

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan metode eksperimental (*Quasi Eksperimental*). Sampel simplisia daun teh hijau (*Camellia sinensis* L) diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasound assisted Extraction*) menggunakan pelarut etanol 70%. Pada penelitian ini analisis kualitatif dilakukan dengan uji organoleptis, skrining fitokimia serta identifikasi senyawa alkaloid dan fenolik dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sedangkan analisis kuantitatif disajikan dalam bentuk data numerik yang mempresentasikan kadar total alkaloid (mgCE/g) dan fenolik (mgGAE/g) sebagai komponen metabolit sekunder dalam daun teh hijau.

B. Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei – Juli 2025 di Laboratorium Biofarmakologi Farmasi Prodi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Populasi dan Sampel

Pada penelitian ini digunakan sampel daun teh hijau (*Camellia sinensis* L) yang muda dan tua. Daun teh muda segar yaitu memiliki warna hijau muda yang terdiri dari urutan daun nomor 1 sampai 5 terhitung dari daun teratas, sedangkan untuk daun teh tua segar memiliki warna hijau tua yang terdiri dari daun ke 6 sampai 8 dari daun teratas. Daun muda dan daun tua berasal dari 1 tanaman yang sama. Sampel diperoleh dari Perkebunan Teh berlokasi di Tritis, Nargosari, Kecamatan Samigaluh, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta ($7^{\circ}39'01.6''S$ $110^{\circ}08'57.6''E$).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Sampel daun teh hijau (*Camellia sinensis* L) muda dan tua.

2. Variabel terikat : Kadar total alkaloid dan fenolik daun teh hijau (*Camellia sinensis* L) muda dan tua.
3. Variabel terkontrol : Lokasi penelitian, tempat tumbuh, waktu panen, suhu pengeringan, pelarut ekstraksi, metode ekstraksi, suhu ekstraksi, suhu pengentalan

E. Definisi Operasional

1. Daun teh hijau muda yaitu memiliki warna hijau muda yang terdiri dari urutan daun nomor 1 sampai 5 terhitung dari daun teratas.
2. Daun teh hijau tua yaitu memiliki warna hijau tua yang terdiri dari daun ke 6 sampai 8 terhitung dari daun teratas. Daun muda dan daun tua berasal dari 1 tanaman yang sama.
3. Ekstrak daun teh hijau didapatkan melalui proses ekstraksi dengan metode UAE menggunakan pelarut etanol 70%.
4. UAE merupakan teknik ekstraksi dengan memanfaatkan bantuan gelombang ultrasonik pada frekuensi 20 kHz sampai 2000 kHz.
5. Kafein adalah senyawa pembanding pada penetapan kadar senyawa alkaloid.
6. Asam galat adalah senyawa pembanding pada penetapan kadar senyawa fenolik.
7. Kadar total alkaloid diukur dalam satuan mg CE (*Caffeine Equivalent*)/ gram sampel dengan menggunakan baku pembanding kuarsetin.
8. Kadar total fenolik diukur dalam satuan mg GAE (*Gallic Acid Equivalent*)/ gram sampel dengan menggunakan baku pembanding asam galat

F. Alat dan Bahan

1. Alat :

Untuk keperluan penelitian ini, Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik (*Ohaus PX224/E*), ayakan 20 mesh, termometer, grinder (*Fomac*), hot plate (*IKA C-Mag HS 7*), *magnetic stirrer*, oven listrik (*Memmert UN-55*), gelas ukur (*iwaki*), erlemeyer, beaker glass (*iwaki*), kaca arloji, batang pengaduk, sonikator (*cool palmer*), lampu UV, wajan, mikropipet (*Eppendorf*),

propipet, pipet tetes, pipet ukur (*iwaki*), tabung reaksi (*iwaki*), labu takar (*iwaki*), chamber KLT, pipa kapiler, *moisture balance*, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV VIS Spektrophotometer*).

