# BAB III

# METODE PENELITIAN

## 3.1 Rancangan Penelitian

## 3.1.1 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat, yaitu: variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun kopi *(Coffea Arabica* L*. ),* dan variabel terikat adalah mutu sediaan sabun cair dan aktivitas antibakteri (*Staphylococcus aureus*)

## 3.1.2 Parameter Penelitian

Metabolit sekunder (alkaloid, flavonoid, saponin, tanin), Uji stabilitas (Ph, homogenitas, viskositas, uji daya busa), karakteristik (Makroskopik, penetapan kadar air, penetapan kadar sari dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu yang tidak larut asam)

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

## 3.2.1 Jadwal Penelitian

Dilakukan pada bulan Januari 2023 sampai bulan Agustus 2023

## 3.2.2 Lokasi Penelitian

Dilakukan di Laboratorium terpadu Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-washliyah Medan

## 3.3 Bahan

Ekstak etanol Daun Kopi, Kaliun Hidroksida (KOH), Hydroxypropyl methyl Celulosa (HPMC), Sodium Lauryl Sulfate (SLS), Asam Stearat, Butyl Hidroksi toluene (BHT), Virgin coconut oil (VCO), Pengaroma, Etanol, Gliserin, Aquadest, Muller Hiton Agar (MHA), Manniton Salt Agar (MSA), NaCl,

Toluene, Etanol 96%, Bakteri *staphylococcus aureus.*

## 3.4 Peralatan

Blender, timbangan digital, gelas ukur, Erlenmeyer, beker glas, cawan penguap, batang pengaduk, ph meter, rotary, Bunsen, cawan petri, ose, tabung reaksi, autoklaf, inkubator, waterbath, cawan krus tertutup, vortex, rak tabung reaksi, tanur, kertas saring, desikator, hot plate, porselin, lampu Bunsen.

## 3.5 Prosedur Penelitian Dan Pengumpulan Data

## 3.5.1 Pengumpulan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun kopi yang masih segar, metode pengambilan sampel dilakukan secara Purposif, yaitu mengambil tanaman dengan sengaja dari suatu tempat tanpa membandingkan dengan hasil dari daerah lain.

## 3.5.2 Pengolahan Sampel

Daun kopi yang masih segar, diambil dan dipisahkan dari bahan asing yang melekat, kemudian dicuci dengan air mengalir sampai bersih. Setelah itu, dikeringkan. Setelah diukur, dipotong menjadi bagian-bagian kecil dan kemudian dikeringkan menggunakan lemari pengering pada suhu 40-50̊ C selama 5 hari hingga menjadi simplisia yang kering. Setelah itu, dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. kemudian diayak untuk mendapatkan simplisia yang lebih halus dan seragam (Depkes RI,1985).

## 3.5.3 Tumbuhan

Identifikasi sampel dilakukan di Herbarium MEDA departemen biologi FMIPA USU, Medan

## 3.6 Pemeriksaan karakterisasi simplisia

## 3.6.1 Pemeriksaan makroskopik

### Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan mengamati bentuk, ukuran, warna, bau dan rasa dari simplisia daun kopi arabika *( Coffea arabica* L*.)* (Kemenkes RI, 2017).

## 3.6.2 Penetapan Kadar Air

1. Penjenuhan Toluene

Sebanyak 200 ml toluene dimasukkan ke dalam labu alas bulat, lalu ditambahkan 2 ml air suling, kemudian alat dipasang dan dilakukan destilasi selama 2 jam sampai tetesan air habis. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 ml, dan diperoleh toluene jenuh.

1. Penetapan Kadar Air Simplisia

Ke dalam labu yang berisi toluene yang telah di jenuhkan dimasukkan 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang, lalu dipanaskan selama 15 menit, setelah toluene mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, lalu kecepatan destilasidinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluene. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluene memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 ml, selisih kedua volume air yang terdapat bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung salam persen (Depkes RI, 1979).

