BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Juni 2025 sedangkan tempat penelitian dilakukan di Desa Jagalempeni Kecamatan Wanasari Kabupaten Brebes dan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini Spektofotometri UV-Vis (Shimadzu), timbangan analitik (HWH DJ602B), tabung reaksi (Pyrex). labu ukur 10 mL (Pyrex), pipet tetes, mikropipet (Dragonlab), gelas beaker (Pyrex), corong kaca (Pyrex), cangkul, timba siram, alat penyemprot, dan penggaris.

3.2.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini yaitu pupuk organik kotoran kambing, pupuk anorganik NPK, etanol 96%, aquadest, $AlCl_3$ 10%, HCl pekat, HCl 2N, serbuk Mg, pereaksi $FeCl_3$ 1%, CH_3COONa, kuersetin, kertas saring, dan kertas whattman.

3.3 Rancangan Penlitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental. Penelitian dilakukan dengan percobaan faktor perbandingan kombinasi pupuk organik dan anorganik dengan 4 perlakuan yaitu: p1= 0 gram pupuk organik dan 0 gram pupuk anorganik, p2= 45 gram pupuk organik dan 180

gram pupuk anorganik, p3= 90 gram pupuk organik dan 90 gram pupuk anorganik, p4= 180 gram pupuk organik dan 45 pupuk anorganik. Setiap perlakuan diulang 3 kali. Kemudian dilakukan perlakuan preparasi sampel dan dianalisis kandungan flavonoid bawang merah menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis.

Variabel pada penelitian ini yaitu:

3.3.1 Variabel bebas (Independen)

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya dan timbulnya variabel terikat (dependent). Variabel bebas dalam penelitian kali ini yaitu perbedaan perbandingan kombinasi pupuk organik dan anorganik.

3.3.2 Variabel Terikat (Dependen)

Variabel terikat (dependent) adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu pertumbuhan (tinggi tanaman, jumlah daun, berat basah) dan kandungan flavonoid.

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu kondisi lingkungan seperti waktu pemberian pupuk dan pemantauan tanaman bawang merah.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan lahan

Langkah pertama yang dilakukan yaitu pilih lokasi dengan koordinat 6˚56`49``S109˚00`14``E. Koordinat tersebut menjelaskan bahwa lokasi berada di garis lintang 6˚56’49’ selatan dan garis bujur

109˚00’14’’ timur, pilih lokasi dengan akses air dan serta sinar matahari yang cukup. Kemudian bersihkan lahan dari rumput dan sisa tanaman sebelumnya. Tanah dicangkul dengan kedalaman 20 – 30 cm. Kemudian dilakukan penyiraman secara merata untuk menjaga kelembaban sebelum penanaman. Ukuran panjang dan lebar lahan yang akan peneliti gunakan yaitu 30 cm x 30 cm (Sumarni, Nani dan Hidayat, 2005).

3.4.2 Pemilihan bibit

Siapkan bibit bawang merah yang berkualitas, biasanya berumur 70-80 hari setelah tanam. Pastikan bibit tidak busuk, bercak-bercak, warnaya cerah. Bibit harus kencang dan tidak layu. Pilih bibit yang berumbi besar dan segar, selanjutnya memotong 1/4 bagian umbi tersebut, tujuannya untuk mempercepat pertumbuhan tunas dan merangsang tumbuhnya umbi samping (Sumarni, Nani dan Hidayat, 2005).

3.4.3 Penanaman Bawang Merah

Penanaman bibit bawang merah dengan cara memasukkan ke dalam tanah dengan gerakan seperti memutar sekrup, sehingga ujung umbi tampak rata dengan permukaan tanah. Umbi ditanam dengan jarak tanam 10cm x 10cm. Tidak dianjurkan untuk menanam terlalu dalam, karena umbi mudah mengalami pembusukan. Penyiraman dilakukan setiap hari yaitu pada pagi atau sore hari, tergantung cuaca atau sesuaikan dengan kebutuhan tanaman (Pujiati *et al*., 2017).

3.4.4 Formulasi Pupuk

Tabel 3.1 Formulasi Pupuk

Perlakuan	Dosis Perlakuan (ton/h^{-1})		Konversi g/m^2		Konversi g/ 900 cm^2	
	Organik	Anorganik	Organik	Anorganik	Organik	Anorganik
P1	0	0	0	0	0	0
P2	5	20	500	2000	45	180
P3	10	10	1000	1000	90	90
P4	20	5	2000	500	180	45

Untuk mendapatkan dosis pupuk gram/ 900 cm^2, maka dilakukan konversi dari ton ke gram dan dari hektar ke m^2 selanjutnya dari m^2 ke cm^2.

Keterangan:

1 hektar = 10.000 m^2

1 m^2 = 100 cm 100 cm

1 ton = 1.000.000 gram

3.4.5 Pemberian Pupuk

Pemberian pupuk dilakukan setelah 10 – 15 hari setelah tanam dengan perbandingan kombinasi pupuk organik dan anorganik yang telah ditentukan oleh peneliti dengan masing-masing perbandingan p1= 0 gram pupuk organik dan 0 gram pupuk anorganik, p2= 45 gram pupuk organik dan 180 gram pupuk anorganik, p3= 90 gram pupuk organik dan 90 pupuk anorganik, p4= 180 gram pupuk organik dan 45 pupuk anorganik (Nooraminah et al., 2023), dilakukan 2 kali pemupukan dengan perbandingan yang sama dan pada interval waktu 10 hari. Pemupukan dilakukan pada pagi hari atau sore hari tergantung dari cuacanya.

Pemupukan dilakukan dengan cara menabur pupuk organik dan anorganik secara merata pada area tanaman.

3.4.6 Pengamatan Pertumbuhan

Parameter yang diamati yaitu tinggi tanaman diukur mulai dari pangkal sampai keujung daun terpanjang mulai dari umur 2 MST (Minggu setelah tanam), 3 MST, 4 MST, 5 MST dan 6 MST. Jumlah daun dilakukan dengan cara menghitung jumlah seluruh daun yang muncul pada anakan setiap rumpunnya saat tanaman berumur 2 MST, 3 MST, 4 MST, 5 MST dan 6 MST. Produksi per sampel dan produksi per plot diperoleh dengan cara menimbang hasil bawang merah setelah panen, waktu pemanenan biasanya setelah bawang merah berumur 40 hari sampai 70 hari. Parameter tersebut diamati untuk mengetahui perbedaan hasil dari perbandingan formulasi pupuk yang digunakan. Semakin tinggi tanaman, semakin banyak helai daun yang dihasilkan dan semakin berat hasil bobot bawang merah maka dapat dikatakan tanaman semakin baik (Rustiawati *et al*., 2021).

3.4.7 Determinasi Tanaman Pasca Panen

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi S1 Universitas Bhamada Slawi. Determinasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya tanaman yang akan diteliti dengan tanaman lain.

3.4.8 Preparasi Sampel

Masing-masing sampel bawang merah dikupas kulitnya, dicuci, dipotong-potong kecil, kemudian ditimbang 500 gram dan dihaluskan menggunakan blender. Selanjutnya sampel disaring menggunakan kertas whattmen hingga dihasilkan filtrat (Hasyin *et al*., 2022).

3.4.9 Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Diambil 0,5 mL sari bawang merah dimasukkan dalam dabung reaksi lalu ditambahkan 2 mg serbuk Mg dan 3 tetes HCl pekat, dikocok dan diamati perubahan warnanya. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning, atau jingga. (Mukhlisa, 2018)

b. Uji Saponin

Diambil sampel 0,5 mL, dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL aquadest dikocok selama 1 menit, lalu ditambahkan 2 tetes HCl 2N. Jika busa terbentuk tetap stabil kurang lebih 7 menit, maka positif mangandung saponin. (Lolaen Ch *et al*., 2013)

c. Uji Tanin

Diambil sampel 0,5 mL lalu dilarutkan dengan 10 mL aquadest, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Selanjutnya filtrat yang diperoleh diambil sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi $FeCl_3$ 1 %. Jika Terbentuk warna biru atau hijau kehitaman menunjukan adanya tanin (Hasibuan *et al*., 2020).

3.4.10 Analisis Spektrofotometri UV-Vis

a. Pembuatan larutan pereaksi

1) Pembuatan reagen $AlCl_3$ 10%, ditimbang 10 mg serbuk $AlCl_3$ kemudian dilarutan dengan aquadest sampai tanda batas 10 mL.
2) Pembuatan CH_3COONa, ditimbang sebanyak 1 gram CH_3COONa kemudian dilarutkan dengan aquadest sampai tanda batas 10 mL (Bachtiar *et al*., 2023).

b. Pembuatan Kurva Baku Standar Kuersetin

Ditimbang 10 mg kuarsetin dicampur dengan 10 mL etanol 96% dalam pembuatan larutan standar kuersetin 1000 ppm. Kemudian dipipet sebanyak 1 mL kemudian dicukupkan volumenya sampai 10 mL dengan mengunakan etanol 96% sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya dibuat beberapa seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Dari masing-masing seri konsentrasi larutan standar kuersetin dipipet 0,2 mL (2 ppm), 0,4 mL (4 ppm), 0,6 mL (6 ppm), 0,8 mL (8 ppm), dan 1 mL (10 ppm). Kemudian masing-masing seri konsentrasi ditambahkan 3 mL etanol 96%, 0,5 mL $AlCl_3$ 10% dan 0,5 mL CH_3COONa, lalu dicukupkan volumenya sampai tanda batas dengan aquadest menggunakan labu ukur 10 mL. Setelah itu, diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum (Bachtiar *et al*., 2023).

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Pada Larutan Standar Kuersetin

Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin dilakukan dengan running larutan kuersetin pada range panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang maksimum tersebut yang akan digunakan untuk mengukur serapan dari sampel (Bachtiar *et al*., 2023).

d. Penetapan Kadar Flavonoid Sari Bawang Merah dengan Spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 0,5 mL (500 µl) sari bawang merah dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan 3 mL etanol 96% 0,5 mL $AlCl_3$ 10%; 0,5 mL CH_3COONa; dan dicukupkan hingga batas tanda menggunakan aquadest. Kemudian, diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Absorbansi ditentukan menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Dimana sampel dibuat dalam tiga replikasi untuk setiap analisis sehingga diperoleh nilai rata-rata absorbansi (Bachtiar *et al*., 2023).

3.5 Analisis Data

Data yang akan diperoleh berupa data kuantitatif. Hasil data pengamatan pertumbuhan tanaman dianalisis menggunakan *one way* ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan, sedangkan analisis kandungan flavonoid dengan metode kurva standar regresi linear dibuat berdasarkan absorbansi dan konsentrasi dengan persamaan regresi linear yaitu y = ax + b. Dimana y adalah absorbansi, a dan b didapatkan dari

pengukuaran absorbansi larutan baku. Berdasarkan seluruh data yang diperoleh dilakukan Uji *One Way* ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Apabila terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Tukey / uji lanjut duncan (Nooraminah *et al*., 2023).