

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Objek Penelitian

Objek dari penelitian yang dilakukan di Laboratorium Universitas Harkat Negeri adalah pengaruh waktu panen terhadap kadar flavonoid pada ekstrak bayam merah (*Amarathus tricolor* L.).

3.2 Sampel dan Teknik Sampling

Sampel yang digunakan adalah ekstrak bayam merah (*Amarathus tricolor* L.) yang didapat dari daerah Kelurahan Pelutan Kabupaten Pemasang. Teknik pengambilan sampel menggunakan purposive sampling yaitu dengan memilih tinggi dari bayam merah. *Purposive sampling* adalah teknik penentuan sampel dengan pertimbangan tertentu.

3.3 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini terdapat beberapa variabel, antara lain:

1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahannya atau timbulnya *variable dependen* (terikat). Variabel bebas yang digunakan adalah Ekstrak bayam merah panen 1, 2, 3, dan 4 minggu.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil kadar flavonoid ekstrak bayam merah (*Amarathus tricolor* L.).

3. Variabel kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan, sehingga tidak akan mempengaruhi variabel yang diteliti. Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah metode pengambilan ekstrak untuk analisis spektrofotometri UV-Vis

3.4 Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang digunakan bersifat kuantitatif dan kualitatif.
2. Metode pengumpulan data menggunakan eksperimen di laboratorium Diploma III Farmasi Universitas Harkat Negeri.

3.5 Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain serbuk bayam merah, etanol 96%, methanol, aquades, asam sulfat pekat (H_2SO_4), NaOH 10%, Asam asetat 5%, aluminium klorida (AlCl_3) 10%, kuersetin, kain kapas, dan flannel.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain untuk maserasi berupa maserator, neraca analitik, batang pengaduk, beaker glass, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet, cawan porselen, corong kaca, kuvet, labu ukur, oven, mikroskop, objek glass, cawan krus, dan spektrofotometer.

3.6 Cara Kerja

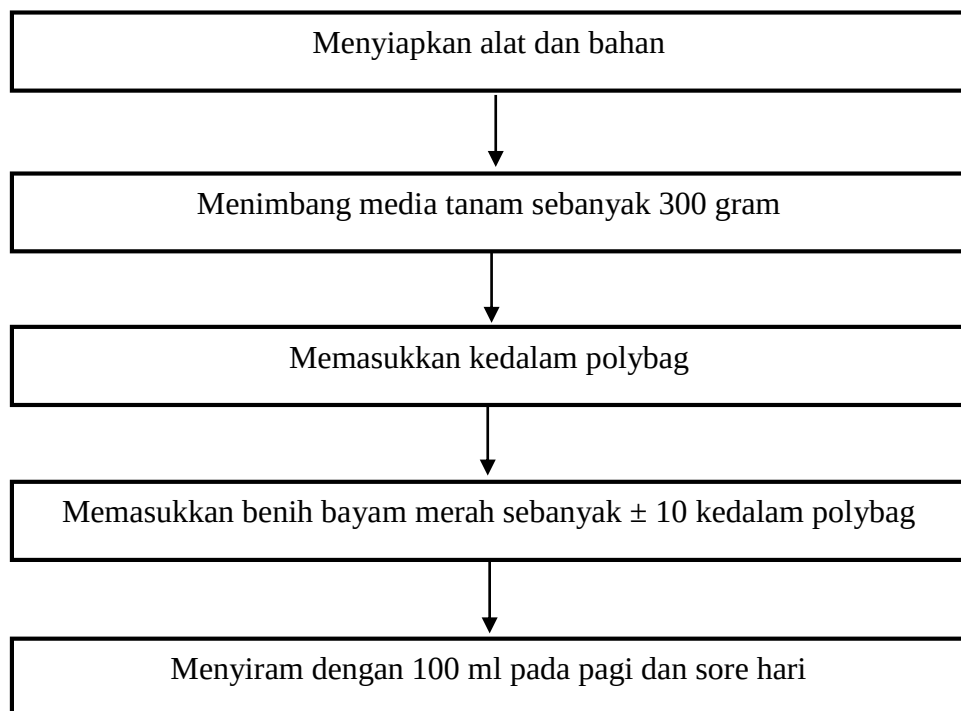
Dalam penelitian ini pengaruh waktu pertumbuhan terhadap kadar flavonoid pada ekstrak daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.), secara

spektrofotometri UV-Vis melalui beberapa tahapan terlebih dahulu diantaranya adalah

1. Proses Penanaman Sampel

Pada penelitian ini penanaman bayam merah dilakukan pada polybag ukuran 15×15 yang diisi dengan media tanam campuran antara sekam dan tanah sebanyak 300 gram. Benih bayam merah dimasukkan kedalam polybag yg sudah terisi dengan media tanam sebanyak ± 10 biji. Penyiraman dilakukan setiap hari pada pagi dan sore sebanyak 100 ml pada setiap polybag.

