

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat Dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember hingga Maret di laboratorium kimia farmasi dan laboratorium bahan alam Program Studi Farmasi S-1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada.

3.2 Alat Dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu kompor listrik (Maspion), Toples (Kedaung), kertas saring, batang pengaduk (Pyrex), gelas beaker (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), labu ukur (Pyrex), pipet tetes (Onemed), pipet ukur (Pyrex), timbangan analitik (Ohaus), seperangkat alat spektrofotometer (Shimadzu), Oven (Drawell), cawan porselen (Sentana), waterbath (Mommert), pH meter (Merck Universal), saringan, kain, karet gelang, kertas label dan alat tulis.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ialah kultur kombucha, air, gula pasir (gulaku), teh daun salam, aquadest, HCl, asam klorida, pereaksi mayer, pereaksi dragendrof, pereaksi wagner, klorofom, asetat anhidrat, asam sulfat, kalium persulfate, kalium klorida, natrium hidrogen fosfat, kalium hidrogen fosfat, Na_2CO_3 , asam galat, FeCl_3 , folin-ciocalteu, buffer asetat, methanol, etanol 96%, serbuk ABTS

(Sigma), standar kuersetin, (Sigma), H₂SO₄, etil asetat, kloroform, pereaksi dragendorf, etanol 70%, magnesium, HCl pekat, asam asetat, HCl 2N, metanol p.a, AlCl₃, aquadest, natrium asetat, kalium persulfat, natrium klorida, kalium klorida, natrium hidrogen fosfat, kalium hidrogen fosfat.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk kedalam jenis penelitian eksperimental.

a. Populasi Penelitian

Dalam penelitian ini yang menjadi populasi merupakan seluruh teh kombucha daun salam dari setiap variasi waktu fermentasi dengan volume setiap toples 1 L.

b. Sampel Penelitian

Dari masing-masing fermentasi (5,10 dan 15 hari) teh kombucha daun salam yang dihasilkan.

c. Variabel Penelitian

Terdapat tiga variabel dalam penelitian ini, yakni:

- 1) Variabel Bebas : Lama fermentasi (5, 10 dan 15 hari).
- 2) Variabel Terikat : Kandungan antioksidan
- 3) Variabel Terkendali : Suhu medium, konsentrasi gula, konsentrasi teh dan SCOBY.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi

Determinasi dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Program Studi Sarjana Farmasi Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Pembuatan Serbuk Simplisia

Pembuatan simplisia diawali dengan pemanenan, pemanenan dilakukan di Desa Ketileng, Kecamatan Kramat, Kabupaten Tegal.

Selanjutnya dilakukan sortasi kering dengan cara daun yang kuning, berbintik putih, masih muda atau rusak dipisahkan dan dibuang. Selanjutnya dilakukan sortasi basah dimasukkan kedalam bak atau baskom dilakukan pencucian pada air mengalir untuk menghilangkan kotoran, debu, dan bagian tanaman lainnya. Dilakukan perajangan untuk mempermudah pengeringan, daun tersebut ditempatkan diatas loyang. anDaun dikeringkan kembali dalam oven dengan suhu 60°C selama \pm 2 jam hingga kaku dan patah pada saat diremas (Rosida, Sofiyah, & Putra., 2021).

3.4.3 Pembuatan Teh Kombucha Daun Salam

Teh kombucha dibuat dengan cara diseduh 6 gram teh ke dalam 1 L air dengan suhu 100°C yang telah ditambahkan 100 gram gula. Kemudian teh didiamkan dingin hingga suhu 37°C lalu ditambahkan starter SCOBY adn air starter sebanyak 60 mL. Setelah penambahan SCOBY teh difermentasi disuhu ruangan dan di tempat gelap waktu fermentasi 5,10,15 hari. Setelah waktu fermentasi selesai teh kombucha,

kemudian dihitung absorbansinya pada panjang gelombang (λ yang sudah didapatkan menggunakan spektrofotometer UV-VIS (Sa'diyah & Devianti, 2022)).

3.4.4 Skrining Fitokimia

Kombucha daun salam dilakukan uji fitokimia berupa uji kualitatif golongan flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, dan steroid (Velavan, 2016).

3.4.4.1 Flavanoid

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).

