

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

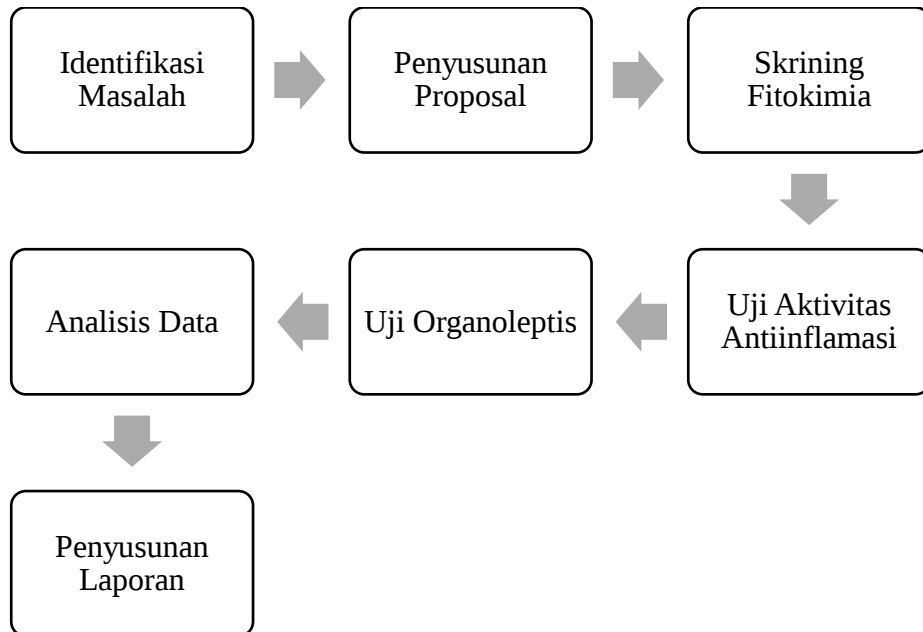
Pada penelitian ini, jenis penelitian yang digunakan adalah jenis deskriptif kualitatif. Menurut Rusandi & Rusli (2022) Penelitian kualitatif membahas mengenai pemahaman secara mendalam pada suatu masalah. Sedangkan penelitian deskriptif adalah metode penelitian yang fokus pada penyelidikan peristiwa atau fenomena, di mana informasi yang diperoleh digambarkan kembali dalam bentuk kata-kata atau disajikan dalam bentuk data seperti tabel dan grafik.

Dapat disimpulkan bahwa penelitian kualitatif deskriptif adalah jenis penelitian yang menggunakan metode interpretatif untuk memahami suatu masalah secara mendalam dan kemudian memaparkannya secara deskriptif.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode kuasi eksperimen (Quasi Experiment Method). Menurut Sugiyono (2016) metode penelitian eksperimen merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh pada sesuatu yang diberi perlakuan terhadap yang lain dalam kondisi yang dapat dikendalikan. Pada penelitian ini terdapat perlakuan berupa kontrol positif yaitu Natrium diklofenak pada uji aktivitas antiinflamasi.

B. Alur Penelitian

Alur penelitian ini disajikan dalam gambar berikut :



Gambar 6 Bagan Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di Kebun Induk Kopi Robusta, Kecamatan Pupuan, Kabupaten Tabanan. Penelitian dilakukan langsung di laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2023 – April 2024.

D. Populasi dan Sampel

1. Kriteria sampel

Sampel dari penelitian ini yaitu daun kopi robusta yang memenuhi kriteria sampel sebagai berikut :

- a. Daun kopi robusta yang dipilih merupakan daun kopi robusta urutan kelima sampai kedelapan dari ujung daun dan masih segar dengan morfologi daun yang utuh karena memiliki antioksidan yang lebih tinggi (Wulandari, 2023).
- b. Sementara kriteria eksklusi daun kopi robusta yaitu daun yang rusak dan berlubang, layu dan sudah tua (berwarna kuning pucat).

2. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah aktivitas antiinflamasi pada teh daun kopi robusta. Kontrol positif menggunakan larutan Natrium diklofenak. Natrium diklofenak digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan obat antiinflamasi non steroid yang memiliki aktivitas antiinflamasi yang besar karena dapat mencegah pelepasan (bukan sintesis) mediator antiinflamasi (Saputra, 2015).

3. Jumlah dan besar sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah teh daun kopi robusta yang dibuat dari simplisia yang dihaluskan menjadi serbuk. Massa sampel total yang diperlukan dalam satu kantong teh celup adalah dua gram dengan pelarut air sebanyak 200 mL. Sampel yang akan dilakukan uji antiinflamasi dibuat dengan tiga ulangan sehingga memiliki 18 larutan uji (25, 50, 100, 200, 400, dan 800 ppm yang ditentukan secara acak).

