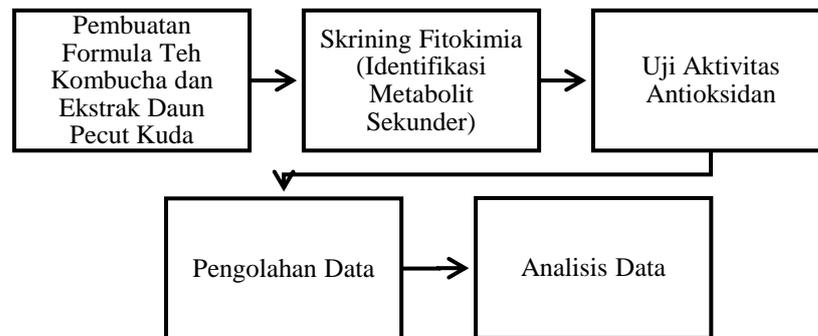


## BAB III METODE PENELITIAN

### A. Desain Penelitian

Penelitian menggunakan model eksperimen dengan menggunakan analisis kualitatif dan kuantitatif. Penelitian dimulai dengan pembuatan teh kombucha dan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) untuk dilakukan skrining fitokimia, dengan tujuan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang ada pada sampel. Selanjutnya, dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode ABTS. Indikator yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan dalam teh kombucha daun pecut kuda dan ekstrak dengan metode ABTS (*2,2-azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid*) didasarkan pada nilai  $IC_{50}$ .

Tahapan pengambilan dan pengolahan data dalam penelitian ini ditampilkan pada gambar desain penelitian berikut:



**Gambar 3. 1. Desain Penelitian**

### B. Lokasi Penelitian

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

2. Pembuatan simplisia dan pengujian standarisasi dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji Skrining fitokimia dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
4. Proses pembuatan ekstrak dilakukan di rumah serta Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
5. Pembuatan teh kombucha dari daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) dilakukan di rumah.
6. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS dilakukan di Laboratorium Instrumen, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.

### **C. Definisi Operasional**

1. Teh kombucha daun pecut kuda minuman hasil fermentasi dari ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) menggunakan kultur simbiotik bakteri dan ragi (SCOBY) selama 8 hari.
2. Ekstrak daun pecut kuda diperoleh dari daun pecut kuda melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%
3. Skrining fitokimia dan diuji kadar flavonoid, fenolik total, dan nilai IC<sub>50</sub> sebagai indikator aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS.
4. Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa dalam menangkal atau meredam radikal bebas, yang diukur menggunakan metode ABTS dengan parameter IC<sub>50</sub> (*Inhibition Concentration 50*), yaitu konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal ABTS

5. Nilai  $IC_{50}$  menggambarkan seberapa efektif suatu senyawa dalam menangkap radikal bebas dan menghambat oksidasi, yang mengindikasikan aktivitas antioksidan senyawa tersebut.

#### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel Independen (Bebas)

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini meliputi formula teh kombucha dan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.).

2. Variabel Dependen (Terikat)

Variabel terikat dalam penelitian ini mencakup nilai  $IC_{50}$ , yang digunakan sebagai parameter untuk mengukur aktivitas antioksidan pada teh kombucha dan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.).

3. Variabel terkontrol

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

#### **E. Pengumpulan Data**

##### **1. Alat Penelitian**

Peralatan yang digunakan pada penelitian meliputi blender, tabung reaksi, rak tabung, pipet tetes, pipet ukur, kertas saring Whatman 42, moisture analyzer (Ohaus), gelas beaker (Iwaki Pyrex), labu takar (Iwaki Pyrex), timbangan analitik (Excellent), ayakan, toples kaca, gelas ukur,

batang pengaduk, aluminium foil, spatula, cawan porselen, corong, oven (Binder ED 56), pot, *waterbath* (Memmert), rotary evaporator (RE 2000E), krus porselen, *muffle furnace* (Thermo Scientific), kertas label, kertas saring, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), serta 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 Barat, air, gula pasir, starter kombucha, SCOBY, etanol 96%, HCl, kloroform, serbuk magnesium, larutan FeCl<sub>3</sub> 1%, CH<sub>3</sub>COOH glasial, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, pereaksi Dragendorff dan Mayer, larutan AlCl<sub>3</sub> 10%, pereaksi Liebermann-Burchard, pereaksi *Folin-Ciocalteu* (Merck), larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5% (Merck), larutan standar kuersetin, asam galat (Merck), serbuk ABTS (Sigma), kalium persulfate (Merck), dan Etanol p.a.

