhu 50°C. Selanjutnya haluskan simplisia dengan blender. Terakhir serbuk simplisia disaring menggunakan ayakan mesh no.40 untuk mendapatkan bubuk simplisia yang halus. Masukkan kedalam wadah toples kaca lalu tutup.

c. Pembuatan Ekstrak daun kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner) di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang.

1. Dimasukkan simplisia kedalam botol gelap sebanyak 500 gram, ditambahkan etanol 96% 3.500ml. Campuran tersebut didiamkan selama 3 hari sambil diaduk 2-3 kali, di tempat terlindung dari cahaya, Setelah itu, maserat dipisahkan dari residu menggunakan kertas saring.
2. Residu hasil penyaringan direndam kembali dalam 3.500 mL etanol 96%, diaduk, lalu didiamkan selama 3 hari. Proses penyaringan kembali dilakukan untuk memperoleh filtrat kedua.
3. Diuap kan menggunakan alat rotary evaporator penggabungan maserat pertama dan kedua sehingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak ini kemudian dipanaskan di atas hotplate untuk menghilangkan sisa pelarut. Setelah menjadi kental, ekstrak disimpan dalam wadah kaca yang bersih, kering, dan steril. Langkah selanjutnya adalah melakukan pengenceran ekstrak hingga diperoleh 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, dan 50%.

Rumus pengenceran berikut :

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

Keterangan :

V1 = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

N1 = Konsentrasi larutan uji (100%)

V2 = Volume larutan uji yang diinginkan (ml)

N2 = Konsentrasi larutan yang akan dibuat (%)

d. Identifikasi Organoleptis

Dengan pengenalan menggunakan panca indera, uji organoleptik ekstrak daun kopi Robusta mengidentifikasi warna (Tidak berwarna, hijau lemah , hijau kuat, dan sebagainya), bentuk (padat, kental, cair, dan sebagainya), dan aroma (Tidak beraroma, aroma daun kopi lemah, aroma daun kopi kuat, dan sebagainya).

e. Skrining Fitokimia

Identifikasi menentukan bioaktiv ekstrak daun kopi robusta yang diperkirakan berperan dalam aktivitas antibakteri. Prosedur uji fitokimia meliputi beberapa tahapan sebagai berikut

1) Uji Alkaloid

Menimbang sebanyak 0,5 gram, lalu campur 9 ml akuades dan 1 ml larutan asam klorida (HCl) 2N. Campuran dipanaskan melalui *hot plate* selama kurang lebih dua menit untuk membantu pelarutan senyawa aktif. Setelah proses pemanasan, larutan didinginkan hingga mencapai suhu ruang, lalu disaring untuk memperoleh filtrat jernih. Filtrat inilah yang selanjutnya digunakan dalam pengujian identifikasi senyawa alkaloid menggunakan tiga jenis pereaksi spesifik.

- a. Dengan memperbanyak 2 tetes pereaksi Mayer pada 3 tetes filtrat, terbentuk endapan putih atau kekuningan sebagai indikasi alkaloid.
- b. Terbentuk endapan coklat tua, dengan pereaksi Bouchardat.
- c. Terbentuk endapan berwarna merah bata dengan pereaksi Dragendorff

Jika minimal dua dari tiga uji menunjukkan pembentukan endapan, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak mengandung alkaloid.

2). Uji Flavonoid

Menimbang 5 gram ekstrak campur 50 ml air panas, lalu dididihkan selama lima menit dan disaring selagi panas. Filtrat sebanyak 5 ml kemudian dicampur dengan 0,1 gram serbuk magnesium, 1 ml HCl pekat, dan 2 ml amil alkohol. Setelah dikocok, campuran didiamkan untuk memisahkan lapisan. Adanya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid

3). Uji Saponin

Menimbang 0,5 gram ekstrak dicampur 10 ml akuades panas. Campuran didinginkan mencapai suhu ruang. Setelah itu, campuran dikocok secara

intens selama sekitar 10 detik untuk memungkinkan pembentukan buih. Indikasi positif keberadaan senyawa saponin dinyatakan dengan tewujudnya busa atau buih yang mencapai ketinggian antara 1 hingga 10 cm dan mampu bertahan minimal selama 10 menit. Untuk memastikan spesifisitas reaksi, ditambahkan satu tetes (HCl) 2N. Jika buih stabil setelah penambahan asam, maka hasil pengujian dikonfirmasi positif mengandung senyawa saponin.