Berikut proses penanaman sampel dapat dilihat pada gambar 3. 1 dibawah ini:



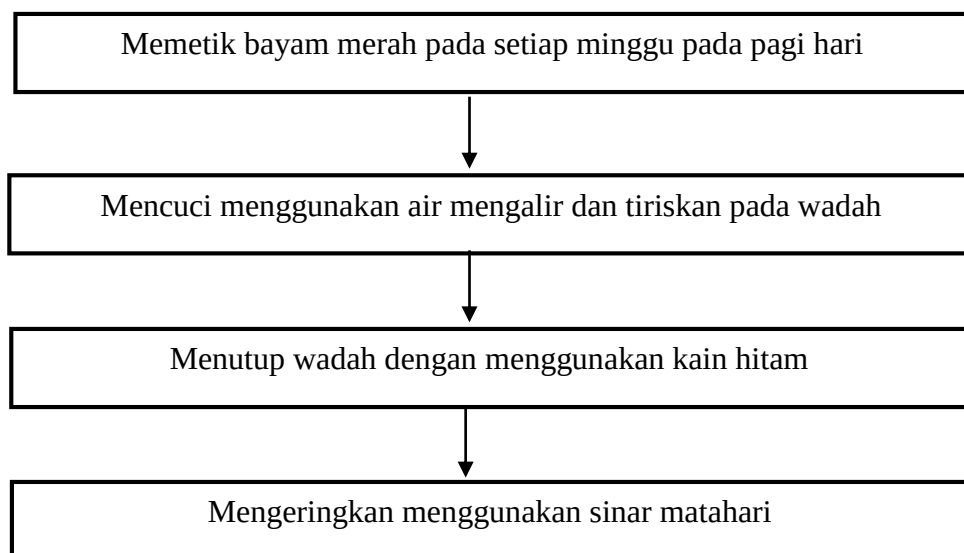
Gambar 3. 1 Skema Proses Penanaman

2. Proses Preparasi Sampel

Pada penelitian ini sampel yang digunakan yaitu bayam merah yang dipetik langsung dari daerah Kelurahan Pelutan Kabupaten Pematang. Pengambilan sampel dilakukan pada minggu ke satu, dua, tiga, dan empat setelah penanaman pada pagi hari.

Bayam merah dicuci menggunakan air mengalir dan tiriskan, lalu letakkan pada wadah yang dasarnya berlubang- lubang seperti wadah yang terbuat dari anyaman bambu dimaksudkan agar aliran udara dari atas kebawah atau sebaliknya berjalan lancar. Setelah itu bagian atasnya ditutup menggunakan kain hitam untuk dilakukan pengeringan pada sinar matahari (Lady & Pranoto, 2020).

Berikut proses preparasi sampel dapat dilihat pada Gambar 3. 2 dibawah ini:



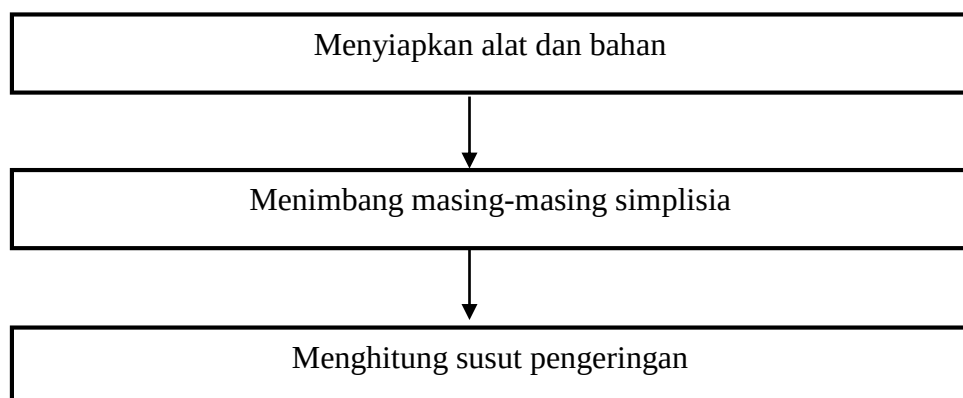
Gambar 3. 2 Skema Proses Preparasi Sampel

3. Perhitungan Susut Pengerinan

Susut pengerinan merupakan kadar bagian yang menguap dari suatu zat. Tujuan mengetahui susut pengerinan yaitu memberikan batas maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengerinan. Susut pengerinan dapat dicari menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ bobot kering terhadap bobot basah} = \frac{\text{bobot kering}}{\text{bobot basah}} \times 100\%$$

Perhitungan susut pengerinan dapat dilihat pada Gambar 3. 3 dibawah ini:



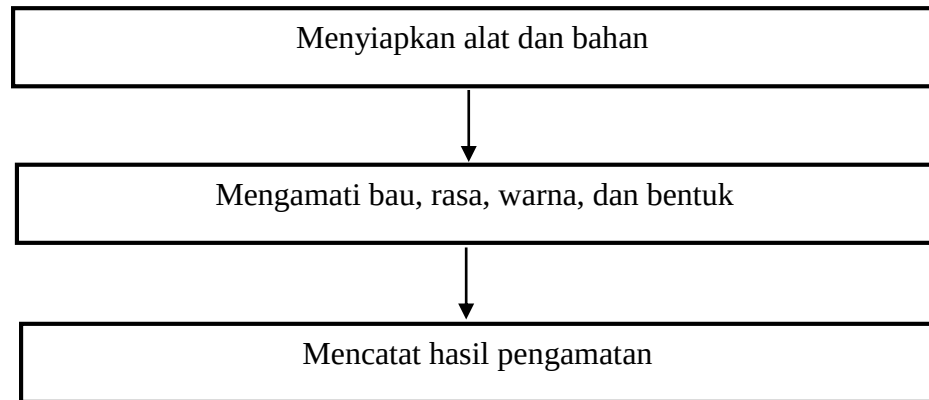
Gambar 3. 3 Skema Perhitungan Susut Pengerinan

4. Identifikasi Serbuk Simplisia

a. Uji Makroskopik

Mengidentifikasi serbuk bayam merah dengan mengamati secara panca indra, pengamatan tersebut berupa uji organoleptik meliputi bau, rasa, warna, dan bentuk (Wicaksono *et al.*, 2023).