3.4.4.2 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 3 bagian, dimasukkan kedalam 3 tabung reaksi. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih pada pereaksi mayer, warna merah jingga pada pereaksi dragendrof dan terbentuk endapan pada penambahan pereaksi wagner (Yuningtyas et al., 2021).

3.4.4.3 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).

3.4.4.4 Saponin

Sampel diambil sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan 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)

3.4.5 Uji pH

Pengukuran pH sampel teh kombucha dilakukan dengan cara mengambil sekitar 10 mL larutan teh kombucha kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian diukur pH larutan teh kombucha menggunakan pH meter (Hassmy et al., 2017).

3.4.6 Uji Iodoform

Sebanyak 5 mL. larutan sampel ditambahkan 1 mL. NaOH 1N dan perlahan-lahan (setelah 3 menit) lalu. ditambahkan 2 mL. iodium 0,1N. Hasil positif ditandai dengan timbulnya bau iodoform dan terbentuk endapan kuning dalam waktu 30 menit jika terdapat etanol (Oktaviani et al., 2011)

3.5 Pengamatan

3.5.1 Uji Aktivitas Antioksidan Kombucha Daun Salam

3.5.1.1 Pembuatan Larutan

a. Pembuatan larutan vitamin C 1000ppm

Larutan vitamin C disiapkan dengan cara menimbang 10 mg vitamin C murni dan dilarutkan dengan etanol p.a, volume akhir dicukupkan hingga 10,0 mL labu ukur.

b. Larutan stok ABTS menimbang ABTS (7 mM) 18 mg dilarutkan akuades dalam labu ukur 5 mL, Kalium persulfat ditimbang 3,5 mg dilarutkan dalam akuades. Kedua larutan dicampurkan lalu tambah etanol p.a sampai 25 mL, diinkubasi selama 12-16 jam dalam ruang gelap (Apriyani, 2020).

c. Larutan $K_2S_2O_8$ menimbang kalium persulfat (2,45 mM) ditimbang 14 mg kemudian dilarutkan ke dalam akuades dalam botol sampai 20 mL (Sari, 2022).

d. Larutan PBS pH (*Phospat Buffered Saline*) 7,4 menimbang natrium klorida 8 g, 0,02 g kalium klorida, 1,42 g natrium hidrogen fosfat, 0,024 g, kalium dihidrogen fosfat dilarutkan dalam akuades sampai 1 L (Apriyani, 2020).

e. Larutan radikal ABTS mencampurkan larutan ABTS 5 mL dengan larutan kalium persulfat 5 mL lalu diinkubasi dalam ruang gelap selama 12-16 jam sebelum digunakan, larutan siap digunakan ditandai warna biru gelap (Apriyani, 2020).

f. Larutan blanko Kalium persulfat sebanyak 5 mL ditambahkan dengan 5 mL aquades lalu diinkubasi dalam ruang gelap suhu 22- 24°C selama 12 -16 jam sebelum digunakan (Apriyani, 2020).

3.5.1.2 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum

Larutan radikal ABTS dipipet sebanyak 1 mL dan dicukupkan dengan PBS (*Phospat Buffered Saline*) pH 7,4 dalam labu ukur 25 mL. Absorbansi larutan diukur pada rentang λ panjang gelombang 600 - 800 nm, tentukan panjang gelombang pada serapan tertinggi (Martani *et.al.*, 2023).

3.5.1.3 Penentuan *Operating Time* (OT)

Larutan ABTS dipipet sebanyak 0,1 mL lalu ditambahkan dengan 1,0 mL larutan vitamin C 3 ppm dalam labu ukur 5,0 mL kemudian amati absorbansinya pada panjang gelombang 734 nm hingga didapatkan absorbansi yang stabil dengan interval waktu pengukuran tiap 1 menit (Rosidah dkk., 2008).

3.5.1.4 Pengukuran Serapan Larutan Kontrol ABTS

Larutan ABTS dipipet sebanyak 1 mL dan dicukupkan volumenya sampai 5mL dengan etanol absolut dalam labu ukur. Larutan ini kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal.

