

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kabupaten Banyuwangi merupakan salah satu penghasil kopi di Jawa Timur tepatnya di Kecamatan Kalibaru (Sari & Reni, 2015). Hal ini berdasarkan hasil wawancara dari Dinas Pertanian Banyuwangi berbagai macam jenis kopi yang dihasilkan dari perkebunan Banyuwangi salah satunya jenis kopi robusta (*Coffea canephora*). Dalam kopi Robusta (*Coffea canephora*) menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap Gram-positif dan Gram-negatif karena mengandung senyawa trigonelline, kafein, dan α -dicarbonyl, fenolik, flavonoid (Patay *et al.*, 2016). Senyawa polifenol yang dihasilkan dari proses ekstraksi kopi mampu mengurangi kadar logam dan membunuh bakteri penyebab penyakit seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Djide dkk., 2008).

Penyakit infeksi masih menjadi masalah terutama di negara berkembang seperti Indonesia (Dwi puji dkk., 2020). Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme bakteri (Triwati, 2014). Dalam penelitian ini menggunakan bakteri *Staphylococcus aereus* dan *Escherichia coli*. *Staphylococcus aereus* umumnya terdapat pada tubuh sebagai flora normal yang terdapat pada kulit, saluran pernafasan, dan pencernaan makanan. *Escherichia coli* umumnya terdapat pada usus yang menyebabkan diare dan infeksi saluran kemih (Sutiknowati, 2016).

Menurut Dwicahyani (2018), tanaman yang memiliki potensi sebagai antibakteri adalah teripang keling (*Holoturia atra*), senyawa yang paling aktif sebagai antibakteri adalah flavonoid, saponin, dan alkaloid (Kurniawati, 2017). Patay et al., (2016) menuturkan bahwa flavonoid juga dapat berperan sebagai antibakteri. Pada hasil penelitian Tiara (2018), kandungan flavonoid yang dihasilkan pelarut etil asetat lebih tinggi $0,59 \pm 0,012\%$ sedangkan pelarut N-Heksan menghasilkan $0,52 \pm 0,0008\%$.

Maserasi merupakan proses ekstraksi yang dilakukan dengan cara sederhana dan tanpa pemanasan. Menurut penelitian yang dilakukan (Tutik dkk., 2022) nilai antioksidan yang paling aktif dilakukan dengan metode Maserasi daripada metode Perkolasi. sehingga proses ekstraksi tidak merusak senyawa yang akan digunakan dan menghasilkan secara maksimal (Sa'adah & Nurhasnawati, 2015). Dalam pemilihan pelarut hal yang harus diperhatikan adalah selektivitas, toksisitas, kepolaran, kemudahan untuk diuapkan, dan harga pelarut (Akbar, 2010). Dalam penelitian ini menggunakan pelarut etil asetat, dikarenakan pelarut ini memiliki senyawa alkaloid dan polifenol yang dapat menghambat daya hambat antibakteri paling tinggi terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Renos dkk., 2014).

Berdasarkan latar belakang diatas diketahui bahwa biji kopi robusta memiliki aktiivitas antibakteri. Oleh karena itu, dilakukan penelitian lebih lanjut pada aktivitas antibakteri ekstrak biji kopi robusta menggunakan pelarut etil asetat. Penelitian ini menggunakan empat formulasi dengan konsentrasinya yang berbeda diantaranya 30%, 50%, 70%, dan 100%. Sampel dibagi menjadi dua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kontrol positif Kloramfenikol.

Karena Kloramfenikol resisten dan mampu menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Sedangkan pada kontrol negatif menggunakan Na.CMC 1%. Daya diperoleh berdasarkan pengukuran zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram dan diukur menggunakan jangka sorong.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat biji kopi Robusta (*Coffea canephora*) pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat biji kopi robusta (*Coffea canephora*) pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a). Menganalisis pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat biji kopi robusta (*Coffea canephora*).
- b). Menganalisa pertumbuhan bakteri (*Escherichia coli*) uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat biji kopi robusta (*Coffea canephora*).

