**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

* 1. **Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian ini meliputi pengumpulan sampel, pengolahan sampel, pembuatan larutan bahan, pembuatan ekstraksi dengan maserasi,dan penetapan kadar β-karoten dengan menggunakan alat spektrofotometer *Visible*.

**3.1.1 Variabel Penelitian**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak bayam hijau segar, ekstrak bayam hijau rebus, ekstrak bayam merah segar dan ekstrak bayam merah rebus sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah kandungan β-karoten dan kadar β-karoten secara Spektrofotometri *Visible*

**3.1.2 Parameter Penelitian**

Parameter penelitian ini menggunakan uji laboratorium secara Spektrofotometri *Visible* meliputi cara pengolahan sampel, pengujian kandungan β-karoten, pembuatan kurva kalibrasi β-karoten, dan penetapan kadar β-karoten.

* 1. **Jadwal dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai juli 2024 dan dilakukan Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan.

* 1. **Alat dan Bahan**
     1. **Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah standart β-karoten, sampel bayam hijau (*Amaranthus viridis* L.) segar dan rebus, sampel bayam merah *(Amaranthus tricolor* L.*)* segar dan rebus, aquadest, n-heksan p.a (Merck), aseton p.a (Merck), etanol p.a (Merck), petroleun eter p.a (Merck), dan benzene p.a (Merck).

* + 1. **Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Spektofotometer UV-Vis, silika gel 60 F₂₅₄, chamber, neraca analitik, waterbath, alat-alat gelas lainnya.

* 1. **Persiapan Sampel**

**3.4.1 Determinasi Sampel**

Determinasi tumbuhan yang memiliki tujuan untuk memastikan Kebenaran bahan penelitian yang digunakan. Determinasi tumbuhan dilakukan oleh Herbarium Medanense (MEDA) Departemen Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara (USU)

**3.4.2 Pengambilan Sampel**

Bayam hijau *(Amaranthus viridis* L.*)* dan bayam merah *(Amaranthus tricolor* L.*)* Pengambilan sampel dipasar tradisional simpang limun Kota Medan Sumatra Utara.

**3.5 Pengolahan Sampel**

**3.5.1 Pengolahan Sempel Pada Bayam Hijau Segar**

Bayam hijau segar dicuci dengan air mengalir, lalu pisahkan daun dari batangnya, dihaluskan dengan blender tanpa air (Chandra et al., 2017). kemudian diambil 100 gram bayam hijau segar yang telah dihaluskan. Pembuatan ekstrak bayam hijau segar dilakukan dengan maserasi dengan menggunakan penyari n-heksan : aseton : etanol (2:1:1 v/v). Proses ekstraksi berlangsung selama 48 jam (Johar & Mustikaningrum, 2023). Filtrat (maserat) kemudian ditambah dengan 50 mL aquadest dan di ekstraksi menggunakan corong pisah sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas diekstraksi lagi hingga diperoleh filtrat jernih. Lapisan bawah yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan waterbath sampai didapat ekstrak kental (Rejeki et al., 2021) .

**3.5.2 Pengolahan Sampel Pada Bayam Merah Segar**

Bayam merah segar dicuci dengan air mengalir, lalu pisahkan daun dari batangnya, dihaluskan dengan blender tanpa air (Chandra et al., 2017). kemudian diambil 100 gram bayam merah segar yang telah dihaluskan. Pembuatan ekstrak bayam merah segar dilakukan dengan maserasi dengan menggunakan penyari n-heksan : aseton : etanol (2:1:1 v/v). Proses ekstraksi berlangsung selama 48 jam (Johar & Mustikaningrum, 2023). Filtrat (maserat) kemudian ditambah dengan 50 mL aquadest dan di ekstraksi menggunakan corong pisah sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas diekstraksi lagi hingga diperoleh filtrat jernih. Lapisan bawah yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan waterbath sampai didapat ekstrak kental (Rejeki et al., 2021) .

**3.5.3. Pengolahan Sampel Pada Bayam Hijau Rebus**

Bayam hijau segar dicuci dengan air mengalir, lalu pisahkan daun dari batangnya, kemudian direbus dengan air selama 6 menit lalu dihaluskan dengan blender tanpa air (Chandra et al., 2017). kemudian diambil 100 gram bayam hijau rebus yang telah dihaluskan. Pembuatan ekstrak bayam hijau rebus dilakukan dengan maserasi dengan menggunakan penyari n-heksan : aseton : etanol (2:1:1 v/v). Proses ekstraksi berlangsung selama 48 jam (Johar & Mustikaningrum, 2023). Filtrat (maserat) kemudian ditambah dengan 50 mL aquadest dan di ekstraksi menggunakan corong pisah sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas diekstraksi lagi hingga diperoleh filtrat jernih. Lapisan bawah yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan waterbath sampai didapat ekstrak kental (Rejeki et al., 2021) .

**3.5.4. Pengolahan Sampel Pada Bayam Merah Rebus**

Bayam merah segar dicuci dengan air mengalir, lalu pisahkan daun dari batangnya, kemudian direbus dengan air selama 6 menit lalu dihaluskan dengan blender tanpa air (Chandra et al., 2017). kemudian diambil 100 gram bayam merah rebus yang telah dihaluskan. Pembuatan ekstrak bayam merah rebus dilakukan dengan maserasi dengan menggunakan penyari n-heksan : aseton : etanol (2:1:1 v/v). Proses ekstraksi berlangsung selama 48 jam (Johar & Mustikaningrum, 2023). Filtrat (maserat) kemudian ditambah dengan 50 mL aquadest dan di ekstraksi menggunakan corong pisah sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas diekstraksi lagi hingga diperoleh filtrat jernih. Lapisan bawah yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan waterbath sampai didapat ekstrak kental (Rejeki et al., 2021) .

**3.6** **Analisis Kualitatif β-karoten**

Fase gerak yang digunakan adalah petroleum eter : benzen (9:1). Fase diam yang digunakan adalah Silika gel 60 F254. Chamber dijenuhkan dengan fase gerak. Larutan β-karoten murni sebagai pembanding dan larutan sampel ditotolkan bersama-sama pada lempeng KLT dengan jarak 1 cm dari tepi bawah lempeng KLT dan jarak rambat (pada jarak rambat diberi tanda). Setelah lempeng KLT kering dimasukkan ke dalam chamber yang berisi cairan. Larutan fase gerak dalam bejana harus mencapai tepi bawah lapisan penyerap, totolan tidak boleh sampai terendam. Tutup bejana diletakkan pada tempatnya dan sistem fase gerak dibiarkan merambat sampai tanda batas jarak rambat. Lempeng dikeluarkan dan dikeringkan di udara, dan bercak diamati dengan lampu UV 254 nm. Diukur dan dicatat tiap-tiap bercak dari titik penotolan. Nilai Rf kemudian dihitung (Styawan et al., 2019)

**3.7 Penetapan Kadar β-karoten Pada Bayam**

**3.7.1**  **Pembuatan Larutan Induk β-karoten 100 mcg**

Ditimbang 50 mg β-karoten murni ditambahkan dengan etanol dalam labu ukur 50 ml (1000 mcg/mL). Larutan induk 1000 mcg/mL dipipet 10 mL kemudian ditambahkan etanol dalam labu ukur 100 mL (100 mcg/mL) (Agustina et al., 2019).

**3.7.2 Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum (λ max) β-karoten**

Larutan induk β-karoten 100 mcg/mL dipipet 0,6 mL kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL (6 mcg/mL) dan ditambahkan etanol hingga 10 mL. Setelah itu serapan diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 410 - 465 (Agustina et al., 2019).

**3.7.4 Penentuan Kurva Kalibrasi**

Sebanyak 0,4 mL; 0,5 mL; 0,6 mL; 0,8 mL dan 1 mL dipipet dari larutan induk β-karoten 100 mcg/mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya menggunakan etanol hingga 10 mL sehingga didapat konsentrasi 4 mcg/mL, 5 mcg/mL, 6 mcg/mL, 8 mcg/mL, dan 10 mcg/mL (Agustina et al., 2019)..

**3.7.5 Penetapan Kadar β-karoten Pada Sampel Ekstrak Bayam Hijau (*Amaranthus viridis* L.) Berbagai Perlakuan**

Ditimbang 50 mg ekstrak bayam hijau pada masing-masing perlakuan lalu dilarutkan dan diencerkan dengan etanol pada labu ukur 25 mL. Kemudian disaring dan dipipet 1 mL lalu dicukupkan volumenya dengan etanol dalam labu ukur 5 mL. Kemudian serapan diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada λ max dengan etanol sebagai blangko. Kadar β-karoten pada sampel kemudian ditentukan berdasarkan persamaan regresi linier Y=ax+b (Agustina et al., 2019).

**3.7.6 Penetapan Kadar β-karoten Pada Sampel Ekstrak Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.) Berbagai Perlakuan.**

Ditimbang 50 mg ekstrak bayam merah pada masing-masing perlakuan lalu dilarutkan dan diencerkan dengan etanol pada labu ukur 25 mL. Kemudian disaring dan dipipet 0,3 mL lalu dicukupkan volumenya dengan etanol dalam labu ukur 5 mL. Kemudian serapan diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada λ max dengan etanol sebagai blangko. Kadar β-karoten pada sampel kemudian ditentukan berdasarkan persamaan regresi linier Y=ax+b (Agustina et al., 2019).