Uji makroskopik dapat dilihat pada Gambar 3.4 dibawah ini:

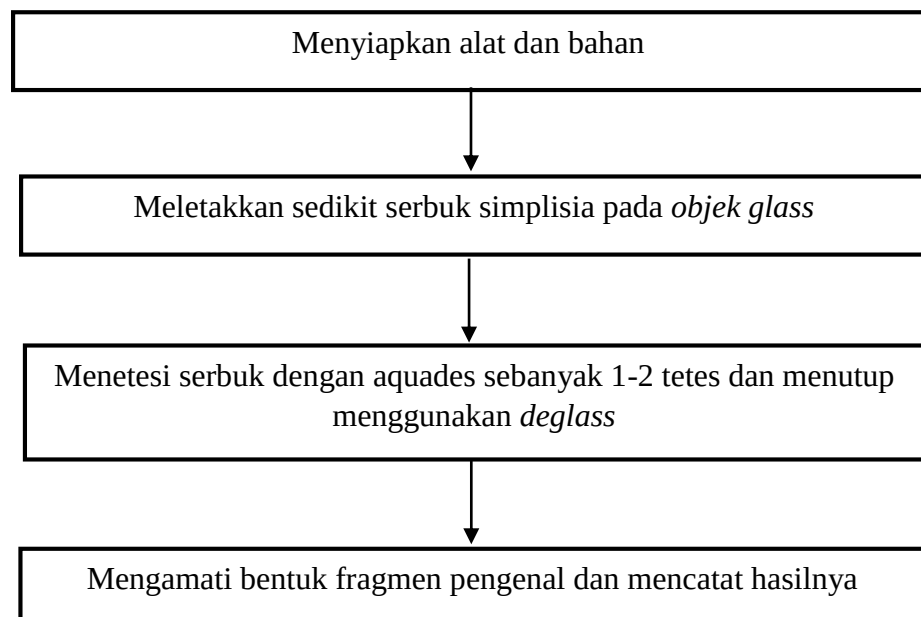


Gambar 3. 4 Skema Uji Makroskopik

b. Uji Mikroskopis

Mengidentifikasi serbuk daun bayam merah menggunakan mikroskop. Meletakkan sedikit serbuk keatas *objek glass* dengan menambahkan 1-2 tetes aquadest dan tutup dengan *deglass* kemudian mengamati bentuk jaringan dan fragmen pengenalnya yang terdapat pada sampel menggunakan mikroskop (Wicaksono *et al.*, 2023).

Uji mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 3. 5 dibawah ini:

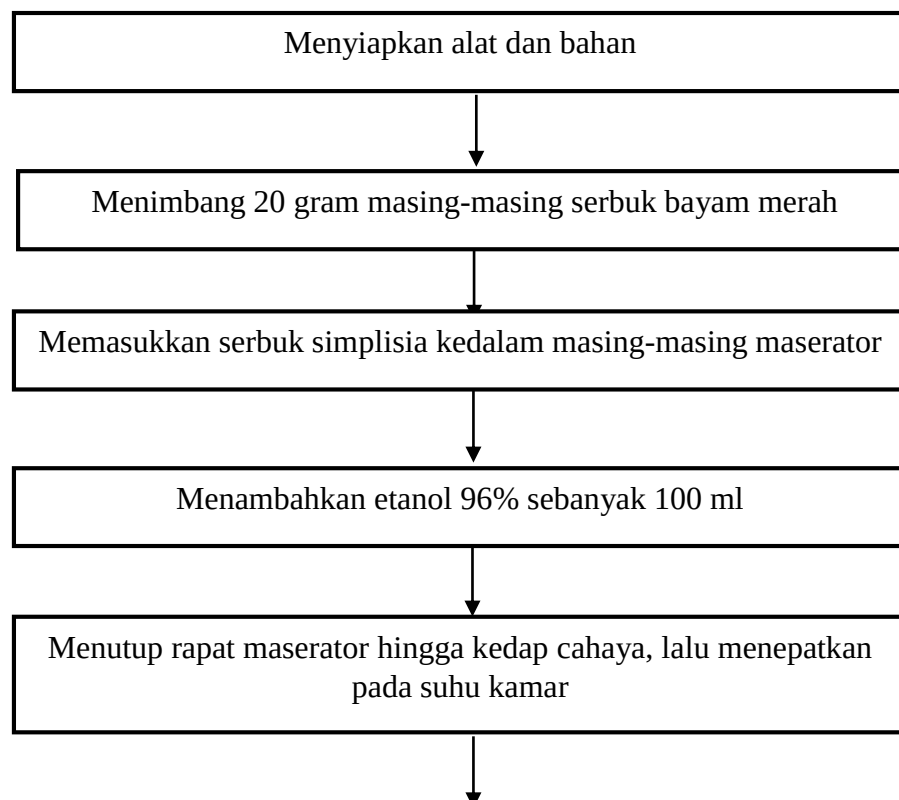


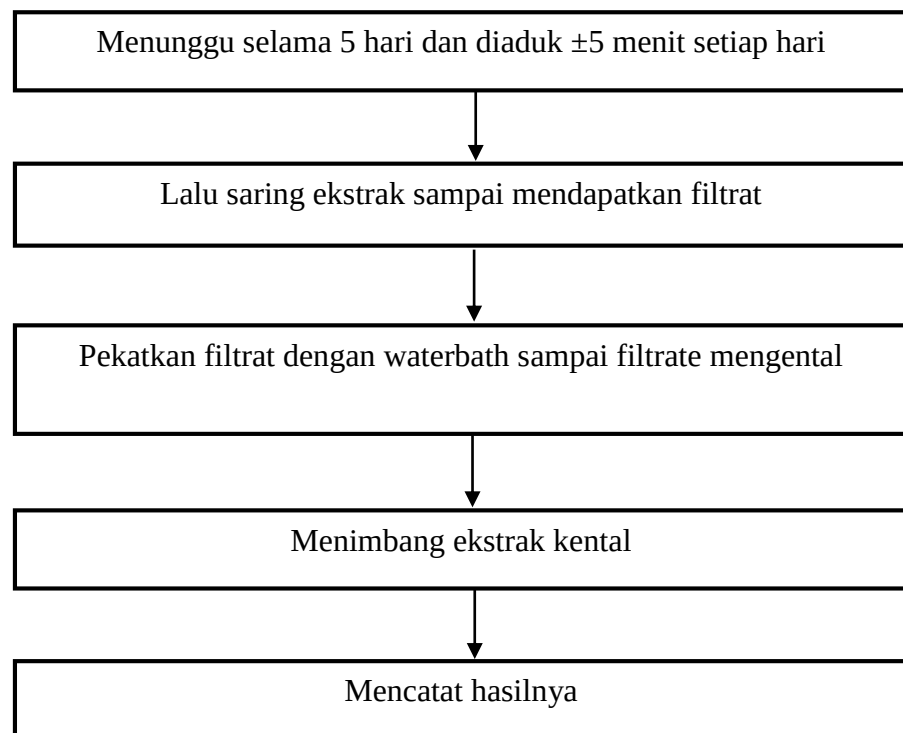
Gambar 3. 5 Skema Uji Mikroskopis

5. Pembuatan Ekstrak Bayam Merah Dengan Menggunakan Metode Maserasi

Untuk membuat ekstrak dari bayam merah menggunakan metode maserasi, langkah awal yang perlu dilakukan adalah mempersiapkan alat dan bahan. Selanjutnya, menimbang masing-masing serbuk simplisia sebanyak 20 gram dan masukkan kedalam maserator. Setelah itu, tambahkan 100 ml etanol 96% dan aduk selama ± 5 menit, lalu tutup maserator hingga kedap cahaya. Simpan pada suhu kamar dan terhindar dari sinar matahari. Tunggu selama 5 hari dan diaduk ± 5 menit setiap hari. Lalu saring ekstrak sampai mendapatkan filtrat, Setelah itu pekatkan filtrat dengan waterbath sampai filtrate mengental. Kemudian, timbang ekstrak kental.

Proses maserasi dapat dilihat pada Gambar 3. 6 dibawah ini:





Gambar 3. 6 Skema Pembuatan Ekstrak Dengan Metode Maserasi

6. Perhitungan Rendemen

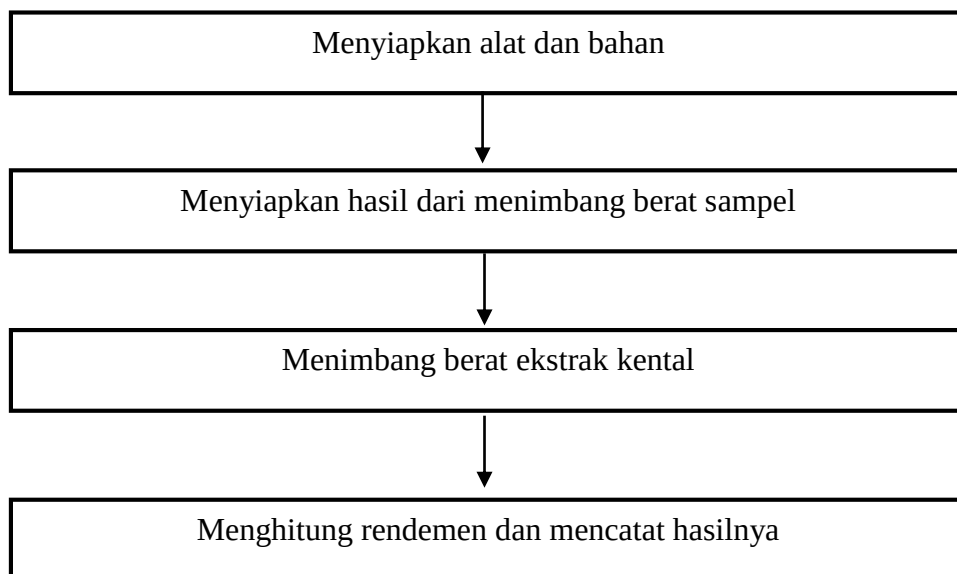
$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (y)}}{\text{Berat sampel (x)}} \times 100\%$$