1.4 Manfaat

1.4.1 Bagi Peneliti

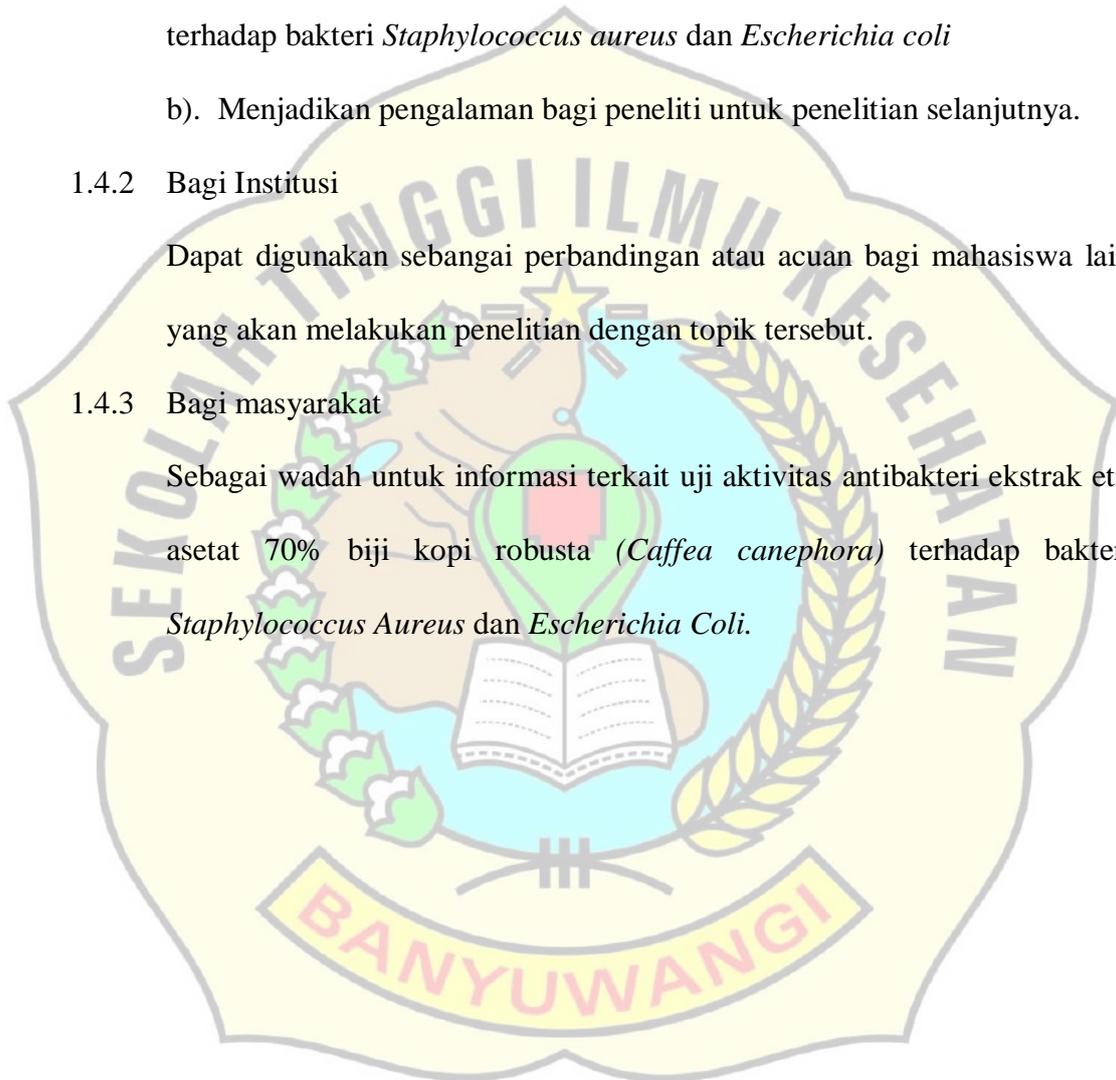
- a). Dapat menambah wawasan dan pengetahuan baru terkait uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat 70% biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*
- b). Menjadikan pengalaman bagi peneliti untuk penelitian selanjutnya.

1.4.2 Bagi Institusi

Dapat digunakan sebagai perbandingan atau acuan bagi mahasiswa lain yang akan melakukan penelitian dengan topik tersebut.