2. Bahan :

Pada penelitian ini, digunakan sejumlah bahan yang meliputi daun teh hijau *Camellia sinensis* (L), asam galat (p.a), kafein (p.a), asam sulfat (*Mallinckrodt*), metanol p.a (*Merck*), etanol 70% (*Teknis*), etanol 96% (*Teknis*), akuades, kalsium karbonat (*Merck*), kloroform (*Merck*), etil asetat (*Merck*), n-heksana (*Merck*), HCL pekat p.a (*Merck*), magnesium p.a (*Merck*), plat silika gel 60 F254 (*Merck*), reagen FeCl₃ (*Merck*), natrium karbonat p.a (*Merck*), WFI (*Teknis*), reagen *Follin-Ciocalteu* (*Merck*), pereaksi *Wagner*, pereaksi *Dragendroff*, pereaksi *Mayer*, kertas saring (*Whatman No. 42*), *bluetip*, *whitetip*, *yellowtip*

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Sampel

Sampel daun teh hijau diperoleh dari Perkebunan Teh Tritis, Ngargosari, Samigaluh, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta pada bulan April 2025. Daun teh hijau yang dipanen yaitu daun teh hijau muda dan daun teh hijau tua dalam kondisi segar. Daun teh hijau muda yaitu memiliki warna hijau muda yang terdiri dari urutan daun nomor 1 sampai 5 terhitung dari daun teratas, sedangkan untuk daun teh hijau tua memiliki warna hijau tua yang terdiri dari daun ke 6 sampai 8 dari daun teratas. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari pukul 06.30 WIB setelah itu, daun teh hijau dideterminasi. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta dengan mengirimkan foto tanaman daun teh hijau. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan digunakan (*Susilowati et al., 2016*).

2. Penyiapan Sampel

Masing – masing 3 kg daun teh hijau muda dan tua (*Camellia sinensis* L) disortir, dirajang dan dicuci dengan air mengalir sampai bersih lalu dikering anginkan selama 5 jam tanpa terkena sinar matahari kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 2 hari atau hingga sampel kering yang ditandai dengan warna kecoklatan dan hancur saat diremas. Sampel yang telah kering, dihaluskan menggunakan grinder kemudian diayak menggunakan ayakan No.20 mesh hingga menjadi serbuk yang halus dan seragam. Jika ada sampel yang tidak lolos dalam ayakan maka dilakukan proses pengecilan partikel kembali. Hasil serbuk yang sudah halus dimasukkan ke wadah tertutup lalu disimpan dalam tempat kering yang terlindung dari paparan sinar matahari (Rahmawati *et al.*, 2022).

3. Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Perdana *et al.*, 2024) dengan modifikasi. Masing-masing serbuk daun teh hijau muda dan tua ditimbang 5 g kemudian diekstraksi dengan etanol 70% sebanyak 500 mL (1:100). Proses ekstraksi dilakukan selama 30 menit dengan alat ultrasonik suhu 50°C. Proses ekstraksi ini dilakukan sebanyak 4 batch dengan perlakuan yang sama untuk masing-masing sampel. Setelah sonikasi, filtrat dipisahkan dari ampas teh hijau memakai kertas saring *Whatman No. 42*, lalu filtrat diuapkan dengan penangas air pada suhu 40°C, hingga didapat ekstrak teh hijau yang kental (Widyasanti *et al.*, 2018).

4. Ekstraksi Cair-Cair Penetapan Kadar Alkaloid

Preparasi uji kafein dilakukan dengan cara ditimbang 1 gram ekstrak kental ditambahkan dengan 150 mL aquadest panas, 1500 mg kalsium karbonat (CaCO_3), dan digojog hingga homogen. Dilakukan tiga kali ekstraksi dengan menambahkan 25 mL kloroform setiap kali ekstraksi. Fase bawah (fase kloroform) diambil dan diuapkan hingga seluruh kloroform menguap. Didapatkan ekstrak kering yang akan digunakan untuk pengujian kafein (Nurhidayat, 2023). Ekstrak kering yang didapat dihitung rendemennya dengan **Persamaan 2**.