Keterangan:

X = berat sampel

Y = berat ekstrak kental

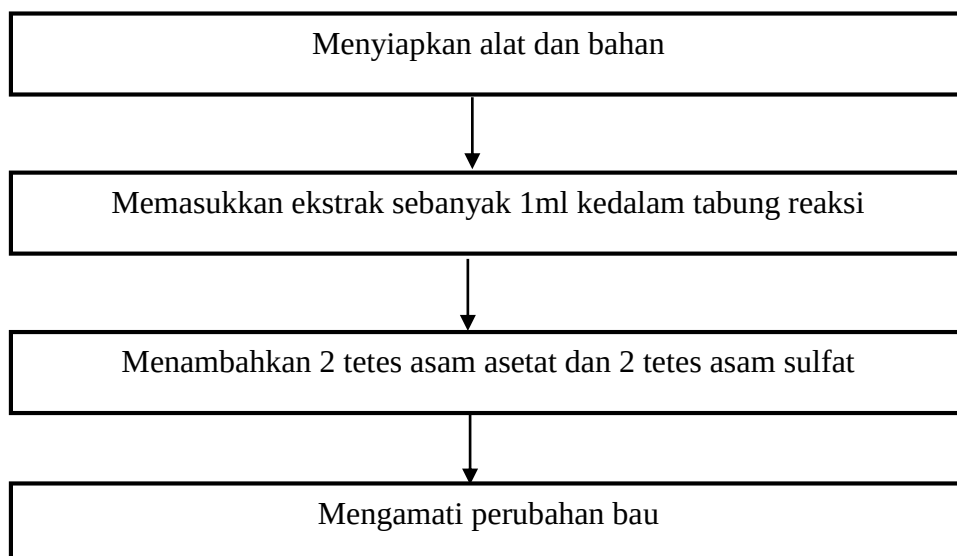
Perhitungan rendemen dapat dilihat pada Gambar 3. 7 dibawah ini:



Gambar 3. 7 Skema Perhitungan Rendemen

7. Uji Bebas Etanol

Memasukkan masing-masing 1ml ekstrak kental bayam merah kedalam tabung reaksi, lalu menambahkan 2 tetes asam asetat dan 2 tetes asam sulfat pekat. Kemudian, mengamati perubahan bau larutan sampai tidak tercium bau ester (Wicaksono *et al.*, 2023). Pengujian bebas etanol dapat dilihat pada Gambar 3. 8 dibawah ini:



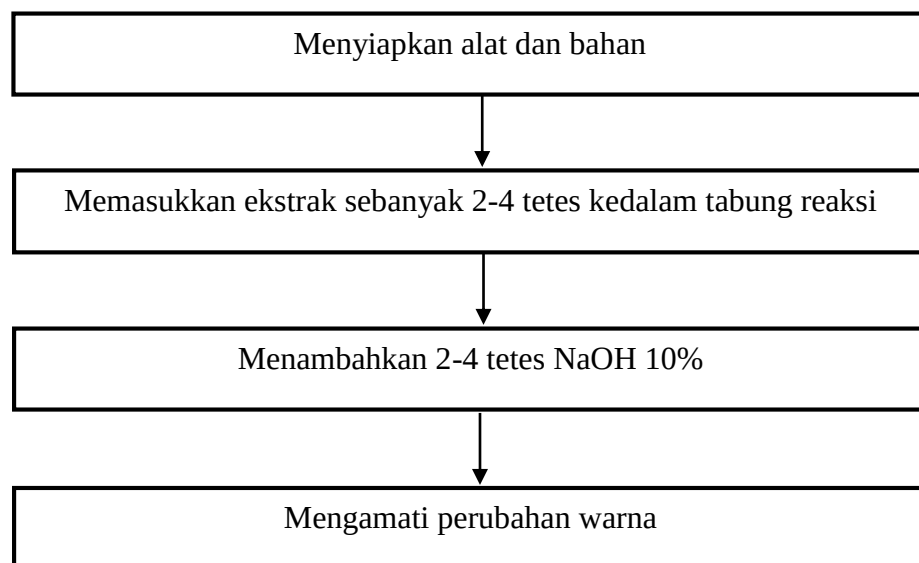
Gambar 3. 8 Skema Uji Bebas Etanol

8. Identifikasi Senyawa Flavonoid

a. Uji warna dengan NaOH 10 %

Menguji warna dengan NaOH 10 % yaitu memasukkan masing-masing ekstrak bayam merah sebanyak 2-4 tetes, kemudian menambahkan dengan 2-4 tetes larutan NaOH 10%. Perubahan warna diamati hingga sampel menunjukkan warna kuning hingga kecoklatan. Hal ini terjadi karena reaksi dengan basa dapat menghasilkan sistem konjugasi pada gugus aromatik, yang kemudian membentuk senyawa flavonoid yang ditandai dengan perubahan warna (Atika *et al.*, 2020).