Pengulangan uji aktivitas antiinflamasi pada teh daun kopi robusta dilakukan dengan membuat tiga larutan uji pada setiap konsentrasinya. Hal ini dilakukan guna mencari rata-rata presentase stabilisasinya.

4. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *purposive* sampling, karena sampel yang dipilih harus memenuhi kriteria yang telah disesuaikan dengan kebutuhan penelitian (Sugiyono, 2017). Masing-masing sampel diambil 500 gram untuk memenuhi massa sampel basah. Seluruh proses yang dilakukan dengan dasar bahwa kandungan bahan berkhasiat sehingga hasil yang diharapkan maksimal.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini adalah pengumpulan data primer dan data sekunder. Data primer diperoleh dengan uji laboratorium dari skrining fitokimia, uji aktivitas antiinflamasi, dan uji organoleptis teh daun kopi robusta yang merupakan teh antiinflamasi. Kemudian, data sekunder diperoleh dari sumber literatur yang berkaitan dengan penelitian ini.

2. Cara pengumpulan data

Cara pengumpulan data pada penelitian ini adalah dengan melakukan percobaan di laboratorium dengan menganalisis kandungan metabolit sekunder melalui uji fitokimia secara kualitatif, aktivitas antiinflamasi dengan metode stabilisasi membran sel darah merah manusia, dan uji organoleptis metode uji hedonik.

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Alat tulis
- b. Kamera
- c. Alat dan bahan untuk skrining fitokimia, uji aktivitas antiinflamasi, dan uji organoleptis.

4. Alat dan bahan

- a. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya : gunting, wadah beranyam kayu, neraca analitik, pipet tetes, pipet volume, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, batang pengaduk, *hot plate*, gelas *beaker*, erlenmeyer, mikropipet, labu ukur, gunting, *sentrifuge*, inkubator, *autoclave*, spektrofotometer UV-Vis, kuvet, komputer, *tourniquet*, dan *stopwatch*.

- b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun kopi robusta, air mineral, label, NaOH 10%, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, FeCl₃ 5%, FeCl₃ 10%, HCl 2N, H₂SO₄, tabung darah antikoagulan plasma sitrat, plester, *alcohol swab*, jarum *vacutainer*, Natrium diklofenak, dan NaCl 0,9%.

5. Prosedur penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan yaitu :

- a. Persiapan sampel
 - 1) Pembuatan serbuk daun kopi robusta

- a) Daun kopi robusta (urutan kelima sampai kedelapan dari ujung daun) yang berwarna hijau dan masih segar dipetik sebanyak 500 gram, selanjutnya daun dibersihkan dari kotoran dengan membilas menggunakan air bersih, lalu ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.
- b) Potong daun menjadi ukuran yang lebih kecil dengan gunting.
- c) Keringkan daun dengan cara diangin-anginkan untuk menghindari zat-zat yang terkandung berkurang. Daun yang kering memiliki karakteristik muda hancur bila diremas dan warnanya berubah secara signifikan (Dharma dkk., 2020).
- d) Blender daun yang sudah kering hingga halus atau menjadi serbuk, lalu pindahkan ke wadah yang kering.

2) Pembuatan teh daun kopi robusta

- a) Simplisia yang sudah diblender hingga menjadi serbuk dimasukkan ke dalam kantong teh celup yang kosong sebanyak 2 gram
- b) Pembuatan teh dilakukan dengan menyeduhnya ke dalam air sebanyak 200 mL dengan suhu 90°C selama lima menit, dan disaring bila terdapat ampas teh.

b. Skrining fitokimia secara kualitatif

Skrining fitokimia secara kualitatif mengacu pada Shaikh & Patil (2020) yang meliputi uji alkaloid, flavonoid, fenol, tanin, saponin, dan triterpenoid :

- 1) Pembuatan kontrol
 - a) Masing-masing formulasi dipindahkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 mL sebagai kontrol atau perbandingan awal (tidak mendapatkan perlakuan apapun).

2) Alkaloid

- a) Filtrat masing-masing formulasi teh dibagi menjadi tiga dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi (masing-masing 2 mL),
- b) Tabung pertama dari seluruh formulasi ditambahkan beberapa tetes reagen dragendroff,
- c) Tabung kedua dari seluruh formulasi ditambahkan beberapa tetes reagen mayer,
- d) Tabung ketiga dari seluruh formulasi ditambahkan beberapa tetes reagen wagner,
- e) Amati dan bandingkan perubahan warna ketiga uji dengan kontrol yang sudah dibuat. Dragendroff positif ditandai dengan terbentuknya endapan merah hingga coklat. Mayer positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih hingga kuning. Wagner positif ditandai dengan terbentuknya endapan coklat atau kemerahan.

3) Flavonoid

- a) Filtrat masing-masing formulasi teh dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi,
- b) Masing-masing filtrat ditambahkan 1-2 mL NaOH 2%,
- c) Kemudian tambahkan beberapa tetes HCl,
- d) Amati dan bandingkan perubahan warna yang terjadi pada seluruh formulasi dengan kontrol yang dibuat. Pada penambahan NaOH 2% akan berubah menjadi kuning pekat dan berubah menjadi tidak berwarna dengan penambahan asam encer.

4) Fenol

- a) Filtrat masing-masing formulasi teh dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi,
- b) Kemudian tambahkan beberapa tetes FeCl_3 5%,
- c) Amati dan bandingkan perubahan warna yang terjadi pada seluruh formulasi dengan kontrol. Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau tua hingga hitam kebiruan.

5) Tanin

- a) Filtrat masing-masing formulasi teh dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi,
- b) Kemudian tambahkan beberapa tetes FeCl_3 10%,
- c) Amati dan bandingkan perubahan warna yang terjadi pada seluruh formulasi dengan kontrol. Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna biru hingga hijau.

6) Saponin

- a) Filtrat masing-masing formulasi teh dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi,
- b) Disiapkan 2 mL air panas lalu dituangkan pada filtrat lalu dikocok,
- c) Bila berbuih didiamkan 10 menit, jika bisa tidak hilang tambahkan HCl 2N,
- d) Amati dan bandingkan busa yang terbentuk pada seluruh formulasi dengan kontrol. Uji positif ditandai dengan tidak hilangnya busa pada penambahan HCl 2N.

7) Triterpenoid

- a) Filtrat masing-masing formulasi teh dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi,
 - b) Kemudian tambahkan beberapa tetes H₂SO₄,
 - c) Amati dan bandingkan lapisan cincin yang terbentuk pada seluruh formulasi dengan kontrol. Uji positif ditandai dengan terbentuknya cincin kuning keemasan pada uji.
- c. Uji aktivitas antiinflamasi

Pada pengujian aktivitas antiinflamasi metode stabilisasi membran sel darah merah manusia mengacu pada penelitian yang dilakukan Saputra (2015).

1) Pembuatan larutan yang dibutuhkan

a) Pembuatan isosalin

Pada suhu ruang, sebanyak 0,85 gram NaCl dilarutkan dalam dapar fosfat pH 7,4 (0,15M) hingga 100 mL, lalu disterilkan dengan autoclaft pada suhu 121°C selama 15 menit.

b) Pembuatan hiposalin

Pada suhu ruang, sebanyak 0,25 gram NaCl dilarutkan dalam dapar fosfat pH 7,4 (0,15M) hingga 100 mL, lalu disterilkan dengan autoclaft pada suhu 121°C selama 15 menit.

c) Penyiapan konsentrasi teh dan Natrium diklofenak

Sebanyak 2 mg teh daun kopi robusta yang diseduh dalam 200 mL air kemudian diencerkan menjadi beberapa seri konsentrasi (25, 50, 100, 200, 400, dan 800 ppm). Lakukan hal yang serupa pada Natrium diklofenak. Pada suhu ruang,

sebanyak 5 mg Na diklofenak dilarutkan dalam 50 mL isiosalin (1000 ppm), lalu encerkan menjadi 100 ppm.

2) Pembuatan suspensi sel darah merah manusia

- a) Darah sebanyak 10 mL disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipisahkan dengan pipet steril, sedangkan sisa endapan sel darah merah dicuci dengan larutan isiosalin dan disentrifuge kembali (diulang sebanyak 4 kali hingga isiosalin jernih). Volume sel darah diukur dan diresuspensi dengan isiosalin hingga diperoleh suspensi sel darah merah dengan konsentrasi 10% v/v. Suspensi sel darah merah dapat disimpan pada suhu 4°C bila tidak digunakan langsung.

