

BAB III METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium dengan 3 perbedaan waktu karamelisasi pada sampel yaitu 10 hari, 12 hari, dan 14 hari. Penelitian ini menggunakan ekstrak bawang hitam yang diperoleh dengan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96% yang selanjutnya akan dilakukan skrining fitokimia dan pengujian aktivitas antioksidan dengan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Variabel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol bawang hitam, senyawa alkaloid, senyawa flavanoid, senyawa tanin, senyawa saponin, senyawa steroid/terpenoid, nilai IC₅₀ dan penentuan potensi antioksidan.

B. Subjek Penelitian

Subjek dari penelitian ini merupakan bawang putih tunggal (*Allium sativum* L. var. solo) yang telah dikaramelisasi menjadi bawang hitam.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Jurusan Farmasi Poltekkes Tanjungkarang pada Laboratorium Kimia Farmasi untuk dilakukan proses ekstraksi dan skrining fitokimia serta Laboratorium Jurusan Botani Universitas Lampung untuk dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Januari-Mei 2025.

D. Pengumpulan Data

1. Cara Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan mengidentifikasi bawang putih. Bawang putih yang digunakan berjenis bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.var.solo). Kemudian dilakukan karamelisasi pada suhu 64-68°C dengan variasi waktu yang berbeda. Setelah itu, diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Filtrat hasil ekstraksi selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* dan dikentalkan menggunakan *waterbath*. Setelah diperoleh ekstrak yang kental, dilakukan identifikasi organoleptis lalu dilanjutkan dengan skrining fitokimia yang meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid/terpenoid. Setelah itu, ekstrak akan dibuat menjadi larutan sampel yang dilarutkan menggunakan etanol *pro analysis* untuk diuji aktivitas antioksidan.

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya *rice cooker Yong Ma MC-2360*, *mini chopper Vanstar V-100*, neraca analitik *Mettler Toledo AE 200*, inkubator *Natural Incubator ICN55 Argolab*, spektrofotometer *Double Beam UV-VIS Spectrophotometer Shimadzu UV-1800*, *rotary evaporator BUCHI Rotavapor R-100 with Cold Trap*, batang pengaduk, *kuvet*, aluminium foil, penangas air, spatula, kertas saring, bulb, *Griffin Heated Waterbath BJI-400-110F*, rak tabung reaksi, tabung reaksi, corong gelas, plat tetes, kaca arloji, botol kaca gelap, pipet tetes, pipet ukur (1,0 mL, 2,0 mL, 3,0 mL, 4,0 mL dan 5,0 mL), beaker glass (100 mL, 250 mL, 1000 mL), erlenmeyer (250 mL), labu ukur (10 mL, 50 mL, dan 100 mL), cawan porselen (100 mL), gelas ukur (10 mL dan 100 mL).

a. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bawang hitam, etanol 96%, etanol *pro analysis*, pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, pereaksi Dragendrof, pereaksi asam klorida (HCl) pekat, serbuk magnesium (Mg), aquadest, pereaksi besi (III) klorida (FeCl₃), pereaksi asam klorida (HCl) 2N, pereaksi asam asetat (CH₃COOH), pereaksi amil alkohol (C₅H₁₂O), asam sulfat (H₂SO₄) pekat, kuersetin, kristal DPPH.

3. Prosedur Kerja Penelitian

a. Pembuatan Bawang Hitam (*Black Garlic*)

- 1) Diletakan tatakan panas ke dalam *rice cooker*
- 2) Dimasukan bawang putih tunggal kedalam wadah *rice cooker*
- 3) Dihubungkan *rice cooker* dengan sumber arus listrik

- 4) Dimasukan wadah *rice cooker* yang berisi bawang putih tunggal kedalam *rice cooker* lalu ditutup dan hidupkan *rice cooker* untuk proses pemanasan
- 5) Dilakukan variasi waktu pemanasan yaitu 10 hari, 12 hari, dan 14 hari pada bawang putih tunggal

b. Ekstraksi Bawang Hitam

(Marjoni, 2016:41-42) menyatakan bahwa prosedur berikut dapat digunakan dalam ekstraksi menggunakan metode maserasi:

