

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen di laboratorium. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis serta membandingkan kadar flavonoid dan fenolik dalam ekstrak bawang dayak dan bawang merah dengan menggunakan teknik spektrofotometri UV-Vis.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Lokasi

- a. Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro (UNDIP) guna memastikan keaslian spesies bawang dayak dan bawang merah.
- b. Pembuatan ekstrak bawang dayak dan bawang merah, dan uji fitokimia ekstrak bawang dayak dan bawang merah dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Penetapan kadar flavonoid dan fenolik ekstrak bawang dayak dan bawang merah dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Juli 2025.

C. Subjek penelitian

1. Populasi

Bawang dayak dan bawang merah diperoleh dari petani lokal.

2. Sampel

Sampel berupa ekstrak bawang dayak dan bawang merah diekstraksi dengan maserasi menggunakan etanol 96%, lalu digunakan untuk analisis kadar flavonoid dan fenolik.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak bawang dayak dan bawang merah.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu hasil kadar flavonoid dan fenolik total dari ekstrak bawang dayak dan bawang merah.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu waktu, dan suhu.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak bawang dayak dan bawang merah adalah ekstrak yang diperoleh dari metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.
2. Penentuan kadar flavonoid bawang dayak dan bawang merah metode spektrofotometri UV-Vis
3. Penentuan kadar fenolik bawang dayak dan bawang merah metode spektrofotometri UV-Vis

F. Pengumpulan data

1. Alat

Penelitian ini dilakukan dengan berbagai macam alat yaitu alat blender, timbangan digital, toples kaca, oven, ayakan nomor 40, kertas saring, corong, kain flanel, sendok panjang, rotary evaporator (Rotavapor® R-300), waterbath (memmert wnb 6), batang pengaduk, cawan penguap, labu takar, tabung reaksi, pipet ukur, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV Mini 1240), beaker glass, gelas ukur, pipet tetes, spatula, panci, tabung reaksi, labu ukur.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Bawang dayak, bawang merah, etanol 96%, Aquades, Amoniak, Pereaksi mayer dan dragendroff, H₂SO₄, HCl pekat, MgSO₄, FeCl₃ 1%, NaOH 1N, Asam Sulfat, dan Kuarsetin, pereaksi Fe (III) klorida 1%, senyawa fenol, serbuk magnesium, HCl pekat, amil alkohol, asam galat, metanol p.a, reagen Folin-Ciocalteu, Natrium karbonat 1M, AlCl₃ 10%, Asam asetat 5%.

G. Prosedur penelitian

1. Determinasi Tanaman

Proses identifikasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro (UNDIP) untuk memastikan keakuratan jenis bawang dayak dan bawang merah.

2. Pembuatan Simplisia

Langkah awal dimulai dengan pengumpulan bahan, kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan bawang yang baik dan yang rusak. Setelah itu, bawang dayak dan bawang merah dicuci menggunakan air mengalir hingga benar-benar bersih. Bawang yang sudah bersih kemudian dirajang tipis dan dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung dengan menggunakan penutup kain hitam untuk menghindari paparan langsung. Setelah kering, dilakukan sortasi kering untuk memisahkan bawang yang benar-benar kering dari yang masih lembab. Selanjutnya, bawang dikeringkan dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Serbuk yang dihasilkan kemudian diayak dengan saringan 40 mesh agar diperoleh serbuk halus dan seragam yang siap digunakan.

3. Standarisasi simplisia

a. Parameter spesifik

Parameter spesifik dilakukan dengan mendeskripsikan tanaman termasuk nama latin, bagian yang digunakan, dan nama Indonesia dari tanaman. Selain itu mengamati karakteristik fisik simplisia seperti pengamatan organoleptis dilakukan dengan mengambil sedikit simplisia dan amati dengan pancaindera untuk menentukan bentuk, warna, bau, dan rasa (Evifania *et al.*, 2020).

b. Parameter non spesifik

1) Uji kadar abu

Uji kadar abu total dilakukan dengan cara menimbang bobot krus kemudian tambahkan 2 gram bubuk simplisia dan ratakan. Pijarkan bubuk simplisia pada suhu 600°C selama 3 jam sampai menjadi abu. Hasil tersebut kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang berat (Nurhidayah & Erviani, 2019).