5. Kontrol Kualitas Ekstrak

- a. Perhitungan rendemen: Dihitung berdasarkan perbandingan antara berat ekstrak akhir yang diperoleh dengan berat sampel awal yang diekstrak lalu dikalikan 100%. Perhitungan rendemen dihitung berdasarkan **Persamaan 2** (Kusuma *et al.*, 2022).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{bobot awal simplisia}} \times 100 \% \dots\dots\dots(2)$$

- b. Uji organoleptik: Dilakukan pengamatan sifat karakteristik fisik dari suatu bahan yang diuji seperti bau, bentuk, dan warna (Pratama *et al.*, 2024).
- c. Penetapan kadar air ekstrak: Sebanyak 500 mg dari masing-masing ekstrak kental daun teh muda dan tua ditimbang dengan teliti dalam wadah yang sudah ditara, lalu dimasukkan kedalam alat *moisture balance*. Setelah itu alat dijalankan hingga muncul tanda warna hijau dan catat angka kadar air yang didapatkan.

6. Skrining Fitokimia

Dibuat larutan stok dengan menimbang 100 mg masing-masing ekstrak kental daun teh hijau muda dan tua dilarutkan dalam 20 mL akuades. Larutan stok dibuat untuk uji fitokimia.

- a. Identifikasi alkaloid: Diambil sebanyak 2 mL masing-masing larutan stok daun teh hijau muda dan tua dilarutkan dalam 20 tetes asam sulfat 2 N (Rahmawati *et al.*, 2022). Dibagi menjadi 3 bagian pada tabung, lalu tabung 1 ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer akan menghasilkan endapan putih atau kuning. Tabung 2 ditambahkan 2 tetes pereaksi Wagner menghasilkan endapan coklat-hitam. Selanjutnya tabung 3 ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan merah bata. Alkaloid dianggap positif apabila terbentuk endapan paling sedikit dua atau tiga dari percobaan di atas (Wahyuni *et al.*, 2020).
- b. Identifikasi fenolik: Diambil sebanyak 2 mL masing-masing larutan stok daun teh hijau muda dan tua lalu ditambahkan dengan 2 mL etanol 96%, kemudian dibagi menjadi 2 bagian. Tabung reaksi 1 sebagai blangko,

tabung reaksi 2 ditambahkan dengan FeCl_3 1% sebanyak 1 tetes. Hasil positif fenolik ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi hijau, biru atau merah (Widiawati *et al.*, 2023).

- c. Identifikasi flavonoid: Diambil sebanyak 2 mL masing-masing larutan stok daun teh hijau muda dan tua kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk Magnesium 2 mg dan diberikan 3 tetes HCl pekat. Sampel dikocok dan diamati perubahan yang terjadi. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada larutan menunjukkan adanya flavonoid (Rahmawati *et al.*, 2022).
 - d. Identifikasi saponin: Diambil sebanyak 2 mL masing-masing larutan stok daun teh hijau muda dan tua ditambahkan asam klorida 5 tetes kemudian dikocok kuat selama 10 menit. Diamkan selama 3 menit kemudian tetesi dengan HCl 2 N sebanyak 2 tetes. Jika buih stabil menandakan positif saponin (Rahmawati *et al.*, 2022).
 - e. Identifikasi tanin: Diambil sebanyak 2 mL masing masing larutan stok daun teh hijau muda dan tua dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan FeCl_3 1% sebanyak 1 tetes. Diamati perubahan yang terjadi, terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tannin (Rahmawati *et al.*, 2022).
7. Identifikasi Senyawa Alkaloid dan Fenolik

Identifikasi senyawa alkaloid dilakukan dengan menggunakan fase diam berupa lempeng silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak berupa kloroform : air (9:1) yang telah dijenuhkan dahulu (Nurhidayat, 2023). Kafein digunakan sebagai standar pembanding dengan konsentrasi 1000 ppm dengan cara ditimbang kafein anhidrat p.a 10 mg add 10 mL dengan akuades. Ditimbang sebanyak 25 mg sampel ekstrak kering dimasukkan dalam labu ukur 10 mL tambahkan akuades (konsentrasi sampel 2.500 ppm). Penotolan dilakukan sebanyak 2 totolan (2 μ L) untuk sampel dan standar pada lempeng dengan jarak elusi 8 cm menggunakan pipa kapiler. Setiap penotolan dilakukan setelah totolan sebelumnya kering. Lalu lempeng dimasukkan ke dalam chamber yang berisi fase gerak yang telah dijenuhkan. Ditunggu hingga

totalan ekstrak terelusi oleh fase gerak hingga batas atas lempeng, di angin-anginkan, kemudian dideteksi penampak bercak dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm. Kemudian dapat dihitung nilai R_f dari masing-masing sampel (Santi *et al.*, 2023).

Identifikasi fenolik dilakukan dengan menggunakan fase diam berupa lempeng silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak berupa n-heksan: etil asetat: etanol (1:8:1) yang telah dijenuhkan dahulu (Evany, 2023). Asam galat digunakan sebagai standar fenolik berkonsentrasi 5000 ppm. Standar asam galat dibuat dengan cara melarutkan 50 mg asam galat dengan metanol hingga mencapai volume 10 mL. Ditimbang sebanyak 100 mg sampel ekstrak kental dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL tambahkan metanol (konsentrasi sampel 10.000 ppm). Penotolan dilakukan sebanyak 1 totalan (1 μ L) untuk sampel dan standar pada lempeng dengan jarak elusi 8 cm menggunakan pipa kapiler. Setiap penotolan dilakukan setelah totalan sebelumnya kering. Lalu lempeng dimasukkan ke dalam chamber yang berisi fase gerak yang telah dijenuhkan. Ditunggu hingga totalan ekstrak terelusi oleh fase gerak hingga batas atas lempeng, di angin-anginkan, dan dideteksi penampak bercak dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm. Dihitung nilai R_f dari masing-masing sampel (Santi *et al.*, 2023). Nilai R_f dihitung berdasarkan persamaan 3 (Usman *et al.*, 2023).

Penentuan nilai R_f :

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}} \dots\dots\dots(3)$$

8. Penetapan Kadar Total Alkaloid

Penetapan kadar total alkaloid dilakukan dengan mengacu prosedur pengerjaan dari Nurhidayat, (2023) dengan tahapan sebagai berikut:

a. Pembuatan Larutan Baku Standar Kafein

Dibuat larutan induk baku kafein dengan konsentrasi 200 ppm dengan cara ditimbang 20 mg kafein standar lalu dilarutkan dengan aquadest hingga volume 100 mL.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan baku kafein dengan konsentrasi 15 ppm diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum ditetapkan berdasarkan panjang gelombang yang dimiliki absorbansi tertinggi.

c. Pembuatan Kurva Baku Standar Kafein

Pembuatan kurva kalibrasi, dilakukan dengan membuat konsentrasi 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 dan 20 ppm dalam labu takar 10 mL dan dilarutkan dengan akuades hingga tanda batas. Dilanjutkan dengan membaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapat yaitu 273 nm.

d. Penentuan Kadar Total Alkaloid

Ekstrak kering daun teh yang telah dipersiapkan sebelumnya diambil 25 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Kemudian diambil 0,1 mL larutan tersebut add 10 mL dengan akuades selanjutnya dibaca absorbansinya menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 273 nm. Pengujian direplikasi. TAC (*Total Alkaloid Content*) dinyatakan dalam milligram ekuivalen kafein (CE) per gram sampel. Kadar alkaloid ditentukan dengan **Persamaan 5**.

9. Penetapan Kadar Total Fenolik

Penetapan kadar total fenolik dilakukan dengan metode *Follin-Ciocalteu* menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Prosedur pengerjaan mengacu pada Nurhasanah *et al.*, (2024) dengan tahapan sebagai berikut:

a. Pembuatan Larutan Baku Standar Asam Galat

Larutan standar asam galat konsentrasi 1000 ppm disiapkan dengan cara menimbang 10 mg asam galat, kemudian dilarutkan menggunakan metanol p.a hingga mencapai volume 10 mL. Dari larutan induk kemudian dibuat seri konsentrasi 150, 200, 250, 300, 350 dan 400 ppm, kemudian diencerkan menggunakan metanol p.a sampai 5 mL.

b. Pembuatan Larutan Natrium Karbonat (Na_2CO_3) 7%

Sebanyak 7 gram Na_2CO_3 dimasukkan ke dalam gelas beker. Kemudian, tambahkan akuades hangat secukupnya ke dalam gelas beker dan dilakukan proses pencampuran dengan alat *ultrasound* untuk memastikan pencampuran menyeluruh, tambahkan akuades hingga volume total larutan mencapai 100 mL.

