BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan metode pra eksperimental dengan rancangan *one shot case study* dengan menggunakan sampel daun murbei hitam dalam sediaan teh kombucha di uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* yang dilakukan di laboratorium Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.2 Sampel

Tanaman Buah Murbei Hitam (*Morus nigra* l.) dari Desa Sukasari Kec. Purwasari Karawang karena banyak sekali tanaman pohon murbei hitam di desa tersebut dan jarang dimanfaatkan oleh warga sekitar. Daun yang diambil adalah daun segar yang masih berwarna hijau. yang diambil adalah daun yang tumbuh di ranting pohon dari daun kedua setelah pucuk.

3.3 Bahan dan Alat yang digunakan

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: simplisia daun murbei hitam, air, gula (Merk gulaku), Air 1000 ml, Starter Kombucha SCOBY (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeasts*) 2 keping, pereaksi mayer (Dragendroff 2ml, HCl 2N 2ml, gelatin 1% 2ml, NaOH 2ml, Etil Asetat 2ml dan Asam Asetat 2ml, Saringan, larutan induk DPPH, (methanol p.a 99,8%), Vitamin C (Murni).

2. Alat

Alat yang digunakan terdiri dari toples kaca, kain putih, neraca analitik (aeAdam), pipet, cawan penguap, penangas air (*waterbath*), alat spektrofotometer *UV-Vis*, labu ukur (Bomex), vial, *beaker glass*, penjepit kayu, tabung reaksi, corong (Xuebei), Kaca arloji (Hebei), spatel logam.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu lama Fermentasi teh Kombucha daun murbei hitam

3.4.2 variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, serta evaluasi sediaan

3.5 Prosedur Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan sebagai berikut:

3.5.1 Determinasi Tanaman

Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) dideterminasi dahulu di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Malang. Determinasi dilakukan agar tidak terjadi kesalahan pada saat pengambilan bahan baku yang dipakai untuk penelitian serta memastikan jenis tumbuhan yang digunakan sesuai dengan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian.

3.5.2 Pembuatan Simplisia

Sampel segar daun murbei hitam diambil 1 kg dari pohon depan rumah di Desa Sukasari Kec. Purwasari Karawang. Daun murbei hitam yang sudah terkumpul kemudian dilakukan sortasi dan cuci bersih dengan air mengalir bertujuan untuk memisahkan daun dari benda asing atau kotoran-kotoran yang menempel, kemudian tiriskan lalu susun diatas tampah rotan lalu keringkan dibawah sinar matahari (dilakukan pengeringan alami) selama 4 hari. Setelah mendapatkan simplisia kering sebanyak 500 gram haluskan simplisia dengan blender, tujuannya agar memperhalus ukuran simplisia untuk proses pembuatan teh dan pengujian (Margaretta *et al.*, 2013).

3.5.3 Pembuatan Teh Kombucha

Panaskan air terlebih dahulu kemudian Sampel sebanyak 5 gr diseduh dengan air panas sebanyak 1 liter, selama 15 menit air seduhan teh disaring untuk memisahkan ampas teh dengan air lalu tambahkan gula sebanyak 10% (b/v) (100 gram) larutkan. Masukkan air teh yang sudah

dilarutkan gula kedalam 2 toples (untuk fermentasi hari ke 7 dan hari ke 14) biarkan hingga dingin lalu masukkan starter kombucha sebanyak 10% (b/v) (100 ml) dan scooby masing-masing sebanyak 1 keping. Tutup dengan kain dan ikat dengan karet. Fermentasi selama 7 dan 14 hari dengan suhu ruang dan tidak boleh terkena sinar matahari (Vina *et al.,* 2017).

3.5.4 Uji Pengukuran pH

Pengukuran pH menggunakan pH meter yang sudah di kalibrasi menggunakan larutan buffer pH 7,00

3.5.5 Skrining Fitokimia Simplisia Daun Murbei Hitam

Prosedur skrining fitokimia menurut Muthmainnah, 2017 sebagai berikut:

1) Alkaloid

Simplisia diambil sebanyak 1 gram, masukkan kedalam mortar tambahkan 20ml ammonia gerus ad homogen lalu tambahkan 20ml kloroform gerus kemudian saring reaksi ditetesi dengan 2 mL HCl 2 N dipanaskan kemudian didinginkan lalu dibagi dalam 3 tabung reaksi, masing-masing 2 mL tiap tabung ditambahkan dengan masing-masing pereaksi. Pada penambahan pereaksi mayer, positif alkaloid membentuk endapan putih atau kuning, pada penambahan pereaksi dragondrof mengandung alkaloid jika terbentuk endapan jingga.

2) Flavonoid

Simplisia diambil sebanyak 1 gram, masukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan HCl pekat lalu dipanaskan dengan waktu 15 meit diatas penangas air, apabila terbentuk warna merah atau kuning berarti positif flavonoid.

3) Tannin

Simplisia diambil sebanyak 1 gram, masukkan kedalam tabung reaksi tambahkan 10mL air panas kemudian didihkan selama 5 menit, filtratnya ditambahkan larutan gelatin 1%, jika adanya endapan putih berarti positif adanya tannin.

4) Kuinon

Simplisia diambil sebanyak 1 gram, masukkan kedalam tabung reaksi tambahkan 10mL air panas kemudian didihkan selama 5 menit, filtratnya ditambahkan larutan NaOH 1N, jika berwarna merah, violet berarti positif adanya kuinon

5) Saponin

Simplisia diambil sebanyak dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu tambahkan 10 ml air panas, dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik jika positif saponin akan terbentuk buih setinggi 1-10 cm tidak kurang 10 menit dan pada penambahan 1 tetes HCl 2 N buih tidak hilang.

6) Steroid/triterpenoid

Simplisia diambil sebanyak 1 gram, dimasukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 2 ml etil asetat dan dikocok, lapisan etil asetat diambil lalu di tetesi pada plat tetes dibiarkan sampai kering, setelah kering tambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat, apabila terbentuk warna merah atau kuning berarti positif terpenoid dan apabila terbentuk warna hijau berarti positif steroid

3.5.6 Penetapan Aktivitas Antioksidan Teh Kombucha Daun Murbei Hitam

1. Pembuatan Larutan Induk DPPH

Menimbang sejumlah 5 mg serbuk DPPH kemudian dilarutkan kedalam 50 mL metanol p.a dan didapatkan konsentrasi 100 ppm (Muchammad *et al.*, 2020).

2. Pembuatan Larutan Blanko

Memipet 2 mL larutan DPPH 100 ppm, lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL yang sudah di bungkus dengan alumunium foil kemudian ditambahkan dengan metanol pro analisis sebanyak 10 mL, dikocok sampai dengan homogen, selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit (Muchammad *et al.*, 2020).

3. Pembuatan Larutan Induk Standar Vitamin C 50 ppm

Menimbang sejumlah 2,5 mg asam askorbat (Vitamin C) kemudian dilarutkan dengan 50 mL metanol pro analisis didalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas, kemudian dikocok hingga homogen (Muchammad *et al.*, 2020).

4. Pembuatan Deret Standar Vitamin C

Membuat deret standar vitamin C dengan konsentrasi 2 ppm; 4 ppm; 6 ppm; 8 ppm ; dan 10 ppm dari larutan vitamin C. lalu ditambahkan 2 mL methanol p.a analisis didalam labu ukur sampai tanda batas. Lalu dari masing masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL, dan ditambahkan dengan 1 mL larutan DPPH, kemudian diinkubasi selama 30 menit. Lalu diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 514 nm dan dilakukan secara tiga kali pengulangan (Muchammad *et al.*, 2020)

5. Pengujian Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

a) Pengukuran Aktivitas Antioksidan teh kombucha daun murbei hitam

Menurut Dwiputri dan Feroniasanti (2019) pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan menggunakan metode DPPH *(2,2-difenil-1-pikrihidrazil*). Dilakukan dengan mencampurkan masing-masing 1 ml teh Kombucha dan 1 ml larutan DPPH didalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan pelarut metanol sampai volume akhir menjadi 5 ml, selanjutnya tabung reaksi di tutup menggunakan aluminium foil, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Sampel control disiapkan dengan mencampurkan 1 mL DPPH dan 4 mL methanol, tanpa penambahan larutan kombucha. Abosrbansi larutan dibaca setelah inkubasi menggunakan spektrofotometer dengan Panjang gelombang 514 nm.

