

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan profil fitokimia bawang putih dibandingkan dengan bawang hitam. Selanjutnya, ekstrak etanol bawang hitam dilakukan analisis antioksidan dengan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) dengan parameter FRAP *value* dan pengujian fitokimia (alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, tannin, steroid & triterpenoid) secara kualitatif.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Laboratorium Bahan Alam dan Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2021 - Agustus 2021

C. Subjek Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian adalah bawang putih yang berasal dari Desa Kaliangrik Kabupaten Magelang, Jawa Tengah dengan ketinggian 1.700 mdpl yang berada di kaki Gunung Sumbing. Bawang putih ini kemudian diolah menjadi bawang hitam. Sebelumnya bawang putih dibagi menjadi dua kelompok yakni bawang putih dengan pemanasan dan bawang putih dengan tanpa pemanasan. Bawang putih dengan pemanasan dilakukan pemanasan selama 12 hari pada suhu 50°C sehingga akan terbentuk bawang hitam yang selanjutnya dilakukan pembuatan ekstrak etanol dari bawang putih dan bawang hitam dengan metode maserasi dengan pelarut etanol teknis 70% dan dilakukan remaserasi sebanyak 1 kali. Hasil ekstraksi kemudian disaring dan dipisahkan dengan penangas air selama 24 jam pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak bawang putih tunggal.

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah profil senyawa fitokimia, 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, pelarut etanol 70%.

E. Definisi Operasional

1. Bawang putih tunggal diperoleh dari petani di Desa Kaliangrik Kabupaten Magelang, Jawa Tengah dengan ketinggian 1.700 mdpl yang berada di kaki Gunung Sumbing.
2. Jenis bawang hitam yang digunakan adalah bawang putih tunggal.
3. Bawang hitam dibuat dengan cara pemanasan menggunakan *rice cooker* selama 12 hari pada suhu 50°C.
4. Parameter antioksidan yang digunakan adalah FRAP *value*, nilai FRAP *value* kemampuan sampel untuk mereduksi ion besi Fe³⁺ menjadi ion besi Fe²⁺ oleh elektron donor dalam sampel.

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian

- a. Alat yang digunakan dalam pembuatan bawang hitam yaitu timbangan analitik (OHAUS SW version 10S), kompor listrik, *rice cooker*, kulkas, dan penangas.
- b. Alat yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak etanol bawang hitam yaitu blender, erlenmeyer, dan peralatan gelas.
- c. Alat-alat untuk uji fitokimia yaitu stopwatch, penangas air, peralatan gelas.

- d. Alat-alat untuk uji antioksidan yaitu timbangan analitik (OHAUS SW version 10S), kuvet, spektrofotometer UV-Vis (10S UV-VIS), vortex, dan peralatan gelas.

2. Bahan penelitian

- a. Bahan yang digunakan dalam pembuatan bawang hitam yaitu bawang putih tunggal 500 gram tanpa pemanasan dan 700 gram dengan pemanasan.
- b. Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstraksi sampel yaitu etanol teknis 70%
- c. Bahan yang digunakan untuk skrining fitokimia yaitu kertas saring, kertas label, alumunium foil, ekstrak etanol bawang putih dan bawang hitam, HCl pekat, NaCl, wagner, etanol pa 96%, etanol teknis 70%, metanol pa 96%, FeCl_3 5%, akuades, kloroform, asam sulfat pekat, akuades panas.
- d. Bahan yang digunakan untuk pengujian antioksidan yaitu etanol teknis 70%, natrium asetat trihidrat, asam asetat, TPTZ (*2,4,6-trpydril-striazine*) (sigma aldrich), HCl pekat, asam sulfat pekat, kloroform, vitamin C, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (KGaA) dan ekstrak etanol bawang hitam dan bawang putih.

F. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi bawang putih tunggal yang diperoleh dari petani di Magelang, dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
2. Pengolahan dan pembuatan sampel
Disiapkan 1 kg bawang putih lalu dibagi menjadi 2 bagian, 700 gram untuk dipanaskan ke dalam *rice cooker* dengan suhu 50°C selama 12 hari (sampai bawang berubah menjadi hitam) dan 500 gram dilakukan tanpa pemanasan.
3. Ekstraksi sampel
Bawang putih tunggal dan bawang hitam tunggal dihaluskan dalam mesin blender secara terpisah, kemudian dilakukan ekstraksi bawang dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol teknis 70% dengan perbandingan (1:10) sampai ekstrak semua terendam selama 24 jam dan terlindung dari cahaya matahari. Selanjutnya, hasil ekstraksi disaring dan residunya diremaserasi satu kali dengan pelarut yang sama yaitu etanol 70% sampai semua ekstrak terendam merata. Hasil ekstraksi (esktrak) kemudian dipekatkan diatas

penangas pada suhu 50°C sampai menjadi ekstrak kental lalu didapatkan ekstrak bawang, kemudian dihitung rendemen (dengan cara membandingkan ekstrak kasar bawang hitam yang diperoleh / berat sampel yang digunakan x 100%).

4. Uji fitokimia

a. Uji kualitatif (Agustina et al., 2020).

1) Flavonoid

Dilakukan dengan cara diuapkan ekstrak bawang hitam sebanyak 3 mg, selanjutnya dilarutkan dalam 20 mL etanol lalu dilakukan penyaringan. Hasil filtrat yang diperoleh ditambahkan 0,5 mL HCl pekat dan serbuk magnesium dan dipanaskan dengan penangas air. Jika terjadi perubahan warna merah, maka menunjukkan hasil positif adanya kandungan flavonoid.

2) Fenolik

Ditimbang sebanyak 0,1 gram sampel dilarutkan dalam 20 mL methanol pa 96%, kemudian diambil 1 mL larutan masukan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 2 tetes pereaksi FeCl_3 5%. Sampel mengandung fenolik apabila terbentuk warna hijau kebiruan-kehitaman.

3) Tanin

Ditimbang ekstrak bawang hitam sebanyak 3 mg diekstraksi dengan aquades panas dan selanjutnya didinginkan. Setelah sampel dingin ditambahkan 5 tetes NaCl 10% kemudian disaring. Hasil filtrat yang diperoleh ditambahkan FeCl_3 5%. Jika terbentuk endapan berwarna cokelat tua maka menunjukkan adanya tanin.

4) Alkaloid

Dilakukan dengan menggunakan uji Wagner yaitu ekstrak bawang hitam ditimbang sebanyak 3 mg diletakkan pada cawan porselin lalu ditambahkan 5 mL HCl 2 M kemudian diaduk homogen lalu didinginkan pada suhu ruangan. Setelah sampel dingin, ditambahkan

0,5 gr NaCl kemudian diaduk sampai homogen lalu disaring. Hasil filtrat yang diperoleh ditambahkan HCl 2 M sebanyak 3 tetes dan 5 tetes pereaksi Wagner. Jika terbentuk endapan coklat, maka hasil menunjukkan adanya alkaloid.

5) Saponin

Sampel ekstrak bawang hitam ditimbang sebanyak 2 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL akuades dan dikocok selama 30 detik. Apabila terdapat busa yang tidak hilang selama 30 detik maka menunjukkan adanya saponin (atau positif mengandung saponin).

6) Steroid dan triterpenoid

Ekstrak bawang hitam dilarutkan dalam kloroform disaring dan hasil filtratnya digunakan untuk pengujian. Larutan ditambahkan beberapa tetes asam sulfat pekat dan diamati perubahan warnanya. Apabila terbentuk hijau kebiruan di lapisan bawah maka mengandung steroid dan apabila terbentuk cincin kecoklatan menunjukkan adanya senyawa triterpenoid (Ladeska et al., 2020).

5. Uji aktivitas antioksidan dengan metode metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (Setiawan dkk., 2018).

a. Pembuatan larutan FRAP

Disiapkan buffer fosfat pH 3,6 sebanyak 50 mL, TPTZ 15,5 mg kemudian dilarutkan dalam HCl encer ad 5 mL, selanjutnya ditimbang $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 16,22 mg yang dilarutkan dalam buffer sampai tanda batas labu ukur 5 mL. Kemudian di campurkan ketiga larutan. Untuk membuat reagen FRAP yaitu dengan menyiapkan buffer fosfat 10 mL, TPTZ 1 mL, FeCl_3 1 mL kemudian dimasukkan dalam wadah yang dibalut dengan aluminium foil. Selanjutnya diambil 1 mL lalu dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml kemudian ditambahkan akuades ad 10 mL (dalam pengenceran 10 x) (Samosir et al., 2012).

