**BAB III**

# METODE PENELITIAN

## **3.1 Rancangan penelitian**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini merupakan metode penelitian deskriptif. Rancangan penelitian ini meliputi pengumpulan dan pengolahan sampel, skrining fitokimia, karakteristik daun bidara, pembuatan kombucha daun bidara, karakteristik teh herbal kombucha daun bidara, uji kadar Vitamin C, dan uji aktivitas antioksidan pada kombucha daun bidara *(Ziziphus mauritiana* Lam)*.*

### **3.1.1 Variabel Penelitian**

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu kombucha daun bidara *(Ziziphus mauritiana* Lam*).* dan variabel terikat dalam penelitian ini adalah kandungan kimia, hasil perubahan warna uji kualitatif, kadar vitamin C serta aktivitas antioksidan pada kombucha daun bidara *(Ziziphus mauritiana* Lam*).*

### **3.1.2 Parameter Penelitian**

Parameter dalam penelitian ini yaitu skrining fitokimia meliputi alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, steroid/triterpenoid, glikosida, kadar air, kadar abu total, kadar abu larut dalam air, kadar abu tak larut dalam asam, kadar vitamin C, dan nilai *IC50.*

## **3.2 Lokasi Penelitian dan Jadwal Penelitian**

### **3.2.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah

### **3.2.2 Jadwal Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2024..

## **3.3 Alat dan Bahan**

### **3.3.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, gelas beaker, tabung reaksi, cawan penguap, corong, desikator, erlenmeyer, gelas ukur, gunting, wadah, kertas saring, krus porselen, labu tentukur, mat pipet, neraca analitik, oven, pipet tetes,panci/wadah,spektrofotometer UV/Vis

### **3.3.2 Bahan**

Bahan yang digunakan meliputi: simplisia daun bidara, aquades, SCOBY (Symbiotic Culture of Bactery and Yeast), KMnO4 0,1 N, gula pasir, DPPH (1,1 diphenyl- 2pycrylhydrazyl), asam galat, hcl 10%, Hcl 0,1 N metanol, Vitamin C (asam askorbat).

## **3.4 Penyiapan Sampel**

### **3.4.1 Pengambilan Sampel Tumbuhan**

Sampel diambil dari Sei Piring Pulau Rakyat, pada siang hari dengan cara mengambil atau mengumpulkan Daun Bidara yang tua.

### **3.4.2 Determinasi Tumbuhan**

Determinasi tumbuhan yang memiliki tujuan untuk memastikan Kebenaran bahan penelitian yang digunakan dilakukan di herbarium medanese (MEDA), universitas sumatera utara.

## **3.5 Pengolahan Simplisia**

### **3.5.1 Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Bidara**

Sampel daun bidara *(Ziziphus mauritiana* Lam*)* yang masih segar dikumpulkan disortasi basah untuk memisahkan cemaran (kotoran dan bahan asing lain) cuci lalu tiriskan,ditimbang berat basahnya. Kemudian dikeringkan dengan dikering anginkan hingga kering dan dilakukan sortasi kering yaitu membuang benda-benda asing yang tertinggal pada simplisia. Kemudian ditimbang berat keringnya, dihaluskan dengan blender, kemudian diayak, dan disimpan di dalam wadah yang tertutup rapat.

## **3.6 Pemeriksaan karakteristik simplisia**

### **3.6.1 Penetapan kadar air**

Panaskan cawan beserta tutup dalam oven (105°C) selama ±1 jam dan dinginkan dalam desikator. masukkan 5 g sampel ke dalam cawan, tutup dan timbang (W1). Panaskan cawan yang berisi sampel tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup cawan di samping cawan di dalam oven pada suhu (105°C) selama tiga jam. Tutup cawan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit kemudian timbang. Lakukan pemanasan kembali selama satu jam dan timbang sampai mencapai bobot yang tetap (W2). Lakukan pekerjaan duplo dan hitung kadar air dalam sampel (SNI 4324:2014).