## **3. Determinasi Tanaman**

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

## **4. Pembuatan Serbuk Simplisia**

Proses pembuatan simplisia sesuai standar CPOTB meliputi pengumpulan bahan baku, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, pengepakan, dan penyimpanan.

a. Pengumpulan bahan baku

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

b. Sortasi Basah

Pada tahap sortasi basah, daun dipisahkan dari bagian tanaman yang tidak diperlukan dan dibersihkan dari kotoran serta bahan asing yang menempel.

c. Pencucian

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

d. Perajangan

Daun dipotong menjadi potongan kecil agar proses pengeringan menjadi lebih mudah.

e. Pengeringan

Pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga kadar air daun  $\leq 10\%$ .

f. Sortasi Kering

Sortasi kering dilakukan dengan memisahkan bahan asing yang dihasilkan dari proses pengeringan.

g. Penghalusan

Simplisia dihaluskan menggunakan blender dan kemudian diayak dengan ayakan 40 mesh untuk mendapatkan serbuk yang lebih halus.

**5. Uji Standarisasi Non Spesifik Simplisia dan Ekstrak**

Uji standarisasi non-spesifik dilakukan dengan mengukur kadar air dan abu total untuk memastikan kualitas dan kandungan mineral yang sesuai.

a. Uji Kadar Air

Penetapan kadar air ditentukan dengan menimbang serbuk dan ekstrak daun pecut kuda sebanyak 3 gram pada lempeng logam alat moisture analyzer, kemudian alat akan menunjukkan hasil kadar air secara otomatis (Aini *et al.*, 2023). Dilakukan tiga kali replikasi (triplo) untuk memperoleh hasil yang lebih akurat. Syarat kadar air untuk simplisia yang baik adalah  $\leq 10\%$  (BPOM RI, 2019).

b. Uji Kadar Abu Total

Penentuan kadar abu dilakukan dengan cara menimbang 2 gram serbuk daun pecut kuda yang kemudian dimasukkan ke dalam krus, dipanaskan dalam tanur *muffle* pada suhu  $600^{\circ}\text{C}$  selama 3 jam hingga terbentuk abu. Krus didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh berat konstan (Aini *et al.*, 2023). Kemudian, kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji (%b/b). Syarat kadar abu untuk simplisia adalah  $\leq 16\%$  (Abdurahman *et al.*, 2022). Perhitungan kadar abu dihitung menggunakan persamaan 1:

$$Kadar\ abu = \frac{w1 - w2}{w} \times 100\%$$

**Keterangan:**

W : bobot serbuk simplisia (g)

W1 : bobot serbuk simplisia (g)

W2 : bobot krus kosong (g)

## 6. Penyiapan Formula Teh Kombucha Daun Pecut Kuda

Formula Teh Kombucha Daun Pecut Kuda menurut Putri *et al.*, (2023) dapat dilihat pada Tabel 3.1.

**Tabel 3. 1. Formula Teh Kombucha Daun Pecut Kuda**

Bahan	Jumlah
Daun Pecut Kuda	13 g
Starter Kombucha dan SCOBY	200 mL
Gula pasir	100 g
Air ad	1000 mL

Pembuatan kombucha daun pecut kuda dimulai dengan menyeduh 13 g daun pecut kuda dalam air mendidih selama 5-10 menit, kemudian disaring untuk memisahkan daun dan air. Teh kombucha yang telah disaring dimasukkan ke dalam stoples kaca dan didiamkan hingga mencapai suhu ruangan. Gula pasir sebanyak 100 g ditambahkan dan diaduk hingga larut dan ditambahkan SCOBY diameter ±9 cm beserta 200 mL starternya. Teh kombucha dalam toples kaca ditutup dengan kain bersih agar udara bisa masuk, namun tetap terlindung dari kotoran dan serangga. Fermentasi dilakukan di tempat sejuk dan gelap selama 8 hari.

## 7. Skrinning Fitokimia Teh Kombucha Daun Pecut Kuda

### a. Alkaloid

Dalam masing-masing dua tabung reaksi, 5 mL teh ditambahkan dengan 0,2 mL HCl 2 N. Tabung 1 mengandung 1 mL reagen Mayer dan tabung 2 mengandung 1 mL reagen Dragendorff. Jika terbentuk endapan berwarna putih atau kuning pada reagen Mayer dan endapan berwarna jingga pada reagen Dragendorff, ekstrak dinyatakan positif mengandung alkaloid (Maulidia *et al.*, 2021).