Uji warna dengan NaOH 10% dapat dilihat pada Gambar 3. 9 dibawah ini:



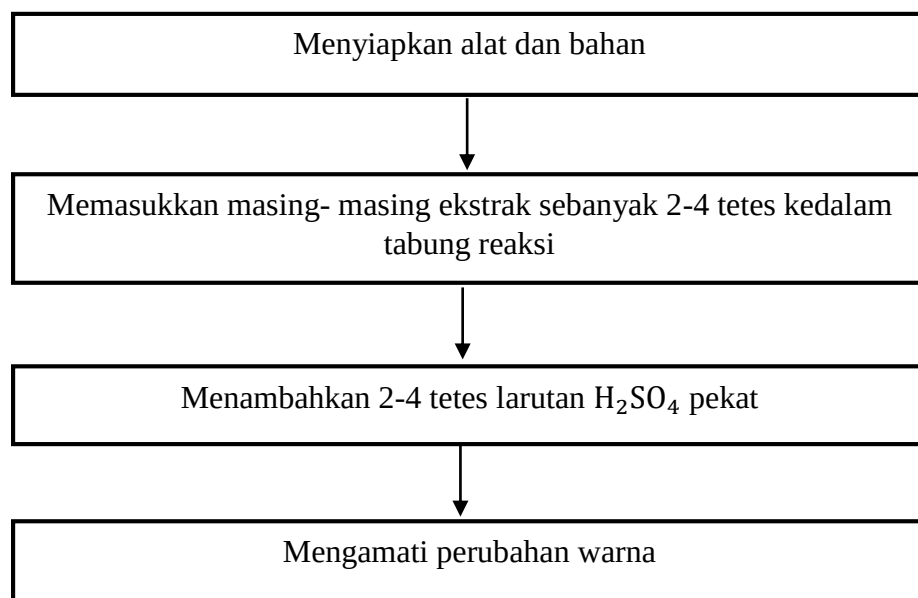
Gambar 3. 9 Skema Uji Warna Dengan NaOH 10%

b. Uji warna dengan H₂SO₄ pekat

Menguji warna dengan H₂SO₄ pekat yaitu memasukkan masing-masing ekstrak bayam merah sebanyak 2-4 tetes kedalam tabung reaksi.

Kemudian menambahkan 2-4 larutan H_2SO_4 pekat. Mengamati perubahan warna hingga menjadi warna merah bata sampai coklat kehitaman. Hal ini terjadi karena adanya reaksi oksidasi reduksi antara H_2SO_4 pekat sebagai pereduksi dengan sampel flavonoid yang menyebabkan pembentukan senyawa kompleks sehingga menimbulkan warna merah bata sampai coklat kehitaman (Wicaksono *et al.*, 2023).

Uji warna dengan H_2SO_4 dapat dilihat pada Gambar 3. 10 dibawah ini:



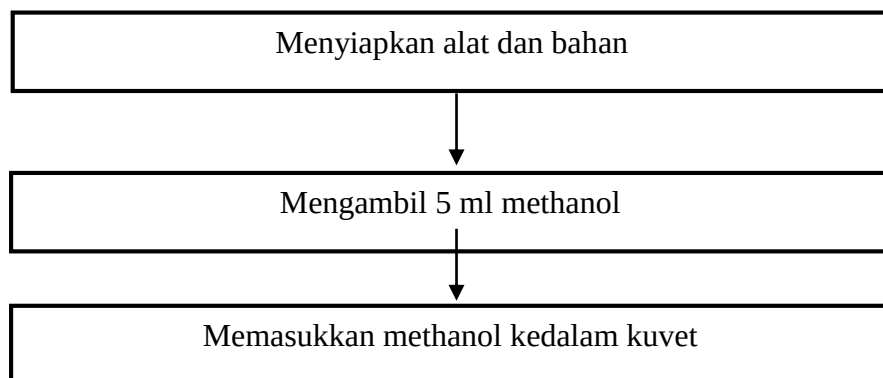
Gambar 3.10 Skema Uji Warna Dengan H_2SO_4 Pekat

c. Uji Spektrofotometri UV-Vis

1) Pembuatan Larutan Blanko

Mengambil 5 ml methanol dan memasukkan kedalam kuvet.

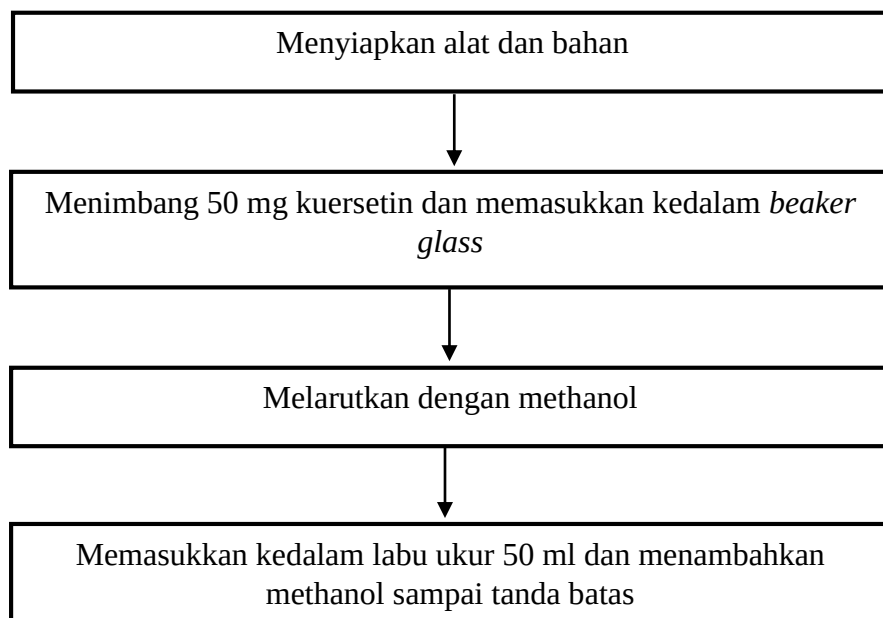
Pembuatan larutan blanko dapat dilihat pada Gambar 3. 11 dibawah ini:



