

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan yaitu dari bulan Februari 2025 hingga Mei 2025 di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Kimia, dan Laboratorium Instrumen Prodi Farmasi S-1 Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Oven (*Yenaco Drying Oven*), spektrofotometri UV-Vis (*Shimadzu*), timbangan analitik (*Ohaus*), micropipet (*Dragon lab*), batang pengaduk, kuvet (*Helma*), gelas beaker (*Pyrex*), labu ukur 5 mL, 10 mL, 100 mL, seperangkat alat gelas (*Pyrex*), pipa kapiler, kertas saring.

3.2.2 Bahan

Tanaman pucuk merah, asam asetat, DPPH, metanol, etanol 70%, pereaksi *Folin-Ciocalteu*, natrium asetat, asam galat, AlCl_3 , kuersetin, Na_2CO_3 7,5%, natrium asetat, pereaksi FeCl_3 , pereaksi AlCl_3 10%, aquadest, magnesium, HCl pekat, pereaksi *folin ciocalteu* alumunium foil.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental kuantitatif yang bertujuan untuk menguji kadar fenol total, flavonoid total, dan aktivitas antioksidan dalam seduhan daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.). Metode ini dilakukan dengan reagen AlCl_3 pada untuk menentukan kandungan flavonoid total, dan reagen *Folin Ciocalteu* untuk menentukan kadar fenol

total, secara spektrofotometri UV-Vis, kemudian penentuan penghambat radikal bebas digunakan metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil).

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu umur daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yaitu daun pucuk merah muda yang berwarna merah, dan daun pucuk merah tua yang berwarna hijau.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu kadar fenolik total, kadar flavonoid total, dan aktivitas antioksidan.

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu suhu penyeduhan, metode pengujian (uji DPPH untuk antioksidan, *folin ciocalteu* untuk fenolik, reagen $AlCl_3$ untuk flavonoid dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis), pelarut yang digunakan yaitu berupa air.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman Pucuk Merah

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Bhamada Slawi untuk memastikan bahwa tumbuhan yang digunakan untuk penelitian yaitu pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp).

3.4.2 Pengambilan Sampel Daun Pucuk Merah

Sampel daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) didapatkan dari Desa Penusupan, Kecamatan Pangkah, Kabupaten Tegal (7°00'16"S 109°09'28"E). Dipilih berdasarkan perbedaan usia daun yang ditandai oleh warna. Daun muda yang berwarna merah

dipilih untuk kategori daun pucuk merah muda, sementara daun tua yang berwarna hijau dipilih untuk kategori daun dewasa. Pengambilan sampel dilakukan secara acak dari beberapa pohon dalam satu area penanaman, dengan memastikan daun yang diambil tidak terkontaminasi oleh hama atau penyakit. Daun merah dan daun hijau dipisahkan secara ketat untuk memastikan hasil uji yang lebih akurat dalam proses pembuatan.

3.4.3 Preparasi Sampel Seduhan Daun Pucuk Merah

Pembuatan bahan seduhan daun pucuk merah didasarkan pada metode (Fannia *et al.*, 2024). Proses pembuatan bahan kering untuk melalui beberapa tahapan yang meliputi bahan baku, sortasi basah, pencucian, penirisan, pengeringan, sortasi kering. Tahap pertama, yaitu sortasi, dilakukan dengan memisahkan bagian daun dari batangnya serta memisahkan bagian daun merah (daun muda) dengan daun hijau (daun tua).

Selanjutnya, proses pencucian dilakukan menggunakan air mengalir untuk membersihkan kotoran, terutama tanah, yang mungkin menempel pada bahan baku. Setelah pencucian selesai, bahan dibiarkan meniriskan air berlebih untuk mengurangi kadar air sebelum pengeringan.

Proses pengeringan dilakukan pada suhu 40°C hingga kadar air bahan mencapai <10% (Luliana *et al.*, 2016). Kadar air yang rendah sangat penting untuk menjaga ketahanan simpan bahan. (Kusmiyati *et al.*, 2015).

