

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan secara eksperimental yang bertujuan untuk menghitung kadar total fenol dari ekstrak etanol 96% umbi bawang dayak dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis berdasarkan variasi waktu tumbuh tanaman.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan mulai pertengahan bulan Agustus 2020 – Juni 2021 yang dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari dan Laboratorium Kimia Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang digunakan pada penelitian ini meliputi:

- a. variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol 96% umbi bawang dayak (*Eleutherine bulbosa Urb.*).
- b. variabel terikat pada penelitian ini yaitu kadar fenol dari ekstrak etanol 96% umbi bawang dayak (*Eleutherine bulbosa Urb.*).

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayakan nomor 16 (*Pharmalab*[®]), batang pengaduk, bejana maserasi, *blender* (*cosmos*[®]), botol coklat, botol semprot, cawan penguap, corong kaca (*Pyrex*[®]), gelas beker (*Pyrex*[®]), gelas ukur (*Pyrex*[®]), hotplate (*IKA*[®]), kuvet (*Hellma*[®]), labu ukur (*Pyrex*[®]), lampu UV 254 nm dan 366 nm, mikropipet (*Dragon Lab*[®]), oven (*Memmert UN55*[®]), pipa kapiler, pipet tetes, pipet ukur (*Pyrex*[®]), *rotary evaporator* (*IKRF10*[®]), sendok tanduk, spektrofotometer UV-Vis (*T60*[®]), timbangan analitik (*Ohaus*[®]), vial, *waterbath* (*Memmert*[®]).

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, asam galat (*Sigma*[®]), *aquadest* (*OneMed*[®]), etanol 96% (*Merck*[®]), FeCl₃ (*Arkitos*[®]), Folin-Ciocalteu (*Merck*[®]), metanol p.a (*Emsure*[®]), Na₂CO₃ (*Merck*[®]), kloroform (*Merck*[®]), plat KLT silika gelGF254 (*Merck*[®]), umbi bawang dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengambilan Sampel

Sampel umbi bawang dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.) diambil dari petani yang berlokasi di Landasan Ulin, Kota Banjarbaru. Pengambilan sampel dilakukan setiap satu bulan sekali selama 6 bulan

dimulai tanggal 12 Agustus 2020. Variasi waktu tumbuh tanaman umbi bawang dayak yang digunakan yaitu 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 bulan.

3.5.2 Pengolahan Sampel

Umbi bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.) yang telah dikumpulkan, disortasi basah untuk membersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel, kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu dipotong-potong kecil, selanjutnya dikeringkan di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam selama 3-4 hari. Simplisia yang telah kering dibersihkan dari kotoran yang masih menempel kemudian diserbuk dengan menggunakan *blender* dan di ayak menggunakan pengayak nomor 16 (Puspadewi dkk, 2013).

3.5.3 Ekstraksi Simplisia

Proses ekstraksi pembuatan ekstrak etanol umbi bawang dayak dilakukan dengan metode maserasi, simplisia umbi bawang dayak dimasukan dalam alat maserasi. Kemudian larutan etanol 96% dituangkan secara perlahan lahan kedalam alat maserasi yang berisi sampel, lalu di aduk hingga merata. Larutan dituangkan hingga 1 cm diatas permukaan sampel. Diaduk sesekali, setiap 1 x 24 jam larutan disaring dan pelarut diganti dengan yang baru sambil sesekali diaduk. Setelah itu dilakukan remaserasi sebanyak dua kali. Setelah itu ekstrak dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan temperatur suhu 50°C sampai didapat ekstrak etanol yang kental dan dilanjutkan dengan penguapan di *waterbath* sehingga diperoleh bobot

tetap (Warnida dkk., 2017; Haq dkk., 2018). Untuk menghitung ekstrak kental rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara bobot yang diperoleh dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan atau dihitung menggunakan rumus (Depkes RI, 2017):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak yang Diperoleh}}{\text{Bobot Simplisia yang Diekstraksi}} \times 100 \%$$

3.5.4 Organoleptik Ekstrak Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.)

Pengamatan organoleptik dilakukan dengan panca indera untuk mendeskripsikan bentuk, warna, rasa dan bau dari ekstrak (Krisyanella dkk., 2013). Pernyataan “tidak berbau”, “praktis tidak berbau”, “berbau khas lemah” atau lainnya, ditetapkan dengan pengamatan setelah wadah yang berisi tidak lebih dari 25 g bahan dibuka (Depkes RI, 2008). Uji organoleptik dinilai dari 5 orang responden.

3.5.5 Makroskopik Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.)

Pemeriksaan morfologi dengan mengamati bentuk fisik secara langsung pada bagian daun, batang dan akar. Uji makroskopik pada keseluruhan bagian tanaman bertujuan untuk melihat ciri-ciri morfologi (Ladeska & Dingga, 2019). Dan untuk memperoleh identitas simplisia (Anggraeni, 2019) dari umbi bawang dayak.

3.5.6 Mikroskopik Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.)

Pemeriksaan secara mikroskopis dilakukan pada serbuk simplisia. Dengan tujuan untuk melihat karakteristik atau penanda

yang khas dimiliki oleh simplisia umbi bawang dayak (Puspadewi dkk., 2013). Pemeriksaan mikroskopik pada serbuk simplisia bawang dayak. Diletakkan pada objek glass yang telah ditetesi *emersi oil* serbuk simplisia, ditutup dengan kaca penutup, lalu diamati dibawah mikroskop (Siswanto, 2017).

3.5.7 Analisis Kualitatif

Uji kualitatif dilakuksn dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT), fase gerak yang digunakan yaitu klorofom : metanol dengan perbandingan terbaik yang telah dioptimasi dengan cara mencelupkan kertas saring, setelah itu ditutup dalam bejana kromatografi sehingga kertas saring basah seluruhnya. Totolkan ekstrak dengan konsentrasi 1% (Gandjar & Rohman, 2011) pada plat KLT GF₂₅₄ dengan ukuran 7,5 x 1,5 cm dengan jarak antara 1 cm dari tepi bawah serta 0,5 cm dari tepi atas lempeng, dan biarkan mengering (FI II, 2017; Fikri, 2020).

Plat KLT GF₂₅₄ yang sudah ditotolkan ekstrak dimasukkan ke dalam bejana kromatografi. Larutan pengembang dalam bejana harus mencapai tepi bawah lapisan penjerap, totolan jangan sampai terendam. Letakkan tutup bejana pada tempatnya dan biarkan sistem hingga fase gerak merambat sampai batas jarak rambat. Keluarkan lempeng dan keringkan di udara, dan amati bercak dengan sinar tampak, ultraviolet gelombang pendek (254 nm) kemudian dengan ultraviolet gelombang panjang (366 nm) (Fikri, 2020). Ukur dan catat

jarak tiap bercak dari titik penotolan dan tentukan harga Rf. Sebagai penampak noda digunakan larutan FeCl_3 10% dalam etanol (FI II, 2017; Ramadhani, 2020).

3.5.8 Analisis Kuantitatif

a) Pembuatan Larutan Induk Baku Asam Galat

Sebanyak 5 mg asam galat dilarutkan dalam 1 mL metanol p.a, kemudian diencerkan dengan air suling sampai volume 50 mL. kemudian diperoleh konsentrasi larutan induk 100 ppm (Khadijah dkk, 2017).

b) Penetapan Panjang Gelombang (λ) Maksimum Asam Galat

Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan menggunakan pembanding asam galat dan pereaksi Folin Ciocateu. Sebanyak 300 μl larutan asam galat konsentrasi 100 ppm ditambah 0,5 mL reagen Folin Ciocalteau (sebelumnya sudah diencerkan dengan *aquadest* 1:10), kemudian digojog dan didiamkan selama 5 menit. Ke dalam larutan tersebut ditambah 1 ml larutan Na_2CO_3 10%, digojog homogen, dan didiamkan pada suhu kamar pada range operating time, kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 400-800 nm (Ulya, 2020).

c) Penentuan *Operating Time* (OT)

Sebanyak 300 μl larutan asam galat konsentrasi 50 ppm ditambah 0,5 mL reagen Folin Ciocalteau (sebelumnya sudah diencerkan dengan *aquadest* 1:10), kemudian digojog dan

didiamkan selama 5 menit ke dalam larutan tersebut ditambah 1 ml larutan Na_2CO_3 10%, digojog sampai homogen, dan diukur absorbansinya dalam rentang waktu 0-60 menit pada panjang gelombang yang telah didapatkan (Ulya, 2020).

d) Penentuan Kurva Baku

Penentuan kurva baku dilakukan dengan mengambil sebanyak 300 μl larutan asam galat konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm masing-masing dimasukkan dalam tabung kemudian ditambah 0,5 mL reagen Folin Ciocalteau (1:10) dan digojog. Setelah didiamkan selama 3 menit, masing-masing larutan ditambah 1 mL larutan Na_2CO_3 10% digojog homogen, dan didiamkan pada *range operating time* pada suhu kamar dengan kondisi tertutup. Semua larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang absorbansi maksimum, kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (ppm) dengan absorbansi (Ulya, 2020).

e) Pengukuran Kadar Fenol Total Pada Ekstrak Etanol 96% Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Urb.)

Sebanyak 10 mg ekstrak etanol Umbi Bawang Dayak dilarutkan sampai volume 10 mL hingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm dengan campuran etanol : air suling (1:1). Larutan ekstrak yang diperoleh dipipet 300 μl dan ditambah 1,5 ml reagen Folin-Ciocalteau dan digojog. Didiamkan selama 3 menit,

ditambah 1,2 ml larutan Na_2CO_3 10% dan didiamkan lagi pada *range operating time* pada suhu kamar. Absorbansi larutan ekstrak diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang absorbansi maksimum. Dilakukan 3 kali pengulangan (Andriani & Mustiwi, 2018).

3.6 Analisis Data

Analisis data terlebih dahulu dilakukan dengan metode kurva standar, regresi linier $y = bx + a$ dibuat berdasarkan data absorbansi dan konsentrasi dari larutan asam galat, kemudian dihitung kadar fenolik totalnya. Kandungan fenol total dalam ekstrak etanol umbi bawang dayak dihitung dengan memasukkan data absorbansi dalam persamaan kurva baku asam galat sebagai nilai y , di mana nilai x yang diperoleh merupakan ekivalensi miligram asam galat dalam tiap gram ekstrak (GAE) (Andriani & Mustiwi, 2018).