

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium dengan tujuan utama menguji satu objek penelitian, yaitu aktivitas antioksidan teh kombucha daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) pada penelitian ini, metode yang digunakan adalah FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

#### **B. Waktu Dan Tempat Penelitian**

##### 1. Waktu Penelitian

Penelitian ini di laksanakan pada bulan November 2024 – Januari 2025

##### 2. Tempat penelitian

- a. Determinasi daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah.
- b. Pembuatan teh kombucha daun pecut kuda serta pengujian aktivitas antioksidannya dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Teknologi Farmasi, Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Ngudi Waluyo, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.

#### **C. Subjek Penelitian**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah teh kombucha dan daun pecut kuda yang diperoleh dari Desa Mijen, Kecamatan Ungaran Barat, Kabupaten Semarang.

#### **D. Definisi operasional**

1. Teh kombucha daun pecut kuda adalah minuman hasil fermentasi yang dibuat dari ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.) menggunakan kultur simbiotik bakteri dan ragi (SCOBY) selama 7 hari.
2. Ekstrak daun pecut kuda diperoleh melalui metode maserasi dengan etanol 96% sebagai pelarut.
3. Aktivitas antioksidan adalah kemampuan suatu senyawa untuk menangkal atau mengurangi efek berbahaya dari radikal bebas. Evaluasi aktivitas ini dilakukan dengan metode FRAP, yang didasarkan pada nilai IC<sub>50</sub>.
4. IC<sub>50</sub> menunjukkan seberapa efektif suatu senyawa dalam menetralkan radikal bebas dan menghambat proses oksidasi, sehingga digunakan sebagai indikator utama aktivitas antioksidannya.

#### **E. Variabel Penelitian**

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah teh kombucha dan ekstrak etanol 96 % daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.)

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai flavonoid total, fenolik total dan IC<sub>50</sub> dari teh kombucha dan ekstrak daun pecut kuda yang diukur menggunakan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

#### **F. Pengumpulan Data**

1. **Alat dan Bahan penelitian**

- a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi blender,

batang pengaduk, cawan porselen, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), rotary evaporator (RE 2000E), oven (Binder ED 56), krus porselen, muffel furnace (Thermo Scientific), *moisture analyzer* (Ohaus), timbangan analitik (Excellent), serta berbagai peralatan gelas seperti *beaker glass* (Iwaki Pyrex), pipet ukur, corong kaca, gelas ukur, labu takar (Iwaki Pyrex), pipet tetes, dan kertas saring. Selain itu, penelitian ini juga menggunakan tisu, aluminium foil, *water bath*, serta ayakan dengan ukuran 40 mesh.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kultur kombucha SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L), air, gula pasir, starter kombucha, serta etanol 96%. Selain itu, bahan kimia yang digunakan mencakup kuersetin, etanol.p.a, HCl, kloroform, amonia, larutan FeCl<sub>3</sub> 1%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, kalium dikromat, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, asam oksalat, asam trikloroasetat, NaOH, serbuk magnesium (Mg), asam sulfat, etil asetat, kloroform, akuades, asam galat (*merck*), pereaksi *Folin-Ciocalteu* (*merck*), serbuk TPTZ (*trip pyridyl triazine*) (*sigma*), asam askorbat, dan kalium ferisianida.

## 2. Determinasi tanaman

Determinasi daun pecut kuda di lakukan untuk mengetahui keaslian dan kebenaran daun pecut kuda yang akan di gunakan sebagai sampel dalam penelitian. Determinasi tanaman di lakukan di Laboratorium Ekologi dan

Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika  
Universitas Diponegoro Semarang ( UNDIP ).

### **3. Pemanenan daun pecut kuda**

Pemanenan daun pecut kuda dilakukan di Desa Mijen, Kecamatan Ungaran Barat, Kabupaten Semarang. Daun yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pecut kuda yang masih muda di ambil sekitar 5 – 7 helai daun. Setelah proses pemanenan, daun pecut kuda kemudian diolah menjadi simplisia.

### **4. Pembuatan simplisia daun pecut kuda**

Pembuatan serbuk simplisia dilakukan dengan mengambil 3 kg daun pecut kuda segar, yang kemudian dicuci bersih di bawah air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Setelah dicuci, daun dipotong kecil-kecil untuk mempermudah proses pengeringan. Daun yang telah dirajang kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam agar tidak terkena cahaya matahari secara langsung. Setelah kering, daun dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh.

### **5. Standarisasi simplisia parameter non spesifik**

#### **a. Uji kadar air simplisia dan ekstrak**

Pengukuran kadar air dilakukan dengan menempatkan 2 gram simplisia dalam alat *moisture analyser* dan dipanaskan pada suhu 105°C selama 10 menit, lalu sampel ditimbang kembali menggunakan neraca analitik. Kadar air yang dianggap ideal adalah kurang dari 10%

(Miftahussanadi *et al.*, 2021).

b. Uji kadar abu simplisia

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia ditimbang dan dimasukkan ke dalam krus porselen yang telah dipijarkan dan ditera. Cawan yang berisi serbuk kemudian dimasukkan ke dalam *furnace* dan dipanaskan secara bertahap dari suhu kamar hingga mencapai 600°C selama 3 jam hingga terbentuk abu. Setelah proses pemanasan selesai, sampel didinginkan dalam desikator dan ditimbang bobotnya (Aini *et al.*, 2023). Kadar total di hitung menggunakan rumus berikut

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat sampel awal}} \times 100 \% \quad (1)$$

## 6. Pembuatan ekstrak daun pecut kuda

Ekstrak etanol dari daun pecut kuda dibuat menggunakan metode maserasi. Metode ini dipilih karena merupakan teknik ekstraksi konvensional yang paling sederhana, di mana sampel direndam dalam pelarut pada suhu ruang. Maserasi sangat cocok untuk sampel bertekstur lunak seperti daun serta bahan yang mengandung senyawa termolabil. Prinsip kerja metode ini didasarkan pada kemampuan larutan penyari menembus dinding sel dan mencapai rongga sel yang mengandung berbagai senyawa aktif. Senyawa aktif tersebut kemudian akan larut atau tersebar dalam pelarut yang digunakan.

Ekstraksi simplisia daun pecut kuda dilakukan dengan metode maserasi. Daun pecut kuda yang telah dikeringkan dan dihaluskan ditimbang sebanyak 200 gram, kemudian dimasukkan ke dalam bejana

maserasi (toples kaca). Perbandingan bobot sampel dibanding pelarut adalah 1:5. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% sebanyak 1000 mL dan diaduk dengan menggunakan pengaduk selama 10 menit sampai larutan homogen. Larutan yang telah diaduk diendapkan selama 5x24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah dimaserasi selama 5x24 jam kemudian disaring menggunakan kertas saring, sehingga akan diperoleh hasil saringan berupa filtrat dan residu. Selanjutnya, residu dimaserasi kembali dengan ekstrak etanol 96% sebanyak 600 ml selama 2 hari. Seluruh filtrat yang diperoleh kemudian digabungkan, dan pelarutnya diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C hingga menghasilkan ekstrak kental (Alouw *et al.*, 2022). Selanjutnya, dihitung persentase rendemen yang diperoleh dengan membandingkan berat ekstrak dengan berat awal sampel (simplisia) dalam satuan persen.

## 7. Perhitungan nilai rendemen ekstrak

Perhitungan rendemen ekstrak dilakukan dengan membandingkan berat kering produk yang dihasilkan dengan berat bahan baku. Rendemen ekstrak dihitung berdasarkan rasio antara berat akhir (berat ekstrak yang diperoleh) dan berat awal (berat biomassa sel yang digunakan), kemudian dikalikan dengan 100% (Senduk *et al.*, 2020). Perhitungna rendemen dihitung dengan rumus berikut :

$$\text{rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental (gram)}}{\text{berat ekstrak awal (gram)}} \times 100\% \quad (2)$$

## **8. Proses Pembuatan teh kombucha daun pecut kuda**

Persiapan bahan baku daun pecut kuda dimulai dengan proses sortasi basah, sortasi kering, dan pengeringan. Daun yang telah kering ditandai dengan teksturnya yang kaku dan mudah patah saat diremas. Proses pembuatan teh kombucha diawali dengan mendidihkan 1 liter air, kemudian didinginkan hingga mencapai suhu 80–90°C. Selanjutnya, sebanyak 30 g daun pecut kuda kering dimasukkan, ditambahkan 10 g gula, lalu diaduk hingga larut, larutan dibiarkan dingin hingga mencapai suhu 22°C. Setelah suhu mencapai suhu ruang, dilakukan proses penyarianan dan diinokulasikan kultur kombucha sebanyak 10 g serta lapisan SCOBY sebanyak 5% ke dalam larutan. Wadah kemudian ditutup menggunakan kain bersih yang diikat rapat dengan karet, dan difermentasi selama 7 hari dalam kondisi ruangan gelap (Yuningtyas *et al.*, 2021).

## **9. Uji bebas etanol**

Pengujian kualitatif terhadap kandungan etanol dilakukan dengan menambahkan 2 tetes asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) pekat dan 1 mL kalium dikromat ke dalam sampel ekstrak daun pecut kuda yang sudah di timbang sebanyak 0,5 gram. Jika terjadi perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan, maka ekstrak tersebut mengandung etanol (Klau *et al.*, 2021).

## 10. Standarisasi Ekstrak Parameter Spesifik

### a. Pengamatan Organoleptis

Pengamatan organoleptik adalah evaluasi ekstrak yang dilakukan dengan mengandalkan panca indra sebagai alat utama untuk mengidentifikasi bentuk, warna, dan aroma ekstrak daun pecut kuda (Lin *et al.*, 2019).

### b. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan secara kualitatif untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat dalam ekstrak daun pecut kuda serta teh kombucha daun pecut kuda, mencakup uji flavonoid, terpenoid, tanin, saponin, dan fenolik.

#### 1) Skrining fitokimia pada ekstrak daun pecut kuda

##### a) Uji flavanoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 mL etanol dan dipanaskan selama 5 menit. Setelah itu, ditambahkan 10 tetes HCl pekat serta 0,2 gram serbuk magnesium. Adanya flavonoid ditandai dengan munculnya warna merah kecokelatan.

##### b) Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 mL kloroform dan 10 mL amonia, serta 10 tetes  $H_2SO_4$ . Campuran dikocok hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan  $H_2SO_4$  yang terbentuk kemudian dipindahkan ke tiga tabung reaksi, masing-masing berisi 2,5 mL.

Larutan tersebut kemudian diuji dengan pereaksi Meyer, Dragendorff, dan Wagner. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi Meyer, perubahan warna menjadi merah jingga pada pereaksi Dragendorff, serta perubahan warna menjadi coklat pada pereaksi Wagner.

c) Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 mL akuades, kemudian dikocok kuat selama sekitar 1 menit. Setelah itu, larutan didiamkan selama 10 menit dan diamati adanya pembentukan busa atau buih. Keberadaan senyawa saponin dalam sampel ditandai dengan terbentuknya buih yang stabil setinggi 1–3 cm yang bertahan selama 10 menit.

d) Uji Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 mL air panas, kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan besi(III) klorida. Adanya tanin dalam sampel ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman.

e) Uji Steroid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dicampurkan dengan 10 tetes  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial dan 2 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Campuran kemudian dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Hasil positif triterpenoid ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah atau ungu, sedangkan hasil positif steroid ditandai dengan

perubahan warna menjadi biru atau hijau.

2) Skrining fitokimia pada teh kombucha daun pecut kuda

a) Uji Flavanioid

Sebanyak 10 mL kombucha daun pecut kuda dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 5 mL air suling (aquades) dan dipanaskan selama 5 menit. Setelah disaring, larutan diberi 5 tetes HCl pekat serta serbuk logam magnesium (Mg). Perubahan warna menjadi kuning, merah, atau jingga menandakan keberadaan flavonoid (Abdilah *et al.*, 2022).

b) Uji Tanin

Sebanyak 10 mL kombucha daun pecut kuda dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, larutan ditambahkan dengan 2 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Perubahan warna menjadi biru tua atau hitam kehijauan menandakan keberadaan tanin (Abdilah *et al.*, 2022).

c) Uji Saponin

Sebanyak 10 mL kombucha daun pecut kuda dipipet, kemudian 5 mL dari larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan air panas. Setelah dikocok selama 1–2 menit, larutan diberi tambahan 2 tetes HCl 1N. Jika busa yang terbentuk tetap bertahan selama 10 menit, maka menunjukkan adanya saponin (Abdilah *et al.*, 2022).