3.4.4 Uji Parameter Simplisia

a. Parameter Spesifik

1) Uji Organoleptis

Serbuk simplisia diambil sedikit, dilakukan uji organoleptis yaitu bentuk, warna dan bau (Evifania *et al.*, 2020).

b. Parameter Non Spesifik

1) Kadar Air

Uji ini dilakukan menggunakan *moisturizer analyzer*, menyalakan *moisturizer analyzer*, kemudian membuka penutup pemanas, lalu sampel ditimbang sebesar 0,5 gram, lalu sampel dimasukkan ke dalam *moisturizer analyzer*, tutup pemanas dan diperiksa hasil pengukuran kadar air. Sehingga dengan melakukan pengujian ini dapat diketahui kadar airnya (Azizah *et al.*, 2022)

3.4.5 Penyeduhan Sampel

Pengolahan sampel dilakukan dengan cara seduhan. Prosedur seduhan daun pucuk merah sama dengan metode (Fillianty *et al.*, 2023) timbang sampel 1 gram, masukkan ke dalam gelas kimia (*beaker glass*) yang berukuran 250 mL. Didihkan air murni sebanyak 100 mL sampai tepat mendidih, kemudian tuangkan ke dalam gelas kimia yang telah berisi sampel, tutup, dan biarkan selama 10 menit kemudian saring dan pastikan tidak ada ampas yang tersisa di dalam seduhan.

3.4.6 Uji Kualitatif

a. Skrining Fitokimia

Sampel yang digunakan untuk skrining fitokimia yaitu seduhan daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.).

1) Fenolik

Sebanyak 1 mL seduhan daun pucuk merah ditambahkan 10 tetes FeCl_3 1%. Terbentuk endapan hijau, merah, ungu, biru atau hitam pekat menunjukkan adanya fenol atau positif mengandung fenol (Azizah et al., 2019).

2) Flavonoid

Larutan seduhan daun pucuk merah sebanyak 2 mL ditambah sedikit magnesium dan HCl pekat 1 mL, kemudian dikocok. Hasil uji positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga (Kusumo et al., 2022).

b. Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Plat yang digunakan untuk identifikasi dengan KLT yaitu plat silika GF-254. Sampel seduhan daun merah dan hijau dari tanaman pucuk merah masing-masing di totolkan menggunakan pipa kapiler dengan jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat, kemudian dikeringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya.

1) Fenolik

Seduhan daun merah dan hijau pucuk merah ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan menggunakan fase gerak

yaitu n-butanol : asam asetat : aquadest menggunakan perbandingan 4 : 1 : 5 dalam 10 mL, kemudian plat dikeringkan di udara. Identifikasi bercak menggunakan sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Kemudian plat disemprot menggunakan pereaksi FeCl_3 (Khairunnisa et al., 2021). Positif mengandung fenol jika noda berwarna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat (Ahmad et al., 2015).

2) Flavonoid

Seduhan daun merah dan hijau pucuk merah ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan menggunakan fase gerak yaitu butanol : asam asetat : air menggunakan perbandingan 4 : 1 : 5 dalam 10 mL, kemudian plat dikeringkan di udara. Identifikasi bercak menggunakan sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Kemudian plat disemprot dengan pereaksi AlCl_3 (Khairunnisa et al., 2021) yang menunjukkan warna noda kuning-kehijauan (Ahmad et al., 2015).

3.4.7 Uji Kuantitatif

a. Uji Kadar Fenol Total

1) Pembuatan Reagen

a) Larutan Induk Asam Galat (500 ppm)

Sebanyak 5 mg asam galat dilarutkan dalam etanol 96% hingga 10 mL, sehingga mendapatkan larutan induk asam galat dengan konsentrasi 500 ppm (Nofita et al., 2020)

b) Reagen Na_2CO_3 7,5%

Ditimbang sebanyak 7,5 gram Na_2CO_3 ditambahkan 100 mL aquadest, kemudian dididihkan sampai serbuk Na_2CO_3 larut dengan sempurna. Setelah itu diamkan selama 24 jam, disaring dan diencerkan dengan aquadest sampai volume 100 mL (Q. Hasanah et al., 2024)

2) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum pada asam galat dengan cara sebanyak 1 mL larutan asam galat konsentrasi 6 ppm yang sudah diencerkan dalam labu ukur 5 mL, ditambah 1,5 mL pereaksi *folin ciocalteu* lalu dikocok hingga homogen. Ditambahkan 1,2 mL Na_2CO_3 7,5%, dikocok hingga homogen, lalu absorbansi diukur pada rentang 600-800 nm (Alfian & Susanti, 2012)

3) Penentuan *Operating Time*

Sebanyak 1 mL larutan asam galat konsentrasi 6 ppm yang sudah diencerkan dalam labu ukur 5 mL, ditambah 1,5 mL pereaksi *folin ciocalteu* lalu dikocok hingga homogen. Kemudian ditambahkan 1,2 mL Na_2CO_3 7,5% b/v, dikocok hingga homogen, selanjutnya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 744 nm dengan interval waktu 1 menit selama 30 menit sampai mencapai absorbansi yang stabil (M. Saputri et al., 2024)

4) Pembuatan Kurva Baku Standar Asam Galat

Pengukuran kandungan fenol total pada seduhan dilakukan menggunakan pereaksi *folin ciocalteu* dengan prosedur (Kusmiyati et al., 2015). Untuk membuat kurva kalibrasi digunakan asam galat dengan variasi konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm masing-masing sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 1,5 mL pereaksi *folin ciocalteu*, lalu dikocok hingga homogen. Kemudian ditambahkan 1,2 mL Na_2CO_3 7,5% b/v dikocok hingga homogen. Selanjutnya dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 744 nm (Yesti et al., 2022)

5) Penetapan Kadar Fenolik Total

Seduhan daun pucuk merah 10.000 ppm kemudian diencerkan menjadi 1000 ppm, diencerkan hingga konsentrasi 1000 ppm, setelah diencerkan kembali dengan akuades hingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm kemudian diambil 1 mL lalu seduhan tersebut ditambahkan 1,5 mL pereaksi *folin ciocalteu*, lalu dikocok hingga homogen selama 1 menit. Sebelum menit kedelapan, ditambahkan 1,2 mL Na_2CO_3 7,5% b/v, dikocok selama 1 menit dan ditambahkan aquades dan dikocok hingga homogen. Selanjutnya dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yang telah

didapatkan sebelumnya (Sugiat et al., 2010). Menghitung penentuan kadar fenolik total menggunakan rumus :

$$KTF_e = \frac{V \text{ (mL)} \cdot X \text{ (mg/mL)} \cdot F_p}{\text{Berat Sampel (g)}}$$

Keterangan :

v = volume sampel yang digunakan (ml)

x = konsentrasi sampel (mg/ml)

fp = faktor pengenceran

g = berat sampel (g)

(Hala et al., 2020)

b. Uji Kadar Flavonoid Total

1) Pembuatan Reagen

a) Pembuatan Larutan Induk Kuersetin (1000 ppm)

Kuersetin sebesar 5 mg dilarutkan dengan metanol sampai 5 mL dan didapatkan larutan baku induk (1000 ppm) (Susilowati & Sari, 2021).

b) Pembuatan Larutan $AlCl_3$ 10%

Ditimbang sebanyak 1 gram $AlCl_3$ padat dilarutkan dengan aquadest hingga 10 mL (Suhaenah et al., 2024).

c) Pembuatan Larutan Natrium Asetat 10%

Ditimbang sebanyak 1 gram natrium asetat kemudian dilarutkn dengan aquadest hingga 10 mL (Hilmi et al., 2018).

2) **Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Larutan standar kuersetin (1000 ppm) kemudian dibuat larutan dengan konsentrasi 6 ppm dengan cara dipipet sebanyak 30 μ L dari larutan baku kuersetin 1000 ppm dan ditambahkan etanol 96% ke dalam labu ukur 5 mL hingga tanda batas, kemudian ditambahkan 0,5 mL AlCl_3 10% dan 0,5 mL natrium asetat dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dihomogenkan. Kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-500 nm (Susilowati & Sari, 2021).

3) **Penentuan *Operating Time***

Larutan dengan konsentrasi 6 ppm di ambil 1 mL kemudian dicampurkan dengan 0,5 mL AlCl_3 10% dan 0,5 mL natrium asetat, dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dihomogenkan. Selanjutnya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 425,5 nm dengan interval waktu 1 menit selama 30 menit sampai mencapai absorbansi yang stabil (Susilowati & Sari, 2021).

4) **Pembuatan Kurva Baku Kuersetin**

Larutan induk kuersetin 1000 ppm selanjutnya dibuat larutan seri dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm (Rawar, 2023) diencerkan dalam labu ukur 5 mL dengan memipet 10, 20, 30, 40 dan 50 μ L, selanjutnya direaksian dengan 0,5 mL

AlCl_3 10% dan 0,5 mL natrium asetat dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dihomogenkan, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit selanjutnya dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 425,5 nm (Haresmita & Pradani, 2022).

5) Penentuan Kadar Flavonoid Total

Konsentrasi larutan seduhan daun pucuk merah yang dibuat sebesar 1000 ppm. Sebanyak 0,5 mL larutan sampel, 0,5 mL AlCl_3 10% dan 0,5 mL natrium asetat kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dihomogenkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruangan selama 15 menit, dan diukur serapan sampel dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 425,5 nm (Rawar, 2023). Menghitung penentuan kadar flavonoid menggunakan rumus :

$$\text{KTFla} = \frac{V(\text{mL}) \cdot X(\text{mg/mL}) \cdot Fp}{\text{Berat Sampel (g)}}$$

Keterangan :

v = volume sampel yang digunakan (ml)

x = konsentrasi sampel (mg/ml)

fp = faktor pengenceran

g = berat sampel (g)

(Dalming et al., 2022)

c. Uji Aktivitas Antioksidan

Analisis Aktivitas Antioksidan

1) Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 10 mg DPPH dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur gelap sampai 100 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm kemudian dibuat dalam konsentrasi 25 ppm (Fertiasari & Kristiandi, 2024).

2) Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Ditimbang 10 mg kuersetin, dilarutkan dalam 100 mL etanol 96% sehingga didapatkan konsentrasi 100 ppm (Werdiningsih, 2023). Selanjutnya dibuat larutan seri dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm (Kusmiyati et al., 2015).

3) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum dengan cara mengukur 4 mL larutan DPPH 25 ppm pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 400-800 nm untuk mendapatkan absorbansi $\pm 0,2-0,8$ (Melani et al., 2023).

4) Penentuan *Operating Time*

Larutan DPPH sebanyak 1 mL ditambahkan dengan larutan standar kuersetin 6 ppm sebanyak 4 mL. Selanjutnya larutan serapannya diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditetapkan dengan interval waktu 2

menit selama 30 menit sampai mencapai absorbansi yang stabil (Aiyuba et al., 2023).

5) Pembuatan Larutan Uji

Seduhan daun hijau dan merah dengan konsentrasi 10.000 ppm (larutan stok) selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat dari 10.000 ppm menjadi 1000 ppm kemudian dibuat variasi konsentrasi yaitu 120, 140, 160, 180, dan 200 ppm (Kusmiyati et al., 2015).

6) Pengujian Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH sesuai yang digunakan (Kusmiyati et al., 2015). Sebanyak 1 mL seduhan dengan konsentrasi 120, 140, 160, 180, dan 200 ppm ditambahkan ke dalam 2 mL DPPH. Campuran selanjutnya dikocok dan diinkubasi pada tempat yang gelap selama 22 menit. Larutan ini selanjutnya diukur pada panjang gelombang 516 nm. Perlakuan yang sama juga dilakukan untuk larutan blanko (larutan DPPH yang tidak mengandung bahan uji) dan kontrol positif kuersetin dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm juga diukur menggunakan panjang gelombang 516 nm. Larutan blanko terdiri dari 2 mL DPPH dan 1 mL metanol. Data hasil pengukuran absorbansi dianalisis aktivitas antioksidannya menggunakan persamaan berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Nilai absorbansi

(T. B. Pratiwi et al., 2023)

3.5 Analisis Data

Pada penelitian ini analisis data yang digunakan yaitu metode deskriptif, data yang diperoleh yaitu kadar fenol total, flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari sampel, data dianalisis dengan menggunakan metode kurva standar, dari regresi linier $y = bx + a$ dilakukan dengan pengukuran absorbansi dari konsentrasi larutan standar kemudian diolah dengan menggunakan microsoft excel. Kemudian dilakukan uji homogenitas dan normalitas menggunakan SPSS. Jika tampilan data normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji *independent sample t-test* untuk mengukur apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara seduhan daun merah dan daun hijau tanaman pucuk merah pada aktivitas antioksidan. Kemudian, ditarik kesimpulan bagian daun mana yang memiliki kadar fenol, kadar flavonoid tertinggi, dan aktivitas antioksidan.