Kadar air (%) = $\frac{W1-W2}{W1-W0}$ x 100%

Keterangan:

WO = bobot cawan kosong dan tutupnya (g);

W1 = bobot cawan, tutupnya dan sampel sebelum dikeringkan (g);

W2 = bobot cawan, tutupnya dan sampel setelah dikeringkan (g).

### **3.6.2 Penetapan kadar sari larut dalam air**

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 ml kloroform p (2,5 ml kloroform dalam 100 ml aquadest) selama 24 jam dalam labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat , kemudian diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan penguap berdasar rata yang telah ditara 20 ml, dipanaskan sisa pada suhu 105˚C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam air. (Depkes RI,1979).

$$\% Kadar Sari Larut Dalam Air =\frac{ Berat sari laut air\left(g\right)}{Berat Sampel}x\frac{100 ml}{20 ml}x 100 \%$$

### **3.6.3 Penetapan kadar sari larut dalam etanol**

Sebanyak 5 g serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol (96%) dalam labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan penguap berdasar rata yang telah ditara 20 ml, dipanaskan sisa pada suhu 105˚C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 96% dihitung terhadap bahan yang dikeringkan di udara (Depkes RI,1979).

$$\% Kadar sari larut etanol=\frac{Berat sari larut etanol (g)}{Berat sampel}x\frac{100 ml}{20 ml}x 100 \%$$

### **3.6.4 Penetapan kadar abu total**

Panaskan cawan dalam tanur pada suhu (525°C) selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (WO). Timbang dengan teliti sampel sebanyak 5 g contoh, masukkan ke dalam cawan dan timbang (W1). Panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam oven pada (105°C) sampai air hilang. Panaskan cawan yang berisi contoh yang telah dikeringkan di atas pemanas listrik hingga terbentuk arang (pemanasan secara bertahap dari panas kecil). Tempatkan cawan yang berisi sampel tersebut dalam tanur pada suhu (525°C) sampai terbentuk abu bewarna putih. Tambahkan air ke dalam abu, keringkan dalam penangas air kemudian lanjutkan pada pemanas listrik kemudian abukan kembali pada suhu (525°C) sampai mencapai bobot yang tetap. Pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang (W2). Lakukan pekerjaan duplo dan hitung kadar abu total dalam sampel (SNI 4324:2014).

Kadar abu total (%): = $\frac{W1-W2}{W1-W0}$ x 100%

Keterangan:

WO = bobot cawan kosong (g);

W1 = bobot cawan dan sampel sebelum diabukan (g);

W2 = bobot cawan dan sampel setelah diabukan (g).

### **3.6.5 Kadar Abu Larut dalam Air**

Sampel yang digunakan adalah abu yang berasal dari penentuan kadar abu total (W). Tambahkan 20 mL air suling ke dalam cawan yang berisi abu total, panaskan sampai hampir mendidih dan saring dengan kertas saring bebas abu. Bilas cawan dan kertas saring beserta isinya dengan air panas hingga jumlah filtrat kira-kira 60 mL. Simpan filtrat untuk penetapan alkalinitas abu larut dalam air. Pindahkan kertas saring dan isinya ke cawan semula, uapkan dengan hati-hati di atas penangas air. Abukan dalam tanur listrik pada suhu (525°C) sampai bebas karbon. Pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang (W3). Ulangi pekerjaan sampai mencapai bobot yang tetap. Lakukan pekerjaan duplo dan hitung kadar abu larut dalam air (SNI 4324:2014).