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Dipipet 0,1 mL konsentrasi 300 ppm dari baku standar asam galat, tambahkan 0,1 mL reagen *Follin-Ciocalteu*, 1 mL Na_2CO_3 7% dan tambahkan WFI sampai volume 5 mL. Dibaca absorbansi pada panjang gelombang 600 nm sampai 800 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum.

d. Penentuan *Operating Time* (OT)

Masukkan 0,1 mL larutan asam galat konsentrasi 300 ppm tambahkan dengan larutan reagen *Follin-Ciocalteu* 0,1 mL, Na_2CO_3 7% 1 mL, dan WFI sampai volume 5 mL. Scanning pada panjang gelombang maksimum yaitu 765 nm dengan jarak 1 menit hingga menghasilkan reaksi stabil.

e. Pembuatan Kurva Baku Standar Asam Galat

Diambil 0,1 mL larutan baku standar asam galat pada setiap konsentrasi tambahkan pereaksi *Follin-Ciocalteu* 0,1 mL dikocok. Larutan Na_2CO_3 7% sebanyak 1 mL ditambahkan dan dikocok lalu ad WFI hingga mencapai 5 mL. Inkubasi selama *operating time* yang didapat yaitu 1 jam 41 menit pada suhu ruang lalu dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum 765 nm dan direplikasi.

f. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dengan menimbang 10 mg ekstrak kental dilarutkan dalam metanol p.a hingga 10 mL. Larutan digojog hingga homogen dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Campuran larutan uji ekstrak divortex selama 2 menit kemudian disaring (Paramita *et al.*, 2020).

g. Penentuan Kadar Total Fenolik

Larutan uji diambil 0,1 mL tambahkan pereaksi *Follin-Ciocalteu* 0,1 mL dan dikocok. Setelah itu, tunggu dalam waktu 4 menit. Di tambahkan natrium karbonat 7% 1 mL dan WFI hingga volume 5 mL, dikocok sampai merata. Diamkan pada suhu kamar selama OT yang didapatkan yaitu 1 jam 41 menit. Di baca absorbansi pada panjang gelombang maksimum 765nm dan direplikasi. TPC (*Total Phenolic Content*) dinyatakan dalam milligram ekuivalen asam galat (GAE) per gram sampel. Kadar fenolik ditentukan dengan **Persamaan 6**.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Analisis Kadar Total Alkaloid dan Fenolik

Dengan menggunakan persamaan regresi linier, dimana absorbansi adalah variabel y dan konsentrasi larutan adalah variabel x untuk menentukan kadar fenolik dan alkaloid daun teh hijau dengan persamaan sebagai berikut :

$$y = bx + a \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan:

y = absorbansi

a = *intersep*

x = konsentrasi/kadar senyawa

b = *slope* (kemiringan) (Junita, 2024)

2. Penentuan nilai Total Alkaloid

$$\text{Kadar total alkaloid} = \frac{C \times V \times Fp}{m} \dots\dots\dots(5)$$

Keterangan :

C = Kadar alkaloid (nilai x)

V = Volume total sampel (mL)

m = Massa sampel yang digunakan (g)

F = Faktor pengenceran (Wahyuni *et al.*, 2020)

3. Penentuan nilai Total Fenolik

$$\text{Kadar total fenolik} = \frac{C \times V \times FP}{g} \dots\dots\dots(6)$$

Keterangan:

C = Kadar fenolik (nilai x)(mg/ml)

V = Volume sampel yang digunakan (mL)