4). Uji Steroid / Terpenoid

Menimbang sebanyak 1 gram ekstrak dimaserasi menggunakan 20 ml pelarut n-heksana selama dua jam untuk mengekstraksi senyawa non-polar. Sesudah proses maserasi selesai, campuran disaring guna memisahkan residu padat dari larutan, lalu filtrat diuapkan hingga kering. Sisa hasil penguapan kemudian ditetesi dengan 1 tetes asam sulfat pekat dan 2 tetes asam asetat anhidrat. Reaksi terhadap senyawa ditandai adanya perubahan warna menjadi ungu atau merah, sementara munculnya warna biru kehijauan mengindikasikan keberadaan senyawa terpenoid.

5). Uji Fenol

Menimbang Ekstrak 0,5 gram dicampur 10 ml akuades diaduk perlahan, lalu filter dan diencerkan hingga tidak berwarna. Sebanyak 2 ml filtrat ditetesi 1–2 tetes larutan FeCl_3 . Munculnya warna hijau, merah keunguan, atau hitam pekat menandakan reaksi positif terhadap senyawa fenol

6). Uji Fenolik

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditimbang dan diekstraksi menggunakan 10 ml akuades, kemudian disaring untuk memperoleh filtrat jernih. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diencerkan dengan akuades hingga tidak berwarna atau tampak bening. Sebanyak 2 ml larutan hasil pengenceran tersebut kemudian direaksikan dengan 1 hingga 2 tetes larutan besi (III) klorida (FeCl_3). Munculnya perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru mengindikasikan hasil positif terhadap keberadaan senyawa fenolik, terutama golongan fenolik.

F. Prosedur Pembuatan Media dan Pengujian Antibakteri Ekstrak Daun Kopi Robusta seluruh proses dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan prosedur kerja semua proses sterilisasi menggunakan autoclave 121°C selama 30mnt dan Oven 160°C selama 2 jam sebagai berikut :

- 1.) Pembuatan media Mueller Hinton Agar (MHA) dalam erlenmeyer dimasukkan sebanyak 10,2 gram MHA yang dilarutkan dalam 300 ml akuades, lalu dipanaskan hingga larut sempurna. Media kemudian ditutup dan disterilkan dengan Setelah media mencapai suhu 45–50°C, larutan tersebut dimasukkan ke dalam cawan Petri yang telah disterilkan, kemudian dibiarkan hingga mengeras.
- 2.) Pembuatan Nutrient Agar (NA) sebanyak 1 gram Nutrient Agar (NA) ditimbang dan dilarutkan pada 50 ml air suling dalam beaker glass. Larutan itu kemudian dipanaskan di atas hot plate hingga seluruh serbuk media terlarut sempurna. Setelah mencapai homogenitas, larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang telah ditutup dengan kapas dan aluminium foil, lalu disterilisasi. Setelah proses sterilisasi selesai, media didinginkan hingga mencapai suhu antara 40°C hingga 45°C sebelum digunakan untuk proses inokulasi atau pembuatan kultur bakteri.
- 3.) Pembuatan Nutrient Broth (NB) sebanyak 0,4 gram Nutrient Broth (NB) ditimbang secara tepat, dicampur 50 ml akuades di dalam gelas kimia, melalui pemanasan sampai homogen untuk memastikan seluruh media terlarut sempurna. Selanjutnya, larutan tersebut dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang telah ditutup menggunakan kapas dan dibungkus aluminium foil, kemudian disterilisasi. Setelah proses sterilisasi selesai, media dibiarkan hingga mendingin dan mencapai suhu sekitar 40°C–45°C. Media ini selanjutnya digunakan sebagai medium cair untuk pemeliharaan serta peremajaan kultur bakteri sebelum dilakukan proses pengujian lebih lanjut.
- 4.) Pembuatan Standar Mc Farland 0,5
Larutan 0,05 ml larutan BaCl₂ 1% membuat Standar McFarland digunakan sebagai patokan tingkat kekeruhan pada suspensi bakteri. Dengan mencampurkan 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1%, lalu diaduk sampai tercampur secara homogen
- 5.) Pembuatan Suspensi Bakteri
Dua mata ose bakteri *Streptococcus mutans* digunakan dari kultur NA miring dan diinokulasikan ke dalam 5ml NB. Kultur diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Kekeruhan suspensi disesuaikan dengan standar McFarland

G. Pengujian Ekstrak daun kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner)
 Pada Pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan prosedur kerja sebagai berikut :