3.5.1.5 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Vitamin C dengan Radikal Bebas ABTS

Larutan Larutan vitamin C dengan konsentrasi 100 ppm dibuat dengan mengencerkan larutan baku vitamin C 1000 ppm. Larutan baku vitamin C dengan deret konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm dibuat dari larutan vitamin C 100 ppm dengan cara dipipet masing-masing sebanyak 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL; 2,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dicukupkan volumenya sampai tanda dengan etanol absolut. Larutan vitamin C pada masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1,0 mL ke dalam labu ukur 5,0 mL dan ditambah 0,1 mL larutan radikal ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai tanda dengan etanol p.a. Selanjutnya dihomogenkan lalu diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada waktu operating time dan panjang gelombang maksimal yang telah didapatkan.

3.5.1.6 Pengukuran Antioksidan Kombucha Daun Salam dengan Metode ABTS

Larutan sampel 1000 ppm dibuat larutan seri 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm dengan dipipet masing-masing 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL dan 2,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dicukupkan volumenya sampai tanda dengan etanol absolut. Larutan sampel pada masing-masing konsentrasi tersebut dipipet 1,0 mL ke dalam labu ukur 5,0 mL

dan ditambah 0,1 mL larutan radikal ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai tanda dengan etanol p.a. dihomogenkan lalu diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal yang didapatkan (Martani *et.al.*, 2023).

3.5.1.7 Penetapan IC₅₀

Perhitungan nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration 50%*) menunjukkan besarnya konsentrasi senyawa larutan uji yang mampu meredam proses oksidasi sebesar 50%, melalui persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi larutan uji (x) dengan % inhibisi (y). Nilai IC₅₀ diperoleh dengan mensubstitusikan y sebagai % inhibisi sebesar 50% dan x sebagai IC₅₀. Perhitungan nilai IC₅₀ dapat dituliskan dengan cara mengubah $y=50$ (Martani *et.al.*, 2023).

$$\begin{aligned} Y &= Bx + A \\ 50 &= Bx + A \\ X &= \frac{50 - A}{B} = IC_{50} \end{aligned}$$

3.5.2 Uji Kadar Alkohol

a. Pembuatan Larutan Kalium Dikromat Asam

Larutan dikromat asam dibuat dengan cara ditimbang sebanyak 0,25g kalium dikromat dan masukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian tambahkan aquadest sedikit demi sedikit dan cukupkan volumenya hingga 10 mL kemudian masukkan kedalam labu ukur 25 mL lalu tambahkan asam sulfat pekat sedikit demi sedikit hingga tanda batas (Rasyid *et al.*, 2022)

b. Pembuatan Larutan Standar

Dibuat larutan standar etanol konsentrasi 2%; 5%; 8%; 11%; 15% dengan cara pipet etanol 70 % sebanyak 0,71 mL, 1,79 mL, 2,86 mL, 3,93 mL, 5,36 mL. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda batas (Rasyid et al., 2022).

c. Pengukuran Panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara membuat larutan standar etanol 11%, larutan etanol 70% dipipet sebanyak 3,93 mL kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Dibaca absorbansi pada panjang gelombang 400-480 nm (Rasyid et al., 2022).

d. Pembuatan Kurva Baku

Konsentrasi baku etanol yang telah dibuat dengan yaitu 2%; 5%; 8%; 11% dan 15 % ditambahkan larutan dikromat asam sebanyak 3 mL. kemudian dipanaskan pada suhu 78°C selama 20 menit. Diambil larutan yang telah berubah warna kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan. Data serapan yang diperoleh kemudian digunakan untuk membuat kurva baku (Rasyid et al., 2022).

e. Uji Kuantitatif Kadar Alkohol

Penetapan kadar pada sampel dilakukan secara triplo dipipet larutan dikromat asam sebanyak 3 mL dan dimasukkan kedalam

tabung reaksi yang telah berisi sampel sebanyak 0,5 ml. Kemudian dipanaskan pada suhu 78°C selama 20 menit kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan aquadest sampai tanda batas dihomogenkan dan diuji sampel dengan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang (Rasyid et al., 2022).

3.6 Teknik Analisis Data

Semua data kuantitatif untuk mengetahui pengaruh waktu fermentasi terhadap aktivitas antioksidan dan pH dilakukan analisis data secara statistik menggunakan metode *One-Way* ANOVA pada taraf kepercayaan 95% dan untuk menganalisis lebih lanjut tentang pengaruh pH terhadap waktu fermentasi dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Multiple Comparisons*. Analisis statistik dilakukandengan menggunakan program aplikasi IBM SPSS Statistics 22 Version (Hassmy, Abidjulu, & Yudistira., 2017).