d) Uji Alkaloid

Sebanyak 10 mL kombucha daun pecut kuda dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 tetes HCl 1%. Setelah campuran diaduk hingga larut, dilakukan pengujian dengan reagen sebagai berikut: Mayer – ditambahkan 1 mL reagen Mayer, Wagner – ditambahkan 1 mL reagen *Wagner*, dan *Dragendorff* – ditambahkan 1 mL reagen *Dragendorff*. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan atau perubahan warna yang sesuai dengan karakteristik masing-masing reagen.

e) Uji Steroid/Terpenoid

Sebanyak 2 mL kombucha daun pecut kuda dipipet dan diuapkan dalam cawan penguap hingga tersisa residu. Residu tersebut kemudian dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu dicampurkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat ditambahkan secara perlahan di sepanjang dinding tabung. Indikasi positif triterpenoid ditandai dengan munculnya warna kecoklatan atau violet pada batas larutan, sedangkan indikasi positif steroid ditunjukkan oleh perubahan warna menjadi biru kehijauan (Abdilah *et al.*, 2022).

## 11. Analisis Kuantitatif Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

### a. Uji Total Flavonoid

#### 1) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin ( $\lambda_{\text{maks}}$ )

Panjang gelombang maksimum kuersetin ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan kuersetin dalam rentang panjang gelombang 400–450 nm. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum standar kuersetin berada pada 435 nm. Nilai tersebut kemudian digunakan sebagai acuan untuk mengukur absorbansi sampel ekstrak.

#### 2) Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

Sebanyak 25 mg kuersetin standar ditimbang lalu dilarutkan dalam 25 mL etanol untuk menghasilkan larutan stok. Selanjutnya, 1 mL larutan stok dipipet dan diencerkan dengan etanol hingga mencapai volume total 10 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Dari larutan ini, dibuat berbagai variasi konsentrasi, yaitu 40, 50, 60, 70, dan 80 ppm.

Sebanyak 1 mL dari masing-masing larutan standar dengan konsentrasi 40–80 ppm diambil, kemudian ditambahkan 1 mL larutan  $\text{AlCl}_3$  2% dan 1 mL larutan kalium asetat 120 mM. Campuran tersebut diinkubasi selama satu jam pada suhu ruang. Setelah itu, absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang maksimum 400–500 nm.

### 3) Penetapan Kadar Flavonoid Total dalam Ekstrak

Sebanyak 15 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL etanol hingga mencapai konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, 1 mL larutan ekstrak dipipet dan dicampurkan dengan 1 mL larutan  $\text{AlCl}_3$  2% serta 1 mL larutan kalium asetat 120 mM. Campuran tersebut kemudian diinkubasi selama satu jam pada suhu ruang.

Setelah proses inkubasi, absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang maksimum 400–500 nm. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali untuk memperoleh nilai rata-rata absorbansi.

#### b. Uji Total Fenolik

##### 1) Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

Sebanyak 10 mg asam galat ditimbang lalu dilarutkan dalam 10 mL aquabidest. Sebanyak 3,5 g natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) dilarutkan dalam aquabidest hingga volume total mencapai 50 mL.

##### 2) Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat

Sebanyak 2,5 mL larutan induk asam galat diencerkan dengan metanol p.a hingga volume total mencapai 25 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Dari larutan tersebut, masing-masing sebanyak 2, 4, 6, 8, dan 10 mL diambil, kemudian diencerkan dengan aquabidest hingga mencapai volume 10 mL, menghasilkan larutan dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm.

Masing-masing larutan dengan konsentrasi 40–100 ppm diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu, dikocok, dan didiamkan selama 4–8 menit. Selanjutnya, 4 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,5% ditambahkan dan dikocok hingga homogen. Volume larutan kemudian disesuaikan hingga 10 mL dengan aquabidest, lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum, kemudian dibuat kurva kalibrasi berdasarkan hubungan antara konsentrasi asam galat ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### 3) Penetapan Kadar Fenolik Total

Sebanyak 10 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL aquabidest. Selanjutnya, 1 mL larutan ekstrak diambil, kemudian dicampur dengan 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu, dikocok, dan didiamkan selama 4–8 menit. Setelah itu, 4 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,5% ditambahkan, dikocok hingga merata, lalu volumenya disesuaikan hingga 10 mL dengan aquabidest. Larutan tersebut didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang sebelum absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran dilakukan tiga kali untuk memperoleh hasil yang akurat, dan kadar fenol dinyatakan dalam gram ekuivalen asam galat per gram ekstrak.

## 12. Uji aktivitas antioksidan metode FRAP

### a. Pereaksi FRAP

#### 1) Larutan Buffer Asetat (pH 3,6)

Buffer asetat dengan pH 3,6 disiapkan dengan melarutkan 0,775 gram natrium asetat trihidrat ( $\text{CH}_2\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) dalam air suling (aquades). Setelah larutan terbentuk, ditambahkan 4 mL asam asetat pekat, kemudian volumenya disesuaikan hingga mencapai 250 mL menggunakan labu takar.

#### 2) Pembuatan Reagen FRAP

Reagen FRAP disiapkan dengan mencampurkan 25 mL buffer asetat, 2,5 mL larutan TPTZ (*Trip Pyridyl Triazine*), dan 2,5 mL larutan  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  yang telah dibuat sebelumnya. Campuran tersebut kemudian diencerkan dengan air suling hingga mencapai volume total 100 mL dalam labu takar.

### c. Penentuan panjang gelombang maksimum

Tabung reaksi yang telah berisi 1 mL asam askorbat, dapar fosfat, dan kalium ferisianida diinkubasi pada suhu  $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  selama 1200 detik. Setelah inkubasi, ditambahkan 1 mL asam trikloroasetat, lalu campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 3000 rad per meter selama 600 detik. Proses ini menghasilkan dua lapisan, di mana 1 mL dari lapisan atas diambil, dicampurkan dengan 5 mL larutan besi klorida 0,1%, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur dan

diencerkan dengan etanol 96% hingga mencapai batas tanda sebelum dihomogenkan. Larutan akhir memiliki konsentrasi 150 mg/L. Selanjutnya, panjang gelombang maksimum larutan ini dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dalam rentang panjang gelombang 500–800 nm

d. Pembuatan dan Penentuan Serapan Larutan Standar Asam Askorbat

Pembuatan larutan standar asam askorbat dengan konsentrasi 1 g/L diawali dengan menimbang 0,025 gram asam askorbat baku, kemudian larutan dimasukkan ke dalam labu ukur dan diencerkan dengan asam oksalat hingga mencapai volume 25 mL, lalu dihomogenkan untuk memperoleh larutan standar. Selanjutnya, larutan seri disiapkan dengan mengambil masing-masing 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, dan 5 mL dari larutan standar tersebut, yang kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur dan diencerkan menggunakan asam oksalat hingga mencapai volume 10 mL. cara ini, diperoleh larutan dengan konsentrasi bertingkat, yaitu 0,01 g/L, 0,02 g/L, 0,03 g/L, 0,04 g/L, dan 0,05 g/L. Asam oksalat digunakan sebagai pelarut untuk menjaga kestabilan asam askorbat.

Sebanyak 1 mL dari setiap larutan dengan konsentrasi seri dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan kalium ferisianida 1% dan dapar fosfat, lalu dihomogenkan. Campuran ini diinkubasi pada suhu  $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 1200 detik, kemudian ditambahkan 1 mL asam trikloroasetat dan disentrifugasi

pada kecepatan 3000 rad per meter selama 600 detik hingga terbentuk dua lapisan. pada lapisan atas masing-masing tabung, sebanyak 1 mL diambil, lalu dicampur dengan 1 mL aquades serta 0,5 mL larutan besi klorida 0,1% dalam tabung reaksi yang terpisah. Campuran tersebut didiamkan selama 600 detik, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet, dilengkapi dengan asam oksalat, dihomogenkan, dan absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan.

c. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Reagen FRAP

Sebanyak 5 gram sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dicampur dengan 0,5 mL etanol 96% dan dihomogenkan. pada larutan sampel tersebut, 1 mL diambil dan dipindahkan ke tabung reaksi lain, lalu ditambahkan 1 mL dapar fosfat serta larutan kalium ferisianida 1%, kemudian dihomogenkan. Campuran ini diinkubasi pada suhu  $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 1200 detik untuk mempercepat reaksi. Setelah proses inkubasi, ditambahkan 1 mL asam trikloroasetat, lalu campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 3000 rad per meter selama 600 detik untuk mengendapkan kalium ferisianida, sehingga terbentuk dua lapisan.pada lapisan atas, sebanyak 1 mL diambil, kemudian dicampur dengan 1 mL aquades serta 0,5 mL larutan besi klorida 0,1%, dan dihomogenkan. Penambahan aquades dan besi klorida 0,1% menghasilkan senyawa kompleks yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kebiruan. Larutan ini didiamkan selama 600 detik, kemudia dimasukkan ke dalam kuvet,

dilengkapi dengan etanol 96%, dan dihomogenkan. Panjang gelombang maksimum diukur untuk menentukan aktivitas antioksidan, dan prosedur ini dilakukan sebanyak tiga kali (Tambunan et al., 2024).

Metode FRAP bekerja dengan mereduksi  $\text{Fe}^{3+}$  menjadi  $\text{Fe}^{2+}$  serta membentuk kompleks dengan gugus -OH, seperti yang terdapat pada flavonoid, fenol, dan senyawa lainnya. Senyawa yang dapat menangkap radikal umumnya bertindak sebagai donor gugus -OH, sehingga atom tersebut dapat bereaksi dengan radikal  $\text{Fe}^{3+}$ , mengubahnya menjadi  $\text{Fe}^{2+}$ . Semakin banyak gugus -OH, semakin banyak pula kompleks fero yang terbentuk. Hal ini sesuai dengan peningkatan kepolaran senyawa aktif dalam ekstrak pepaya Jepang, yang berkontribusi terhadap peningkatan aktivitas antioksidan (I. Purnamasari *et al.*, 2024).

## G. Analisis Data

Kadar flavonoid total ditentukan berdasarkan nilai absorbansi sampel yang diukur pada panjang gelombang 500 nm dengan tiga kali pengulangan. Nilai absorbansi ini kemudian dimasukkan ke dalam persamaan garis linear  $y = bx + a$ , yang diperoleh dari kurva standar kuersetin. Kurva standar tersebut dibuat berdasarkan hubungan antara konsentrasi kuersetin (mg/L) dan nilai absorbansi. Hasil perhitungan kadar flavonoid dinyatakan dalam mg ekuivalen kuersetin (mgQE/g sampel), dengan mengonversi kadar flavonoid dalam mg/L sampel ke ekuivalen kuersetin per gram sampel.

Hasil analisis kadar fenol dianalisis dengan membandingkannya terhadap kurva standar menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh. Begitu pula, hasil analisis aktivitas antioksidan dibandingkan dengan kurva standar berdasarkan persamaan regresi linier. Selanjutnya, kadar fenol dikorelasikan dengan aktivitas antioksidan untuk memperoleh persamaan regresi linier. Nilai R yang dihasilkan menunjukkan tingkat keterkaitan antara kadar fenol dan aktivitas antioksidan.

Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan nilai (*inhibitory concentration 50%*)  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi sampel yang dapat menghambat 50% radikal bebas. Persentase inhibisi dari berbagai konsentrasi sampel dianalisis menggunakan regresi linier (x, y) untuk memperoleh nilai  $IC_{50}$ , di mana x merepresentasikan konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ ) dan y menunjukkan persentase aktivitas. Sampel dan pembanding dihitung menggunakan rumus berikut

$$Y = B x + A \quad (3)$$

Keterangan :

Y = Variabel terikat  
X = Variabel bebas  
B = Koefisien regresi  
A = Intersep

IC<sub>50</sub> diperoleh dengan mengganti y dengan 50. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub>, semakin tinggi aktivitas antioksidan sampel.

Hasil uji aktivitas antioksidan kemudian dianalisis untuk membandingkan efektivitas antara teh kombucha dan ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.). Analisis dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS dengan uji *Independent T-Test* untuk menentukan apakah terdapat perbedaan yang signifikan dalam aktivitas antioksidan antara kedua sampel.