- 1) Dihaluskan dan ditimbang bawang hitam menggunakan neraca analitik
- 2) Ditambahkan pelarut etanol 96% (1:7) kemudian ditutup menggunakan *aluminium foil* selama 3 hari pada wadah yang terlindung dari cahaya
 - a. Bawang hitam pemanasan 10 hari sebanyak 195 gram direndam dengan 1365 mL pelarut etanol 96%
 - b. Bawang hitam pemanasan 12 hari sebanyak 166 gram direndam dengan 1162 mL pelarut etanol 96%
 - c. Bawang hitam pemanasan 14 hari sebanyak 199 gram direndam dengan 1393 mL pelarut etanol 96%
- 3) Selama proses maserasi, dilakukan pengadukan berulang. Lakukan selama ± 5 menit setiap satu kali pengadukan
- 4) Setelah waktu perendaman selesai, maserat difiltrasi untuk menghasilkan filtrat
- 5) Selanjutnya maserat digunakan untuk remaserasi (1:3) selama 2 hari
 - a. Bawang hitam pemanasan 10 hari direndam dengan 585 mL pelarut etanol 96%
 - b. Bawang hitam pemanasan 12 hari direndam dengan 498 mL pelarut etanol 96%
 - c. Bawang hitam pemanasan 14 hari direndam dengan 597 mL pelarut etanol 96%
- 6) Lakukan selama ± 5 menit setiap satu kali pengadukan. Setelah remaserasi selesai, maserat difiltrasi untuk menghasilkan filtrat lalu satukan dengan hasil filtrat sebelumnya
- 7) Kemudian filtrat dipekatkan dengan cara menguapkan didalam *rotary evaporator* dalam suhu 50°C. Selanjutnya dilakukan pengentalan menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C
- 8) Ekstrak yang diperoleh dimasukan kedalam wadah ekstrak kemudian ditimbang

9) Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

d. Skrining Fitokimia Alkaloid

1) Uji Alkaloid

- a) Diambil ekstrak bawang hitam sebanyak 1 mL
- b) Ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL aquadest
- c) Kemudian dipanaskan di atas penangas air dalam waktu dua menit setelah itu didinginkan. Filtrat dipakai dalam pengujian sebagai berikut:
 - Diambil 3 tetes filtrat, kemudian tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer sehingga menghasilkan endapan putih/kuning
 - Diambil 3 tetes filtrat, kemudian tambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat sehingga menghasilkan endapan coklat hingga hitam
 - Diambil 3 tetes filtrat, kemudian tambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof sehingga menghasilkan endapan merah bata
- d) Jika terbentuk endapan pada setidaknya dua atau tiga dari pengujian tersebut, maka sampel dapat dikatakan positif mengandung alkaloid

2) Uji Tanin

- a) Diambil ekstrak bawang hitam sebanyak 1 mL kemudian diencerkan menggunakan aquadest hingga tidak berwarna
- b) Hasil pengenceran ini diambil 2 mL, lalu ditambahkan 1-2 tetes FeCl_3
- c) Jika terbentuk warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin

3) Uji Saponin

- a) Diambil ekstrak bawang hitam sebanyak 1 mL dimasukkan ke tabung reaksi lalu tambahkan 10 mL aquadest panas dan dikocok kuat dalam waktu 10 detik, terbentuk buih/busa tidak kurang dari 10 menit dengan tinggi 1 hingga 10 cm.
- b) Ditambahkan 1 tetes HCL 2N
- c) Jika pada saat ditambahkan HCL 2N buih tidak hilang maka sampel positif mengandung saponin

4) Uji Steroid/Triterpenoid

- a) Diambil ekstrak bawang hitam sebanyak 1 mL kedalam cawan porselen kemudian diuapkan
- b) Ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan ditambahkan 1 tetes $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{p})$
- c) Jika terbentuk warna merah atau ungu menunjukkan kandungan terpenoid dan warna hijau atau biru menunjukkan positif steroid

