

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan kali ini yaitu dengan model penelitian eksperimental. Penelitian eksperimental yang dilakukan yaitu secara kualitatif dan kuantitatif. Penelitian diawali dengan pembuatan teh dan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis L.*) untuk dilakukan skrining fitokimia agar diketahui metabolit sekunder yang ada pada daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis L.*). Tahap selanjutnya, dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dengan metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazyl*). Parameter yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada pembuatan teh dan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis L.*) dengan metode DPPH yaitu berdasarkan nilai IC₅₀.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan simplisia dan pengujian standarisasi simplisia dilakukan di tempat tinggal dan Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.

3. Skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
4. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
5. Teh daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) diproduksi di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
6. Uji antioksidan dengan metode DPPH dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.

C. Definisi Operasional

1. Skrining fitokimia merupakan penentuan kandungan zat aktif yang terdapat pada ekstrak dan teh daun pecut kuda.
2. Panjang gelombang maksimum merupakan nilai panjang gelombang yang memiliki nilai absorbansi tertinggi pada DPPH.
3. Nilai IC_{50} adalah nilai yang menunjukkan kemampuan aktivitas antioksidan suatu senyawa dalam menangkap radikal bebas dan menghambat terjadinya oksidasi.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Independen (Bebas)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah teh dan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.).

2. Variabel Dependen (Terikat)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kandungan metabolit, kadar flavonoid, dan nilai IC₅₀ sebagai parameter aktivitas antioksidan ekstrak dan teh daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.).

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah suhu, waktu, dan metode pengeringan.

E. Pengumpulan Data

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *blander*, kertas saring whatman 42, *moisture analyzer* (Ohaus), tabung reaksi, rak tabung, pipet tetes, pipet ukur, bunsen, *beaker glass* (Iwaki Pyrex), labu takar (Iwaki Pyrex),, timbangan analitik (Excellent), ayakan, gelas ukur, toples kaca, batang pengaduk, *aluminium foil*, cawan porselen, spatula, corong, oven (Binder ED 56), pot, kertas label, *waterbath* (Mettler), *rotary evaporator* (RE 2000E), krus porselen, *muffle furnace* (Thermo Scientific), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800) dan alat – alat gelas lainnya.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) yang diperoleh dari daerah Ungaran Timur, aquades, etanol 70%, etanol p.a, HCl 2N, kloroform, ammonia,

pereaksi Mayer dan Dragendorff, serbuk Magnesium (Mg), FeCl_3 , HCl pekat, CH_3COOH glasial, AlCl_3 , H_2SO_4 pekat, FeCl_3 , DPPH, dan Kuersetin.

3. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Semarang.

4. Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Pecut Kuda

a. Pengumpulan bahan baku

Pada tahap ini dilakukan pemanenan di daerah Ungaran Timur. Daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) yang dipanen yaitu daun yang masih segar dan berwarna hijau.

b. Sortasi Basah

Sortasi basah dilakukan dengan cara memisahkan bagian daun dari bagian tanaman yang tidak diinginkan serta menghilangkan kotoran atau bahan asing pada daun.

c. Pencucian

Pencucian dilakukan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun agar diperoleh daun yang bersih.

d. Perajangan

Pada tahap ini daun dipotong-potong menjadi beberapa bagian kecil agar mempermudah proses pengeringan.

e. Pengerinan

Pengerinan dilakukan dengan 2 perlakuan yaitu menggunakan oven suhu 40°C dan pengerinan menggunakan sinar matahari tidak langsung tidak langsung. Pengerinan dilakukan hingga mencapai hasil nilai kadar air kurang dari 10%.

f. Sortasi kering

Sortasi kering dilakukan dengan cara memisahkan bahan asing yang diperoleh dari proses pengerinan.

g. Penghalusan

Penghalusan simplisia dilakukan menggunakan mesin *blander* lalu diayak dengan ayakan 40 mesh agar diperoleh serbuk halus.

5. Uji Standarisasi Non-Spesifik Simplisia

a. Uji Kadar Air

Uji kadar air simplisia dilakukan dengan cara menimbang 3 gram simplisia ke dalam alat *moisture analyzer* sebanyak triplo (Hermawati et al., 2023). Selanjutnya jumlah kadar air akan muncul pada alat secara otomatis. Kadar air yang ditetapkan untuk menjaga mutu simplisia adalah $\leq 10\%$ (Wijaya & Noviana, 2022).

b. Uji Kadar Abu Total

Uji kadar abu total simplisia daun pecut kuda dilakukan dengan cara menimbang 2 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam krus lalu dimasukkan kedalam tanur 600°C hingga arang habis. Krus

dinginkan pada suhu ruang dan ditimbang. Perhitungan kadar abu dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Kadar abu total} = \frac{W1-W2}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

W : bobot serbuk simplisia (g)

W1: bobot serbuk simplisia (g)

W2: bobot krus kosong (g)

Syarat nilai kadar abu pada simplisia daun pecut kuda yaitu dengan nilai $\leq 16\%$ (Abdurahman et al., 2022).

6. Pembuatan Ekstrak Daun Pecut Kuda

Serbuk simplisia daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) sebanyak 250 gram dimaserasi dengan cara perendaman serbuk simplisia menggunakan etanol 70% sebanyak 1250 ml selama 5 hari. Pada proses maserasi dilakukan sesekali pengadukan untuk meratakan konsentrasi zat aktif dalam pelarut sehingga dapat mempercepat kontak pelarut dengan serbuk. Maserat hasil maserasi dipisahkan dari pelarut lalu dilakukan remaserasi menggunakan etanol 70% sebanyak 750 ml selama 3 hari (Rante et al., 2020).

Hasil maserat kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C lalu diuapkan menggunakan *waterbath* suhu 60°C untuk menghilangkan pelarut yang digunakan dari proses maserasi (Surtina et al., 2020). Ekstrak yang sudah kental selanjutnya dihitung

persentase rendemennya dengan menggunakan menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat awal simplisia}} \times 100\%$$

Persentase rendemen diperoleh dari hasil perhitungan berat ekstrak dibagi dengan berat awal sampel (berat simplisia) dalam satuan persen (Jumawardi et al., 2021).

7. Uji Standarisasi Non-Spesifik Ekstrak

a. Uji Kadar Air

Penetapan kadar air ekstrak menggunakan alat *moisture analyzer* dengan cara menimbang 1 gram ekstrak kemudian dimasukan dalam lempeng logam, ratakan. Tunggu sampai alat berbunyi yang menandakan analisis sudah selesai (Aini et al., 2023).

b. Uji Kadar Abu

Timbang 2 gram ekstrak masukkan ke dalam krus lalu dimasukan dalam *muffle furnace* dan dipijarkan pada suhu 600°C selama 3 jam, kemudian didinginkan lalu ditimbang sampai diperoleh bobot tetap (Aini et al., 2023).

8. Penyiapan Teh Daun Pecut Kuda

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L) dikemas di dalam *tea bag*. Tahap selanjutnya penyiapan sampel teh daun pecut kuda dilakukan dengan cara

menambahkan aquades yang telah mendidih ke dalam gelas sebanyak 200 ml lalu didiamkan selama 5–15 menit (Susilowati et al., 2023).

9. Uji Standarisasi Spesifik Ekstrak

a. Uji Organoleptis

Pada pengujian organoleptis dilakukan pengamatan secara langsung seperti bentuk, warna, dan bau (Yuliana et al., 2022).

b. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Pecut Kuda

1) Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 ml kloroform secukupnya dan 10 ml amonia lalu ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 . Campuran dikocok dan dibiarkan hingga membentuk 2 lapisan. Lapisan H_2SO_4 dipindahkan dalam 2 tabung reaksi dengan volume masing-masing 2,5 ml. Larutan dalam 2 tabung tersebut diuji dengan pereaksi Mayer dan Dragendorf. Larutan positif alkaloid pada pereaksi Mayer jika terbentuk endapan putih, larutan positif pada pereaksi Dragendorf dengan berubahnya larutan menjadi warna merah jingga (Rante et al., 2020).

2) Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 ml etanol dan dipanaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi. Larutan ditambahkan 10 tetes HCl pekat, kemudian ditambahkan 0,2 gram serbuk Mg. Adanya flavonoid ditandai

dengan perubahan warna larutan menjadi merah coklat (Rante et al., 2020).

3) Fenolik

Identifikasi fenolik dilakukan dengan cara dimasukkan 0,5 g ekstrak daun pecut kuda ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 ml aquades, lalu panaskan sampai mendidih selama 2 menit, dinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 2 tetes larutan FeCl_3 1% akan terbentuk warna hijau atau hitam kehijauan menunjukkan adanya fenolik (Jumawardi et al., 2021).

4) Saponin

Identifikasi saponin dilakukan dengan cara dimasukkan 1 mg ekstrak daun pecut kuda ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 10 ml air dan dikocok kuat-kuat selama 10 menit sampai terbentuk busa. Pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, apabila buih tidak hilang, maka ekstrak positif mengandung saponin (Jumawardi et al., 2021).