Gambar 3. 11 Skema Pembuatan Larutan Blanko

2) Pembuatan larutan induk kuersetin (1000 ppm)

Menimbang 50 mg kuersetin kemudian dilarutkan dengan 50 ml methanol hingga larut. Larutan tersebut dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml, lalu ditambahkan methanol sampai tanda batas atas (Wicaksono *et al.*, 2023). Pembuatan larutan induk kuersetin (1000 ppm) dapat dilihat pada gambar 3. 12 dibawah ini:

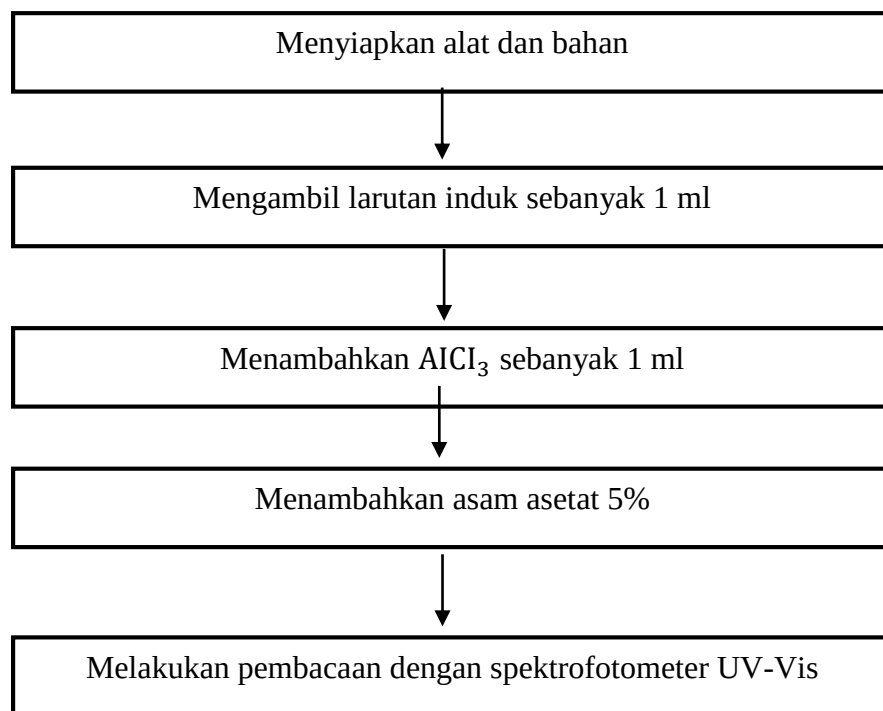


Gambar 3. 12 Pembuatan Larutan Induk Kuersetin (1000 ppm)

3) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mengambil larutan induk sebanyak 1 ml, menambahkan AlCl_3 sebanyak 1 ml dan menambahkan asam asetat 5 %. Lakukan pembacaan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 300-400 nm.

Penentuan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Gambar 3. 13 dibawah ini:



Gambar 3. 13 Skema Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

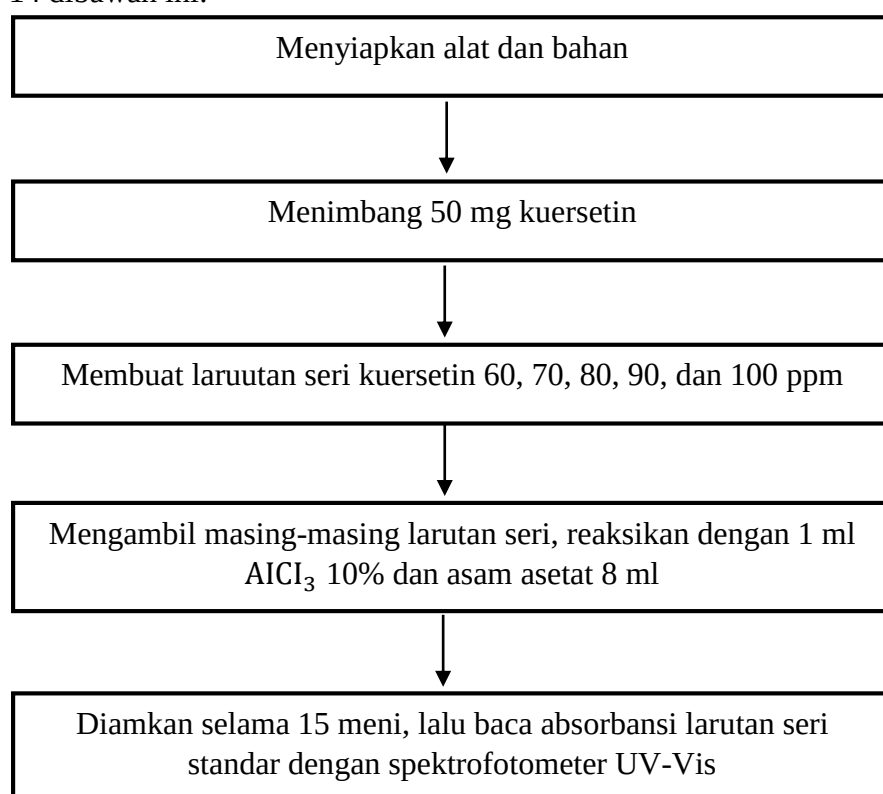
4) Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Larutan seri standar dibuat dengan menggunakan kuersetin sebagai bahan baku standar yaitu dengan menimbang 50 mg kuersetin dan membuat konsentasi larutan. Konsentrasi larutan dibuat