5) Uji Flavonoid

- a) Ekstrak bawang hitam sebanyak 10 mL ditambahkan dengan 100 mL aquadest kemudian disaring
- b) Diambil sebanyak 5 mL filtrat kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium, 1 mL $\text{HCL}(\text{p})$, 2 mL amil alkohol, kocok dan dibiarkan memisah
- c) Flavonoid positif jika menghasilkan warna merah, kuning, atau jingga di lapisan amil alkohol

e. Uji Antioksidan

Berdasarkan (Kiromah, Husein, Rahayu, 2021:63) dan (Pindan; dkk, 2021:24), pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yaitu sebagai berikut:

1) Pembuatan Larutan DPPH 0,25 mM

- a) Ditimbang kristal DPPH sebanyak 0,0098 gram atau 9,8582 mg
- b) Ditambahkan etanol *pro analysis* hingga 100 ml.
- c) Dilarutkan kristal DPPH dengan menggunakan etanol *pro analysis* lalu dihomogenkan larutan dan simpan larutan dalam botol gelap.

2) Pembuatan larutan sampel

- a. Ditimbang ekstrak etanol bawang hitam sebanyak 40 mg.
- b. Dilarutkan dengan pelarut etanol *pro analysis* hingga 20 ml.
- c. Dihomogenkan dan letakkan dalam botol gelap.
- d. Dibuat larutan dengan variasi konsentrasi masing-masing 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm.

3) Pembuatan Larutan Blanko

- a. Dimasukan 1-2 ml etanol *pro analysis* kedalam botol

4) Pembuatan Larutan Kontrol

- a. Diambil larutan DPPH sebanyak 1 mL

- b. Ditambahkan etanol *pro analysis* sebanyak 4 mL
 - c. Diinkubasi selama 30 menit
 - d. Diukur serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-600 nm
- 5) Pembuatan Larutan Kuersetin
- a) Ditimbang kuersetin sebanyak 2,5 mg
 - b) Dilarutkan dengan etanol *pro analysis* hingga 50 ml, homogenkan
 - c) Dibuat larutan dengan variasi konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm
- 6) Penentuan Aktivitas Antioksidan
- a) Dipipet 4 ml dari masing masing konsentrasi ekstrak bawang hitam (20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm) dan larutan kuersetin (1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm)
 - b) Ditambahkan 1 mL larutan DPPH
 - c) Diinkubasi selama 30 menit didalam inkubator
 - d) Diamati perubahan warna yang terjadi setelah dilakukan proses inkubasi.
 - e) Diukur nilai serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (516 nm).
 - f) Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

E. Pengolahan dan Analisis Data

Aktivitas antioksidan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data dianalisis menggunakan persamaan regresi linier. Nilai IC₅₀ atau konsentrasi yang menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH adalah parameter yang umum dipakai untuk menginterpretasikan hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (Sukma dkk, 2022:30). Data % inhibisi pengujian diperlukan untuk menentukan nilai IC₅₀. Rumus yang dapat digunakan untuk menentukan % inhibisi (Putri dan Mahfur, 2023:7) sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

Keterangan:

Absorbansi Blanko : Absorbansi yang tidak mengandung sampel

Absorbansi Sampel : Absorbansi yang mengandung sampel

(Surya dan Rahayu, 2020:3)

Tabel 3.1 Potensi antioksidan metode *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH)

Intensitas Kekuatan Antioksidan	Nilai IC50
Sangat Kuat	<50 µg/mL
Kuat	50-100 µg/mL
Sedang	101-150 µg/mL
Lemah	>150 µg/mL

Untuk menghitung nilai IC50 sebagai aktivitas antioksidan diperlukan persamaan regresi linier yang mengkaitkan konsentrasi ekstrak dengan % inhibisi. Koefisien korelasi (R^2) dengan nilai >0,75-0,99 digolongkan berkorelasi sangat kuat (Hidayah dan Anggarani, 2022:128). Rumus perhitungan regresi linier sebagai berikut:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

$y = 50$

x = konsentrasi larutan