

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari hingga Juli 2021. Diawali dengan persiapan pengambilan sampel kopi robusta di desa Manggarai, kecamatan Air Hitam, kabupaten Lampung Barat. Kemudian dilakukan proses ekstraksi dan uji fitokimia yang dilaksanakan di laboratorium kimia Universitas Lampung dan pembuatan sediaan ekstrak dilaksanakan di laboratorium terpadu Universitas Lampung. Setelah sediaan ekstrak berhasil dibuat, maka dilaksanakan uji zona hambat ekstrak kopi robusta dan uji zona hambat sediaan *gel peel off* dilaksanakan di laboratorium Institut Teknologi Sumatera. Dilanjutkan dengan uji GC-MS yang dilakukan di laboratorium pusat penelitian kimia LIPI, Tangerang Selatan.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan antara lain erlenmeyer (PYREX), gelas ukur (PYREX), gelas kimia (PYREX), tabung reaksi (IWAKI), spektrofotometer (Thermo scientific), gelas ukur, vortex (Ohaus), mikropipet (Thermo scientific), laminar airflow (Thermo scientific), autoklaf (tomy), neraca analitik (Metler Toledo), jarum ose, rak tabung reaksi, pipet tetes, GC-MS, hot plate (Ika C-MAG HS 10), *rotary vacuum evaporato*, sedotan, labu ekstraksi, batang pengaduk, cawan petri (IWAKI), pinset, inkubator (Mettler IN30) dan alat fotografi.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu biji kopi robusta, bakteri uji, akuades steril, etanol 96%, tetrasiklin, media MHA, media MSA, kertas saring, HPMC, nipagin, nipasol, Polivinil alcohol (PVA), kertas label dan aluminium foil.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Biji kopi Robusta yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari perkebunan kopi Robusta di Desa Mangarai Kabupaten Lampung Barat..Biji kopi yang terkumpul dibersihkan lalu dicuci dengan air mengalir hingga bersih, tiriskan dan keringkan dengan cara diangin-anginkan. Biji kopi robusta yang telah dihaluskan sebanyak 850 gram dimaserasi dengan cara direndam pada tabung maserator yang berisi 2 liter etanol 96%. Keuntungan metode maserasi ini yaitu sederhana, mudah, dan biaya yang murah. Kekurangan metode maserasi ini adalah membutuhkan waktu yang lama dalam ekstraksi (Maleta, 2018). Namun di sisi lain, cara perendaman dapat menghindari kerusakan senyawa termolabil (Mukhriani, 2014).

Selanjutnya larutan dihomogenkan dengan pengaduk dan didiamkan 24 jam, kemudian ekstrak yang telah diperoleh selanjutnya disaring dengan corong *Buchner* menggunakan vakum dan filtrat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* hingga didapatkan ekstrak pekat. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia FMIPA, Universitas Lampung. Selanjutnya dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui metabolit sekunder yang ada pada biji kopi robusta.

Menurut Mukhriani (2014), ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sampel. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama. Tujuan ekstraksi yaitu untuk menarik dan memisahkan senyawa yang mempunyai kelarutan yang berbeda dalam berbagai pelarut komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam dengan menggunakan pelarut organik tertentu. Proses ekstraksi ini didasarkan

pada kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel secara osmosis yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara di dalam dan di luar sel, mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif keluar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif didalam dan diluar sel (Dirjen POM, 2000).

3.3.2. Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan dengan menggunakan pereaksi pendekteksi golongan pada tabung reaksi. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi:

1. Uji Saponin

Disiapkan ekstrak kopi robusta sebanyak 0,5 mL, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan aquades sebanyak 5 mL lalu dikocok selama 30 detik. Perubahan yang terjadi terhadap terbentuknya busa diamati, maka hasil uji saponin menunjukkan reaksi positif.

2 . Uji Steroid

Disiapkan ekstrak kopi robusta sebanyak 0,5 mL, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan asam asetat glacial sebanyak 0,5 mL dan H_2SO_4 sebanyak 0,5 mL. Perubahan warna sampel yang akan terjadi yaitu menjadi warna biru atau ungu, maka hasil uji steroid menunjukkan reaksi positif.

3. Uji Terpenoid

Disiapkan ekstrak kopi robusta sebanyak 0,5 mL, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan asam asetat glacial sebanyak 0,5 mL dan H_2SO_4 sebanyak 0,5 mL. Perubahan warna sampel yang akan terjadi yaitu menjadi warna merah atau kuning, maka hasil uji terpenoid menunjukkan reaksi positif.

4. Uji Tanin

Disiapkan ekstrak kopi robusta sebanyak 1 mL, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 tetes larutan $FeCl_3$ 10%. Perubahan warna sampel yang akan terjadi yaitu terlihat larutan hitam kebiruan, maka hasil uji tanin menunjukkan reaksi positif.

