

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian experimental laboratorium dengan kandungan fermentasi daun terubuk untuk meguji kandungan antioksidan fermentasi ekstrak etanol dan fraksi air daun terubuk (*S. spontaneum*) dengan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Pengukuran hasil pengujian aktivitas antioksidan dinyatakan dalam nilai IC₅₀.

3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang akan diuji yaitu daun terubuk (*S. spontaneum*) tanaman terubuk ini diambil di Kecamatan Tegalwaru Loji Kabupaten Karawang, Provinsi Jawa Barat.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian yaitu, spektrofotometri UV-Vis, autoklaf, incubator, LAF, timbangan analitik, waterbath, rotary evaporator, kuvet (HELLMA), labu ukur 50 mL (Pyrex), labu ukur 10 mL (Pyrex), labu ukur 5 mL (Pyrex), pipet volume 5,0 mL (Pyrex), pipet volume 1,0 mL (Pyrex), oven, corong kaca (Pyrex), kaca arloji, batang pengaduk, gelas beker (Pyrex), gelas ukur (IWAKI), tabung reaksi (Pyrex), Erlenmeyer (Iwaki, rak tabung reaksi, aluminium foil, kertas saring, vial coklat dan putih, tang kurs, cawan porselen, kurs, jarum ose, cawan petri, kaki tiga, bunsen dan spirtus, pipet tetes.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya, simplisia daun terubuk (*S. spontaneum*), etanol 96%, aquadest, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Vitamin C, etanol p.a, pereaksi Dragendorff, Pereaksi mayer, pereaksi Lieberman, kertas saring, serbuk Mg, HCL 2N, FeCl₃ 1 %, McFarland 0,5, PDA.

3.4 Alur Kegiatan

Penelitian akan dilakukan di laboratorium bahan alam Universitas Buana Perjuangan Karawang, pada bulan Januari sampai Juli tahun 2025.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu fermentasi ekstrak etanol dan fraksi air daun terubuk.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu standarisasi simplisia, skrining fitokimia, nilai IC_{50} hasil uji dari aktivitas antioksidan fermentasi ekstrak etanol dan fraksi air daun terubuk dengan metode DPPH.

3.5.2 Definisi Operasional Variabel

Berikut merupakan definisi variabel operasional yang terdapat pada penelitian ini sebagai berikut :

Tabel 3. 1 Variabel Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Rasio
Variabel Bebas				
Ekstrak etanol daun terubuk	Ekstrak etanol daun terubuk adalah ekstrak kental yang terbuat dari daun terubuk yang sudah dikeringan dan diekstraksi dengan etanol 96% untuk	Observasi	Nominal	

	memperoleh rendemen ekstrak				
Variabel					
Terikat					
Skrinning Fitokimia	Ekstrak sudah dimaserasi dan didapatkan ekstrak kental di uji dengan reagen pendeteksi golongan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, dll, kemudian dilihat perubahan warna dan endapan yang terjadi	yang Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif	
Uji Antioksidan	Aktivitas antioksidan dari ekstrak daun terubuk diuji dengan menggunakan metode DPPH, dengan mengukur nilai absorbansi	Spektrofotometer Uv-Vis	Rasio	ppm (per part million)	

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Daun terubuk (*S. spontaneum*) tanaman terubuk ini diambil di Kecamatan Tegalwaru Loji Kabupaten Karawang, Provinsi Jawa Barat. Daun terubuk diidentifikasi di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Herbarium Jatinangor, Jurusan Biologi FMIPA UNPAD.

3.6.2 Preparasi Daun Terubuk

Sebanyak 3 kg daun terubuk (*S. spontaneum*) dicuci bersih kemudian dipotong tipis-tipis. Dikeringkan dengan cara dipanaskan dibawah sinar matahari, setelah kering diblender hingga halus (Sulasiyah *et al.*, 2018).

3.6.3 Peremajaan *Aspergillus oryzae*

Stok jamur *Aspergillus oryzae* diambil menggunakan jarum ose steril kemudian di celupkan kedalam medium *Potato Dextrose* agar (PDA), dan diinkubasi pada suhu 25-30°C. Setelah inkubasi, spora jamur yang tumbuh dibandingkan dengan *McFarland* konsentrasi 0,5. Bertujuan untuk menyeragamkan konsentrasi spora jamur yang digunakan (Sulasiyah *et al.*, 2018).

3.6.4 Fermentasi Daun Terubuk

Sebanyak 200 gram serbuk fermentasi daun terubuk (*S. spontaneum*) dimasukkan ke dalam botol kaca berwarna coklat, kemudian ditambahkan aquades sebanyak 800 mL dengan rasio 1:4 (b/v). Selanjutnya, suspensi spora diinokulasi ke dalam substrat sebesar 1% (v/v), lalu dihomogenkan secara merata. Campuran tersebut kemudian diinkubasi selama 72 jam dalam kondisi terkontrol untuk mendukung aktivitas fermentasi (Putri *et al.*, 2023).

3.6.5 Ekstraksi Produk Fermentasi

Ekstraksi terhadap hasil fermentasi daun terubuk (*S. spontaneum*) dilakukan melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan rasio 1:10 (v/v) selama 24 jam. Setelah proses perendaman selesai, sampel disaring untuk memperoleh filtrat. Filtrat yang diperoleh kemudian dievaporasi dengan bantuan rotary evaporator hingga menghasilkan ekstrak kering yang siap digunakan dalam tahap analisis selanjutnya (Sulasiyah *et al.*, 2018).

3.6.6 Fraksinasi

Proses fraksinasi diawali dengan pelarutan ekstrak kental, diikuti oleh pengadukan hingga homogen. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah berkapasitas 500 mL untuk dilakukan pemisahan menggunakan pelarut *n*-heksana, sehingga terbentuk dua fase: fraksi *n*-heksana di lapisan atas dan fraksi air di lapisan bawah. Fraksi air selanjutnya diekstraksi ulang menggunakan etil asetat, menghasilkan fraksi etil asetat dan fraksi air sisa. Setiap fraksi yang diperoleh meliputi fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air, kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental bebas pelarut, yang siap dianalisis lebih lanjut (Hasanah *et al.*, 2017).

3.6.7 Skrinning Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Pada uji alkaloid dalam suatu sampel dapat dideteksi melalui uji Mayer dan uji Dragendorff. Pada uji mayer 1 mL ekstrak diencerkan dengan HCl dan tetes Mayer reagen ditambahkan. Adanya endapan berwarna putih yang terbentuk mengindikasikan adanya alkaloid dalam sampel. Sementara itu, pada uji Dragendorff, tetesan pereaksi Dragendorff ditambahkan ke dalam 2 mL larutan ekstrak. Munculnya endapan berwarna merah kecokelatan menunjukkan hasil positif terhadap keberadaan alkaloid (Kalauni *et al.*, 2024).

b. Saponin

Adanya saponin dalam ekstrak dapat diidentifikasi melalui uji busa. 1 mg ekstrak direbus bersama dengan 5 mL air suling. Filtrat yang dihasilkan kemudian dikocok. Terbentuknya busa yang stabil pada permukaan filtrat mengindikasikan adanya senyawa saponin dalam sampel (Kalauni *et al.*, 2024).

c. Flavonoid

Sebanyak 1 mg ekstrak etanol ditambahkan serbuk magnesium (Mg) dan asam klorida pekat (HCl) sebagai reagen deteksi. Kemunculan warna khas seperti kuning, biru, jingga, atau merah mengindikasikan

keberadaan senyawa flavonoid dalam ekstrak tersebut. Reaksi warna ini terjadi akibat interaksi antara struktur flavonoid dengan magnesium dan HCl, membentuk kompleks berwarna yang dapat diamati secara visual sebagai indikator kualitatif (Oktavia dan Sutoyo, 2021).

d. Steroid dan Triterpenoid (Uji Lieberman-Bourchard)

Sebanyak 1 mg sampel padat dari ekstrak etanol ditempatkan pada cawan penguap, kemudian ditambahkan reagen Lieberman-Burchard dan diaduk hingga homogen. Perubahan warna yang terjadi pada larutan digunakan sebagai indikator keberadaan senyawa tertentu: warna ungu hingga jingga menunjukkan kemungkinan adanya senyawa triterpenoid, sedangkan warna biru atau hijau mengindikasikan keberadaan senyawa steroid (Oktavia dan Sutoyo, 2021).

e. Tanin

Sebanyak 1 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dilakukan pemanasan ringan. Selanjutnya, larutan FeCl_3 1% ditambahkan sebanyak 2–3 tetes ke dalam sampel. Perubahan warna menjadi hijau, hijau tua, atau biru kehitaman menunjukkan hasil positif terhadap keberadaan senyawa tanin, berdasarkan reaksi kompleksasi antara Fe^{3+} dan gugus fenolik dari tanin (Bajrami *et al.*, 2023).

f. Fenolik

Sejumlah 1 mg sampel padat diletakkan dalam plat tetes, masukkan 10 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terciptanya warna hitam (Oktavia dan Sutoyo, 2021).

3.6.8 Standarisasi

1. Parameter Spesifik

a. Identitas Ekstrak

Identitas ekstrak meliputi deskripsi tata nama, nama lain tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan dan nama Indonesia tumbuhan (Ni'am *et al.*, 2023).

b. Uji Organoleptik

Uji organoleptik meliputi bentuk, warna, dan bau ekstrak (Ni'am *et al.*, 2023).

c. Kadar Sari Larut Etanol

Sebanyak 2 gram ekstrak dimaserasi menggunakan 100 mL etanol 95% dalam labu bersumbat selama 24 jam. Selama 6 jam pertama, campuran dikocok secara berkala untuk mempercepat proses pelarutan, kemudian didiamkan selama 18 jam. Filtrat disaring secara cepat untuk mencegah penguapan pelarut etanol. Selanjutnya, sebanyak 20 mL filtrat diuapkan dalam cawan penguap bertanda hingga kering, dan residu yang diperoleh dipanaskan pada suhu 105 °C hingga mencapai bobot konstan. Persentase senyawa yang larut dalam etanol dihitung berdasarkan massa residu terhadap massa ekstrak awal (Najib *et al.*, 2018). Standar acuan menurut Farmakope Herbal Indonesia, lebih dari 8%. Berikut rumus untuk perhitungan kadar sari larut etanol yaitu:

$$\text{Kadar Sari Larut Etanol} = \frac{\text{Bobot sari larut etanol}}{\text{Berat ekstrak}} \times \frac{100}{20} \times 100 \%$$

d. Uji Sari Larut Air

Sebanyak 2 gram ekstrak dimaserasi menggunakan campuran air-kloroform sebanyak 100 mL dalam labu bersumbat selama 24 jam. Selama 6 jam pertama, larutan dikocok secara berkala untuk memastikan proses pelarutan berlangsung optimal, kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah itu, campuran disaring untuk memperoleh filtrat yang jernih. Sebanyak 20 mL filtrat dimasukkan ke dalam cawan penguap, lalu diuapkan hingga kering. Residu yang diperoleh dipanaskan pada suhu 105 °C hingga mencapai bobot tetap. Persentase senyawa yang larut dalam pelarut air dihitung berdasarkan bobot residu terhadap berat ekstrak awal (Najib *et al.*, 2018). Standar acuan menurut Farmakope Herbal Indonesia, tidak kurang dari 12%. Berikut rumus perhitungan kadar sari larut air yaitu:

$$\text{Kadar Sari Larut Air} = \frac{\text{Bobot sari larut air}}{\text{Berat ekstrak}} \times \frac{100}{20} \times 100 \%$$

2. Parameter Non-Spesifik

a. Uji Kadar Air

Sebanyak 2 gram ekstrak ditempatkan ke dalam botol timbang yang telah ditera dan diketahui bobotnya secara presisi. Proses pengeringan dilakukan dalam oven pada suhu 105 °C selama 3 jam, kemudian sampel didinginkan dalam desikator untuk menghindari pengaruh kelembaban. Setelah mencapai suhu ruang, botol timbang berisi residu ditimbang dan dicatat. Tahapan pengeringan dan penimbangan diulang hingga diperoleh bobot tetap, sebagai indikator bahwa pelarut telah sepenuhnya teruapkan (Ni'am *et al.*, 2023). Untuk menjaga kualitas dan stabilitas simplisia, kadar airnya harus dipertahankan di bawah atau sama dengan 10% (Dewi *et al.*, 2023). Berikut rumus perhitungan kadar air yaitu:

$$\text{Kadar Air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

b. Uji Susut Pengeringan

Cawan penguap kosong ditimbang terlebih dahulu, kemudian dipanaskan pada suhu yang telah ditetapkan selama 30 menit untuk menghilangkan kelembaban. Setelah itu, cawan didinginkan dalam desikator hingga mencapai suhu ruang dan ditimbang kembali hingga diperoleh bobot konstan. Selanjutnya, sebanyak 2 gram ekstrak ditimbang dan dimasukkan ke dalam cawan tersebut, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu antara 50–60 °C selama 1 hingga 2 jam. Pengeringan dan penimbangan dilakukan berulang sampai diperoleh bobot tetap, yang mencerminkan hilangnya pelarut atau kadar air yang masih terkandung dalam sampel (Ni'am *et al.*, 2023). Standar acuan menurut Farmakope Herbal Indonesia, kurat dari 10%. Berikut rumus perhitungan susut pengeringan yaitu:

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{(W_1 - W_0) - (W_2 - W_0)}{(W_1 - W_0)} \times 100 \%$$

c. Uji Kadar Abu Total

Untuk mengetahui kandungan mineral dalam fermentasi daun terubuk (*S. spontaneum*), dilakukan pengujian kadar abu. Sebanyak 2 gram ekstrak dilarutkan dalam etanol 96% lalu dipanaskan hingga semua bagian organik terbakar habis dan menyisakan abu. Berat abu yang tersisa kemudian diukur (Putri *et al.*, 2021). Standar acuan menurut Farmakope Herbal Indonesia, Tidak lebih dari 10,6%. Berikut rumus perhitungan kadar abu total yaitu:

$$\text{Kadar Abu Total} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

d. Uji Abu Tidak Larut Asam

Abu yang telah diperoleh kemudian dilarutkan dalam asam klorida untuk melarutkan mineral-mineral yang terkandung di dalamnya. Abu yang tidak larut disaring dan dicuci bersih untuk memastikan semua mineral larut terambil. Sisa abu dan kertas saring kemudian dikeringkan dan ditimbang untuk mengetahui jumlah abu yang tidak larut dalam asam (Putri *et al.*, 2021). Standar acuan menurut Farmakope Herbal Indonesia, Tidak lebih dari 2%. Berikut rumus perhitungan kadar abu tidak larut asam yaitu:

$$\text{Kadar Abu Tidak Larut Asam} = \frac{\text{Berat abu tidak larut asam}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100 \%$$

3.6.9 Uji Antioksidan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 2 mg serbuk DPPH ditimbang secara presisi, kemudian dilarutkan dalam 50 mL etanol pro analisis (p.a.) dengan pengocokan hingga larut sempurna untuk menghasilkan larutan DPPH dengan konsentrasi akhir sebesar 40 ppm. Larutan yang telah homogen dipindahkan ke dalam labu ukur berkapasitas 50 mL, lalu disimpan pada tempat yang terlindung dari cahaya matahari langsung guna mempertahankan kestabilan kimia DPPH selama periode penyimpanan (Hartanto, 2018).

b. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko disiapkan dengan menempatkan sebanyak 4 mL larutan DPPH ke dalam kuvet kuarsa, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum karakteristik DPPH. Langkah ini bertujuan untuk memperoleh nilai absorbansi awal sebagai kontrol pembanding dalam pengujian aktivitas antioksidan, sehingga penurunan absorbansi dapat digunakan sebagai indikator kemampuan ekstrak dalam mereduksi radikal bebas (Hartanto, 2018).

c. Pembuatan Larutan Pembanding

Vitamin C ditimbang sebanyak 2,5 mg, kemudian dilarutkan ke dalam 50 mL etanol p.a untuk menghasilkan larutan induk dengan konsentrasi 50 ppm. Dari larutan induk ini, dibuat larutan seri dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Untuk memperoleh larutan 2 ppm, sebanyak 0,4 mL larutan induk dipipet dan diencerkan dengan etanol p.a hingga mencapai volume 10 mL. Selanjutnya, 2 mL larutan tersebut dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH. Larutan 4 ppm dibuat dengan memipet 0,8 mL larutan induk, kemudian diencerkan hingga 10 mL dengan etanol p.a, dan diambil 2 mL untuk dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH. Pembuatan larutan 6 ppm dilakukan dengan cara memipet 1,2 mL larutan induk, diencerkan hingga volume akhir 10 mL, lalu diambil 2 mL dan dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH. Untuk larutan 8 ppm, sebanyak 1,6 mL larutan induk dipipet, kemudian diencerkan menggunakan etanol p.a hingga 10 mL, dan diambil 2 mL untuk direaksikan dengan 2 mL larutan DPPH. Terakhir, larutan 10 ppm diperoleh dengan memipet 2 mL larutan induk, diencerkan dengan etanol p.a hingga volume 10 mL, kemudian 2 mL larutan tersebut dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH (Hartanto, 2018).

d. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Larutan uji dari ekstrak etanol dan fraksi air hasil ekstraksi cair-cair (ECC) masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg, lalu dilarutkan dalam pelarut etanol p.a hingga mencapai volume akhir 10 mL. Prosedur

ini menghasilkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, dilakukan preparasi larutan uji dengan konsentrasi bertingkat yaitu 10, 20, 40, 80, dan 100 ppm. Seluruh larutan campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit guna memastikan reaksi dengan larutan DPPH berlangsung secara optimal. Setelah proses inkubasi, pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum DPPH. Data absorbansi yang diperoleh digunakan dalam perhitungan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas DPPH (Erikania *et al.*, 2023). Aktivitas penangkapan radikal bebas (persen inhibisi) dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

Penentuan nilai IC_{50} dimulai dengan penyusunan persamaan regresi linier yang merepresentasikan hubungan antara persentase inhibisi dengan variasi konsentrasi larutan uji, baik dari ekstrak sampel maupun senyawa pembanding seperti vitamin C. Berdasarkan persamaan tersebut, nilai IC_{50} dihitung sebagai konsentrasi yang mampu memberikan efek penghambatan sebesar 50% terhadap radikal bebas DPPH, yang ditunjukkan oleh titik potong kurva regresi dengan garis horizontal pada level inhibisi 50% (Hasanah *et al.*, 2017). Berdasarkan persamaan garis regresi linear antara variabel y (respon yang diamati, seperti absorbansi) dan variabel x (konsentrasi larutan standar), digunakan rumus umum regresi linear:

$$y = ax + b$$

di mana:

y = nilai respon (misalnya absorbansi)

x = nilai konsentrasi larutan

a = kemiringan (*slope*) garis regresi

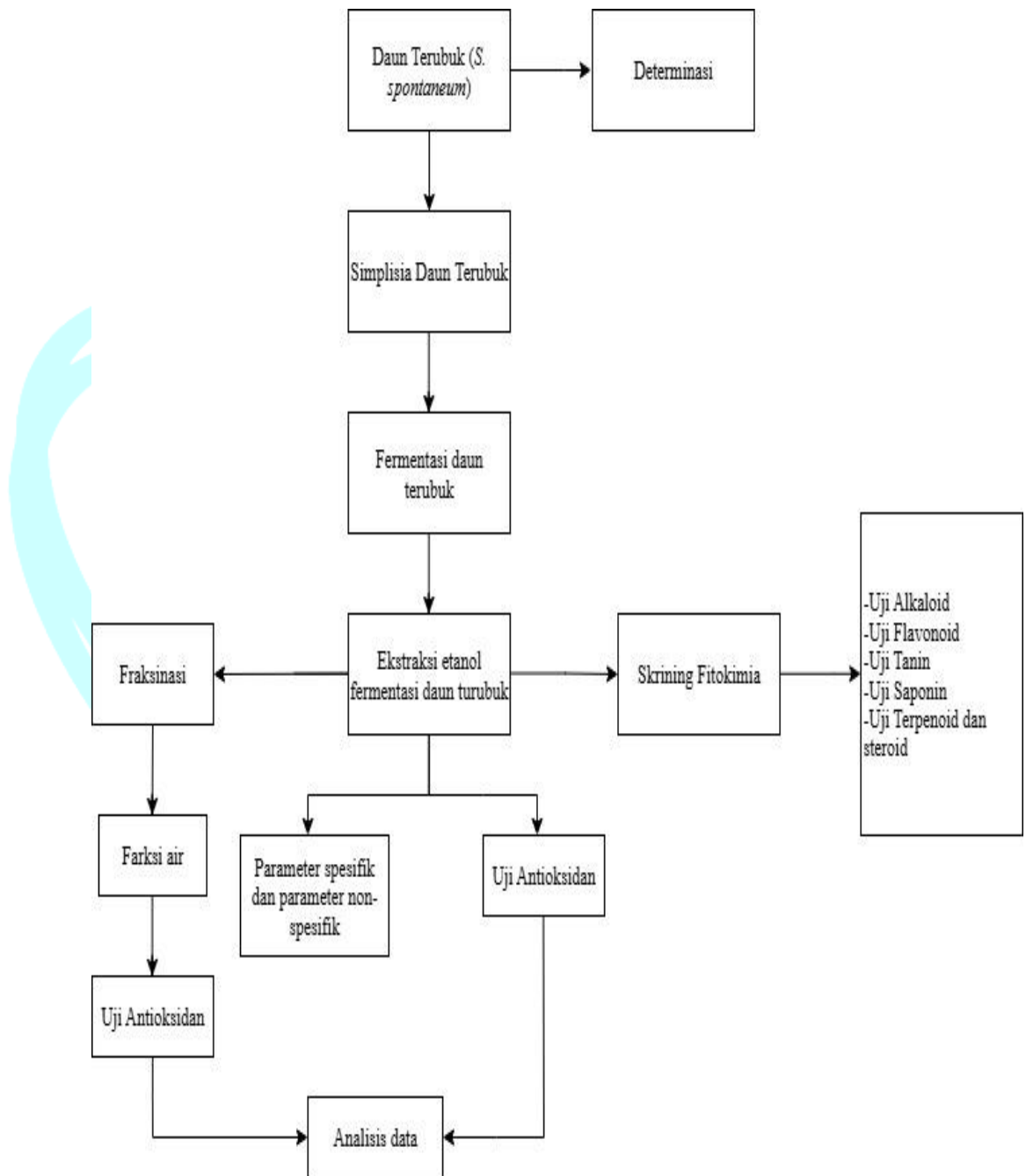
b = intersep (titik potong sumbu y)

3.7 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan menghitung nilai rata-rata dan menyajikan hasil dalam bentuk tabel dan grafik untuk menggambarkan aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi air dari fermentasi daun terubuk (*S. spontaneum*).



3.8 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian