

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan yakni bulan Februari sampai Juni 2025 di Laboratorium Kimia Farmasi dan Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV 2450), kuvet, pisau, blender (Philips), timbangan analitik (HWH DJ 203 A), labu ukur 100 mL (*Pyrex*), labu ukur 50 mL (*Pyrex*), labu ukur 10 mL (*Pyrex*), tabung reaksi (*Pyrex*), rak tabung reaksi, gelas ukur (*Pyrex*), corong kaca (*Pyrex*), beaker glass (*Pyrex*), pipet tetes, mikropipet, batang pengaduk, sendok tanduk, termometer, labu spirtus dan penjepit tabung reaksi.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sayur bayam hijau (*Amaranthus tricolor* L.), kangkung darat (*Merremia hirta* Merr.), sawi hijau (*Brassica juncea* (L.) Czern.), terong ungu (*Solanum melongena* L.), mentimun (*Cucumis sativus* L.), asam askorbat (vitamin C), aquadest bebas CO₂, larutan KMnO₄ 1%, larutan AgNO₃ 1%,

larutan metilen biru, kertas saring *Whatman*, kain flannel dan alumunium foil.

3.3. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu eksperimental untuk mengetahui perbedaan kadar vitamin C yang terkandung dalam sayuran lokal dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

3.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah sayur bayam hijau (*Amaranthus tricolor* L.), kangkung darat (*Merremia hirta* Merr.), sawi hijau (*Brassica juncea* (L.) Czern.), terong ungu (*Solanum melongena* L.), mentimun (*Cucumis sativus* L.).

3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar vitamin C pada sampel.

3.3.3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah lokasi pengambilan sayuran lokal, berat sampel, reaksi warna dan metode spektrofotometri UV-Vis.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas

Bhamada Slawi. Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran tanaman yang akan diteliti serta untuk mencegah kesalahan saat mengumpulkan bahan dan menghindari kemungkinan tercampurnya tanaman yang akan diteliti dengan tanaman lainnya (Klau & Hesturini, 2021).

3.4.2. Penyiapan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sayur bayam hijau (*Amaranthus tricolor* L.), kangkung darat (*Merremia hirta* Merr.), sawi hijau (*Brassica juncea* (L.) Czern.), terong ungu (*Solanum melongena* L.), mentimun (*Cucumis sativus* L.). Sayur bayam hijau diperoleh dari Desa Sidakaton, sayur kangkung darat diperoleh dari Desa Pengarasan, sayur sawi hijau diperoleh dari Desa Dukuhturi, sayur terong ungu diperoleh dari desa Sidapurna dan sayur mentimun diperoleh dari Desa Kepandean Kecamatan Dukuhturi. Semua sampel sayur dicuci bersih dengan air mengalir lalu ditiriskan, setelah itu dipotong kecil-kecil dan ditimbang sebanyak 100 g, ditambahkan aquadest bebas CO₂ sebanyak 50 mL lalu diblender hingga halus kemudian disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan aquadest bebas CO₂ hingga tanda batas dan dihomogenkan (Juliani & Mangunsong, 2023).

3.4.3. Analisis Kualitatif Vitamin C dengan Reaksi Warna

1. Reaksi Warna dengan KMnO_4 1%

Filtrat sampel sayur bayam hijau, kangkung darat, sawi hijau, terong ungu dan mentimun sebanyak 2 mL direaksikan dengan 3 tetes KMnO_4 1%. Keberadaan vitamin C pada sampel ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi coklat (Purwani dkk., 2023).

2. Reaksi Warna dengan AgNO_3 1%

Filtrat sampel sayur bayam hijau, kangkung darat, sawi hijau, terong ungu dan mentimun sebanyak 2 mL direaksikan dengan 3 tetes AgNO_3 1%. Hasil positif yang menandakan adanya vitamin C dalam sampel ditunjukkan oleh warna larutan menjadi hitam dengan endapan hitam (Oktavia dkk., 2023).

3. Reaksi Warna dengan Metilen Biru

Filtrat sampel sayur bayam hijau, kangkung darat, sawi hijau, terong ungu dan mentimun sebanyak 2 mL ditambahkan 4 tetes metilen biru, hangatkan hingga suhu 40°C terjadi warna biru tua dalam waktu 3 menit berubah menjadi lebih muda atau hilang (Aminah dkk., 2019).

3.4.4. Analisis Kuantitatif dengan Spektrofotometri UV-Vis

1. Pembuatan Larutan Induk Vitamin C 1000 ppm

Vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang telah dibungkus alumunium foil kemudian dilarutkan dengan aquadest bebas CO_2 sampai tanda batas

dan dihomogenkan sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm (Muflihunna dkk., 2022).

2. Pembuatan Larutan Kurva Kalibrasi

Larutan vitamin C 1000 ppm dipipet sebesar 0,04 mL, 0,06 mL, 0,08 mL, 0,1 mL, 0,12 mL dan 0,14 mL ke dalam labu ukur 10 mL yang telah dibungkus alumunium foil. Setelah itu ditambahkan aquadest bebas CO₂ hingga tanda batas dan dihomogenkan sehingga didapatkan konsentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm dan 14 ppm (Mulyani, 2018).

3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Vitamin C

Larutan konsentrasi 10 ppm diambil dari larutan kurva kalibrasi kemudian dimasukkan ke dalam kuvet, selanjutnya diukur pada panjang gelombang 200-400 nm dengan menggunakan blanko aquadest. Pada penelitian sebelumnya didapatkan panjang gelombang 265 nm (Dewi, 2018).

4. Pengukuran Larutan Kurva Kalibrasi

Masing-masing larutan kurva kalibrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm dan 14 ppm dimasukkan ke dalam kuvet, lalu diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Setelah itu dibuat kurva kalibrasi dan dihitung persamaan regresi linear dari data yang diperoleh lalu akan didapatkan nilai koefisien korelasi (r) (Dewi, 2018).

5. Penentuan Kadar Vitamin C pada Sayur Bayam Hijau, Kangkung Darat, Sawi Hijau, Terong Ungu dan Mentimun

Larutan sampel dibuat dengan cara sampel dipotong kecil-kecil kemudian dihaluskan dengan blender. Lalu ditimbang sebanyak 50 g dan dilarutkan dengan aquadest bebas CO₂ dalam beaker glass. Setelah itu dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquadest bebas CO₂ hingga tanda batas kemudian dihomogenkan. Lalu larutan sampel disaring menggunakan kertas saring. Larutan sampel yang didapat kemudian dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan aquadest bebas CO₂ hingga tanda batas. Aquadest bebas CO₂ dibuat dengan cara memanaskan aquadest dalam beaker glass yang ditutup aluminium foil sampai mendidih. Penentuan kadar vitamin C pada sampel dilakukan dengan cara larutan sampel dimasukkan kedalam kuvet dan diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang didapat lalu dihitung kadar vitamin C dengan memasukkan nilai absorbansi kedalam persamaan regresi linear (Dewi, 2018). Setiap pengukuran direplikasi sebanyak 3 kali untuk memastikan pengukuran dilakukan secara tepat (Indriyati dkk., 2023).

3.5. Validasi Metode

3.5.1. Akurasi

Akurasi pada penelitian ini dilakukan dengan metode penambahan baku (*standard addition method*). Perbandingan antara

sampel dan baku standar adalah 7:3 dengan rentang 80, 100, dan 120%. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum dan percobaan dilakukan sebanyak 3 kali (Yunita dkk., 2019).

3.5.2. Presisi

Larutan baku seri dengan konsentrasi 10 ppm ditentukan absorbansinya pada λ maksimum. Pengujian dilakukan dengan enam kali pengulangan dan dianalisis pada waktu yang bersamaan untuk mendapatkan keterulangan. Kemudian ditentukan RSD nya (Kurniawati & Lestari, 2024).

3.5.3. Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan bersamaan dengan pembuatan kurva baku pada deret larutan baku seri yang sama, yaitu pada kadar 4, 6, 8, 10, 12 dan 14 ppm. Absorbansi ditentukan dengan menggunakan λ maksimum dan kemudian ditentukan nilai r (Kurniawati & Lestari, 2024).

3.5.4. LOD dan LOQ

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (SD) (Harmita, 2004).

3.6. Analisis Data

Analisis data diperoleh dari data deskriptif yang meliputi pereaksi KMnO_4 1%, pereaksi AgNO_3 1% dan pereaksi metilen biru. Kemudian untuk menganalisis data dari penentuan kadar vitamin C masing-masing sampel sayuran lokal dengan metode spektrofotometri UV-Vis yaitu dengan menggunakan persamaan regresi linear $Y = BX + A$ dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke kurva kalibrasi. Persamaan ini digunakan untuk menghitung kadar vitamin C dalam sampel dimana (Y) menyatakan nilai pengukuran absorbansi dan (X) menyatakan kadar vitamin C dalam sampel (Dewi, 2018). Nilai konsentrasi (X) yang telah didapat kemudian digunakan untuk menghitung persentase kadar dengan rumus (Tjahjani dkk., 2021):

$$\text{Kadar} = \frac{X \times V_s \times \text{FP}}{M_s}$$

Keterangan:

X = konsentrasi sampel (ppm atau mg/L)

V_s = volume sampel (L)

FP = Faktor pengenceran

M_s = massa sampel (g)

Kemudian kadar dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji statistik *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan atau tidak. Data yang diolah dengan *ANOVA* harus memenuhi syarat yaitu memiliki sebaran yang normal dan kesamaan varian yang dapat diperiksa dengan uji distribusi normal dan homogenitas (Handayani dkk., 2021).