### b. Flavonoid

Sebanyak 3 mL teh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,2 g magnesium dan 5-10 tetes HCl pekat. Ekstrak dinyatakan positif mengandung flavonol jika terjadi perubahan warna kuning jingga, merah muda, hingga merah tua (Maulidia *et al.*, 2021).

### c. Fenolik

Sebanyak 3 mL teh ditambahkan 3–4 tetes  $\text{FeCl}_3$ . Perubahan warna menjadi hitam kebiruan hingga hitam pekat menunjukkan adanya kandungan fenol (Septia Ningsih *et al.*, 2020).

### d. Saponin

Sebanyak 3 mL teh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok kuat. Jika busa yang terbentuk stabil, maka sampel mengandung saponin (Yuningtyas *et al.*, 2021).

### e. Steroid dan Triterpenoid

Sebanyak 3 mL teh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL kloroform dan 3 mL asam sulfat pekat. Ekstrak

dikatakan positif mengandung terpenoid jika terbentuk cincin kuning pada antarmuka dua cairan yang berubah menjadi coklat kemerahan setelah dua menit. Jika terbentuk warna merah, maka ekstrak positif mengandung steroid (Maulidia *et al*, 2021).

f. Tanin

Sebanyak 3 mL teh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 mL larutan FeCl<sub>3</sub> 5% (b/v). Ekstrak dikatakan positif mengandung tanin jika terbentuk warna hijau tua (Maulidia *et al*, 2021).

## 8. Pembuatan Ekstrak Daun Pecut Kuda

Serbuk simplisia daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) dimaserasi menggunakan pelarut dengan ratio 1:5 sebanyak 150 g dicampurkan dengan 750 mL etanol 96%. Campuran diaduk dua kali sehari selama lima hari menggunakan batang pengaduk. Maserat dipisahkan dan diremaserasi menggunakan etanol 96 dengan ratio 1:3 sebanyak 450 mL selama 3 hari (Rante *et al.*, 2020). Wadah diletakkan di tempat yang tidak terpapar langsung oleh sinar matahari, kemudian disaring untuk memperoleh filtrat. Filtrat yang dihasilkan mengalami evaporasi menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C untuk menguapkan pelarut dan diuapkan pada *waterbath* hingga menghasilkan ekstrak kental daun pecut kuda (Jumawardi *et al.*, 2021). Ekstrak yang sudah kental selanjutnya dihitung persentase rendemennya dengan menggunakan persamaan 2:

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat serbuk simplisia}} \times 100\%$$

## 9. Uji Standarisasi Spesifik Ekstrak

### a. Uji Organoleptik

Uji organoleptik, pengamatan langsung dilakukan menggunakan lima indra seperti bentuk, warna, dan bau (Larasati *et al.*, 2020)

### b. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Pecut Kuda

#### 1) Alkaloid

Sebanyak 0,5 g ekstrak dicampur dengan 5 mL kloroform, lalu diaduk. Selanjutnya, 1 mL HCl 2N ditambahkan, dikocok, dan didiamkan. Lapisan yang terbentuk diuji dengan pereaksi Dragendorff dan Mayer. Hasil positif alkaloid ditunjukkan oleh endapan kuning jingga, jingga, atau merah dengan pereaksi Dragendorff, serta endapan putih dengan pereaksi Mayer (Aini *et al.*, 2023).

#### 2) Flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 mL etanol dan dipanaskan selama 5 menit. Setelah itu, 10 tetes HCl pekat dan 0,2 g serbuk Mg ditambahkan. Kehadiran flavonoid ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah coklat (Rante *et al.*, 2020).

#### 3) Fenolik

Sebanyak 0,5 g ekstrak daun ekor kuda dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 mL air suling dan dipanaskan hingga mendidih selama 2 menit. Setelah didiamkan dan

disaring, filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Kehadiran fenolik ditandai dengan terbentuknya warna hijau atau hitam kehijauan (Jumawardi *et al.*, 2021).

#### 4) Saponin

Sebanyak 1 mg ekstrak daun pecut kuda dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan 10 mL air. Selama sepuluh menit, kocok dengan kuat hingga terbentuk busa. Jika buih tetap ada setelah penambahan satu tetes HCl 2 N, ekstrak dianggap positif mengandung saponin (Jumawardi *et al.*, 2021).