b. Pembuatan standar kurva baku FeSO_4

Dilakukan dengan cara menimbang FeSO_4 sebanyak 25 mg dalam etanol 25 mL labu ukur. Dibuat larutan seri konsentrasi 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm dengan cara memipetkan larutan FeSO_4 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, dan 5 mL selanjutnya dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL. Dipipet masing-masing konsentrasi sebanyak 1 mL ditambahkan 3 mL reagen FRAP dan etanol pa 96% sampai tanda batas labu takar 5 mL (Samosir *et al.*, 2012).

c. Penyiapan larutan induk vitamin C 100 ppm (pembanding)

Dilakukan dengan cara menimbang vitamin C sebanyak 2 mg kemudian dilarutkan dalam etanol pa 96% dimasukkan pada labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan sampai tandai batas.

d. Penyiapan larutan standar kerja vitamin C

Dibuat seri konsentrasi vitamin C dengan masing-masing konsentrasi 10 ppm, 18 ppm, dan 26 ppm dengan cara memipetkan larutan vitamin C sebanyak 500 μL , 900 μL , dan 1300 μL . Dipipet masing-masing konsentrasi sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL ditambahkan 3 mL reagen FRAP dan etanol pa 96% sampai tanda batas (Novi, 2020).

e. Penyiapan sampel

Larutan stok sampel ditimbang dengan seksama ekstrak bawang hitam sebanyak 10 mg dalam 10 ml etanol pa 96% sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.

f. Penentuan panjang gelombang maksimal

Diambil sebanyak 3 mL larutan FRAP dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas. Kemudian serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 500-800 nm hingga diperoleh panjang gelombang maksimal.

g. Penentuan *operating time* sampel

Diambil sebanyak 20 μL larutan stok sampel kemudian ditambahkan 3 ml larutan pereaksi FRAP lalu ditambahkan kedalam labu ukur 5 ml dan dihomogenkan dengan magnetik stirer selama 1 menit dan diukur absorbansinya setiap 1 menit pada panjang gelombang maksimum 595 nm. *Operating time* ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang stabil pada menit tertentu.

h. Aktivitas antioksidan sampel ekstrak etanol bawang hitam dan bawang putih dengan metode FRAP

Dibuat larutan sampel dengan 3 seri konsentrasi yang berbeda yakni 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm. Dipipet sebanyak 500 μL , 1000 μL , dan 1500 μL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan ad etanol sampai tanda batas. Masing-masing konsentrasi sampel diambil cuplikan sebanyak 1 mL tambahkan 3 mL larutan FRAP dicukupkan 5 mL dengan etanol pa 96% sampai homogen dan didiamkan selama waktu yang telah didapatkan berdasarkan hasil *operating time* pada suhu ruangan, kemudian diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari hasil panjang gelombang maksimal.

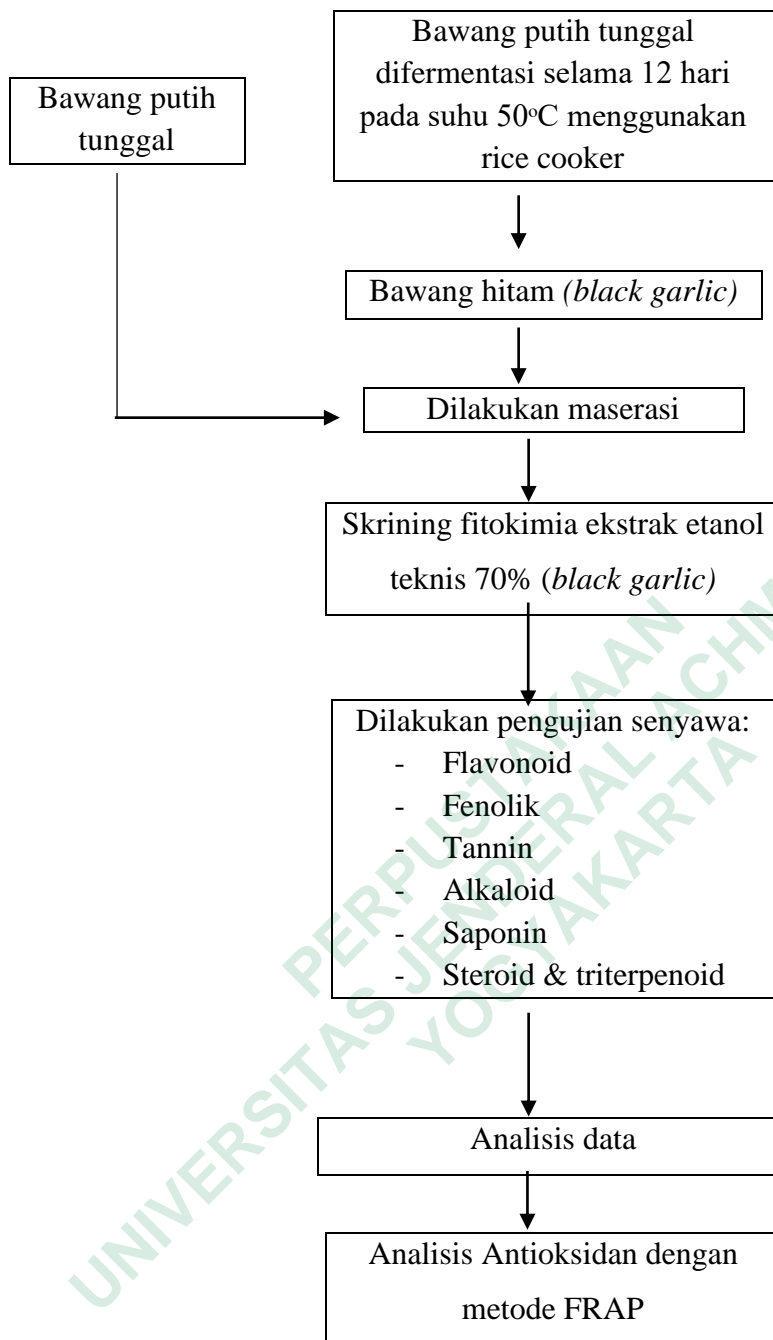
G. Metode Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menghitung nilai rendemen ekstrak untuk membandingkan berat ekstrak kasar terhadap berat sampel yang digunakan kemudian dikali 100%. Hasil pengujian aktivitas antioksidan dihitung dari data absorbansi pada masing-masing ekstrak dan pembanding. Pembanding yang digunakan yaitu vitamin C. Selanjutnya dilakukan perhitungan parameter FRAP *value* dengan menggunakan persamaan regresi linear pada FeSO_4 sebagai standar yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ekstrak (x) dengan persen (%) aktivitas antioksidan (y) $y = bx + a$. y merupakan sumbu dari nilai absorbansi. Setelah didapatkan konsentrasi maka dihitung nilai FRAP *value* dengan rumus:

$$\frac{C \times V \times fp}{\text{berat awal sampel}}$$

Nilai C merupakan konsentrasi, V sebagai volume yang digunakan, fp sebagai faktor pengenceran berat awal sampel dimana FRAP *value* nya semakin besar maka antioksidannya semakin tinggi, dimana sampel menunjukkan mampu mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} sehingga semakin bagus (baik) aktivitas antioksidannya.

Selanjutnya seluruh data yang sudah diperoleh dari penelitian dikumpulkan dan dianalisis secara statistik untuk mengetahui apakah aktivitas antioksidan antara kedua ekstrak bawang putih dan bawang hitam terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak. Selanjutnya data aktivitas antioksidan akan diproses dengan menggunakan SPSS. Terlebih dahulu dilakukan uji distribusi data dan homogenitas. Uji distribusi data dilakukan menggunakan uji Shapiro-Wilk. Sedangkan untuk uji homogenitas menggunakan uji Leven's. Kesimpulannya apabila data tidak terdistribusi secara normal maka dilakukan pengujian dengan Mann Whitney, apabila data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95%. Bila signifikansinya $p < 0,05$ artinya terdapat perbedaan yang signifikan antara dua kelompok, namun apabila $p > 0,05$ tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara dua kelompok (Agustina et al., 2020).



Gambar 6. Skema Jalannya Penelitian