

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental yaitu untuk mengetahui pengaruh yang disebabkan oleh suatu perlakuan. Dalam hal ini guna membandingkan kadar flavonoid total serta aktivitas antioksidan teh kombucha dan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*) dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV-VIS.

B. Lokasi Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-Juli

2. Lokasi Penelitian

- a. Lokasi Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika (FSM) Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).
- b. Lokasi pembuatan teh kombucha dan sterilisasi alat dilakukan di Laboratorium Steril Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Lokasi pembuatan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*) dan penelitian pengujian metabolit sekunder dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo.
- d. Lokasi penelitian pengujian aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun kersen (*Muntingia calabura*) yang diambil di daerah Banyuwangi.

2. Sampel

a. Kriteria Inklusi

Sampel diambil di Desa Kemiri, Kecamatan Singojuruh, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur yaitu daun kersen (*Muntingia calabura*) tua dengan panjang 4-7 cm dan lebar 3-4 cm.

b. Kriteria Ekslusi

Daun kersen tua yang tidak segar ataupun tidak sehat.

c. Cara pengambilan sampel

Pada penelitian ini menggunakan *purposive* sampling terhadap daun kersen, yang artinya sampel daun kersen (*Muntingia calabura*). Cara pengambilan yang sama yaitu daun berwarna hijau tua dengan Panjang daun 4-7 cm dan lebar daun 3-4 cm sehingga mempunyai kesempatan yang sama untuk dipilih sebagai sampel

D. Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Teh kombucha

Teh kombucha berasal dari gula dan air kemudian ditambahkan kultur kombucha bakteri *Acebacter xylium* dan khamir *Saccharomyces cerevisease*.

2. Metode ekstraksi

Metode ekstraksi maserasi merupakan metode yang digunakan untuk ekstraksi daun kersen tua dengan pelarut etanol 96% dengan wadah tertutup rapat selama 5 hari kemudian disaring dan residu dilakukan remaserasi selama 2 hari, setelah itu dilanjutkan dengan evaporasi.

3. Etanol 96%

Etanol 96% adalah pelarut yang bersifat polar yang mudah menguap sehingga baik digunakan sebagai pelarut ekstrak.

4. Uji kadar flavonoid total

Uji yang dilakukan dengan pereaksi asam asetat dan aluminium klorida sampel teh kombucha dan ekstrak daun kersen menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

5. Uji aktivitas antioksidan

Uji yang dilakukan dengan metode DPPH sampel teh kombucha dan ekstrak daun kersen menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

E. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah teh kombucha dan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*) dengan konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah metabolit sekunder, kadar flavonoid total serta aktivitas antioksidan pada teh kombucha dan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*) diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah cahaya dan suhu pada setiap perlakuan serta panjang gelombang absorbansi.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah gelas kaca, karet gelang, penangas air, timbangan analitik, saringan, kertas saring, sendok, labu ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas beker, pipet volume, pipet ukur, pipet tetes, kompor, rotary evaporator, cawan perselen, batang pengaduk, blender, pengukur suhu, corong kaca, kuvet, moisture balance, tanur, kurs silikat, spektrofotometri UV-Vis

b. Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah kultur kombucha (diperoleh dari wikikombucha.com), daun kersen, aquades, etanol 96%, etanol pa, asam asetat, aluminium klorida, gula pasir, aluminium foil, Magnesium (Mg), Asam klorida (HCl), Natrium klorida (NaCl) 10%, FeCl₃ 10%, H₂SO₄, kuersetin, DPPH.

2. Determinasi tanaman

Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika (FSM) Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).

3. Penetapan kadar air simplisia dan ekstrak

Uji kadar air menggunakan alat moisture balance dengan cara mengambil serbuk simplisia maupun ekstrak sebanyak 3 gram dan dimasukkan ke dalam alat dengan suhu 105°C selama 10 menit, kemudian diukur kadar airnya. Syarat kadar air yang baik ialah tidak lebih dari 10% (Sumiati *et al.*, 2019).

4. Uji kadar abu simplisia

Kadar abu ditetapkan dengan cara menimbang 2-3 gram serbuk simplisia dan dimasukkan ke dalam krus porselin yang sudah dipijar dan ditara lalu diratakan. Pijaran dilakukan perlahan-lahan sampai arang habis dengan suhu 600°C selama 3 jam. Hasil didapat lalu didinginkan dan ditimbang sampai memperoleh bobot tetap (Anggraeni, 2020).

$$\% \text{ kadar abu} = \frac{\text{Berat abu}}{\text{Berat sampel awal}} \times 100\%$$

5. Pembuatan teh kombucha

a. Sterilisasi alat

Alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu hingga bersih dan dikeringkan. Untuk alat gelas dibungkus terlebih dahulu menggunakan kertas kemudian disterilkan menggunakan oven dengan suhu 180°C selama 60 menit (Misna & Diana, 2016). Sedangkan untuk

alat non kaca pyrex menggunakan air mendidih selama 10 menit (Verawati, 2019b).

b. Pembuatan Teh Kombucha Daun Kersen

Didihkan air sebanyak 1 L kemudian diturunkan suhunya hingga 80-90°C, kemudian ditambahkan gula pasir sebanyak 100 mg sambil diaduk hingga larut dan ditambahkan daun kersen sebanyak 20 gram, larutan teh dibiarkan hingga suhu menjadi 22°C, lalu saring seduhan teh daun kersen. Teh daun kersen ditempatkan pada wadah, kemudian ditambahkan *starter* 100 gram dan lapisan scoby sebanyak 50 gram, kemudian bagian atas wadah ditutup dengan *tissue*/kain dan difermentasikan selama 10 hari (Proses fermentasi wadah tidak boleh dipindah dan ditempatkan pada keadaan gelap). Proses menghentikan fermentasi, kultur yang terbentuk di permukaan teh diambil dan ditempatkan pada wadah yang berbeda, kemudian larutan teh kombucha daun kersen dimasukkan ke dalam lemari es (Rosida *et al.*, 2021).

6. Pembuatan Ekstrak Daun Kersen

Ditimbang serbuk simplisia sebanyak 300 gram, kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L rendaman pertama dengan proses maserasi selama 5 hari, kemudian disaring menggunakan kertas saring sehingga didapatkan filtrat pertama dan residu. Residu dimaserasi kembali selama 2 hari dengan etanol 96% sebanyak 750 mL, kemudian disaring sehingga didapatkan filtrat yang ke dua. Hasil filtrat pertama dan kedua dijadikan satu, kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator

dengan suhu 60°C sehingga didapatkan ekstrak kental (Pambudi *et al.*, 2021).

7. Pembuatan Teh Daun Kersen

Dididihkan air sebanyak sebanyak 1 L kemudian diturunkan suhunya hingga 80-90°C dan ditambahkan gula pasir sebanyak 100 mg sambil diaduk hingga larut, selanjutnya ditambahkan daun kersen kering sebanyak 20 gram, lalu saring seduhan teh daun kersen. Teh daun kersen ditempatkan pada wadah.

8. Pengujian Bebas Etanol

Ekstrak daun kersen diambil sebanyak 1 gram lalu ditambahkan 1 mL kalium dikromat dan 2 tetes H₂SO₄ pekat, Hasil positif etanol ditandai dengan perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan (Adiningsih *et al.*, 2021).

9. Perhitungan Nilai Rendemen Ekstrak

Perhitungan rendemen merupakan presentase antara bagian yang dapat terekstrak dengan bahan mentah. Besar rendemen dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut: (Verawati, 2019b).

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (gram)}}{\text{Berat sampel awal (gram)}} \times 100\%$$

10. Parameter spesifik teh kombucha dan ekstrak daun kersen

a. Organoleptis teh kombucha dan ekstrak daun kersen

Organoleptis pada teh kombucha daun kersen meliputi warna, aroma dan rasa (Prastiwi, 2020). Sedangkan pada ekstrak daun kersen meliputi bentuk, bau dan warna (Sari *et al.*, 2016).

b. Skrining Fitokimia

1) Skrining Fitokimia Pada Teh kombucha Daun Kersen

a) Uji Flavonoid

Sampel diambil sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes etanol 96% kemudian diuapkan hingga kering. ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 10 mL HCl. Apabila terjadi suatu perubahan warna merah maka mengandung flavonoid (Cholidah *et al.*, 2020).

b) Uji Tanin

Sampel diambil sebanyak 5 ml kemudian ditetes dengan FeCl_3 1%. Apabila terjadi suatu perubahan dengan munculnya warna biru kehitaman atau hijau kecokelatan maka mengandung tanin (Yuningtyas *et al.*, 2021).

c) Uji Saponin

Sampel diambil sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutal HCl 2N sebanyak 5 mL. larutan didinginkan dan dikocok dengan kuat selama 30 detik. Apabila terbentuk busa yang tidak hilang selama 30 detik menyatakan bahwa adanya saponin (Cholidah *et al.*, 2020).

d) Uji Alkaloid

Sampel diambil sebanyak 5 ml dan ditambahkan 1 ml HCl 2N lalu ditambahkan 10 ml air, campur dan panaskan dengan penangas selama 2 menit, didinginkan dan disaring

kemudian dibagi menjadi 2 bagian dan dimasukkan kedalam 2 tabung reaksi. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih pada pereaksi Mayer dan warna merah jingga pada pereaksi Dragendorff (Yuningtyas *et al.*, 2021).

e) Uji Fenol

Sampel diambil 3 ml dan ditambahkan aquadest panas kemudian didinginkan pada suhu ruang. Setelah dingin ditambahkan 5 tetes larutan NaCl 10% dan 3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan adanya perubahan warna menjadi warna hitam kebiruan/ hijau (Cholidah *et al.*, 2020).

2) Skrining Fitokimia Pada Ekstrak Daun Kersen

a) Uji Flavonoid

Ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura*) ditimbang sebanyak 0,5 gram, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dalam 1 mL etanol 96%, kemudian ditambahkan serbuk magnesium (Mg) sebanyak 0,1 gram dan 10 mL asam klorida (HCl) pekat. Jika terjadi suatu perubahan warna merah jingga atau merah ungu pada hasil reaksi, sampel menunjukkan bahwa mengandung senyawa flavonoid (Vonna *et al.*, 2021).

b) Uji Tanin

Ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura*) sebanyak 0,5 gram dan diencerkan dengan aquades hingga tidak

berwarna, kemudian diambil 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 10%. Jika terjadi suatu perubahan warna biru atau hijau pada hasil reaksi, sampel menunjukkan bahwa mengandung senyawa tanin (Vonna *et al.*, 2021).

c) Uji Saponin

Ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura*) ditimbang sebanyak 0,5 gram, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas, kemudian didinginkan dan kocok dengan kuat selama 10 detik, akan terbentuk buih selama 10 menit dan setinggi 1-10 cm. Jika buih tidak hilang saat penambahan 1 tetes HCl 2N maka sampel dinyatakan mengandung senyawa saponin (Vonna *et al.*, 2021)

d) Uji Alkoloid

Diambil sampel sebanyak 500 mg ditambahkan 1 ml HCl 2N dan aquadest 9 ml kemudian dipanaskan selama 2 menit. didinginkan dan disaring, kemudian dibagi menjadi 2 tabung reaksi masing-masing ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer dan dragendrof. Hasil menunjukkan hasil positif jika pereaksi mayer ada endapan putih/kuning dan pereaksi dragendrof ada endapan kuning jingga (Vonna *et al.*, 2021).

e) Uji Fenol

Diambil 100 mg ekstrak daun kersen dilarutkan dalam etanol 96% dan ditambahkan 5 ml aquadest, kemudian disaring dan dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 5 tetes FeCl_3 1%. Jika berwarna biru/biru hitam menunjukkan hasil positif senyawa fenol (Puspitasari & Wulandari, 2017).

11. Uji Penetapan kadar flavonoid

a. Pembuatan pereaksi AlCl_3 10%

Diambil dan timbang 1 gram AlCl_3 dan dilarutkan dengan aquadest hingga tanda batas labu ukur 10 ml.

b. Pembuatan larutan asam asetat 5%

Diambil 5 ml asam asetat dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 100 ml (Kumalasari *et al.*, 2018).

c. Pembuatan larutan blanko

Diambil etanol p.a sebanyak 2 ml, 0,1 AlCl_3 10% 0,1 ml dan asam asetat 5% 0,1 ml, kemudian ditambahkan aquades pada labu ukur 10 ml sampai tanda batas (Supriningrum *et al.*, 2017).

d. Pembuatan larutan baku kuersetin

Diambil dan timbang serbuk kuersetin sebanyak 25 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a sebanyak 25ml dapatkan konsentrasi 1000 ppm.

e. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Diambil larutan kuersetin 1000 ppm sebanyak 1 ml, diencerkan dengan etanol p.a sebanyak 10 ml didapatkan 100 ppm. Kemudian diambil 1 ml larutan standar 1 ml ditambahkan 1 ml AlCl_3 10% kemudian ditambahkan 8 ml larutan asam asetat 5%. Panjang gelombang kuersetin dilakukan dengan cara *running* larutan kuersetin dengan rentang panjang gelombang 400-500 nm (Winahyu *et al.*, 2018).

f. Penentuan operating time kuersetin

Diambil larutan kuersetin 100 ppm sebanyak 1 ml, ditambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml larutan asam asetat 5%. Kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit sampai serapan stabil (Bakti *et al.*, 2017).

g. Penentuan kadar seri kuersetin

Larutan baku kuersetin 1000 ppm diencerkan menjadi seri kadar 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm. Pipet 1 ml larutan standar dari masing konsentrasi kemudian ditambahkan 1 ml aluminium klorida 10%, 8 ml larutan asam asetat. Selanjutnya diinkubasi selama waktu yang ditentukan dan ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan gelombang maksimum (Ramadhani *et al.*, 2020).

h. Penetapan kadar flavonoid total

1) Teh kombucha dan teh daun kersen

Sampel diambil 100 mg dilarutkan dengan aquades 100 ml didapatkan konsentrasi 1000 ppm, kemudian diambil 1 ml, ditambahkan dengan AlCl_3 dan 8 ml larutan asam asetat. Selanjutnya diinkubasi selama waktu yang telah ditentukan dan ukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

2) Ekstrak daun kersen

Ekstrak dibuat dengan larutan konsentrasi 1000 ppm dengan cara mengambil ekstrak sebanyak 25 mg dilarutkan dengan etanol p.a 25 ml, kemudian diambil sebanyak 1 ml, ditambahkan dengan 1 ml AlCl_3 dan 8 ml larutan asam asetat. Selanjutnya diinkubasi selama waktu yang telah ditentukan dan ukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Ramadhani *et al.*, 2020).

12. Pembuatan DPPH

a. Penimbangan

Molaritas DPPH yang dibutuhkan $0,04 \text{ mM} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Berat Molekul DPPH = 394,32 g/mol

Volume larutan = 100 mL

Penimbangan DPPH = Berat Molekul x V. larutan x Molaritas DPPH
 $= 394,32 \text{ g/mol} \times 100 \text{ mL} \times 4 \cdot 10^{-4}$

$$= 15,8 \times 10^{-3} \text{ gram}$$

$$= 15,8 \text{ mg}$$

b. Cara pembuatan larutan DPPH

Ditimbang serbuk DPPH sebanyak 15,8 mg dan dimasukkan kedalam labu takar 100 mL, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 0,04 mM (Andarwati, 2019).

13. Pengujian DPPH

a. Penentuan Panjang Gelombang DPPH

Diambil sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,04 mM dan ditambahkan 4 mL etanol p.a sampai tanda batas labu ukur 5 mL, kemudian diinkubasi selama menit pada tempat yang gelap. Diukur absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Susiloningrum & Sari, 2020).

b. Penentuan Operating Time DPPH

Penentuan *operating time* dengan cara mengambil 2 mL larutan DPPH 0,04 mM dan ditambahkan larutan standar kuersetin 3 ppm sampai tanda batas labu ukur 5 mL. Kemudian larutan tersebut diukur absorbansinya pada gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit sampai serapan stabil (Bakti *et al.*, 2017).

c. Pembuatan larutan blanko

Cara pembuatan larutan blanko dengan cara menambahkan larutan DPPH sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 4 ml etanol p.a ke dalam labu ukur 5 ml. kemudian serapan larutan diukur dengan

spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Susiloningrum & Sari, 2021).

d. Pembuatan kurva baku kuersetin

Kurva baku diawali dengan pembuatan larutan baku kuersetin 1000 ppm dengan cara menimbang sebanyak 25 mg kuersetin kemudian dilarutkan sebanyak 25 mL etanol p.a. Setelah itu larutan baku diencerkan menjadi larutan seri kadar dengan kadar 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm. Sebanyak 1 mL larutan standart DPPH 0,04 mM, ditambahkan 1 ml larutan standar kuersetin kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 5 ml, lalu diinkubasi di tempat yang gelap selama 15 menit, setelah itu pembacaan absorbansi seri kadar menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan gelombang maksimum (Susiloningrum & Sari, 2021).

14. Pengujian aktivitas antioksidan teh kombucha dan ekstrak daun kersen

a. Teh kombucha Daun Kersen

Larutan teh kombucha diambil sebanyak 100 mg dilarutkan dengan aquades sebanyak 100 mL didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian larutan teh kombucha daun kersen diencerkan menjadi seri kadar 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm. Setelah itu larutan teh kombucha pada setiap konsentrasi diambil 1 mL dan ditambahkan 1 mL DPPH 0,04 mM lalu ditambahkan 3 mL aquades dikocok hingga homogen. Pengujian dilakukan dengan cara memipet 1 mL larutan dengan berbagai konsentrasi, kemudian diinkubasi di tempat yang gelap

selama beberapa menit, setelah itu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan gelombang maksimum.

b. Ekstrak Daun kersen

Ekstrak daun kersen diambil sebanyak 25 mg dilarutkan 25 mL etanol sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Larutan ekstrak daun kersen diencerkan dengan berbagai seri kadar 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm. Masing-masing konsentrasi pada setiap konsentrasi diambil 1 mL dimasukkan kedalam labu ukur, lalu ditambahkan 1 mL DPPH 0,04 mM dan ditambahkan etanol p.a pada labu ukur 5 ml, kemudian diinkubasi selama menit tertentu. Kemudian masing-masing kadar seri konsentrasi diukur nilai absorbansinya pada gelombang maksimum (Pambudi *et al.*, 2021).

c. Teh Daun Kersen Tanpa Kombucha

Larutan teh diambil sebanyak 100 mg dilarutkan dengan aquades sebanyak 100 ml, kemudian larutan teh diencerkan menjadi seri kadar 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm, setelah itu pada setiap konsentrasi diambil 1 ml dan ditambahkan 1 ml DPPH 0,04 mM lalu ditambahkan aquades 3 ml dikocok hingga homogen. Pengujian dilakukan dengan cara memipet 1 ml larutan dengan berbagai konsentrasi, kemudian diinkubasi di tempat yang gelap selama beberapa menit, setelah itu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan gelombang maksimum.

G. Analisis Data

Untuk mengetahui perhitungan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan menggunakan persamaan regresi linier $y = a + bx$, konsentrasi sampel sebagai sumbu (x) dan % inhibisi sebagai sumbu (y) (Aminah *et al.*, 2016). Analisis data yang diperoleh dari uji flavonoid total dan uji aktivitas antioksidan teh kombucha dan ekstrak daun kersen dianalisis menggunakan program SPSS dengan uji *oneway* ANOVA. Namun, langkah pertama yang dilakukan ialah uji normalitas terlebih dahulu untuk mengetahui data yang diperoleh telah berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena sampel kurang dari 50, suatu data yang dikatakan berdistribusi normal dengan nilai signifikan $>0,05$ (Suardi, 2019).