## 3.6.3 Penetapan Kadar Sari Yang Larut Dalam Air

Sebanyak 5 g serbuk yang telah dikeringkan di udara, dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml air-kloroform (2,5 ml kloroform dalam air suling sampai 1 liter) dalam labu bersumbat sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 8 jam, lalu disaring. Sejumlah 20 ml filtrat pertama diuapkan sampai kering dalam cawan penguap, sisa dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1979)

## 3.6.4 Penetapan Kadar Sari Yang Larut Dalam Etanol

Sebanyak 5 g serbuk simplisia yang telah dikeringkan di udara dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml etanol 96% dalam labu tersumbat sambil dikocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Lalu disaring, 20 ml filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan penguap berdasarkan rata yang telah ditara dan dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 95% dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1979)

**3.6.5 Penetapan Kadar Abu Total**

Sebanyak 2 g serbuk yang telah digerus ditimbang, dimasukkan kedalam krus porselin yang telah dipijar dan ditara, kemudian diratakan. Krus dipijarkan perlahan – lahan hingga arang abis, pemijaran dilakukan pada suhu 500-600°C selama 3 jam kemudian didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1979)

## 3.6.6 Penetapan Kadar Abu Yang Tidak Larut Dalam Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 ml asam klorida encer selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas, residu dengan kertas saring dipijarkan sampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1979)

**3.7 Uji Skrining Fitokimia**

1 . Uji Alkaloid

Serbuk simplisia 0,5 gram dicampur dengan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air yang telah dihasilkan dari proses penyulingan. Campuran ini dipanaskan di atas penangas air selama 5 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Larutan hasil penyaringan ini akan digunakan untuk pengujian berikut:

A. Sejumlah 1 ml larutan ini dicampurkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer. Jika reaksi menghasilkan endapan yang berwarna putih atau bening yang membentuk gumpalan, maka hasil reaksi ini dianggap positif.

1. Sebanyak 1 ml larutan dicampurkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat. Reaksi dianggap positif jika larutan menghasilkan endapan yang berwarna coklat hingga hitam.
2. Larutan sebanyak 1 ml dicampurkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendroff. Jika hasil reaksi menunjukkan terbentuknya warna jingga, maka hasil reaksi ini dianggap positif.

 2. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram simplisia dicampur dengan 10 ml air panas. Campuran ini dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit, setelah itu disaring dalam keadaan masih panas. Dalam 5 ml larutan hasil penyaringan ini, ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium, 1 ml asam klorida pekat, dan 2 ml amil alkohol. Larutan ini kemudian dikocok dan dibiarkan untuk memisah. Keberadaan flavonoid dapat diketahui dengan melihat perubahan warna pada amil alkohol setelah ditambahkan larutan. Jika flavonoid hadir, maka amil alkohol akan berubah menjadi warna merah, kuning, atau jingga (Depkes RI, 1989).

3. Uji Saponin

Sejumlah 0,5 gram simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan 10 mL air suling yang telah dipanaskan sebelumnya. Setelah proses pemberian air, campuran ini didinginkan dan kemudian dikocok secara energik selama 10 detik. Akibat pengocokan ini, akan terbentuk busa yang kental dan bertahan selama minimal 10 menit, dengan tinggi busa mencapai 1-10 cm. Kemudian, diteteskan 1 tetes larutan asam klorida 2N ke dalam campuran ini. Jika buih tidak menghilang setelah penambahan asam klorida, hal ini menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1989).

4. Uji Tanin

Sejumlah 0,5 gram simplisia dicampur dengan 10 ml air suling. Campuran ini kemudian disaring. Filtrat hasil penyaringan ini diencerkan dengan penambahan air hingga tidak memiliki warna yang khas. Dari larutan ini, diambil 2 ml dan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi FeCl3 1%. Jika terjadi perubahan warna menjadi biru atau hijau kehitaman, ini menunjukkan adanya kandungan tanin (Depkes RI, 1989)

## 3.8 Pembuatan Ekstak etanol daun kopi

Ekstrak Etanol daun kopi dilakukan dengan cara maserasi. Masukkan 10 bagian simplisia atau campuran simplisia dengan derajaat halus yang cocok ke dalam sebuah bejana. Tuangi dengan 75 bagian (3750 ml) cairan penyari etanol. Tutup, Dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, serkai , peras, cuci ampas dengan cairan penyari seckupnya sehingga diperoleh 100 bagian (5000 ml) maserat. Dipindahkan kedalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk terlindung dari cahaya selama 2 hari kemudian dienap tuangkan atau disaring. Maserat lalu dipekatkan dengan alat rotary evaporator lalu ditimbang ( Depkes RI, 1979)

## 3.9 Sterilisasi Alat

Alat-alat dan bahan untuk pengujian harus disterilkan dahulu seperti beaker glass, Erlenmeyer, tabung reaksi, dan cawan petri disterilkan dioven pada suhu 170°C selama 1-2 jam, alat atau bahan gelas dan tidak tahan terhadap pemanasan tinggi dalam jangka waktu lama seperti gelas ukur, media, pipet tetes disterilkan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan jarum ose disterilkan dengan cara dibakar pada lampu spiritus sampai pijar (Pamungkas & Yuniarti, 2022)

## 3.10 Pembuatan medium Mueller Hiton Agar (MHA)

# Pembuatan media MHA adalah dengan menimbang 38 g MHA dilarutkan ke dalam 1L aquades kemudian panaskan sampai mendidih. Larutan di Sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 C selama 25 menit , Setelah steril tunggu sampai suhu MHA turun menjadi 40 ° C lalu tuangkan MHA ke cawan Petri yang telah di Sterilkan (Nofita, 2021)

## 3.11 Pembuatan media Manniton Salt Agar (MSA)

# Sebanyak 5,5 g media MSA. Masukan ke dalam Erlenmayer 100 ml tambahkan aquades sebanyak 50 ml di panaskan di atas hotplate sambil di aduk hingga larut. Tutup lubang erlenmeyer tutup dengan kapas yang dibungkus dengan kain kasa dan erlenmeyer dibungkus lalu setelah mendidih di Sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 C selama 15 min larutan yang sudah steril dimasukkan 15 ml ke dalam cawan Petri, biarkan sampai padat (Suhartati et al., 2018)

## 3.12 Penyiapan bakteri uji

*Staphylococcus aureus* yang berasal dari biakan murni, masing masing diambil 1 ose lalu diinokulasi kan dengan cara digores pada medium maniton salt agar setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakkan bakteri diambil dengan jarum ose steril lalu di suspensi kan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9% sampai didapat kekeruhan suspensi bakteri yang sama dengan kekeruhan standar Mc.Farland 0,5 ini berarti konsentrasi suspensi bakteri adalah 108 CFU/ ml. Konsentrasi suspensi bakteri 108 CFU/ml yang di gunakan pada pengujian aktivitas antibakteri (Afni et al., 2015)

## 3.13 Formulasi Sabun Cair Ekstrak Daun Kopi Arabika

Tabel 3.1 Formulasi Sabun Cair Ekstrak Daun Kopi (Coffea Arabica Folium)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **No** | **Bahan**  | **F0** | **FI** | **FII** | **FIII** | **Fungsi** |
| 1 | Ekstrak daun kopi arabika  | 0 | 2,5 g | 5,0 g | 7,5 g | Bahan aktif |
| 2 | Virgin coconut oil (VCO) | 25 g | 25 g | 25 g | 25 g | Pelembut kulit |
| 3 | Kalium hidroksida (KOH) | 6,85 g | 6,85 g | 6,85 g | 6,85 g | Menetralisir asam  |
| 4 | Asam stearate | 5 g | 5 g | 5 g | 5 g | Menstabilkan busa, dan memberikan kekentalan pada sabun  |
| 5 | Sodium Lauryl Sulfate (SLS) | 5 g | 5 g | 5 g | 5 g | Penghasil busa |
| 6 | Gliserin | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | Pelembab kulit |
| 7 | Hydroxypropyl methyl Celulosa (HPMC) | 0,5 g | 0,5 g | 0,5 g | 0,5 g | Pengental dan Pengisi  |
| 8 | Butyl hidroksi toluene (BHT) | 0,05 g  | 0,05 | 0,05 | 0,05 | Antioksidan |
| 9 | Pengaroma  | 6 ml | 6 ml | 6 ml | 6 ml | Memberikan aroma  |
| 10 | Aquades | ad 100 ml | ad 100 ml | ad 100 ml | ad 100 ml | Pelarut |

##

## 3.14 Pembuatan Sabun Cair

Masukkan VCO sebanyak 25 ml kedalam beaker glass, kemudian menambahkan ekstrak daun kopi arabika sesuai konsentrasi diaduk sampai homogen. Ditambah KOH sedikit demi sedikit sambil dipanaskan pada suhu 50°C hingga mendapatkan dasar sabun. Kemudian, ditambahkan aquades (±25 ml), lalu masukkan HPMC yang sudah dikembangkan dengan aquadest dan aduk hingga homogen. Ditambahkan gliserin aduk sampai homogen. Selanjutnya menambahkan asam stearat aduk sampai homogen. Ditambahkan SLS aduk sampai homogen. Menambahkan BHT aduk hingga homogen, menambahkan pengharum aroma secukupnya kemudian menambahkan aquades sampai 100 ml di masukkan kedalam wadah bersih yang telah di siapkan. Pembuatan sabun cair ekstrak etanol daun kopi (*Coffea arabica* L*.*) Setelah itu dilakukan uji mutu sabun cair ekstrak etanol daun kopi (*Coffea arabica* L*.*) dengan uji viskositas , pH , tinggi busa dan homogenitas. (Pamungkas & Yuniarti, 2022)

## 3.15 Pengujian mutu fisik kimia sabun cair

## 3.15.1 Uji Stabilitas

## 3.15.1.1 Uji pH

Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Alat pH meter dikalibrasi setiap akan dilakukan pengukuran. Elektroda, yang telah dibersihkan, dicelupkan ke dalam sampel yang akan diperiksa. Nilai pH pada skala pH meter dibaca dan dicatat, dilakukuan sebanyak 6 sikus. ( Sari & Ferdinan, 2017)

## 3.15.1.2 Uji Daya Busa

Sampel ditimbang sebanyak 1 g, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan akuades sampai 10 ml, dikocok dengan membolak- balikkan tabung reaksi, lalu segera diukur tinggi busa yang dihasilkan. Lalu, tabung didiamkan selama 5 menit, kemudian diukur lagi tinggi busa yang dihasilkan setelah 5 menit. (Sari & Ferdinan, 2017)

## 3.15.1.3 Uji homogenitas

Uji homogenitas dikajukan dengan cara memindahkan sediaan di kaca objek untuk melihat adanya partikel atau butiran- butiran kasar, dilakukan 6 siklus. (Rusli, 2022)

## 3.15.1.4 Uji viskositas

Sampel dimasukkan ke dalam wadah kemudian spindle no 3 dimasukkan kedalamnya hingga tanda batas, motor dihidupkan, dibiarkan beberapa lama hingga skala menunjukkan angka yang stabil. Dengan kecepatan 60 rpm, silakukan sebanyak 6 siklus. (Muna et al., 2021)

## 3.16 Uji aktivitas antibakteri sabun cair ekstrak daun kopi

## 3.16.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Pada uji antibakteri perlakuan harus dalam keadaan steril, Alat-alat yang digunakan harus disteriliasasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Untuk alat seperti cawan petri dan tabung reaksi terlebih dahulu dibungkus menggunakan kertas selanjutnya disterilisasi menggunakan oven selama 15 menit. Sedangkan kawat ose disteriliasi dengan cara dibakar menggunakan api bunsen. Tujuan dari steriliasai adalah membunuh mikroganisme yang ada pada alat, karena dikhawatirkan akan menggangu proses penelitian. (Sari & Ferdinan, 2017)

## 3.16.2 Pembuatan medium Manniton Salt Agar (MSA)

# Sebanyak 5,5 g media MSA. Masukan ke dalam Erlenmayer 100 ml tambahkan aquades sebanyak 50 ml di panaskan di atas hotplate sambil di aduk hingga larut. Tutup lubang erlenmeyer tutup dengan kapas yang dibungkus dengan kain kasa dan erlenmeyer dibungkus lalu setelah mendidih di Sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 C selama 15 min larutan yang sudah steril dimasukkan 15 ml ke dalam cawan Petri, biarkan sampai padat (Suhartati, 2018)

## 3.16.3 Penyiapan Bakteri Uji

*Staphylococcus aureus* yang berasal dari biakan murni, masing masing diambil 1 ose lalu diinokulasi kan dengan cara digores pada manniton salt agar (MSA) setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakkan bakteri diambil dengan jarum ose steril lalu di suspensi kan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9% sampai didapat kekeruhan suspensi bakteri yang sama dengan kekeruhan standar Mc.Farland 0,5 ini berarti konsentrasi suspensi bakteri adalah 108 CFU/ ml. Konsentrasi suspensi bakteri 108 CFU/ml yang di gunakan pada pengujian aktivitas antibakteri (Afni et al., 2015)

## 3.16.4 Uji Aktivitas Antibakteri Sabun cair Ekstrak Daun Kopi

Teknik sumur digunakan untuk mengukur aktivitas antibakteri. Bakteri dalam suspensi yang telah mendapat media MHA diberi waktu untuk memadat. Media yang telah memadat kemudian dilubangi menggunakan bagian ujung pipet kaca steril. Masukkan 40 µl sediaan ke dalam masing-masing sumur setelah diberi label. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C ( Saputera 2019)