5) Steroid dan Triterpenoid

Ditimbang 0,5 gram ekstrak lalu ditambahkan 10 tetes CH_3COOH glasial dan 2 tetes H_2SO_4 pekat. Campuran dikocok perlahan lalu didiamkan selama beberapa menit. Hasil positif triterpenoid jika larutan berubah menjadi warna merah atau ungu. Dan hasil positif

steroid ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi warna biru atau hijau (Rante et al., 2020).

6) Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 10 ml aquades panas lalu ditetaskan FeCl_3 . Adanya tanin ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman (Rante et al., 2020).

c. Uji Kuantitatif Flavonoid

1) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Larutan kuersetin dengan konsentrasi 50 ppm diambil sebanyak 1 ml, ditambahkan dengan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat. Dilakukan pembacaan dengan spektrofotometri Uv-Vis pada rentang panjang gelombang 400-500 nm (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

2) Penentuan *Operating Time*

Larutan kuersetin 50 ppm diambil sebanyak 1 ml, ditambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml larutan asam asetat 5%, selanjutnya dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit sampai serapan stabil (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

3) Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan 1000 ppm dibuat menjadi larutan seri dengan konsentrasi 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, dan 70 ppm (Tri Wahyudi, 2023). Masing-masing konsentrasi diambil 1 ml kemudian

ditambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml larutan asam asetat 5% lalu didiamkan selama waktu optimum. Dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

4) Penentuan Flavonoid Total Teh Daun Pecut Kuda

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia daun pecut kuda ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam kantong teh lalu diseduh dengan 100 ml aquades panas selanjutnya masing-masing dipipet 1 ml untuk analisis total flavonoid (Widarta et al., 2018). Sampel teh yang diambil 1 ml kemudian ditambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml larutan asam asetat 5% lalu didiamkan selama waktu optimum, kemudian dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer Uv- Vis pada panjang gelombang maksimum dan dilakukan 3 kali pengulangan (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

5) Penentuan Flavonoid Total Ekstrak Daun Pecut Kuda

Ekstrak ditimbang sebanyak 40 mg dilarutkan dalam 100 ml etanol pa untuk membuat larutan konsentrasi 4000 ppm. Pipet 1 mL larutan ekstrak, tambahkan 1 mL larutan AlCl_3 10% dan 8 mL CH_3COOH 5%. Sampel didiamkan selama *operating time* dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Elvansi, 2022).

10. Skrining Fitokimia Teh Daun Pecut Kuda

a. Alkaloid

Sebanyak 5 ml teh ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 10 ml aquades, panaskan selama 2 menit lalu didinginkan kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi 2 tabung reaksi. Tabung pertama dimasukkan pereaksi Mayer, pada tabung kedua dimasukkan pereaksi Dragendorf. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih pada pereaksi mayer dan warna merah jingga pada pereaksi Dragendorff (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

b. Flavonoid

Sebanyak 3 ml teh dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes etanol 96% kemudian diuapkan hingga kering. Tambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 10 ml HCl. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi merah (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

c. Fenol

Sebanyak 3 ml teh ditambahkan aquades panas kemudian didinginkan pada suhu ruang. Tambahkan 5 tetes larutan NaCl 10% dan 3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan adanya perubahan warna menjadi warna hitam kebiruan/ hijau (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

d. Saponin

Sampel teh dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml kemudian dikocok dengan kuat. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil (Yuningtyas et al., 2021).

e. Steroid dan Triterpenoid

Sebanyak 5 ml teh diuapkan dalam cawan penguap. Residu dilarutkan dengan 0,5 ml kloroform, ditambahkan 0,5 ml asam asetat anhidrat, dan 2 ml H₂SO₄ pekat. Hasil yang ditandai dengan terbentuknya cincin cokelat atau ungu pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Yuningtyas et al., 2021).

f. Tanin

Sebanyak 5 ml teh diberi beberapa tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru kehitaman atau hijau kecoklatan (Yuningtyas et al., 2021).

11. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan larutan baku DPPH 40 ppm

Sebanyak 4 mg serbuk DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam etanol p.a. ke dalam labu ukur berukuran 100 ml. Pelarut etanol p.a. ditambahkan ke dalam labu ukur hingga mencapai tanda batas 100 ml dan dikocokkan hingga homogen menjadi larutan DPPH dengan konsentrasi 40 ppm (Damanis et al., 2020).

b. Pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH

Sebanyak 3 ml larutan baku DPPH 40 ppm ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml etanol p.a ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan DPPH. Inkubasikan larutan dalam ruangan gelap selama 30 menit agar reaksi antara DPPH dan etanol dapat mencapai kesetimbangan. Tahap selanjutnya, setelah larutan diinkubasi maka dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Larutan blanko digunakan etanol p.a tanpa larutan DPPH (Jumawardi et al., 2021). Panjang gelombang maksimal DPPH yaitu 517 nm (Rante et al., 2020).

c. Pengukuran absorbansi blanko DPPH

Sebanyak 3 ml larutan DPPH 40 ppm dan 1 ml etanol p.a. dicampurkan. Larutan blanko yang digunakan yaitu etanol p.a. tanpa larutan DPPH. Baca absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimal yang telah ditentukan (Jumawardi et al., 2021).

d. Penentuan *operating time*

Setelah larutan DPPH 40 ppm dihomogenisasi, sebanyak 3 ml larutan DPPH 40 ppm dan 1 ml etanol p.a. dicampurkan. Serapan larutan diukur pada panjang gelombang maksimal yang telah ditentukan sampai tanda 60 menit, kemudian dilakukan pengamatan untuk menentukan kapan larutan menghasilkan serapan yang stabil untuk menentukan *operating time* (Sirait et al., 2023).

e. Pengukuran aktivitas antioksidan kuersetin

Serangkaian larutan seri kuersetin dibuat dengan mengencerkan larutan kuersetin konsentrasi 1000 ppm menjadi konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 ppm. Larutan kuersetin 1000 ppm dibuat dengan menimbang 10 mg kuersetin lalu dilarutkan ke dalam 10 ml etanol p.a. dan dihomogenkan. (Tri Wahyudi, 2023). Tahap selanjutnya masing-masing seri konsentrasi dipipet sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 3 mL DPPH 40 ppm selanjutnya diukur absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali (Jumawardi et al., 2021).

f. Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak daun pecut kuda

Ditimbang 10 mg ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) kemudian dilarutkan dengan etanol p.a lalu ditambahkan hingga tanda batas labu takar 10 ml. Diperoleh larutan stok konsentrasi 1000 ppm untuk dibuat menjadi larutan seri konsentrasi 120 ppm, 100 ppm, 80 ppm, 60 ppm, 40 ppm, dan 20 ppm (Rante et al., 2020). Masing-masing seri konsentrasi dipipet 1 mL kemudian ditambahkan 3 mL DPPH 40 ppm lalu dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Setiabudi et al., 2020). Pengukuran direplikasi sebanyak 3 kali.

g. Pengukuran aktivitas antioksidan teh daun pecut kuda

Sampel teh dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm dengan cara menimbang 100 mg teh dan dimasukkan ke dalam kantong the

kemudian ditunggu hingga suhu menurun atau suhu ruang. Tahap selanjutnya ditambahkan aquades panas 100 ml kemudian diencerkan dengan konsentrasi 150 ppm, 100 ppm, 80 ppm, 60 ppm, 40 ppm, dan 20 ppm. Masing-masing konsentrasi diambil 1 ml, lalu ditambahkan 3 ml larutan DPPH kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran direplikasi sebanyak 3 kali (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

F. Pegolahan Data

Data hasil penelitian diolah dalam bentuk tabel dan grafik. Analisis data dilakukan dengan analisis regresi linier menggunakan aplikasi perhitungan *Microsoft Excel* untuk menghitung nilai IC₅₀.

G. Analisis Data

Data dari absorbansi yang didapatkan selanjutnya dihitung nilai IC₅₀ teh herbal dan ekstrak daun pecut kuda serta kuersetin terhadap radikal bebas DPPH dengan rumus :

$$X (IC_{50}) = \frac{50 - a}{b} \times 100\%$$

Dimana x = konsentrasi (ppm) dan y = persentase inhibisi (%). Nilai IC₅₀ didapatkan dari nilai x setelah mengganti y = 50. Dari hasil perhitungan tersebut dapat ditentukan kategori kekuatan aktivitas antioksidan sampel teh dan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis L.*). Hasil uji aktivitas antioksidan selanjutnya dilakukan analisis perbedaan antara teh dan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis L.*). menggunakan

aplikasi SPSS agar diketahui apakah ada perbedaan yang signifikan antara aktivitas antioksidan teh dan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis L.*).