bertingkat, yaitu 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm. Masing-masing larutan dengan volume 1ml larutan AlCl_3 10%, kemudian diamkan selama 15 menit. Lalu dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

Pembuatan kurva baku kuersetin dapat dilihat pada Gambar 3.

14 dibawah ini:

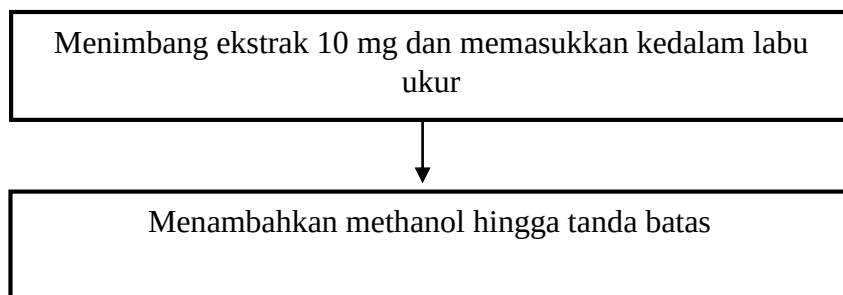


Gambar 3. 14 Skema Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

5) Penentuan Senyawa Flavonoid Total

a) Pembuatan larutan induk ekstrak 1000 ppm

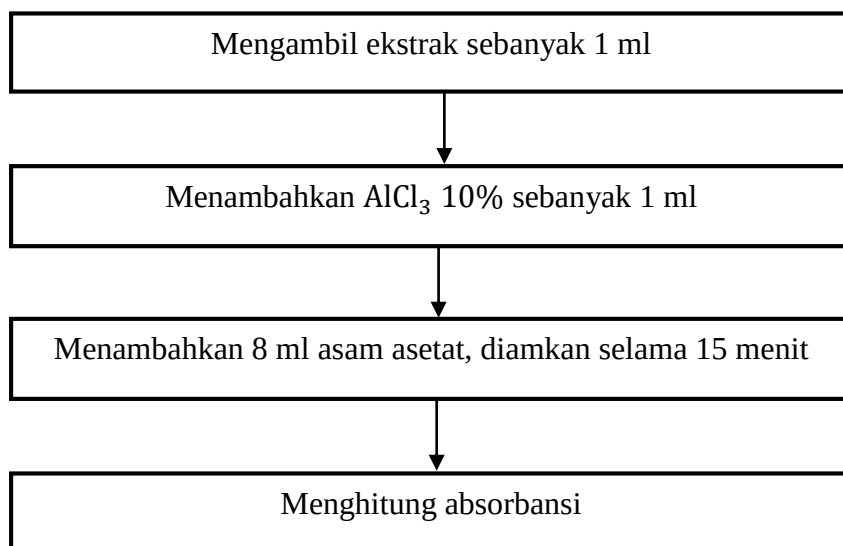
Menimbang ekstrak 10 mg dilarutkan dalam 10 ml methanol, volume dicukupkan hingga tanda batas. Pembuatan larutan induk ekstrak 1000 ppm dapat dilihat pada Gambar 3.15 dibawah ini:



Gambar 3. 15 Skema Pembuatan Larutan Induk Ekstrak 1000 ppm

b) Penentuan senyawa flavonoid Total

Mengambil ekstrak 1 ml, kemudian menambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat, diamkan selama 15 menit. Lalu dihitung absorbansi yang dihasilkan oleh tiap tiap konsentrasi dipanjang gelombang maksimum mampu membuat kurva hubungan antara konsentrasi baku dengan absorbansinya. Penentuan senyawa flavonoid total dapat dilihat pada Gambar 3. 16 dibawah ini:



Gambar 3. 16 Skema Penentuan Senyawa Flavonoid Total

c) Perhitungan Kadar Total flavonoid

Dengan menggunakan hukum Lambert- Beer yaitu

$$Y = a x + b$$

Keterangan:

Y = absorbansi

X = konsentrasi

a = slope

b = intersep

3.7. Analisis Data

Dari hasil pengukuran flavonoid yang terdapat pada bayam merah dengan metode spektrofotometri UV-Vis, analisis data dapat dilakukan menggunakan regresi linier dengan bantuan software Ms office.