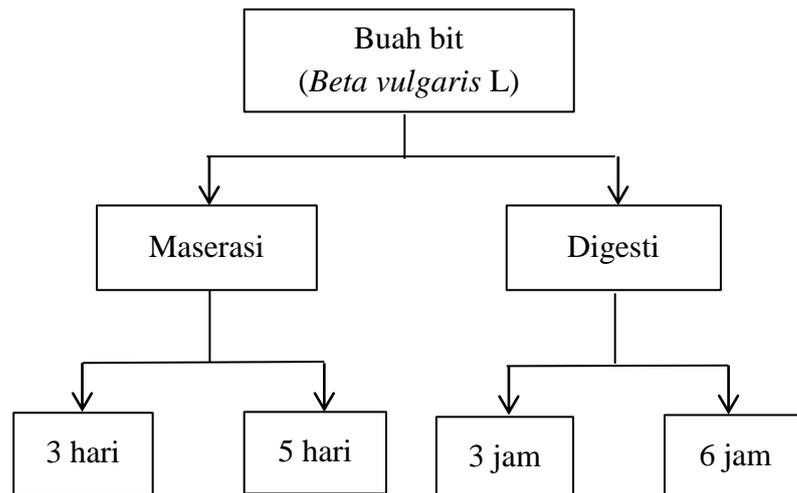


BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian



Gambar 3. 1 Desain Penelitian

B. Lokasi penelitian

1. Determinasi tanaman akan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).
2. Ekstraksi buah bit (*Beta vulgaris L*) dan skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji kadar flavonoid total akan dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo.
4. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari Bulan Juni-Juli 2023.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah buah bit (*Beta vulgaris* L) yang berasal dari Kelurahan Kumpulrejo, Kec. Argomulyo, Kota Salatiga, Jawa Tengah

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol buah bit (*Beta vulgaris* L) sebanyak 12 kg yang berasal dari Kelurahan Kumpulrejo, Kec. Argomulyo, Kota Salatiga, Jawa Tengah dan dilakukan pengujian penetapan kadar flavonoid total menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

D. Definisi Operasional

1. Metode Ekstraksi Maserasi

Metode ekstraksi maserasi merupakan proses ekstraksi tanpa pemanasan dengan mencampurkan serbuk simplisia yang direndaman dengan pelarut etanol 96% di dalam wadah tertutup rapat pada suhu ruang, selama 3 hari dan 5 hari.

2. Metode Ekstraksi Digesti

Metode ekstraksi digesti merupakan proses ekstraksi menggunakan temperatur panas pada suhu 40-50°C dengan mencampurkan serbuk simplisia dengan pelarut etanol 96% di dalam *rotary evaporator* selama 3 jam dan 6 jam.

3. Ekstrak Buah Bit Metode Maserasi

Ekstrak buah bit (*Beta vulgaris* L) adalah ekstrak yang didapatkan dari proses ekstraksi maserasi selama 3 hari dan 5 hari dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan pelarut 1 : 5 kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi menggunakan *rotary evaporator* menggunakan suhu 50°C

4. Ekstrak Buah Bit Metode Digesti

Ekstrak buah bit (*Beta vulgaris* L) adalah ekstrak yang didapatkan dari proses ekstraksi digesti selama 3 jam dan 6 jam dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan pelarut 1 : 5 kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi menggunakan *rotary evaporator* menggunakan suhu 50°C

5. Etanol 96%

Etanol 96% adalah senyawa polar yang mudah menguap sehingga baik digunakan sebagai pelarut ekstrak.

6. Uji Flavonoid Dengan Metode KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah suatu teknik sederhana yang digunakan untuk menentukan apakah sampel mengandung senyawa flavonoid atau tidak dengan melihat hasil warna bercak dan nilai Rfnya.

7. Uji Flavonoid Total dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis

Pengujian kadar flavonoid total dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis menggunakan aluminium klorida (AlCl_3), standar yang digunakan adalah kuersetin.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi buah bit (*Beta vulgaris* L) yaitu maserasi selama (3 hari dan 5 hari) dan digesti selama (3 jam dan 6 jam).

2. Variabel terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi akibat dari adanya variabel bebas yaitu adanya perbedaan kadar flavonoid buah bit.

a. Kadar Flavonoid buah bit (*Beta vulgaris* L) dari metode maserasi

b. Kadar Flavonoid buah bit (*Beta vulgaris* L) dari metode digesti

3. Variabel terkontrol adalah variabel yang keberadaannya merupakan prasyarat bagi bekerjanya suatu variabel bebas terhadap variabel terikat.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

a. Buah bit (*Beta vulgaris* L) didapatkan di daerah dan tempat yang sama

b. Penyiapan bahan yang akan diekstraksi dengan maserasi dan digesti

c. Lama waktu yang dibutuhkan selama proses ekstraksi maserasi dan digesti berlangsung

d. Suhu saat proses ekstraksi digesti berlangsung 40°C

F. Alat dan Bahan

1. Alat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan berbagai macam alat yaitu alat ekstraksi (Pisau, Nampan, Blender (Vaganza), Ayakan 60 mesh, Kain Flanel, Toples, Batang Pengaduk, *Rotary Evaporator*, *waterbath*), Spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10 vis Series*), Plat Silica Gel GF254, Sinar UV₂₅₄ nm UV₃₆₆ nm, *Chamber*, Pipa Kapiler, Oven (Mettler UN-30), Kuvet, dan lain-lain (Timbangan Analitik (Ohaus), Aluminium Foil, Corong Kaca, Cawan Porselen, Tabung Reaksi (Iwaki), Pipet Volume 1 ml, Pipet Tetes, Labu Ukur 10 ml, Labu ukur 25 ml dan Labu Ukur 100 ml).

2) Bahan Penelitian

Bahan simplisia : Ekstrak etanol buah bit

Bahan kimia yang digunakan antara lain : Etanol 96%, etanol p.a, kuersetin, asam asetat, AlCl₃ 10%, n-butanol, aquadest, HCl 2N pekat, bubuk magnesium.

G. Prosedur Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi buah bit (*Beta vulgaris* L) dilakukan untuk mengetahui apakah bahan tanaman yang akan digunakan dalam penelitian sesuai dengan yang dimaksud (Burhan *et al.*, 2019). Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).

2. Pembuatan simplisia umbi bit (*Beta vulgaris* L)

Sampel yang digunakan yaitu buah bit (*Beta vulgaris* L) dengan kriteria buah yang masih segar, tidak busuk dan tidak diserang hama (Pujiastuti & El'Zeba, 2021). Sampel buah bit yang diperoleh dari hasil panen dari Desa Kumpulrejo, Kec. Argomulyo, Kota Salatiga, Jawa Tengah sebanyak 14 kg. Buah bit yang terkumpul disortasi basah, dicuci dengan air bersih yang mengalir sebanyak 3 kali, ditiriskan dan dirajang. Kemudian sampel dikeringkan menggunakan sinar matahari tidak langsung dengan cara sampel ditutup dengan kain hitam. Selanjutnya sampel yang sudah kering dilakukan sortasi kering (Candra *et al.*, 2021). Kemudian sampel diblender untuk memperluas permukaan sampel, sampel selanjutnya diayak menggunakan ayakan 60 mesh dan selanjutnya sampel diekstraksi menggunakan beberapa metode ekstraksi (Antari *et al.*, 2015).

3. Uji standarisasi parameter non spesifik pada simplisia dan ekstrak

a. Uji kadar air pada simplisia dan ekstrak

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara cawan porselin dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 1 jam, kemudian dinginkan cawan dan ditimbang bobotnya. Setelah itu ditimbang sebanyak 2 gram sampel lalu dipanaskan dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam, kemudian didinginkan dalam desikator. Setelah itu, ditimbang hingga berat konstan dan dihitung persentase kadar air (Rahayu, 2021).

b. Uji kadar abu pada simplisia dan ekstrak

Uji kadar abu pada simplisia buah bit dilakukan dengan cara menimbang 2 gram sampel, lalu dimasukkan dalam krus porselen yang sebelumnya telah ditimbang, kemudian dipanaskan menggunakan alat mufle furnace pada suhu 600°C selama 3 jam. Kemudian didinginkan, setelah itu ditimbang hingga berat konstan dan dihitung persentase kadar abu (Anggraini, 2020). Kadar abu total dihitung dengan rumus sebagai berikut :

c. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol pada ekstrak dilakukan secara kualitatif dengan cara memasukkan ekstrak kental kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes asam sulfat pekat (H_2SO_4) dan 1 ml larutan kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$), adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan adanya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan (Adiningsih *et al.*, 2021).

4. Pembuatan ekstrak etanol buah bit (*Beta vulgaris* L)

a. Metode maserasi

Ekstraksi maserasi selama 3 hari dan 5 hari

Serbuk simplisia buah bit masing-masing sebanyak 100 gram dimasukkan ke dalam toples kaca 1 dan 2. Kemudian dimasukkan pelarut etanol 96% sebanyak 500 ml (1:5) kedalam toples kaca maserasi 1 dan 2 (Nudiasari *et al.*, 2019). Kemudian simpan toples kaca 1 dan toples kaca 2 dalam keadaan tertutup selama 3 hari dan 5 hari. Setiap 24 jam sekali dilakukan pengadukan sebanyak 3 sampai 4

kali. Selanjutnya hasil ekstrak cair dikentalkan dengan bantuan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, dilanjutkan dengan diuapkan diatas *waterbath* pada suhu 50°C (Muiz *et al.*, 2021). Proses berikutnya adalah ekstrak ditimbang untuk mengetahui berat rendemen dan dihitung % rendemennya.

b. Metode digesti dengan suhu 40°C

Ekstraksi digesti selama 3 jam dan 6 jam

Serbuk simplisia buah bit masing-masing sebanyak 100 gram dilarutkan kedalam etanol 96% sebanyak 500 ml atau perbandingan (1:5) (Nudiasari *et al.*, 2019). Selanjutnya direndam dan diputar selama 3 jam dan 6 jam menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40°C (Putri *et al.*, 2022). Setelah itu disaring hingga diperoleh ekstrak cair, selanjutnya hasil ekstrak cair dikentalkan dengan bantuan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, dilanjutkan dengan diuapkan diatas *waterbath* pada suhu 50°C (Muiz *et al.*, 2021). Proses berikutnya adalah ekstrak ditimbang untuk mengetahui berat rendemen dan dihitung % rendemennya.