1.4.3 Bagi masyarakat

Sebagai wadah untuk informasi terkait uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat 70% biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap bakteri *Staphylococcus Aureus* dan *Escherichia Coli*.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

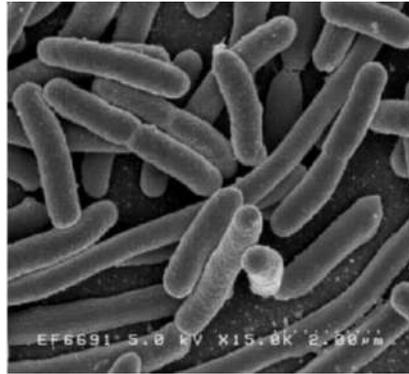
2.1. Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri batang gram negatif, panjangnya sekitar 2 mikron diameter sekitar 0,5 mikron. *Escherichia coli* hidup pada suhu 20-40°C. Bakteri ini tidak dapat dibunuh dengan pendinginan atau pembekuan, bakteri *Escherichia coli* hanya dapat dibunuh dengan antibiotik, sinar ultraviolet (UV) atau panas di atas 100°C. Suhu tinggi dapat merusak protein dalam sel, menyebabkan *Escherichia coli* tidak dapat bertahan lagi (Sutiknowati, 2016).

2.1.1 Klasifikasi

Menurut Sutiknowati (2016), taksonomi bakteri *Escherichia coli* adalah sebagai berikut :

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Eubacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Family	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Eschericia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>



Gambar 2.1 Bakteri *Escherichia coli* (Sutiknowati, 2016).

2.2 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif yang merupakan anggota Filum bakteri, dan ditemukan di saluran pernapasan, hidung dan pada kulit. Bakteri ini merupakan penyebab umum infeksi kulit, infeksi saluran nafas seperti sinusitis, keracunan makanan (Asadi & Jamali, 2017).

2.2.1 Klasifikasi

Menurut (Asadi & Jamali, 2017) klasifikasi *Staphylococcus aureus* sebagai berikut :

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Eubacteria
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: <i>Micrococcaceae</i>
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>



Gambar 2.2 *Staphylococcus aureus* secara mikroskopis (Brooks *et al.*, 2005).

2.3 Kopi

Kopi adalah salah satu dari banyak tanaman dalam keluarga Rubiaceae diproduksi dan dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia dan dunia. Dua jenis kopi yang sering ditanam adalah Kopi Arabica Dan Kopi Robusta (*Coffea canephora*). Tanaman ini tumbuh dengan tegak, bercabang, tingginya mencapai 12 m. bentuk daunnya bulat telur dengan ujung yang runcing. Daun tumbuh berhadapan dengan batang, cabang dan rantingnya (Najiyati dkk., 2009).

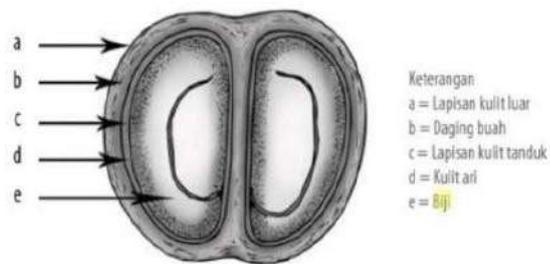
2.3.1 Morfologi Kopi

Kopi Robusta berasal dari Kongo dan masuk ke Indonesia pada tahun 1900. Kopi ini memiliki khasiat yang unggul dan tumbuh sangat cepat karena jenis ini lebih banyak ditanam di kalangan petani kopi di Indonesia. beberapa fitur kopi robusta penting, yaitu: (1) tahan terhadap penyakit (HIV); (2) dewasa baik di 400-700 meter di atas permukaan laut (di atas permukaan laut), tetapi masih toleran di bawah 400 meter di atas permukaan laut, suhu 21-24⁰C; (3) Ingin memiliki area kering selama 3-4 bulan berturut-turut, Ada 3-4 kiriman hujan; (4) hasil lebih tinggi

dari Arabika dan Liberika, rata-rata \pm 9-13 ku/ha/tahun). Jika manajemen terpusat dapat produksi 20 stok/ha/tahun (5) Kualitas buah lebih rendah dari Arabika, tetapi lebih tinggi dari kopi Liberia; (6) Hasil \pm 22% (perbandingan berat biji kopi dan biji kopi bubuk) (Najiyati *et al.*, 2004).

Pada awalnya bunga ini berasal dari ketiak daun yang terletak pada batang utama atau cabang perkembangbiakan. Bunga pohon kopi kecil, mahkotanya berwarna putih, dan baunya enak. Kelopaknya berwarna hijau dan pangkalnya menutupi ovarium, yang berisi dua bakal biji. Benang sari terdiri dari 5-7 tangkai pendek. Ketika bunga matang, kelopak dan mahkota terbuka dan penyerbukan segera terjadi. Buah dari tanaman kopi terdiri dari daging buah dan biji. Daging buah terdiri dari 3 bagian yaitu lapisan kulit luar (exocarp), lapisan pulpa (mesocarp) dan lapisan tanduk (endocarp) yang tipis dan keras. Biji ini terdiri dari kulit biji dan badan, badan atau yang biasa dikenal dengan endosperma merupakan bagian yang dapat digunakan sebagai bahan untuk membuat minuman kopi (Najiyati *et al.*, 2004).

Daging buah kopi yang sudah matang mengandung lendir senyawa gula yang rasanya manis. Kulit tanduk buah kopi memiliki struktur agak keras dan membungkus sepasang biji kopi. Bagian dalam dari buah kopi adalah biji kopi. Susunan biji kopi yaitu: (1) Kulit ari; (2) Lembaga; (3) Celah atau *center cut* (Penggabean, 2011).



Gambar 2.3 Ilustrasi penampang melintang buah kopi (Penggabean, 2011).

2.3.2 Klasifikasi Kopi Robusta

Taksonomi jenis Robusta yaitu (Chamidah, 2012)

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Divisi : Mangnoliophyta

Kelas : Magnoliophyta

Ordo : Rubiales

Family : Rubiaceae

Genus : Coffea

Spesies : *Coffea canephora, coffea*



Gambar 2.3 Tanaman Kopi Robusta (Panggabean, 2011).

2.3.3 Kandungan Biji Kopi Robusta

Senyawa dalam biji kopi dapat dibedakan menjadi senyawa volatil dan senyawa non volatil. Senyawa volatil adalah senyawa yang mudah menguap terutama pada suhu tinggi. Senyawa volatil yang mempengaruhi aroma kopi antara lain aldehid, keton dan alkohol, dan senyawa non-volatil yang mempengaruhi kualitas kopi antara lain kafein, asam klorogenat, hidrokarbon alifatik, asam, alkohol, tiol, furan, piro, piridin, kuinon, fenol (asam lemak), poliamina aromatik (Ramanaviciene dkk.,2003).

Kafein ialah senyawa alkaloid berupa kristal bercorak putih. Kafein, bahan dalam biji kopi yang membatasi perkembangan kuman, muncul pada 1, 6% - 2, 4% dalam kopi robusta memiliki peran penting dalam pengembangan Pertahanan tubuh melawan bakteri dengan meningkatkan konsentrasi beberapa sel immunokompeten dan memperkuat aktivitas lisozim. Kandungan asam klorogenik dan asam kafein yang merupakan asam organik non-volatil mampu mencegah pertumbuhan bakteri Gram positif dan negatif, senyawa antibakteri tersebut bekerja dengan cara masuk ke dalam sel dan merusak struktur dinding sel bakteri (Ramanaviciene dkk., 2003).

Fenol ialah salah satu senyawa yang mempunyai guna selaku antioksidan. Antioksidan sendiri ialah senyawa yang bisa melindungi sel badan dari paparan radikal leluasa. Senyawa fenol meliputi flavonoid(turunan inti flavan), cincin kroman (tokoferol) serta lignan. Fenol diklasifikasikan selaku komponen yang tidak larut semacam lignin serta komponen yang larut semacam asam fenolik, phenylpropanoids, flavonoid serta kuinon. Asam Fenolik terdiri dari asam klorogenat, asam kafeat, asam p- kumarat, serta asam vanilat (Silalahi, 2006).

Asam klorogenat sangat bagus untuk peningkatan energi karena membantu

tubuh melepaskan glukosa. Kandungan asam klorogenat di dalam kopi dapat menghambat penyerapan gula di saluran pencernaan. Berbagai penelitian para ahli juga telah membuktikan bahwa mengkonsumsi atau meminum kopi mampu menurunkan hingga 50% dari resiko diabetes. Asam klorogenat merupakan zat yang berperan sangat penting dalam pembentukan insulin (Prindle dkk., 2000).