2) Uji kadar air

Masukkan 3 gram simplisia ke dalam alat *moisture analyzer* yang telah ditara sebelumnya. Tunggu sampai proses pengujian selesai. Kemudian baca dan catat hasil kadar air yang tertera pada layar alat (Santoso *et al.*, 2023).

4. Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 500 gram serbuk sampel umbi bawang dayak dan umbi bawang merah ditimbang secara terpisah dengan cermat sebelum diekstraksi. Proses ekstraksi ini menggunakan metode maserasi, yaitu dengan merendam serbuk umbi bawang dayak dan umbi bawang merah masing-masing dalam 2500 mL pelarut etanol 96% hingga seluruh serbuk benar-benar terendam sempurna. Wadah yang berisi campuran serbuk dan pelarut ditutup rapat menggunakan aluminium foil untuk mencegah penguapan dan kontaminasi. Selanjutnya, wadah tersebut disimpan di tempat yang terlindung dari paparan sinar matahari langsung selama 5 hari.

Selama proses maserasi, campuran tersebut secara berkala diaduk agar ekstraksi berjalan optimal dan merata.

Setelah proses maserasi berlangsung selama 5 hari, dilakukan remaserasi sebanyak dua kali. Setiap tahap remaserasi menggunakan 1500 mL pelarut etanol 96%, dengan waktu perendaman selama 3 hari. Filtrat etanol 96% yang diperoleh dari maserasi dan remaserasi kemudian digabungkan. Selanjutnya, filtrat tersebut diuapkan menggunakan Rotary Evaporator hingga diperoleh ekstrak kental dari umbi bawang dayak dan bawang merah. Ekstrak kental yang dihasilkan kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik untuk menentukan bobot ekstrak. Setelah itu, ekstrak disimpan dalam wadah kaca tertutup rapat untuk keperluan uji lebih lanjut (Toar *et al.*, 2023).

5. Identifikasi Metabolit Sekunder Pada Ekstrak Bawang Dayak dan Bawang Merah

a. Uji Fenol

Sebanyak 0,05 gram ekstrak yang akan diuji dilarutkan dalam sejumlah akuades, kemudian larutan tersebut dibagi secara merata ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama berfungsi sebagai tabung uji, dimana ditambahkan 3 tetes pereaksi besi (III) klorida dengan konsentrasi 1%. Reaksi antara pereaksi besi (III) klorida dan senyawa fenol (jika ada) akan ditandai dengan terbentuknya warna pada larutan, yaitu hijau, merah ungu, biru, atau hitam. Perubahan warna ini mengindikasikan keberadaan senyawa fenol dalam ekstrak. Tabung

kedua, yang berisi larutan ekstrak tanpa penambahan pereaksi, digunakan sebagai tabung kontrol atau pembanding.

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,05 gram ekstrak dilarutkan dalam 20 mL akuades, kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit dan disaring dalam kondisi panas. Sebanyak 3 mL filtrat dimasukkan ke dalam tabung I, lalu ditambahkan 0,5 mg serbuk magnesium, 1 mL HCl pekat, dan 2 mL amil alkohol, kemudian dikocok hingga merata. Adanya flavonoid ditandai dengan munculnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol. Tabung II berfungsi sebagai kontrol (Hidayatullah *et al.*, 2024).

c. Uji alkaloid

Pengujian alkaloid dilakukan dengan menimbang 0,5 gram ekstrak kental, lalu menambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air suling. Campuran tersebut dipanaskan selama 2 menit menggunakan penangas air, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang dihasilkan digunakan untuk uji kualitatif alkaloid. Sebanyak 0,5 mL filtrat dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi. Pada tabung pertama, ditetesi 2 tetes pereaksi Mayer yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning. Pada tabung kedua, ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat hingga muncul endapan coklat. Sedangkan pada tabung ketiga, ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff yang menghasilkan endapan putih.

Sampel dinyatakan mengandung alkaloid apabila terbentuk endapan atau kekeruhan pada minimal dua dari tiga uji yang dilakukan (Djoko *et al.*, 2020).

d. Uji saponin

Uji saponin dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,5 gram ekstrak kental, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas. Setelah didinginkan, larutan dikocok kuat selama 10 detik. Adanya saponin dalam sampel ditandai dengan terbentuknya busa yang tetap stabil setelah ditambahkan asam klorida 2N (Djoko *et al.*, 2020).

e. Uji tanin

Uji tanin dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,5 gram ekstrak kental, larutkan dalam 10 ml akuades, kemudian disaring. Filtrat yang dihasilkan diencerkan kembali dengan akuades hingga tidak berwarna. Setelah itu, diambil 2 ml larutan dan ditambahkan 1-2 tetes larutan besi (III) klorida. Jika muncul warna biru atau hijau kehitaman menandakan adanya kandungan tanin (Aljanah *et al.*, 2022).

6. Penetapan Kadar Fenolik Total

a. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

Larutan induk asam galat dengan konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 10 mg asam galat dalam etanol p.a hingga mencapai volume akhir 10 mL. Larutan ini berfungsi sebagai stok awal untuk

berbagai aplikasi yang memerlukan konsentrasi asam galat yang lebih rendah (Hidayatullah *et al.*, 2024).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Analisis kuantitatif asam galat, larutan asam galat dengan konsentrasi 50 ppm sebanyak 0,5 mL dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, 5 mL reagen Folin-Ciocalteu ditambahkan ke dalam tabung yang sama. Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 5 menit pada suhu kamar. Setelah 5 menit, 4 mL larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) 1M ditambahkan ke dalam tabung. Campuran tersebut kemudian dikocok hingga homogen. Tabung reaksi kemudian didiamkan dalam kondisi gelap pada suhu kamar selama 30 menit. Setelah 30 menit, absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 600-800 nm (Hidayatullah *et al.*, 2024).

c. Penentuan *Operating Time* Asam Galat

500 μL larutan baku asam galat dengan konsentrasi 30 ppm dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, 1,5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan 1:10 ditambahkan ke dalam tabung yang sama. Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 3 menit pada suhu kamar. Setelah 3 menit, 1,2 mL larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) 7,5% ditambahkan ke dalam tabung. Campuran tersebut kemudian dikocok hingga homogen. Absorbansi larutan kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang

gelombang maksimum. Pengukuran absorbansi dilakukan setiap 3 menit selama periode 45 menit.

d. Pembuatan Kurva Baku Asam Galat

Larutan induk asam galat dengan konsentrasi 1000 ppm diencerkan menjadi serangkaian konsentrasi, yaitu 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Dari masing-masing larutan standar yang telah diencerkan, sebanyak 0,5 mL diambil dan dimasukkan ke dalam vial. Selanjutnya, 5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan 1:10 dengan akuades ditambahkan ke dalam vial yang sama. Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 5 menit pada suhu kamar. Setelah 5 menit, 4 mL larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) 1M ditambahkan ke dalam vial. Campuran tersebut kemudian dikocok hingga homogen. Vial kemudian didiamkan dalam kondisi gelap pada suhu kamar selama 30 menit. Setelah 30 menit, absorbansi masing-masing larutan standar diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya dan dilakukan replikasi.

e. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Bawang Dayak dan Bawang Merah

10 mg ekstrak bawang merah dan bawang dayak masing-masing dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a dalam labu ukur. Kemudian, 0,5 mL larutan ekstrak yang dihasilkan dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, 5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan 1:10 dengan akuades ditambahkan ke dalam tabung yang sama.

Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 5 menit pada suhu kamar. Setelah 5 menit, 4 mL larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) 1M ditambahkan ke dalam tabung. Campuran tersebut kemudian dikocok hingga homogen. Tabung reaksi kemudian didiamkan dalam kondisi gelap pada suhu kamar selama 45-50 menit. Setelah 45-50 menit, absorbansi larutan diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya.

7. Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Larutan induk kuersetin, 10 mg kuersetin ditimbang secara akurat dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Kemudian, etanol p.a ditambahkan sedikit demi sedikit hingga kuersetin larut sepenuhnya. Setelah kuersetin larut, volume larutan dicukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas 10 mL. Larutan ini memiliki konsentrasi 1000 ppm dan disebut sebagai larutan induk kuersetin.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

0,5 mL larutan kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, 0,5 mL larutan aluminium klorida (AlCl_3) 10% dan 4 mL asam asetat 5% ditambahkan ke dalam tabung yang sama. Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Setelah 30 menit, absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 370-450 nm.

c. Penentuan *Operating Time* Kuersetin

Larutan baku kuersetin dengan konsentrasi 1000 ppm diencerkan terlebih dahulu menjadi 40 ppm. Kemudian, 1 mL dari larutan kerja kuersetin 40 ppm dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ke dalam tabung yang sama, ditambahkan 0,5 mL AlCl_3 10% dan 4 mL asam asetat 5%. Campuran tersebut kemudian dikocok hingga homogen dan didiamkan. Absorbansi larutan kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan. Pengukuran absorbansi ini diulang setiap 2 menit selama periode 60 menit, atau hingga nilai absorbansi menjadi stabil.

d. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Larutan induk kuersetin dengan konsentrasi 1000 ppm diencerkan menjadi serangkaian konsentrasi, yaitu 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Dari masing-masing larutan standar yang telah diencerkan, sebanyak 0,5 mL diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, 0,5 mL larutan aluminium klorida (AlCl_3) 10% dan 4 mL asam asetat 5% ditambahkan ke dalam tabung yang sama. Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 21-26 menit pada suhu kamar. Setelah 30 menit, absorbansi masing-masing larutan standar diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (Hidayatullah *et al.*, 2024).

e. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Bawang Dayak dan Bawang Merah

10 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. dalam labu ukur. Kemudian, 0,5 mL larutan ekstrak yang dihasilkan dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, 0,5 mL larutan aluminium klorida (AlCl₃) 10% dan 4 mL asam asetat 5% ditambahkan ke dalam tabung yang sama. Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 21 menit pada suhu kamar. Setelah 21 menit, absorbansi larutan diukur menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (Hidayatullah et al., 2024b).

H. Analisis Data

1. Analisis Data Kadar Fenolik Total

Data dianalisis menggunakan regresi linier dengan persamaan $y = bx + a$, di mana nilai absorbansi larutan uji dimasukkan ke dalam rumus. Kadar fenolik total dinyatakan dalam miligram ekuivalen asam galat per gram ekstrak (mg GAE/g) dan dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Kadar fenol total} = \frac{C \times V \times Fp}{M}$$

Keterangan :

C : Kesetaraan ekstrak (mg/L)

V : Volume total ekstrak (ml)

M : Berat sampel (mg)

Fp : Faktor Pengenceran

2. Analisis Data Kadar Flavonoid Total

Data dianalisis menggunakan regresi linier dengan persamaan $y = bx + a$, di mana nilai absorbansi larutan uji dimasukkan ke dalam rumus. Kadar flavonoid total dinyatakan dalam mg ekuivalen kuersetin per gram ekstrak (mg QE/g). Perhitungan kadar flavonoid menggunakan rumus :

$$\text{Kandungan Flavonoid Total} = \frac{C \times V}{M}$$

Keterangan :

C : Kesetaraan kuarsetin (mg/L)

V : Volume total ekstrak (ml)

M : Berat sampel (mg)

3. Analisis data statistik

pada penelitian ini, data yang diperoleh di analisis dengan dilakukan beberapa pengujian menggunakan SPSS untuk mengevaluasi bagian *Normalitas* data tidak terdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji statistik *independent t-test* untuk mengetahui perbedaan signifikan flavonoid dan fenolik pada ekstrak bawang dayak dan bawang merah.