Penentuan persentase Inhibisi

$$\% \text{ inhibisi DPPH} = \frac{A1-A2}{A1} \text{ x } 100\%$$

A1 = Absorbansi baku pembanding

A2 = absorbansi sampel

Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antiradical bebas atau antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas kosentrasi aktivitasnya (Rastuti, 2012 & Pratama *et al.*, 2013)

Adapun kategori antioksidan sebagai berikut:

Tabel 3.1 Kategori Antioksidan

Kategori Antioksidan	Nilai IC_{50} (ppm)
Sangat kuat	<50
Kuat	50 – 100
Sedang	100 – 250
Lemah	250 – 500
Sangat Lemah	>500

b) Perhitungan Nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} menyatakan hubungan antara konsentrasi larutan uji (x) dengan % inhibisi (y). Nilai IC_{50} dihitung dengan cara memperoleh dari persamaan regresi linear, yaitu:

$y = a + bx$

Keterangan:

y: 50 (% hambatan) a: intersep

x: Konsentrasi IC_{50} b: Slop

3.5.7 Uji Organoeptik

Uji kesukaan juga disebut uji hedonik. Panelis diminta tanggapan pribadinya tentang kesukaan atau sebaliknya (ketidaksukaan). Disamping panelis mengemukakan tanggapan senang, suka atau kebalikannya, mereka juga mengemukakan tingkat kesukaannya. Misalnya dalam hal “suka”.

Dalam penelitian ini digunakan uji kesukaan dengan 5 skala hedonik sebagai berikut

Tabel 3.2 Skala Hedonik Uji Organoleptik (Wagiyono, 2003)

Skala Hedonik	Skala Numerik
sangat suka	5
Suka	4
Netral	3
Tidak suka	2
Sangat Tidak suka	1

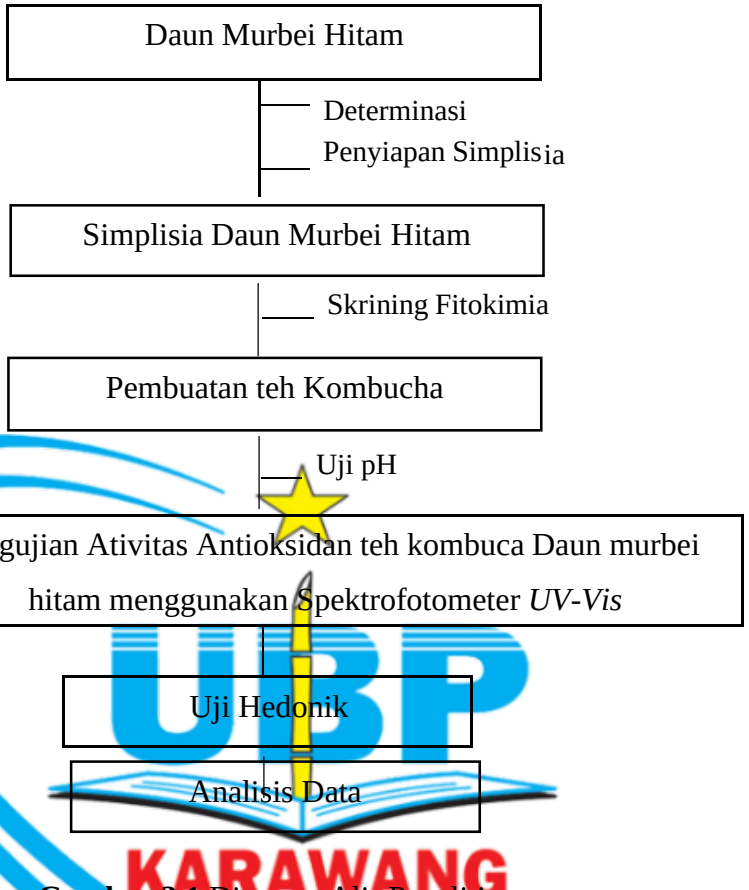
Petunjuk :

1) Dihadapan anda terdapat teh kombucha dengan lama fermentasi selama 7 hari dan 14 hari
2) sebelum meminum sampel, 30 panelis (yang terdiri dari 20 perempuan dan 10 laki-laki usia 20-30 tahun) diharuskan untuk meminum air putih terlebih dahulu
3) Berikan penilaian anda pada form yang telah disediakan dengan cara memberikan skor penilaian pada kolom yang telah disediakan

3.6 Analisis Data

Data hasil skrining fitokimia yang diperoleh di analisis dan dimuat dalam bentuk tabel. Hasil pengujian antioksidan dinyatakan sebagai rata-rata standar deviasi (SD). Data diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* dan dilakukan analisis data secara statistik menggunakan regresi linear menggunakan aplikasi varian satu arah (ANOVA one-way) untuk membandingkan rata-rata populasi.

3.7 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian