

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental. Penelitian ini menggunakan sampel bawang hitam jenis tunggal yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%. Hasil ekstraksi yang berupa filtrat kemudian dilakukan pemekatan sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak etanol bawang tunggal hitam yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk uji penentuan aktivitas antioksidan dengan metode *FRAP* (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) menggunakan parameter *FRAP value* dengan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sebagai larutan standar, uji kuantitatif yaitu kadar flavonoid dan fenolik total menggunakan kuarsetin dan asam galat sebagai standar. Selain itu, uji kualitatif yaitu profil senyawa fitokimia (alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, tanin, steroid & triterpenoid).

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

1. Lokasi penelitian

Laboratorium Kimia Farmasi Prodi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu penelitian : Maret-Juli 2021

#### **C. Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bawang putih tunggal (*Solo garlic*) diperoleh dari Desa Adipuro Kecamatan Kaliangkrik, Magelang Jawa Tengah, dengan ketinggian tanah pada lokasi penanaman bawang 1.454 meter di atas permukaan air laut. Pada penelitian ini bawang tunggal hitam diperoleh dari hasil pemanasan bawang putih tunggal pada suhu 40-50°C menggunakan *rice cooker* selama 12 hari.

#### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol bawang tunggal hitam beserta kulit dan tanpa kulit .

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan yang dinyatakan sebagai nilai FRAP *value*.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah suhu dan waktu pemanasan bawang putih menjadi bawang hitam, dan kadar lembab ekstrak etanol bawang tunggal hitam.

#### **E. Definisi Operasional**

1. Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol bawang tunggal hitam yang merupakan hasil pemanasan dari bawang putih (*Allium sativum* L.). Adapun jenis bawang putih yang digunakan adalah bawang putih tunggal (*Solo garlic*) yang diperoleh dari Desa Adipuro Kecamatan Kaliangkrik, Magelang Jawa Tengah.
2. Bawang tunggal hitam dibuat dengan memanaskan bawang putih tunggal pada suhu 40-50°C menggunakan *rice cooker* selama 12 hari.
3. Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam nilai ekivalensi ( $\text{FeSO}_4/\text{mg}$  sampel) ekstrak dengan vitamin C sebagai pembanding.

#### **F. Alat dan Bahan Penelitian**

1. Alat penelitian

- a) Alat yang digunakan dalam proses pembuatan bawang tunggal hitam yaitu timbangan, termometer (Magicst), dan *rice cooker*.
- b) Alat yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak etanol bawang tunggal hitam yaitu blender, batang pengaduk, tempat ekstrak bawang tunggal hitam dan termometer air raksa.

- c) Alat yang digunakan untuk pengujian antioksidan serta penentuan kadar flavonoid dan fenolik yaitu timbangan analitik (Ohaus), peralatan gelas (Iwaki Pyrex), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S-UV-Vis), *stopwatch*, dan vortex (Ohaus) dan *moisturizer balance* (Ohaus).
- d) Alat yang digunakan untuk uji kualitatif profil senyawa fitokimia yaitu peralatan gelas (Iwaki Pyrex), *stopwatch*, dan penangas air.

## 2. Bahan penelitian

- a) Bahan yang digunakan dalam proses pembuatan bawang tunggal hitam yaitu bawang putih tunggal (*Solo garlic*) sebanyak 1 kg.
- b) Bahan yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak yaitu bawang tunggal hitam, etanol 70%, aluminium foil, dan kertas label.
- c) Bahan yang digunakan untuk pengujian antioksidan yaitu ekstrak etanol bawang tunggal hitam, etanol pa 96%, natrium asetat trihidrat, asam asetat pekat, TPTZ (2,4-6-tripyridyl-striazine), asam klorida, klorida heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (*Ferro sulfat heptahidrat*), buffer asetat pH 3,6, vitamin C, akuadest, aluminium foil, kertas label, dan indikator pH. Uji kuantitatif flavonoid dan fenolik total yaitu  $\text{AlCl}_3$ , asam asetat, asam galat, akuadest, aquabidest, kuarsetin, etanol pa 96%, pereaksi folin-ciocalteu, natrium karbonat, , kalium asetat, dan metanol pa.
- d) Bahan yang digunakan untuk uji kualitatif skrining fitokimia yaitu kertas saring, ekstrak etanol bawang hitam beserta kulit dan tanpa kulit, HCl pekat, NaCl, serbuk magnesium, pereaksi wagner, etanol 70%,  $\text{FeCl}_3$ , akuadest, asam sulfat pekat, kloroform, akuadest panas.