3) Pengujian aktivitas teh terhadap stabilisasi membran sel darah merah

a) Pembuatan larutan uji

Larutan uji yang terdiri dari 1 mL larutan sampel, 2 mL hiposalin, 0,5 suspensi sel darah merah, dan 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15M).

b) Pembuatan larutan kontrol positif

Larutan kontrol positif yang terdiri dari 1 mL larutan Na diklofenak, 2 mL hiposalin, 0,5 suspensi sel darah merah, dan 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15M).

c) Pembuatan larutan kontrol uji

Larutan kontrol uji yang terdiri dari 1 mL larutan sampel, 0,5 mL larutan isiosalin pengganti suspensi sel darah merah, 2 mL hiposalin, dan 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15M).

d) Pembuatan larutan kontrol negatif

Larutan kontrol negatif yang terdiri dari 1 mL larutan isosalin pengganti larutan sampel, 0,5 mL suspensi sel darah merah, 2 mL hiposalin, dan 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15M).

e) Pembacaan dengan spektrofotometer UV-Vis

Setiap larutan yang sudah dibuat (larutan uji, kontrol uji, kontrol positif dan negatif) diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Cairan supernatan yang terbentuk diambil dan kandungan hemoglobinnnya diperhitungkan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 560 nm. Persen stabilitas membran sel darah dan Natrium diklofenak dapat diperhitungkan dengan rumus berikut (Saputra, 2015) :

% Stabilitas membran sel darah merah

$$= 100 - \left[\frac{\text{Abs larutan uji} - \text{Abs larutan kontrol uji}}{\text{Abs larutan kontrol negatif}} \right] \times 100\%$$

% Stabilitas Natrium diklofenak

$$= 100 - \left[\frac{\text{Abs larutan Natrium diklofenak} - \text{Abs larutan kontrol uji}}{\text{Abs larutan kontrol negatif}} \right] \times 100\%$$

d. Uji organoleptis metode uji hedonik

- 1) Disiapkan rebusan teh daun kopi yang sudah diseduh selama lima menit dengan suhu 90°C dalam 200 mL air,
- 2) Disiapkan 30 panelis secara acak,
- 3) Panelis diberikan *informed consent* dan formulir untuk melengkapi biodata pada uji organoleptis,
- 4) Dilakukan penilaian uji organoleptis pada teh daun kopi robusta meliputi rasa, aroma, dan warna.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

a. Pengolahan data skrining fitokimia secara kualitatif

Data yang diperoleh berupa analisis kualitatif yaitu menjelaskan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun kopi robusta. Metabolit sekunder yang dideteksi antara lain alkaloid, flavonoid, fenol, tanin, saponin, dan triterpenoid. Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel yang diberi narasi, kemudian dibandingkan dengan literatur terkait.

b. Pengolahan data aktivitas antiinflamasi metode stabilisasi membran sel darah merah

Aktivitas antiinflamasi dianalisis dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat distribusi data dan analisis dengan uji Levene untuk melihat homogenitas data. Data yang terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji ANOVA satu arah dengan taraf kepercayaan 95% sehingga berpotensi mengetahui perbedaan yang diperoleh bermakna atau tidak. Apabila tidak terdapat perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan metode LSD (Saputra, 2015).

c. Pengolahan data uji organoleptis metode uji hedonik

Uji organoleptis pada teh daun kopi robusta diolah dalam bentuk tabel yang diberikan deskripsi atau narasi.

2. Analisis data

Analisis data pada hasil skrining fitokimia diolah dalam bentuk deskriptif kualitatif yaitu dengan menjelaskan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam teh daun kopi robusta. Sedangkan aktivitas antiinflamasi pada teh

daun kopi robusta disajikan dalam bentuk deskriptif kuantitatif yang dianalisis dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat distribusi data dan analisis dengan uji Levene untuk melihat homogenitas data. Kemudian uji organoleptis dilakukan dengan analisis data deskriptif yaitu dengan menggambarkan hasil penilaian rasa, aroma, dan warna dari 30 panelis terhadap teh daun kopi robusta.

G. Etika Penelitian

Etika penelitian kesehatan memiliki tiga prinsip dengan bobot moral yang dapat dipertanggungjawabkan, hal ini dikemukakan oleh Komite Etik Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Nasional Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Komite Etik Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Nasional Kementerian Kesehatan RI, 2021) :

1. Prinsip menghormati harkat martabat manusia

Prinsip menghormati harkat martabat manusia atau *respect for persons* di dasarkan kepada keyakinan bahwa manusia harus diperlakukan dengan hormat karena mereka unik, makhluk otonom yang dapat membuat pilihan sendiri. Tujuan prinsip ini ialah untuk melindungi hak seseorang untuk membuat keputusan sendiri dalam sebuah lingkungan yang bebas dan adil.

2. Prinsip berbuat baik dan tidak merugikan

Prinsip berbuat baik dan tidak merugikan atau *beneficence and non-maleficence*, inti dari konsep etika berbuat baik yaitu mengutamakan keuntungan di atas kerugian. Konsep tidak membahayakan dikembangkan agar dapat melindungi peserta studi sehingga tidak digunakan secara tidak tepat.

3. Prinsip keadilan

Prinsip keadilan atau *justice* menyerukan perlakuan yang adil terhadap subjek studi dalam hal keuntungan dan biaya yang terkait dengan partisipasi responden.