Senyawa fenol adalah flavonoid yang terdapat dalam biji kopi. Aktifitas biologis senyawa flavonoid dilakukan dengan caramerusak dinding sel baktreri, melalui perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alcohol pada senyawa flavonoid sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri.cara kerja aktifitas biologis oleh senyawa flavonoid ini berbeda dengan yang dilakukan oleh senyawa alkaloid, dimana senyawa flavonoid dalam merusak sel bakteri memanfaatkan perbedaan kepolaran antara lipid penyusun sel bakteri dengn gugus alcohol pada senyawa flavonoid. Sedangkan pada senyawa alkaloid memanfaatkan sifat reaktif gugus basa pada senyawa alkaloid untuk bereaksi dengan gugus asam amino pada sel bakteri (Gunawan, 2009).

2.4 Metode ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2000).

2.4.1. Ekstraksi panas

Ekstraksi panas adalah metode ekstraksi dengan menggunakan pemanasan dalam proses ini pelarut yang digunakan lebih sedikit dan lebih menghemat waktu.

1) Sokhlektasi

Sokhlektasi merupakan proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut baru dan menggunakan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi secara terus menerus (Depkes RI, 2000).

2) Refluks

Refluks adalah proses ekstraksi dengan menggunakan bantuan pemanasan dan mampu mengekstraksi andrografolid yang merupakan senyawa tahan panas (Depkes RI, 2000).

3) Infus

Sediaan cair yang dibuat dengan cara menyari simplisia (lunak: daun dan bunga) dengan air pada suhu 90 °C selama 15 menit (Depkes RI, 2000).

4) Dekok

sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia (lebih keras) dengan air pada suhu 90 °C pada waktu 30 menit (Depkes RI, 2000).

2.4.2 Ekstraksi dingin

Ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis ekstraksi secara dingin. Ekstraksi secara dingin dapat dilakukan dengan cara berikut:

1) Maserasi

Proses pengekstraksian serbuk simplisia dengan cara merendam dalam pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu kamar. dalam melakukan metode maserasi sendiri terdapat keuntungan dan kerugian. Keuntungan dari metode ini yaitu cara pengerjaan yang mudah, Peralatan yang digunakan relatif sederhana, dan mudah cocok untuk zat aktif yang tidak tahan pemanasan. Sedangkan kerugian dari metode maserasi yaitu waktu penyarian yang relatif lama, penyariannya kurang sempurna, dan memerlukan jumlah pelarut yang besar (Depkes RI, 2000).



Gambar. 2.4 Maserasi (Depkes RI, 2000).

2) Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses ini

terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (Depkes RI, 2000).

2.5 Pelarut

Pelarut adalah cairan yang melarutkan zat kimia dan menghasilkan suatu larutan. Pelarut dibagi menjadi 3 yaitu: pelarut polar, pelarut non polar, dan pelarut semi polar.

1) Pelarut polar

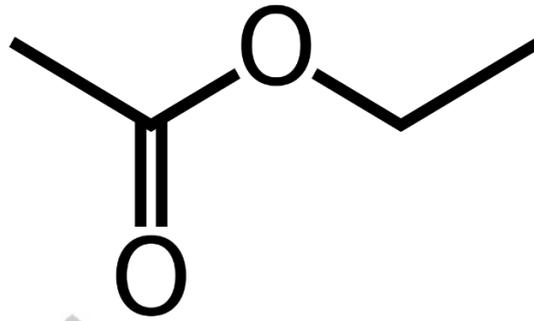
Pelarut polar merupakan pelarut yang mempunyai tingkat kepolaran yang tinggi sehingga cocok untuk mengekstraksi senyawa polar dari tanaman. Contohnya: metanol, etanol, air, asam asetat (Sudarmadjie *et al.*,1997).

2) Pelarut non polar

Pelarut non polar merupakan pelarut yang hampir tidak polar, dan biasanya digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang tidak bisa larut. Contohnya: heksana, eter, benzana (Sutrisna,2016).

3) Pelarut semi polar

Pelarut semi polar adalah salah jenis pelarut yang memiliki tingkat kepolaran lebih rendah daripada jenis pelarut lainnya. Contohnya: aseton, etil asetat, kloroform (Sutrisna,2016).



Gambar. 2.5 Pelarut Semi Polar Etil Asetat

2.6 Metode uji antibakteri

Aktivitas uji antibakteri adalah untuk mengetahui potensi suatu zat dalam larutan yang diduga atau memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri (Jawetz *et al.*, 2001). Dalam uji antibakteri ini menggunakan metode:

2.6.1 Difusi

1) Metode Kertas Cakram

Metode ini untuk menentukan aktivitas antimikroba. Media agar yang telah ditanam mikroorganisme dan didifusikan, dihitung zona hambatnya. Tanda jika ada hambatan pada pertumbuhan mikroorganisme munculnya zona bening pada area tersebut (Jawetz *et al.*, 2001).