5. Uji Alkaloid

Disiapkan ekstrak kopi robusta sebanyak 0,5 mL, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 tetes kloroform dan 5 tetes pereaksi Mayer (dari 1 g KI dilarutkan dalam 20 ml aquades, ditambahkan 0,271g HgCl₂ hingga larut). Perubahan warna sampel yang akan terjadi yaitu terlihat larutan putih kecoklatan seperti endapan, maka hasil uji alkaloid menunjukkan reaksi positif.

6. Uji Flavonoid

Disiapkan ekstrak kopi robusta sebanyak 0,5 mL (dari 0,5 g serbuk Mg), kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 ml HCl tetes demi setetes. Perubahan warna sampel yang akan terjadi yaitu warna menjadi merah atau kuning dan terdapat busa, maka hasil uji tanin menunjukkan reaksi positif.

3.3.3. Peremajaan Kultur Isolat

S. aureus dan *P. acnes* diangkat dengan jarum ose steril digores pada media agar *Natrium Agar* lalu diinkubasi selama 24 jam dilanjutkan dengan menkonfirmasi isolat dengan melakukan peremajaan kembali menggunakan media MSA dengan cara digores. Kemudian diinkubasi di inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam (Apriani, 2014).

3.3.4. Pembuatan Media

3.3.4.1 Media Nutrient Agar (NA)

Komposisi yang terdapat pada Natrium Agar adalah sebagai berikut; Peptone 5 g, meat extract 2 g, agar agar 12 g, distilled water ad 1000 ml, pH : 7,0 ± 0,2 pada suhu 25°C. Cara pembuatan: Sebanyak 20 g serbuk NA dilarutkan dalam air suling hingga 1 liter dengan bantuan pemanasan sampai semua bahan larut sempurna. Disterilkan media NA dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Merck, 2005).

3.3.4.2 Media Muller Hinton Agar (MHA)

Komposisi yang ada pada *Muller Hinton Agar* adalah; Acid casein peptone 17,5 g, Beef Infusion 2 g, Starch 1.5 g, Bacteriological agar, 17 g, Distilled water ad

1000 ml, pH : $7,4 \pm 0,2$ pada suhu 25°C . Cara pembuatan: Sebanyak 38 g serbuk MHA dilarutkan dalam air suling hingga 1 liter dengan bantuan pemanasan sampai semua bahan larut sempurna. Disterilkan media MHA dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Catherine, 2018)

3.3.5 Pembuatan larutan standar kekeruhan McFarland

Standar McFarland adalah larutan yang terbuat dari 9,95 mL H_2SO_4 1% dan 0,05 mL BaCl_2 1% (Konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Ketika tabung yang berisi larutan standar kekeruhan McFarland digoyangkan dan larutan memiliki tingkat kekeruhan yang sama dengan inokulum bakteri (McFarland, 1907).

3.3.6 Uji Zona Hambat

Amati setelah 24 jam inkubasi. Daerah bening adalah petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan mistar berskala dengan cara diameter keseluruhan dikurangi diameter sumuran 7 mm. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya. (Wardani, 2020). Dalam pengukuran zona hambat ini digunakan media MHA dan bakteri dimasukkan dalam media dengan menginokulasikan bakteri uji ke dalam media. Pertama inokulasikan bakteri uji dengan teknik spread plate, lalu buat sumuran dengan diameter 7 mm menggunakan sedotan, dan masukan antibakteri sebanyak $100 \mu\text{m}$, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C .

3.3.7 Pembuatan Masker Gel Peel Off

Pembuatan masker gel peel off dilakukan dengan menimbang PVA dan HPMC terlebih dahulu. Kedua senyawa ini dilarutkan pada air hangat di wadah berbeda. Kemudian larutkan nipagin dan ekstrak pada wadah yang berbeda, gabungkan semua bahan dan ditambahkan nipasol lalu homogenkan hingga merata. Formulasi bahan sediaan masker gel peel off adalah: konsentrasi formulasi ekstrak kopi robusta antara lain adalah 6%, Polivinil alkohol 10%, HPMC 2%, Nipasol 15%, Nipagin 0,2%, Air

100 ml. (Tanauma, 2016)

3.3.8 Uji Kandungan Antibakteri Ekstrak Kopi Robusta (Uji GC-MS)

Uji ini dilakukan di laboratorium Pusat Penelitian Kimia LIPI, Tangerang Selatan. Menggunakan alat GCMS untuk mengetahui kandungan dari ekstrak kopi. GC-MS (*Gas Chromatography and Mass Spectrometry*) adalah alat untuk menganalisis senyawa dalam sampel. Kromatografi adalah salah satu metode pemisahan bahan kimia terpenting. Senyawa dalam campuran dipisahkan pada kolom kromatografi. Analisis komponen ekstrak kopi robusta menggunakan *gas chromatography–mass spectrometry* (GC-MS) dengan fase diam kolom db5ms dan fase gerak gas helium (Lamona, 2018)

Diagram Alir Penelitian