Abu larut dalam air = $\frac{W4-W3}{W}$ x $\frac{100}{100-KA}$ x 100%

Keterangan:

W = bobot sampel pada penetapan abu total (g);

W4 = sampel abu total (g)

W3 = sampel abu tak larut dalam air (g);

KA = kadar air (%)

### **3.6.6 Penetapan** **Kadar Abu Tidak Larut dalam Asam**

Sampel merupakan abu tak larut dalam air (W3). Ditambahkan 25 ml, HCI 10% ke dalam cawan yang berisi sampel, tutup cawan untuk menghindari percikan dan didihkan larutan hati-hati selama sepuluh menit di atas penangas air. Dinginkan dan saring larutan menggunakan kertas saring bebas abu. Bilas menggunakan air panas hingga air pencuci bebas dari asam. Hal ini dapat diuji dengan larutan AgNO3. Tempatkan kembali kertas saring dan isi ke dalam cawan, uapkan hati-hati di atas penangas air yang mendidih, kemudian panaskan dalam tanur pada suhu (525°C) hingga partikel bebas karbon. Segera pindahkan dan dinginkan cawan ke dalam desikator selama 30 menit dan timbang (W4). Ulangi pekerjaan sampai mencapai bobot yang tetap. Lakukan pekerjaan duplo dan hitung kadar abu tak larut dalam asam (SNI 4324:2014).

Kadar abu tak larut dalam asam (%) = $\frac{W4}{W3}$ x $\frac{100}{100-KA}$ x 100%

Keterangan:

W4 = bobot sampel pada penetapan abu total (g);

W3 = bobot abu tak larut dalam air (g).

KA = kadar air, dinyatakan dalam %

## **3.7 Pembuatan Larutan Pereaksi**

### **3.7.1 Pereaksi Bouchardat**

Sebanyak 4 gram kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml aqua dest kemudian 2 gram iodium dilarutkan sedikit demi sedikit kedalamnya, setelah semuanya larut ditambahkan air suling hingga volume 100 ml (Ditjen POM,1979).

### **3.7.2 Pereaksi Mayer**

Sebanyak 1,36 gram raksa (II) klorida dilarutkan sedikit demi sedikit dalam 60 ml aqua dest. kemudian pada wadah lain sebanyak 5 gram kaliu iodide dilarutkan dalam 10 ml air suling, kedua larutan dicampurkan dan volume dicukupkan dengan air suling sehingga 100 ml (Ditjen POM,1979).

### **3.7.3 Pereaksi Dragendorf**

Sebanyak 8 gram bismuth (II) nitrat dilarutkan 20 ml asam nitrat Pekat. Pada wadah lainm ditimbang 27,2 gram kalium iodida dilarutkan dilarutkan dalam 50 ml air suling. Kedua larutan dicampurkan sama banyak dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan air suling hingga 100 ml (Ditjen POM,1979).

### **3.7.4 Pereaksi Molish**

Sebanyak 3 gram alfa naftol ditimbang kemudian ditambahkan beberapa tetes etanol kemudian dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga volume 100 ml (Ditjen POM,1979).

### **3.7.5 KMnO4 0,1 N**

 Sebanyak 0,316 gram KmnO4 ditimbang, kemudian larutkan dengan aquadest pada beaker gelas 100 ml, kemudian masukkan kedalam labu ukur 100 ml hingga tanda batas (Depkes RI, 1995).

### **3.7.6 Asam Klorida 2N**

Sebanyak 16,67 ml asam klorida pekat diencerkan dengan air suling hingga volume 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.7.7 Asam Sulfat 2N**

Sebanyak 5,4 ml asam sulfat pekat diencerkan dengan air suling hingga volume 100 ml (Depkes RI,1995).

### **3.7.8 Besi (III) Klorida 1%**

Sebanyak 1 g besi (III) klorida dilarutkan sedikit demi sedikit kedalam asam klorida 0,5 dan volumenya dicukupkan hingga volume 100 ml (DepkesRI,1995).

### **3.7.9 Timbal (II) asetat 0,4 M**

Sebanyak 15,17 g timbal (II) asetat dilarukan sedikit demi sedikit dalam air suling bebas karbondioksida hingga volume 100 ml (Depkes RI,1995).

### **3.7.10 Natrium hidroksida 2N**

Sebanyak 8,002 g natrium hidroksida dilarukan sedikit demi sedikit dalam air suling hingga volume 100 ml (Depkes RI,1995).