## G. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Determinasi sampel bawang putih

Determinasi tanaman bawang putih tunggal (*Solo garlic*) yang diperoleh dari petani di Desa Adipuro Kecamatan Kaliangkrik Magelang, Jawa Tengah dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

## 2. Proses pembuatan sampel bawang hitam.

Sejumlah 1 kg bawang putih tunggal (*Solo garlic*) dipanaskan pada suhu 40-50 °C menggunakan *rice cooker* selama 12 hari.

## 3. Ekstraksi dan kontrol kualitas bawang hitam

### a. Ekstraksi.

Bawang tunggal hitam dibagi menjadi 2 bagian yaitu bawang tunggal hitam beserta kulit (200 gram) dan tanpa kulit (700 gram). Keduanya dihaluskan dengan blender secara terpisah, kemudian dimaserasi dengan etanol 70% menggunakan perbandingan (1:10) selama 24 jam dan terlindung dari cahaya matahari (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Selanjutnya, filtrat disaring dan residunya diremaserasi satu kali menggunakan pelarut yang sama yaitu etanol 70%. Hasil ekstraksi dipekatan dengan penangas air dalam suhu kurang dari 50°C sampai diperoleh ekstrak kental.

### b. Kontrol kualitas ekstrak etanol bawang tunggal hitam

#### 1) Perhitungan nilai rendemen

Perhitungan nilai rendemen ekstrak etanol bawang tunggal hitam dihitung dengan berat ekstrak kental yang dihasilkan dibagi dengan berat sampel awal (berat simplisia) kemudian dikali 100%.

#### 2) Penentuan kadar lembab

Penentuan kadar lembab dalam ekstrak etanol bawang tunggal hitam dilakukan dengan menggunakan alat *moisturizer balance*. 1 gram ekstrak dimasukan kedalam *moisturizer balance* kemudian ditutup, selanjutnya akan diperoleh hasil kadar lembab dalam bentuk persentase.

## 4. Uji kualitatif

### a. Alkaloid

Sejumlah 3 mL ekstrak etanol bawang tunggal hitam dimasukan pada tabung reaksi ditambahkan 5 mL HCl 2 M, kemudian disaring dan filtrat ditambahkan 0,5g NaCl dan disaring kembali. Filtrat yang diperoleh ditambahkan HCl 2 M sebanyak 3 tetes dan pereaksi wagner sebanyak 5

tetes. Sampel dikatakan positif mengandung alkaloid apabila terbentuk endapan (Agustina dkk, 2020).

b. Flavonoid

Sejumlah 2 mL ekstrak etanol bawang tunggal hitam ditambahkan akuadest secukupnya kemudian dipanaskan, ekstrak disaring selanjutnya ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,05 mg dan HCl pekat beberapa tetes sampai terjadi perubahan warna. Sampel dikatakan positif mengandung flavonoid apabila terjadi perubahan warna merah tua atau merah pekat, kuning sampai jingga (Maulida dkk, 2016).

c. Fenolik

Sejumlah 1 mL ekstrak etanol bawang tunggal hitam ditambahkan 2 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$ . Sampel dikatakan positif mengandung fenolik apabila terjadi perubahan warna biru kehitaman (Maulida dkk, 2016).

d. Saponin

Sejumlah 2 mL sampel ekstrak etanol bawang tunggal hitam ditambahkan 10 mL akuadest kemudian dikocok selama 30 detik. Sampel dikatakan positif mengandung saponin apabila terdapat busa yang tidak hilang selama 30 detik (Agustina dkk, 2020).

e. Tanin

Sejumlah 3 mL ekstrak etanol bawang tunggal hitam dipanaskan kemudian ditambahkan 5 tetes NaCl 10% dan disaring. Filtrat ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  5%. Sampel dikatakan positif mengandung tanin apabila terjadi perubahan warna coklat tua (Agustina dkk, 2020).

f. Steroid dan triterpenoid

Ekstrak etanol bawang tunggal hitam dilarutkan dalam kloroform, kemudian disaring, filtrat ditambahkan beberapa tetes asam sulfat pekat sampai terjadi perubahan warna. Sampel dikatakan positif mengandung steroid apabila terdapat warna merah pada lapisan bawah sedangkan triterpenoid apabila terbentuk warna kuning keemasan (Agustina dkk, 2020).

## 5. Uji kuantitatif flavonoid dan fenolik total.

### a. Flavonoid total

Pengujian kadar flavonoid total pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri aluminium klorida yang mengacu pada prosedur Das dkk., (2014) dalam (Ramadhani dkk., 2020).

#### 1) Pembuatan larutan induk dan seri kadar kuarsetin

Ditimbang dengan seksama 10 mg kuarsetin dilarutkan kedalam 10 mL etanol pa 96% homogenkan sampai diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dipipet 2,5 mL larutan induk kuarsetin 1000 ppm dicukupkan volumenya sampai 25 mL dengan etanol pa 96% sampai diperoleh konsentrasi 100 ppm.

Dibuat seri kadar 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm dengan cara dipipet 1, 2, 3, 4 dan 5 mL ke dalam labu takar 5 mL kemudian ditambahkan etanol pa 96% sampai tanda batas atas.

#### 2) Penentuan Panjang gelombang maksimal

Dipipet 1 mL larutan kuarsetin 100 ppm dimasukan ke dalam labu ukur 5 mL tambahkan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5%. Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan scanning dengan range panjang gelombang 400-500 nm.

#### 3) Penentuan *operating time*

Dipipet 1 mL larutan kuarsetin 100 ppm dimasukan ke dalam labu ukur 5 mL tambahkan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5%. Penentuan *operating time* dilakukan pada panjang gelombang 430 nm dengan interval waktu 2 menit selama kurang lebih 30 menit sampai diperoleh absorbansi stabil.

#### 4) Pembuatan kurva standar kuarsetin

Dipipet 1 mL dari masing-masing seri kadar 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm, kemudian ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 1 mL asam asetat 5% didiamkan selama 10 menit. Dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 430 nm.

Penentuan kurva standar kuarsetin dibuat dalam 3 kali pembacaan absorbansi.

5) Pengujian kadar flavonoid total

Dipipet 1 mL larutan ekstrak dengan konsentrasi 8000 ppm, ditambahkan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 1 mL asam asetat 5% didiamkan selama 10 menit. Dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 430 nm. Penentuan kadar flavonoid total dibuat dalam 3 kali pembacaan absorbansi sehingga hasil yang diperoleh sebagai miligram ekuivalen kuarsetin/ gram ekstrak.

b. Fenolik

Pengujian kadar fenolik total pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri folin-ciocalteu yang mengacu pada prosedur Singleton, dkk., (1974) dalam (Sari, 2014).

1) Pembuatan larutan induk dan seri kadar asam galat

Ditimbang dengan seksama 50 mg asam galat dilarutkan ke dalam 5 mL metanol pa sampai diperoleh konsentrasi 1%. Dibuat seri kadar 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm dengan cara dipipet 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; dan 0,5 mL dicukupkan volumenya sampai 5 mL dengan metanol pa.

2) Penentuan panjang gelombang maksimum

Dipipet 0,1 mL larutan asam galat konsentrasi 200 ppm dimasukan ke dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan 1 mL folin-ciocalteu dibiarkan selama 4 menit, tambahkan 1 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% kemudian ditambahkan aquabidest sampai tanda batas atas. Selanjutnya dilakukan scanning panjang gelombang maksimum dengan range panjang gelombang 500-750 nm (Priadi dkk., 2019).

3) Penentuan *operating time*

Dipipet 0,1 mL larutan asam galat konsentrasi 200 ppm dimasukan ke dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan 1 mL folin-ciocalteu dibiarkan selama 4 menit, tambahkan 1 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% kemudian ditambahkan aquabidest sampai tanda batas atas. Selanjutnya penentuan

penentuan *operating time* dilakukan pada panjang gelombang 641 dengan interval waktu 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

4) Pembuatan kurva standar asam galat

Dipipet 0,1 mL dari masing-masing seri kadar asam galat 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm dimasukkan dalam labu ukur 5 mL, tambahkan dengan 1 mL folin-ciocalteu dibiarkan selama 4 menit, tambahkan 1 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% kemudian ditambahkan aquabidest sampai tanda batas atas. Larutan didiamkan selama 2 jam kemudian dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 641 nm. Pembuatan kurva standar asam galat dilakukan 3 kali pembacaan absorbansi.

5) Pengujian kadar fenolik total

Dipipet 0,1 mL larutan ekstrak etanol bawang tunggal hitam konsentrasi 2% ditambahkan dengan 0,1 mL pereaksi folin-Ciocalteu, didiamkan selama 4 menit kemudian ditambahkan 1 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% dan ditambahkan aquabidest sampai tanda batas atas, didiamkan selama 2 jam. Dilakukan pembacaan absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 641 nm. Pengujian kadar flavonoid total dibuat dalam 3 kali pembacaan absorbansi untuk setiap analisis sampel.

6. Uji aktivitas antioksidan dengan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

a. Pembuatan larutan reagen FRAP (Safitri dkk., 2020)

1) Buffer Asetat PH 3,6

Sebanyak 3,7 mL natrium asetat trihidrat ditambahkan dengan 46,3 mL asam asetat pekat kemudian dilarutkan dengan akuadest sampai 100 mL dalam labu ukur.

2) Larutan 2,4,6-tripyridyl-striazine (TPTZ)

Sebanyak 31 mg TPTZ dilarutkan dalam 10 mL HCl 40 mmol/L dalam labu takar 10 mL.

3) Larutan  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Sebanyak 32,44 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam 10 mL larutan buffer asetat pada labu ukur 10 mL.



#### 4) Pembuatan reagen FRAP

Dicampurkan bahan dengan perbandingan 10:1:1 yaitu 25 mL buffer asetat, 2,5 mL larutan TPTZ dan 2,5 mL larutan  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dihomogenkan. Reagen FRAP diencerkan 10 kali dengan cara memipet 1 mL reagen FRAP ditambahkan akuadest sampai 10 mL.

#### 5) Pembuatan larutan induk dan seri kadar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Ditimbang 25 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dengan akuadest dalam labu ukur 25 mL sampai diperoleh konsentrasi 1000 ppm. dibuat larutan seri kadar  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm dengan cara dipipet 1, 2, 3, 4, dan 5 mL dicukupkan dengan akuadest dalam labu ukur 5 mL sampai tanda batas atas.

#### 6) Penentuan panjang gelombang maksimal.

Dipipet 1 mL larutan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dengan konsentrasi 1000 ppm, ditambahkan 3 mL reagen FRAP dilakukan scanning panjang gelombang maksimal menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan range panjang gelombang 580-610 nm.

#### 7) Penentuan *operating time*

Dipipet 1 mL larutan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dengan konsentrasi 1000 ppm, ditambahkan 3 mL reagen FRAP dilakukan penentuan *operating time* menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 595 nm dengan interval waktu 5 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Samosir dkk., 2012).

#### 8) Penentuan aktivitas antioksidan vitamin C

Ditimbang 1 mg vitamin C dilarutkan dengan etanol pa 96% dalam labu ukur 10 mL sampai diperoleh konsentrasi 100 ppm. Dibuat seri kadar vitamin C 18, 26, dan 34 ppm dengan cara dipipet; 0,9 ; 1,3 ; dan 1,7 mL dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan dengan etanol pa 96% sampai tanda batas atas.

Penentuan aktivitas antioksidan vitamin C dilakukan dengan cara dipipet 1 mL dari masing-masing seri kadar vitamin C, ditambahkan reagen FRAP sebanyak 3 mL kemudian didiamkan selama 30 menit.

Dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 595 nm. Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dalam 3 kali pembacaan absorbansi dan hasilnya dinyatakan dalam mmol Fe<sup>2+</sup>/mg sampel.

9) Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak etanol bawang tunggal hitam

Dibuat larutan induk sampel konsentrasi 1000 ppm dengan ditimbang kedua ekstrak 5 mg dilarutkan dalam etanol pa 96% labu ukur 5 mL. Dibuat seri kadar untuk kedua ekstrak 150 ppm, 175 ppm, dan 200 ppm dengan cara dipipet 0,75 ; 0,875; dan 1 mL ditambahkan dengan etanol pa 96% pada labu takar 5 mL sampai tanda batas atas.

Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak etanol bawang tunggal hitam dilakukan dengan cara dipipet 1 mL dari masing-masing seri kadar 150 ; 175 ; dan 200 ppm kemudian ditambahkan dengan reagen FRAP sebanyak 3 mL, didiamkan selama 30 menit. Dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 595 nm. Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak etanol bawang tunggal hitam dilakukan dalam 3 kali pembacaan absorbansi dan mmol Fe<sup>2+</sup>/mg sampel.

## H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Metode pengolahan dan analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan:

1. Nilai rendemen ekstrak.

Nilai rendemen dapat diperoleh dengan cara berat ekstrak kental yang dihasilkan dibagi dengan berat sampel awal (berat simplisia) kemudian dikali 100%.

2. Flavonoid dan fenolik total.

Dilakukan dengan menggunakan persamaan regresi linear, dimana kuarsetin sebagai pembanding flavonoid dan asam galat sebagai pembanding fenolik.

3. Penentuan aktivitas antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan menghitung data absorbansi pada kedua ekstrak dan vitamin C sebagai pembanding. Penentuan

aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan larutan baku standar  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sehingga didapatkan kurva kalibrasi regresi linear yang digunakan untuk menghitung konsentrasi,  $y = bx + a$ , dimana (y) sebagai absorbansi dari masing-masing sampel, dan (x) sebagai konsentrasi yang akan dicari. Setelah didapatkan konsentrasi selanjutnya dilakukan perhitungan FRAP *value*, dimana semakin tinggi nilai FRAP *value* maka kapasitas sampel untuk mereduksi  $\text{Fe}^{3+}$  menjadi  $\text{Fe}^{2+}$  akan semakin meningkat sehingga aktivitas antioksidan dari sampel akan semakin kuat. Perhitungan FRAP *value* dilakukan dengan menggunakan persamaan:

$$\text{FRAP value: } \frac{C \times V \times fp}{\text{Bobot sampel}}$$

Keterangan:

C : konsentrasi sampel atau nilai x (mg/L)

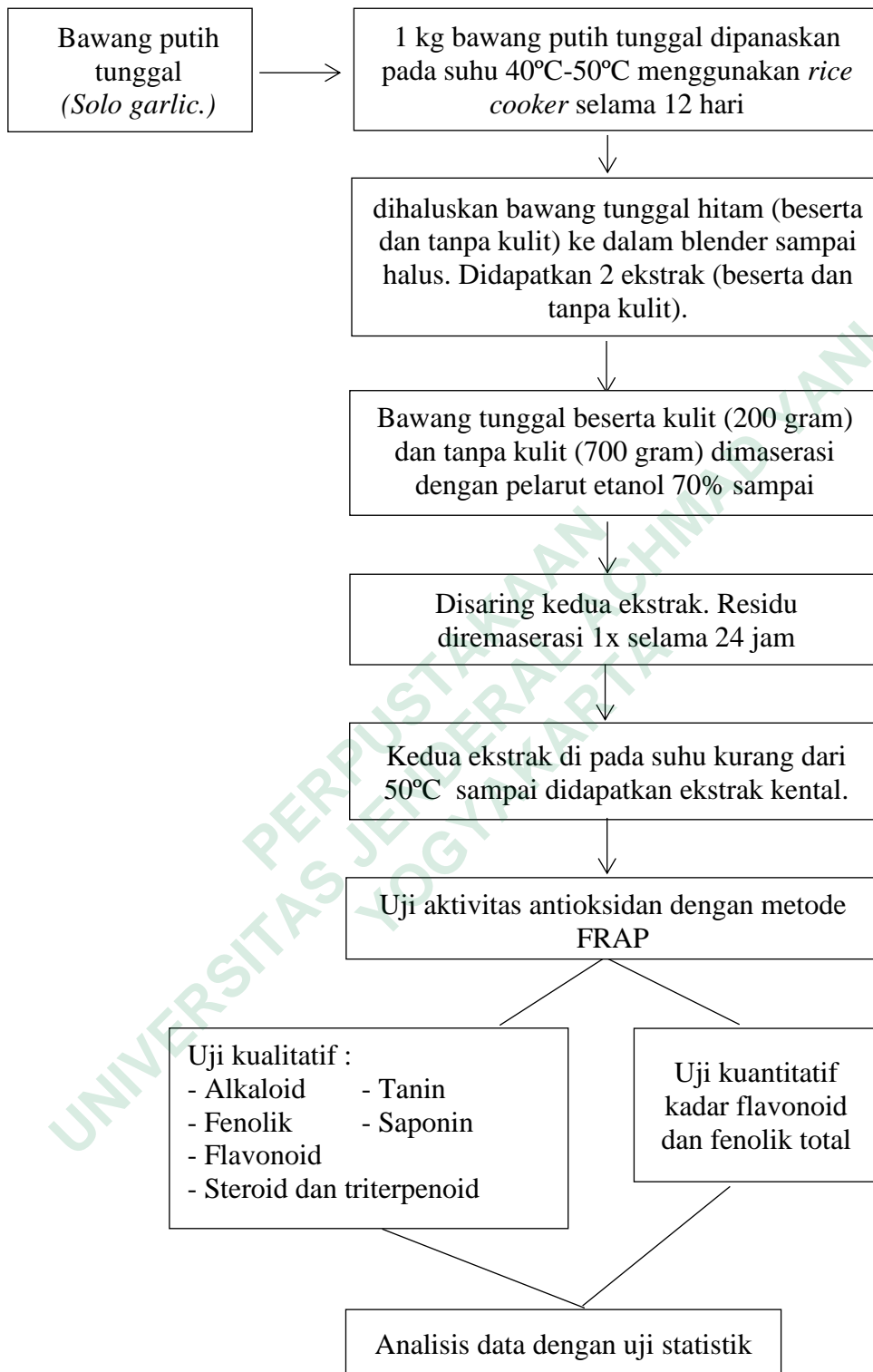
V : volume cuplikan yang digunakan (mL)

Fp : faktor pengenceran

Berat sampel : berat sampel yang digunakan (mg)

#### 4. Uji Statistik

Seluruh data yang diperoleh dari penelitian akan dikumpulkan kemudian analisis secara statistik untuk mengetahui apakah aktivitas antioksidan antara sampel berbeda signifikan atau tidak dengan menggunakan IBM SPSS *statistics* versi 28.0. Sebelum diuji analisis yang dilakukan terlebih dahulu dilakukan uji homogenitas dan distribusi data. Uji homogenitas dilakukan dengan uji Levene's, sedangkan uji distribusi data dilakukan menggunakan uji Shapiro-Wilk. Jika data homogen dan terdistribusi normal ditandai dengan nilai signifikansinya  $>0,05$  maka dilanjutkan analisis menggunakan uji *One Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95% (Kim dkk., 2016). Uji *One Way Anova*, dikatakan signifikan apabila nilai signifikansinya  $<0,05$  maka dilanjutkan dengan uji post hoc tests, tetapi jika nilai signifikansinya  $>0,05$  maka tidak ada perbedaan yang signifikan antara sampel. Selanjutnya dilakukan uji post hoc tests dengan menggunakan uji LSD (*Least Significance Different*).



**Gambar 7. Skema Pelaksanaan Penelitian**