5. Uji kualitatif flavonoid

a. Uji Kualitatif dengan Metode Uji Warna

Masing-masing ekstrak buah bit hasil maserasi dan digesti ditimbang sebanyak 200 mg, lalu ditambah dengan 5 ml etanol dan dipanaskan selama 5 menit didalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah 1 ml HCl 2N pekat. Kemudian ditambah 0,2 g bubuk mg.

Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua dalam waktu 3 menit (Bangun *et al.*, 2021).

b. Uji Kualitatif dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak etanol buah bit dengan metode maserasi dan digesti masing-masing ditimbang sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam etanol p.a, kemudian ekstrak ditotolkan pada lempeng KLT, masukan lempeng tersebut dalam wadah bejana yang berisi fase gerak n-butanol : asam asetat : akuadest (4:1:5) yang telah dijenuhkan, selanjutnya biarkan fase gerak merambat sampai tanda batas. Kemudian keluarkan lempeng ditunggu sampai kering dulu, lalu diuapi dengan amonia. Hasil elusi diamati dengan lampu UV 254 nm dan 365 nm, sebagai zat pembanding digunakan kuersetin (Ramadhani *et al.*, 2020).

6. Uji Kuantitatif Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin 1000 ppm

Ditimbang serbuk kuersetin sebanyak 25 mg kemudian dilarutkan menggunakan etanol p.a 25 ml sampai tanda batas (1000 ppm).

b. Pembuatan Laruta Kuersetin 100 ppm

Sebanyak 1 ml larutan induk kuersetin (1000 ppm) dipipet dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga volume 10 ml agar didapat konsentrasi 100 ppm.

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Lakukan pembacaan dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 350-450 nm.

d. Penentuan *Operating Time*

Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh dengan interval pada waktu 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

e. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan kuersetin sebagai baku standar dibuat kadar sebesar 50, 60, 70, 80 dan 90 ppm. Sebanyak 1 mL larutan kadar dari masing-masing konsentrasi dimasukkan, direaksikan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Didiamkan selama 2 menit pembacaan absorbansi kadar dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

f. Penentuan kadar Flavonoid Total

Larutan ekstrak 1000 ppm diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5% didiamkan selama 2 menit. Dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum.

g. Perhitungan Kadar Flavonoid

Untuk menghitung kadar flavonoid yang terdapat pada buah bit dapat dihitung dari nilai absorbansi yang diperoleh dari 5 konsentrasi kuersetin dengan persamaan regresi linier: $y = a + bx$

Keterangan :

y = absorbansi

x = konsentrasi

a = intercept (perpotongan garis)

b = slope (kemiringan)

Penetapan kadar flavonoid dalam sampel dapat dihitung dengan rumus :

$$C = \frac{C1 \times V \times FP}{m}$$

Keterangan :

C = Total flavonoid (mg/g)

$C1$ = Konsentrasi kuersetin (mg/L)

V = Volume Sampel

M = Berat ekstrak (g)

FP = Faktor pengenceran (L)

H. Analisis Data

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara kualitatif menggunakan metode uji warna dan metode kromatografi lapis tipis untuk membuktikan bahwa ekstrak yang diperoleh mengandung flavonoid kemudian dianalisis secara kuantitatif menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis untuk menentukan kadar flavonoid total dari metode ekstraksi baik maserasi dan digesti. Secara kuantitatif, data deret konsentrasi yang dibuat dari baku

kuersetin untuk flavonoid total kemudian dibuat persamaan kurva baku. Persamaan kurva baku $y = a + bx$ dengan $y =$ absorbansi dalam nm, $x =$ kadar dalam ppm (mg/L). Absorbansi ekstrak buah bit yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku sehingga didapatkan kadar flavonoid total buah bit.

Data kadar flavonoid total ekstrak etanol buah bit dari metode maserasi dan digesti dianalisis secara statistik menggunakan uji normalitas data dilakukan dengan analisis statistik *Saphiro-Wilk* karena jumlah data kurang dari 50 data. Data dikatakan terdistribusi normal $p > 0,05$ dan data dikatakan tidak terdistribusi normal jika $p < 0,05$. Kemudian di lanjutkan uji *Uji Levene test* yaitu untuk mengetahui homogenitas data. Data dikatakan homogen jika $p > 0,05$ dan data dikatakan tidak homogen jika $p < 0,05$. Data yang terdistribusi normal dan variannya homogen dianalisis menggunakan uji statistik One Way Anova (*Analysis Of Varians*) dengan taraf kepercayaan 95%. Selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc Test* untuk menilai perbedaan antara beberapa kelompok sekaligus untuk menghindari kesalahan eksperimen. Bila nilai $p > 0,05$ maka tidak ada perbedaan yang signifikan dan apabila $p < 0,05$ maka dikatakan terdapat perbedaan signifikan.