### **3.7.11 Pereaksi Liebermann-Burchard**

Sebanyak 5 ml asam asetat anhidrida dicampurkan dengan 5 ml asam sulfat pekat kemudian ditambahkan etanol hingga volume 50 ml (Depkes RI,1995)

## **3.8 Skrining Fitokimia**

### **3.8.1 Pemeriksaan Alkaloid**

Serbuk simplisia ditimbang 0,5 g ditambahkan 1 ml Hcl 2 N ditambahkan 9 ml aquades, lalu dipanaskan air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring filtrate dipakai untuk pemeriksaan alkaloid :

1. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer
2. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Bourchardat
3. Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan paling sedikit dua atau tiga dari percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

### **3.8.2 Pemeriksaan Flavonoid**

Sebanyak 0,5 g serbuk ditimbang, kemudian ditambahkan 10 ml air suling panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, filtrate yang diperoleh kemudian diambil 5 ml lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Magnesium dan1 ml Hcl pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Adanya Flavonoid ditandai dengan adanya warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1995).

### **3.8.3 Pemeriksaan Tanin**

Sebanyak 0,5 gram simplisia disari dengan 10 ml air suling, lalu disaring filtratnya diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan 1-2 ml larutan besi (III) klorida 1%, jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes RI, 1995).

**3.8.4 Pemeriksaan Saponin**

Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia dimasukkan kedalan tabung reaksi, lalu ditambahkan10 ml air suling panas dan didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 menit, jika terbentuk busa dengan ketinggian 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes Hcl 2N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

**3.8.5 Pemeriksaan Glikosida**

Sebanyak 0,5 g simplisia disari 30 ml campuran etanol 95% dengan aquades (7:3) dan 10 ml HCL 2N direfluks selama 2 jam, didinginkan dan disaring. Diambil 20 ml filtrat ditambahkan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M dikocok, lalu didiamkan selama 5 menit lalu disari dengan 25 ml campuran kloroform dan isopropanol (3:2), dilakukan berulang sebanyak 3 kali. Sari air dikumpulkan dan diuapkan pada temperatur tidak lebih 50°C. Sisanya dilarutkan didalam metanol larutan sisa digunakan untuk percobaan berikut 0,2 ml larutan percobaan di atas dimasukkan ke dalam tabung reaksi, diuapkan penangas air, pada sisa tambahkan 2 ml aquadest dan 5 ml tetes pereaksi Molisch, secara perlahan-lahan tambahkan 2 ml H2SO4(p) melalui dinding tabung, terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas kedua lapisan menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI, 1995).

### **3.8.6 Pemeriksaan Steroida/Triterpenoida**

Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam, maserat disaring lalu filtrate diuapkan dalam cawan penguap, sisanya ditambahkan 2 tetes Liebermann-Burchard, apabila terbentuk warna ungu atau merah yang kemudian berubah menjadi biru atau biru hijau menunjukkan adanya steroida atau triterpenoida (Harbone, 1987).

**3.9 Pembuatan Kombucha Daun Bidara *(Ziziphus mauritiana* Lam*)***

**3.9.1 Pembuatan Larutan Seduhan Teh Herbal Daun Bidara *(Ziziphus mauritiana* Lam*)***

Ditimbang 20 g (1 % b/v) serbuk simplisia daun bidara kemudian diseduh dengan air mendidih sebanyak 2000 mL, tutup wadah dengan aluminium foil hingga dingin, saring.

### **3.9.2 Pembuatan Formulasi Sediaan Kombucha Daun Bidara *(Ziziphus mauritiana* Lam**

Seduhan teh herbal daun bidara sebanyak 2 liter (2000 ml) yang sudah disiapkan sebelumnya kemudian dituangkan ke dalam wadah kaca yang telah di sterilkan sebelumnya, lalu tambahkan gula sebanyak 200 g (10% b/v), Tutup wadah kaca dengan alumunium foil kemudian diamkan hingga teh memiliki suhu sama dengan suhu ruang. Kemudian masukkan starter kombucha atau SCOBY (Symbiotic Culture of Bactery and Yeast) ke dalam wadah lalu difermentasi selama 12 hari (Rosyada, 2022).

## **3.10 Karakterisitik Kombucha**

### **3.10.1 Uji Pengukuran pH**

Pengukuran pH menggunakan pH meter yang sudah di kalibrasi menggunakan larutan buffer pH 7,00 (Jamilah, 2019).

### **3.10.2 Organoleptis**

Pengujian organoleptis meliputi warna, bau dan rasa dengan indera penglihatan, penciuman dan pengecap (lidah) (SNI 4324, 2014).

### **3.10.3 Uji Stabilitas**

Uji stabilitas dilakukan dengan metode cycling test dan penyimpanan pada suhu kamar,dingin,dan oven. Teh herbal kombucha disimpan pada suhu dingin ± 4°C selama 24 jam, pada suhu kamar 20°C kemudian dilakukan pengujian stabilitas di oven pada suhu ± 40°C Pengujian dilakukan selama 6 siklus, dimana setiap siklus diamati perubahan fisik Teh herbal kombucha meliputi Organoleptis, dan PH. (Suryani et al, 2017).

## **3.11 Uji Kualitatif Teh dan Kombucha Daun Bidara**

### **3.11.1 Uji Kualitatif Vitamin C**

Ditambahkan 5 ml sampel dengan 5 tetes larutan KMnO4 0,1 Nakan memberikan hasil positif jika warna dari KMnO4 0,1 N luntur (Dyah, Santoso, and Nopiyanti 2022).

## **3.12 Penetapan Kadar Vitamin C**

### **3.12.1 Pembuatan Larutan Baku Vitamin C**

Vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan 10 ml metanol sehingga didapat konsentrasi 1000 ppm (Lonteng, Yudistira, and Wewengkang 2020)

### **3.12.2 Pengujian Kadar Vitamin C**

Dipipet 1 ml masing masing dari teh dan kombucha daun bidara, kemudian dilarutkan dengan aquadest 10 ml sehingga di dapatkan larutan uji dengan kosentrasi 1000 µg/mL (1000 ppm).

## **3.13 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH**

### **3.13.1 Prinsip Metode Penangkapan Radikal Bebas DPPH**

Kemampuan sampel uji dalam merendam proses oksidasi DPPH (*1,1- diphenyl-2-picryhidrazyl*) sebagai radikal bebas dalam larutan etanol dan metanol (sehingga terjadi peredaman warna ungu DPPH) dengan nilai *IC5*0  (sebagai konsentrasi sampel uji yang mampu menurunkan radikal bebas sebesar 50%) digunakan sebagai parameter untuk menentukan aktivitas antioksidan sampel uji tersebut (Molyneux 2004).

### **3.13.2 Pembuatan Larutan Induk Baku DPPH**

Ditimbang 20 mg DPPH dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 ml kemudian dilarutkan dengan metanol dan dicukupkan sampai garis tanda batas atas, hingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 200 ppm (Molyneux, 2004).

### **3.13.3 Pembuatan Larutan Blanko**

Larutan baku DPPH konsentrasi 200 ppm dipipet sebanyak 1 ml, kemudian dimasukkan kedalam labu tentukur 5 ml, ditambahkan dengan metanol dan dicukupkan sampai garis tanda batas atas, sehingga didapat (konsentrasi 40 ppm). Larutan disimpan ditempat yang terlindung dari cahaya (Molyneux, 2004).

### **3,13.4 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum DPPH**

Larutan DPPH konsentrasi 200 ug/ml, dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 ml, dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda, diperoleh larutan DPPH konsentrasi 40 ug/ml, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 mm, sehingga diperoleh absorbansi maksimum sebagai panjang gelombang maksimum DPPH.

### **3.13.5 Pengukuran Operating Time DPPH**

Sebanyak 1 ml larutan DPPH (dari larutan konsentrasi 200 ug/ml), dimasukkan dalam labu tentukur 5 ml, dicukupkan volumenya hingga garis tanda, diperoleh larutan DPPH konsentrasi 40 ug/ml. Lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh, dimulai dari menit pertama hingga diperoleh absorbansi stabil, sebagai Operating Time (waktu kerja pengukuran yang baik).

### **3.13.6 Pengukuran Absorbansi Campuran DPPH dan Vitamin C**

Dipipet larutan vitamin C (dari larutan konsentrasi 100 ug/ml) sebanyak 5

ml, diencerkan di dalam labu tentukur sampai 5 ml, volumenya dicukupkan dengan aquadest sampai garis tanda, maka diperoleh larutan vitamin C konsentrasi 100 ug/ml. Selanjutnya larutan ini digunakan untuk pengukuran absorbansi dipipet masing-masing sebanyak 0,05 ml, 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, 0,25 ml diencerkan dengan aquadest di dalam labu tentukur sampai 5 ml lalu ditambahkan 0,8 ml larutan DPPH (konsentrasi 200 ug/ml), sehingga diperoleh larutan vitamin C konsentrasi 1 ug/ml; 2 ug/ml; 3 ug/ml; 4 ug/ml; dan 5 ug/ml. Selanjutnya didiamkan beberapa menit sesuai dengan waktu stabil, diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Perlakuan diulangi sampai 3 kali, sehingga diperoleh data absorbansi dari campuran DPPH dengan vitamin C berbagai konsentrasi.

### **3.13.7 Pengukuran Absorbansi DPPH dan Seduhan Teh Herbal kombucha Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana* Lam)**

Dipipet larutan seduhan teh herbal daun bidara (dari konsentrasi 10.000 ug/ml) masing-masing sebanyak 0,2 ml, 0,35 ml, 0,5 ml, 0,65 ml, dan 0,8 ml. Dan kombucha daun bidara (dari konsentrasi 10.000 ug/ml) masing-masing sebanyak 0,05 ml; 0,2 ml; 0,35 ml; 0,5 ml; dan 0,65 ml, masing-masing Dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 ml, dan masing-masing ditambahkan dengan 0,8 ml larutan DPPH (dari larutan konsentrasi 200 ug/ml), lalu volumenya dicukupkan dengan metanol sampai garis tanda, maka diperoleh larutan konsentrasi seduhan teh herbal daun bidara 400 ug/ml; 700 ug/ml; 1000 ug/ml; 1300 ug/ml; dan 1600 ug/ml. Dan Konsentrasi kombucha daun bidara 100 ug/ml; 400 ug/ml; 700 ug/ml; 1000 ug/ml; dan 1300 ug/ml.Selanjutnya didiamkan beberapa menit sesuai dengan waktu stabil (Operating Time yang diperoleh), diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Perlakuan diulangi sampai 3 kali, sehingga diperoleh data absorbansi dari campuran DPPH dengan teh seduhan daun bidara dan kombucha daun bidara dengan berbagai konsentrasi.

### **3.13.8 Penentuan Persen Peredaman**

Kemudian antioksidan diukur sebagai penurunan serapan larutan DPPH akibat adanya penambahan larutan uji. Nilai serapan larutan DPPH sebelum ditambah larutan uji dan sesudah penambahan larutan uji dihitung sebagai persen

|  |
| --- |
| % peredaman = $\frac{A kontrol-A sampel}{A kontrol}$ x 100% |

 peredaman.

Keterangan

A kontrol = Absorbansi yang tidak mengandung sampel

A sampel = Absorbansi sampel

(Tristantini, 2016).

### **3.13.9 Penentuan IC50**

Nilai IC50 merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji (mcg/ml) yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50%. Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti peredaman total denga pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya. Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak (ug/m]) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % peredaman (antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu Y).

Kemudian dari persamaan tersebut, dihitung nilai ICso untuk mendapatkan nilai

antioksidannya.

y = ax + b

Keterangan : y = % inhibisi

 a = slope

 b = intersep

 × = In konsentrasi uji