#### 5) Steroid dan Triterpenoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun pecut kuda, ditambahkan 10 tetes  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial dan 2 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Kocok bahan dengan kecepatan rendah. Tunggu selama beberapa menit. Jika larutan berubah menjadi merah atau ungu, itu menunjukkan adanya triterpenoid; jika berubah menjadi biru atau hijau, itu menunjukkan adanya steroid (Rante *et al.*, 2020).

#### 6) Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun pecut kuda dimasukkan dalam 10 mL aquades panas,  $\text{FeCl}_3$  diteteskan. Perubahan warna menjadi hijau kehitaman adalah tanda adanya tanin (Rante *et al.*, 2020).

c. Uji Kuantitatif Flavonoid

1) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Sebanyak 1 mL larutan kuersetin dengan konsentrasi 50 ppm diambil, ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 ml asam asetat. Pembacaan dilakukan menggunakan spektrofotometri Uv-Vis pada rentang panjang gelombang 728–770 nm (Rusita *et al.*, 2024).

2) Penentuan *Operating Time*

Sebanyak 1 mL larutan kuersetin dengan konsentrasi 50 ppm diambil dan ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL larutan asam asetat 5%. Pembacaan absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu satu menit sampai serapan stabil (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

3) Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan 1000 ppm diencerkan menjadi larutan seri dengan konsentrasi 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, dan 90 ppm masing-masing sebanyak 1 mL. Kemudian, 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL larutan asam asetat 5% ditambahkan, dan kemudian didiamkan selama waktu yang optimum. Untuk mengukur absorbansi, digunakan spektrofotometer Uv-Vis dengan panjang gelombang maksimum (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

4) Penentuan Flavonoid Total Teh Kombucha Daun Pecut Kuda

Sebanyak 1 mL sampel teh kombucha diambil, ditambahkan 1 ml  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL larutan asam asetat 5%, dan kemudian didiamkan selama waktu yang optimum. Untuk mengukur

absorbansi, spektrofotometer UV-Vis digunakan dengan panjang gelombang maksimum dan pengulangan tiga kali (Elvansi & Vifta, 2022).

#### 5) Penentuan Flavonoid Total Ekstrak Daun Pecut Kuda

Ekstrak ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a untuk membuat larutan konsentrasi 1000 ppm. Pipet 1 mL larutan ekstrak, tambahkan 1 mL larutan  $AlCl_3$  10%, dan 8 mL asam asetat glasial 5%. Sampel dibiarkan selama periode waktu yang optimum. Untuk mengukur absorbansi, spektrofotometer UV-Vis digunakan dengan panjang gelombang maksimum (Nintiasari & Ramadhani, 2022).

#### d. Uji Kuantitatif Fenolik

##### 1) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Sebanyak 0,3 mL larutan asam galat dengan konsentrasi 40 ppm dicampur dengan 1,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* (dengan perbandingan 1:10), lalu dikocok dan dibiarkan selama 3 menit. Selanjutnya, 1,2 mL larutan  $Na_2CO_3$  7,5 % ditambahkan, dan dikocok hingga homogen. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 750-850 nm (Ramadhani *et al.*, 2020).

##### 2) Penentuan *Operating Time*

Sebanyak 0,3 mL larutan asam galat dengan konsentrasi 40 ppm dicampur dengan 1,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* (1:10), kemudian dikocok dan dibiarkan selama 3 menit. Selanjutnya, 1,2 ml larutan  $Na_2CO_3$  7,5% ditambahkan, dan dikocok hingga

homogen. Absorbensi diukur dalam waktu 0 hingga 90 menit dengan panjang gelombang maksimum (M. A. Ramadhani et al., 2020).

### 3) Penentuan Kurva Baku Asam Galat

Sebanyak 0,3 mL larutan asam galat dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* (1:10) dan dikocok. Setelah didiamkan selama 3 menit, masing-masing larutan ditambahkan 1,2 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5%, dikocok hingga homogen, dan didiamkan pada *range operating time* pada suhu kamar. Absorbansi semua larutan diukur pada panjang gelombang maksimum, kemudian dibuat kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi asam galat (ppm) dan absorbansi (M. A. Ramadhani et al., 2020).

### 4) Penentuan Fenolik Total Teh Kombucha Daun Pecut Kuda

Sebanyak 1 mL larutan sampel kombucha dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu*. Selanjutnya, ditambahkan 4 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7%, dan dihomogenkan. Didiamkan selama 8 menit untuk mengukur absorbansi larutan ekstrak, digunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang absorbansi maksimum (Rosyada et al., 2023).

### 5) Penentuan Fenolik Total Ekstrak Daun Pecut Kuda

Larutan ekstrak (1000 ppm) dibuat dengan menimbang 10 mg ekstrak daun pecut kudak dalam 10 mL etanol p.a. Larutan

ekstrak diipipet sebanyak 0,3 mL dan ditambahkan 1,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* (1:10), kemudian dikocok. Setelah didiamkan selama 3 menit, ditambahkan 1,2 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% dan didiamkan kembali pada *range operating time* di suhu kamar. Absorbansi larutan ekstrak diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang absorbansi maksimum (M. A. Ramadhani et al., 2020).

## 10. Uji Aktivitas Antioksidan

### Metode ABTS

#### 1) Pembuatan Larutan Stok ABTS

Sebanyak 38,4 mg ABTS dan 6,6 mg  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  dilarutkan dalam 10 mL aquades. Kedua larutan dicampur dan diinkubasi selama 16 jam di ruang gelap hingga berwarna biru-hijau (Y. D. Putri *et al.*, 2024)

#### 2) Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum

Untuk mengukur larutan ABTS, pipet 1 mL dan tambahkan 5 mL etanol pa. Selanjutnya, pengukuran dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 650-800 nm (Azizah, 2023).

#### 3) Penentuan *Operating Time*

Larutan standar kuersetin 15 ppm diambil 0,1 mL dan ditambahkan 2 mL larutan stok ABTS. Absorbansi larutan diukur

pada panjang gelombang maksimum selama 1 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Erma *et al.*, 2022).

#### 4) Pengukuran Aktivitas Antioksidan Dengan Baku Pembanding

Larutan standar kuersetin dibuat dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Masing-masing larutan diambil 1 mL dan dirambahkan 2 mL larutan stok ABTS. Larutan diinkubasi selama operasi waktu dan diukur menggunakan spektrofotometri UV-VIS dengan panjang gelombang maksimum (Erma *et al.*, 2022).

#### 5) Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun

Larutan induk ekstrak dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm, kemudian diencerkan dengan konsentrasi 200, 250, 300, 350 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan dipipet sebanyak 1 mL, dicampur dengan 1 mL larutan radikal ABTS, dan ditambah etanol sampai volume mencapai 5 mL. Larutan diukur dengan spektrofotometer ultraviolet (Azizah, 2023).

#### 6) Pengukuran Aktivitas Antioksidan Teh Kombucha Daun Pecut Kuda

Sebanyak 1 mL larutan ABTS dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 1 mL teh kombucha dengan konsentrasi 20, 40, 80 dan 100 ppm. Larutan didiamkan selama 30 menit atau waktu operasional di tempat gelap. Dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh, 730,6 nm, daya antioksidan

teh kombucha dapat dihitung dalam persen terhadap radikal bebas ABTS dengan persamaan 4 (Puspitasari *et al*, 2020):

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{A_o - A_s}{A_o} \times 100\%$$

**Keterangan:**

A<sub>o</sub> : Absorbansi larutan kontrol (ABTS tanpa teh kombucha)

A<sub>s</sub> : Absorbansi larutan sampel setelah ditambahkan ABTS

## 11. Pengolahan Data

Data hasil penelitian dibuat dalam bentuk tabel dan grafik. Nilai IC<sub>50</sub> dihitung melalui analisis data regresi linier menggunakan Microsoft Excel.

## 12. Analisis Data

Data absorbansi yang didapatkan selanjutnya dihitung Nilai IC<sub>50</sub> menggunakan persamaan regresi linier, yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi larutan uji (variabel x) dan persentase inhibisi (variabel y). IC<sub>50</sub> ditentukan dengan menggantikan y sebesar 50% inhibisi, sehingga x mewakili nilai IC<sub>50</sub>. Perhitungan IC<sub>50</sub> (*Inhibitory Concentration 50%*) menunjukkan konsentrasi larutan uji yang dibutuhkan untuk menghambat proses oksidasi sebesar 50% (Utami *et al.*, 2024)

Hasil uji aktivitas antioksidan selanjutnya dianalisis untuk membandingkan aktivitas antara teh kombucha dan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.). Analisis dilakukan menggunakan aplikasi SPSS menggunakan uji *Independent T-Test*, agar diketahui apakah terdapat perbedaan signifikan antara aktivitas antioksidan antara teh kombucha dengan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.).