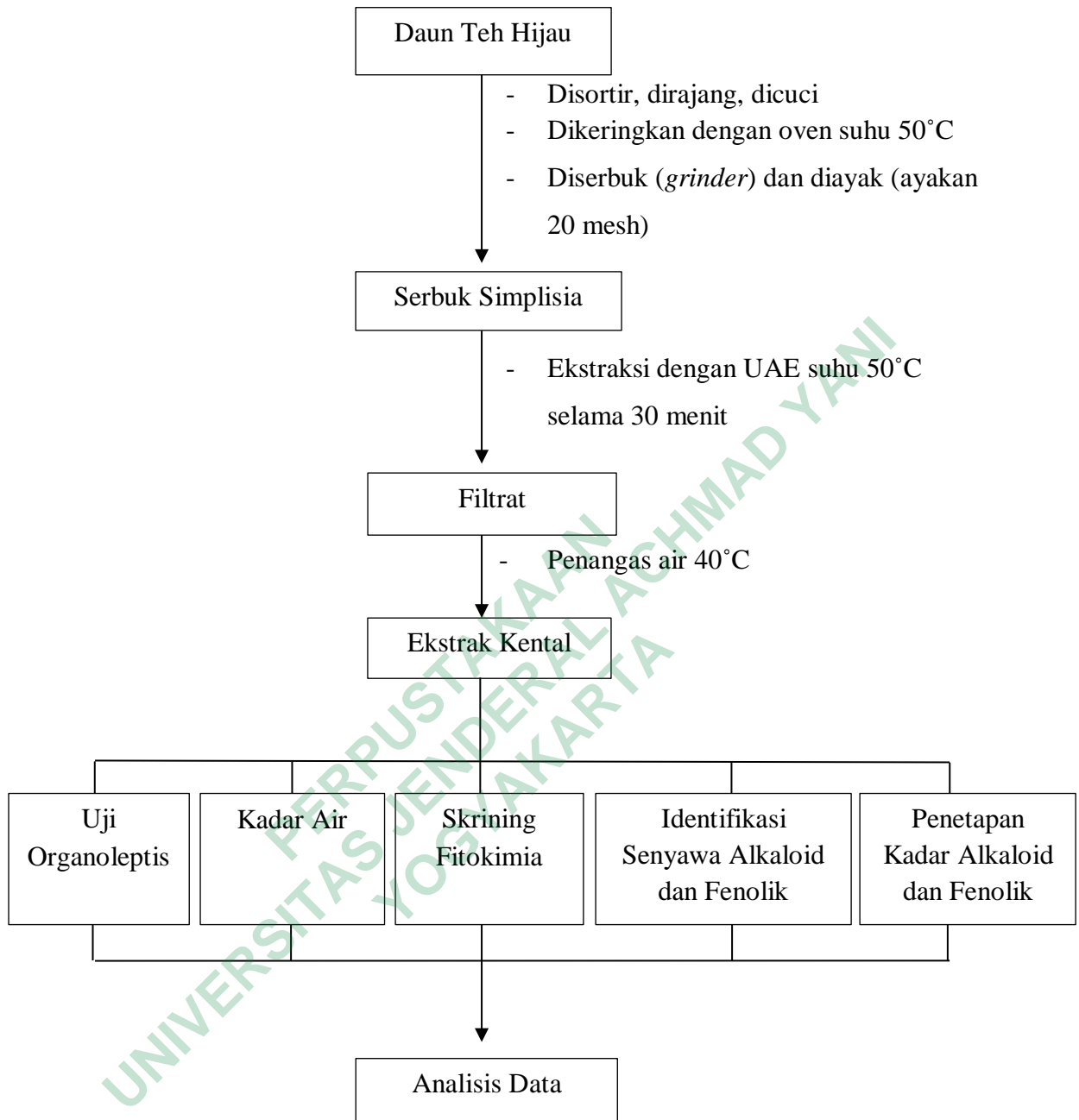
Fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g) (Nurhasanah *et al.*, 2024)

4. Analisis Data

Pengolahan data secara statistik menggunakan *software* SPSS dengan membandingkan kadar total alkaloid dan fenolik yang diperoleh dari daun teh hijau muda dan tua. Langkah-langkah uji SPSS sebagai berikut:

Uji normalitas *Shapiro-Wilk* digunakan untuk sampel kurang dari 50. Uji homogenitas *Levene's* untuk memastikan bahwa dua atau lebih kelompok sampel data memiliki varians yang serupa. Uji ini memastikan bahwa variasi dalam setiap kelompok sampel tidak berbeda secara signifikan satu sama lain. Syarat uji normalitas dan homogenitas signifikasinya lebih dari 0,05 ($\alpha=5\%$). Hasil memenuhi syarat normalitas dan homogen maka dilakukan uji *T Independent*. Hasil nilai signifikansinya $< 0,05$ ($\alpha=5\%$), berarti terdapat perbedaan signifikan dalam hasil sampel antara kedua sampel yang digunakan.



Gambar 12. Alur penelitian