1. Seluruh alat dipakai disterilkan
2. Persiapan Disk Ciprofloxacin (Kontrol Positif)
 Disk ciprofloxacin digunakan sebagai kontrol pembanding terhadap aktivitas antibakteri ekstrak
3. Bakteri *Streptococcus mutans* ditanam pada NA miring menggunakan jarum ose steril dan diinkubasi satu hari pada suhu tubuh.
4. Pembuatan Suspensi Bakteri
 Biakan bakteri dari NA disuspensikan dalam 5 ml NB, kemudian disesuaikan kekeruhannya hingga setara dengan standar McFarland 0,5.
5. Beberapa plate media diuji sterilitasnya dengan inkubasi 37°C selama 48 jam. Jika ditemukan pertumbuhan koloni, media dianggap tidak steril (Soemarno, 2000).
6. Suspensi bakteri dioleskan (streak) menggunakan lidi kapas steril secara merata pada permukaan MHA yang telah dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Media dibiarkan selama 5 menit agar suspensi menyerap sempurna
7. Pelaksanaan Uji Daya Hambat
 - a) Disk steril direndam pada larutan ekstrak, kontrol positif (ciprofloxacin), dan kontrol negatif (aquadest) masing-masing 15 menit. Disk kemudian diletakkan di atas MHA menggunakan pinset steril dengan jarak antar disk sekitar 15 mm
 - b) Diinkubasi Cawan petri pada suhu 37°C selama tiga hari. Setelah inkubasi, terbentuk zona di sekitar disk mengukur diameternya memakai jangka sorong.
 - c) Pengukuran diameter zona hambat dianalisis untuk menentukan tingkat efektivitas antibakteri dari ekstrak daun kopi robusta pada pertumbuhan *Streptococcus mutans*, sesuai dengan kriteria yang tercantum dalam tabel 3.1

Tabel 3. 1 Karagori Diameter Daya Hambat (Davis & Stout, 1971)

Diameter Zona Hambat	Katagori Zona Hambat
<5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat Kuat

E. Pengelolaan dan Analisis data

1. Pengelolaan Data

Menurut Notoatmodjo (2012), pengelolaan dan identifikasi data tahapan penting menyusun, menyederhanakan, dan menginterpretasikan data agar dapat ditarik kesimpulan yang valid. Dalam penelitian ini, proses pengolahan data dilakukan melalui beberapa tahapan sistematis sebagai berikut:

a. Pengumpulan Data

Data dikumpulkan melalui serangkaian uji laboratorium yang bertujuan untuk mengevaluasi daya hambat antibakteri dari ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Uji dilakukan dengan menggunakan beberapa variasi, yakni 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, dan 40%. Setiap konsentrasi diuji untuk mengamati pengaruh dosis terhadap efektivitas antibakteri.

b. Pengukuran Diameter Zona Hambat

Setelah proses inkubasi selesai, pengamatan diameter zona hambat dilakukan secara cermat dengan memakai alat jangka sorong pada satuan milimeter (mm). Pengukuran ini bertujuan untuk mengetahui sejauh mana ekstrak pada masing-masing konsentrasi mampu menghambat pertumbuhan koloni bakteri target.

c. Penyajian Data

Data hasil pengukuran zona hambat pada setiap konsentrasi ekstrak diatur secara terstruktur dan dipresentasikan dalam bentuk tabel agar memudahkan dalam membaca, membandingkan, dan menganalisis perbedaan efek dari setiap variasi perlakuan. Penyajian ini menjadi dasar dalam proses analisis statistik

untuk mengidentifikasi hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan tingkat efektivitas antibakterinya

2. Analisis Data

Diperoleh zona hambat dianalisis secara statistik memakai uji One Way ANOVA. Identifikasi ini bertujuan mengetahui beda nyata yang terlihat secara statistik antar variasi konsentrasi yang diuji. Hasil memperlihatkan nilai p-value sebesar 0,000, terdapat beda nyata dari batas signifikansi 0,05. Dari hasil diameter zona hambat menyatakan terdapat beda yang nyata konsentrasi ekstrak. Berdasarkan temuan ini, dilanjutkan analisis dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) guna mengidentifikasi secara lebih spesifik kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan signifikan. Uji BNT memakai persentase kepercayaan sebesar 95% dan kesalahan 5%, sehingga memungkinkan interpretasi yang lebih akurat terhadap efek variasi konsentrasi ekstrak terhadap aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*.