2) Metode Difusi agar Strip/Epsilometer

Bertujuan untuk memperkirakan dan dapat menghambat mikroorganisme. Metode ini berisikan agen antimikroba untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media untuk menunjukkan daerah zona bening (Jawetz *et al.*, 2001).

3) Metode Sumuran

Membuat lubang pada agar yang sudah diinokulasi dengan bakteri. Setelah itu lubang diinjeksi menggunakan ekstrak yang sudah di uji (Jawetz *et al.*, 2001).

2.6.2 Dilusi

1) Metode Dilusi Cair (*Borth dilution test*)

Metode ini adalah KHM (tingkat hambat minimum) dan KBM (Tingkat pembunuhan minimum) yang harus Anda lakukan adalah membuat seri Antimikroba diencerkan dalam media cair Mikroorganisme uji ditambahkan. Solusi Pengujian Proksi Tingkat antimikroba minimal, dengan tidak adanya Pertumbuhan mikroorganisme uji disebut MIC (Pratiwi, 2008).

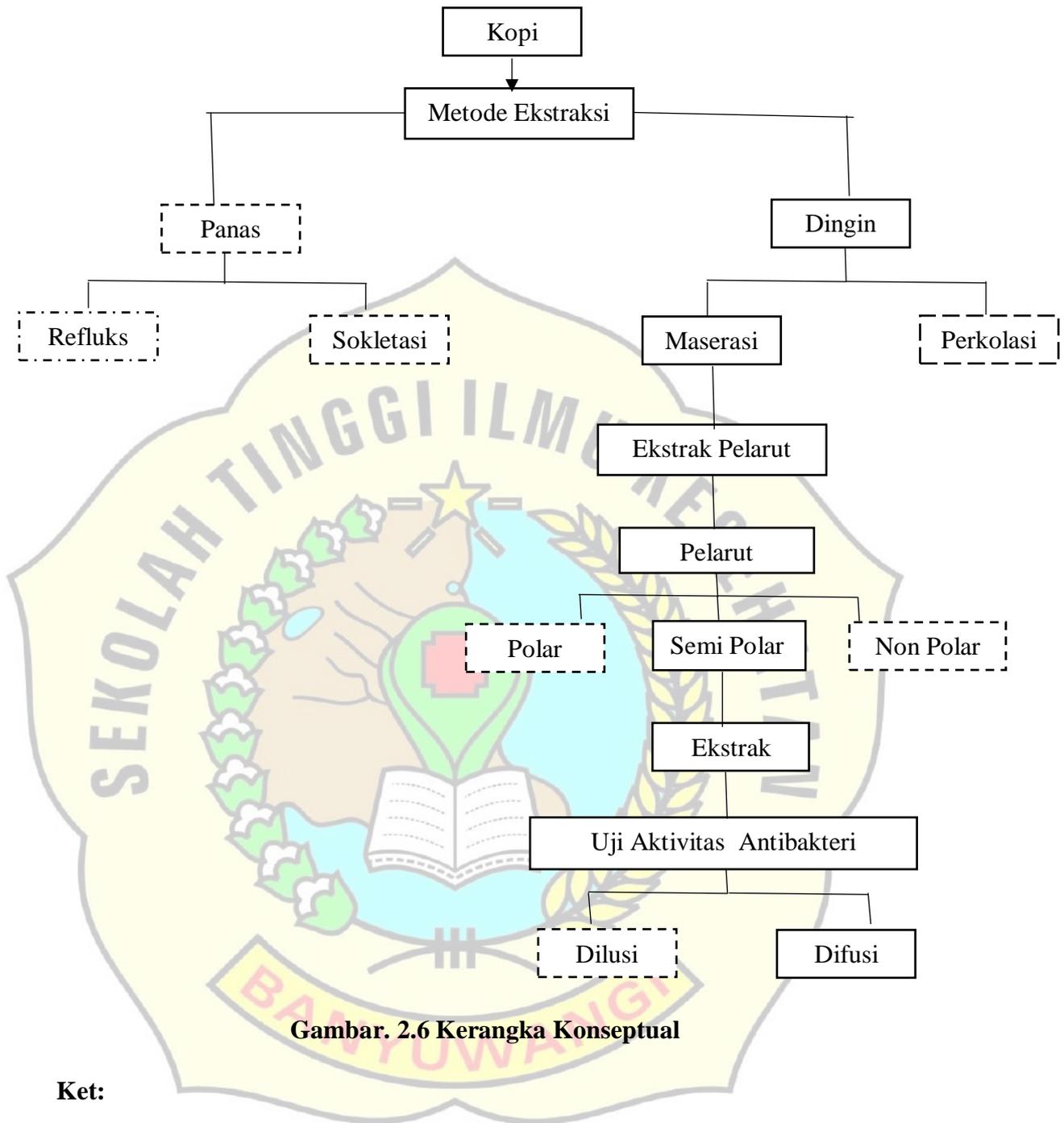
2) Metode Dilusi Padat (*Solid dilution test*)

Metode ini sama dengan metode cair hanya menggunakan media padat. Kelebihan dalam menggunakan metode ini adalah konsentrasi agen antimikroba dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba (Pratiwi, 2008).

Tabel 2.6.2 Klasifikasi Daya Hambat (Davis and Stout, 1971)

Diameter Zona Hambat (mm)	Kekuatan Daya Hambat
< 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
>21 mm	Sangat kuat

2.6 Kerangka Konseptual



Gambar. 2.6 Kerangka Konseptual

Ket:

Tidak di teliti= [-----]

Diteliti= [_____]

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Untuk menganalisis pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada media nutrient agar setelah diletakkan kertas cakram yang telah ditambah ekstrak etil asetat biji kopi robusta dengan konsentrasi 30%, 50%, 70%, dan 100%. Dan mengukur zona hambat pada masing-masing sampel. Setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Hasil penelitian ini disajikan menggunakan bentuk tabel dan gambar.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai bulan Juni 2023.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium STIKES Banyuwangi yaitu di Laboratorium Bahan Alam.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, masker, sarung tangan (*handscoon*), erlenmeyer, timbangan analitik, gelas ukur, gelas kimia,

cawan petri, corong pisah, *autoklaf*, pinset, spatula, bunsen, pipet tetes, *ose*, batang pengaduk, rak tabung reaksi, tabung reaksi lemari pendingin, inkubator, mikropipet, pot, jangka sorong, *water bath*, *Laminer Air Flow*, label, tissue, kertas saring

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah biji kopi robusta, ekstrak etil asetat larutan NaCl 0,9%, aquades, bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, Nutrien agar, alkohol, Na.CMC, Kloramfenikol.

3.4 Prosedur kerja

3.4.1 Ekstraksi

Biji kopi robusta tanpa kulit sebanyak 942 gram, dioven sehingga didapatkan berat simplisia 275 gram. Kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etil asetat sebanyak 400 ml. Hasil maserasi direndam selama 3 jam dan sesekali diaduk. Proses maserasi dilakukan selama 3x24 jam. Setelah di rendam sampel disaring, terbentuk filtrat. Kemudian filtrat tersebut dipekatkan dalam *water bath* suhu 60-70⁰c sampai didapatkan ekstrak kental 20,8 g.

3.4.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

Pembuatan larutan induk Na.CMC 1% dibuat dengan cara mengambil 1 gram Na.CMC dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest.

Konsentrasi ekstrak 30 % : ekstrak seberat 1,5 gram ditambahkan larutan Na.
CMC 5 ml

Konsentrasi ekstrak 50 % : ekstrak seberat 2,5 gram ditambahkan larutan Na.
CMC 5 ml

Konsentrasi ekstrak 70 % : ekstrak seberat 3,5 gram ditambahkan larutan Na.
CMC 5 ml

Konsentrasi ekstrak 100 % : ekstrak seberat 5 gram ditambahkan larutan Na.
CMC 5 ml

3.4.3 Sterilisasi

Sebelum dilakukan penelitian alat-alat kaca disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰ C selama 15 menit, pinset dibakar dengan pembakaran di atas api langsung. Pada media yang menggunakan autoklaf disterilkan pada suhu 121⁰ C selama 15 menit (Waluyo, 2007).

3.4.4 Pembuatan Media Agar

Nutrien Agar (NA) ditimbang sebanyak 23 gram dan ditambahkan dengan aquadest sampai 1000 ml dan dilarutkan hingga homogen. Dipanaskan menggunakan *hot plate*, kemudian disterilkan dengan menggunakan *autoklaf* pada suhu 121⁰C selama 15 menit, dan dibiarkan sampai media cukup dingin. Media NA yang dingin kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat.

3.4.5 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Pada larutan kontrol negatif dibuat dengan Na.CMC 1% dengan cara : 1 gram serbuk Na. CMC ditaburkan diatas aquadest steril 50 ml kemudian ditunggu sampai mengembang (Holinda & Asriyanti, 2017).

3.4.6 Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Kelompok kontrol positif menggunakan antibiotik Kloramfenikol. Pembuatan larutan Kloramfenikol 0,01% dibuat dengan cara menimbang 0,1 gram Kloramfenikol dilarutkan dalam 10 mL aquadest.

Konsentrasi kontrol positif 0,1%

Kontrol positif dibuat dengan menimbang Kloramfenikol 500 mg sebanyak 0,2 mg, kemudian dilarutkan dengan aquadest ad 10 ml.

Perhitungan Kloramfenikol:

Stok konsentrasi Kloramfenikol 0,1%

$$b/v \ 0,1\% = 0,1 \text{ g}/100\text{ml}$$

$$= 0,1 \text{ g} : 10$$

$$= 0,01 \text{ g} \times 1.000$$

$$= 10 \text{ mg (Kloramfenikol yang dihitung)}$$

$$= \frac{\text{Berat 1 kapsul} \times 10 \text{ mg}}$$

Kandungan kloramfenikol

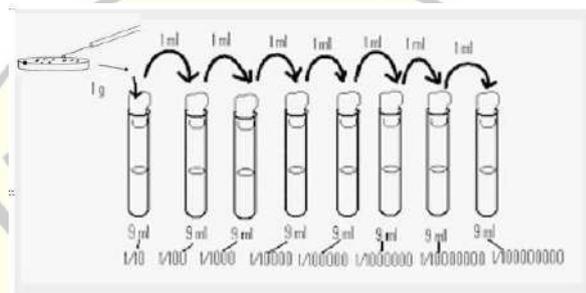
$$= \frac{283 \text{ mg} \times 10 \text{ mg}}$$

$$250 \text{ mg}$$

$$= 11,32 \text{ mg ad 10 ml}$$

3.4.7 Pembuatan Suspensi Bakteri.

Staphylococcus aureus dan *Escherichia coli* diambil kurang lebih 1 ohse kemudian disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 10 mL larutan NaCL 0,9% (larutan fisiologis) yang di encerkan. Pengenceran dilakukan 5-6 kali suspensi bakteri diambil dari dari tabung pengenceran (Misna & Khusnul, 2016).



Gambar.3.4 pengenceran suspensi bakteri (Misna & Khusnul, 2016).

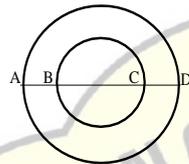
3.4.6 Pengujian Antibakteri.

Siapkan cawan petri steril yang telah ditambahkan suspensi bakteri pada tabung pengenceran 10^{-5} sebanyak 1 ml. kemudian tambahkan media NA cair steril kurang lebih 10 ml lalu homogenkan. Tunggu sampai media NA memadat kurang lebih 10-15 menit. Kertas cakram yang berisi konsentrasi 30% ekstrak kopi dimasukkan kedalam cawan petri berisi media NA dan suspensi bakteri tersebut. Lakukan pada konsentrasi 50%, 70%, dan 100% dengan tiga kali pengulangan pada masing-masing konsentrasi ekstrak dan masing-masing bakteri.

3.4.7 Pengukuran Zona Hambat

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam inkubasi. Daerah bening merupakan indikasi kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lain yang

digunakan sebagai bahan uji, yang dinyatakan sebagai lebar diameter zona hambat. Gunakan skala untuk mengukur diameter zona hambat dalam milimeter (mm) dengan mengurangkan 7 mm dari diameter lubang dari diameter total. Diameter zona hambat kemudian diklasifikasikan menurut kemampuan bakteriostatik menurut klasifikasi David & Stout, 1971).



AD = Zona Keseluruhan

BC = Diameter Cakram

Zona hambat = AD - BC

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dengan pengujian aktivitas antibakteri pelarut etil asetat ekstrak kopi Robusta (*Coffea canephora*) menggunakan metode difusi cakram dapat disajikan dalam bentuk tabel dan grafik (metode deskriptif).

3.6 Alur Penelitian

