

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

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

Penelitian dilakukan dengan metode experimental. Penelitian yang dilakukan dengan ekstrak kulit dan umbi bawang bombay serta menentukan kadar flavonoid total dan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

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

##### 1. Lokasi Penelitian

- a. Lokasi Determinasi dibuktikan di Laboratorium Ekologi dan Diosistematika Fakultas Sains dan Matematika Departemen Biologi Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Lokasi pembuatan ekstrak kulit dan umbi bawang bombay (*Allium cepa* L.) dan metabolit sekunder dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Lokasi penelitian pengujian aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo.

##### 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni – Agustus 2022

### **C. Populasi dan Sampel**

Populasi dan sampel pada penelitian ini adalah bawang bombay (*Allium cepa* L.) yang diperoleh dari petani di daerah Bandungan, Kabupaten Semarang, dan sampel penelitian yang digunakan yaitu kulit dan umbi bawang bombay.

### **D. Variabel Penelitian**

#### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang dipengaruhi oleh variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah kulit dan umbi bawang bombay (*Allium cepa* L.).

#### 2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung merupakan variabel yang mencangkup hipotesis penelitian dan keragamannya dipengaruhi oleh variabel bebas. Kadar flavonoid pada ekstrak kulit dan umbi bawang bombay dengan konsentrasi yang digunakan 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm. Aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit dan umbi bawang bombay konsentrasi yang digunakan 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm.

#### 3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali penelitian ini adalah kualitas bahan-bahan yang digunakan, alat yang digunakan, dan suhu.

#### 4. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Data Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Metode/Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
	Bebas				
1.	Ekstrak Umbi bawang bombay	Ekstrak kental yang sebelumnya telah mengalami proses penguapan dan sudah tidak mengandung cairan pelarut.	Metode Maserasi, penguapan dengan alat rotary evaporator dan waterbat	%	Nominal
2.	Ekstrak Kulit bawang bombay			%	Nominal
	Tergantung				
1.	Kandungan flavonoid	Banyaknya senyawa flavonoid yang terkandung didalam ekstrak kulit dan umbi bawang bombay	Spektrofotometer UV-Vis	mg QE/gr	Nominal
2.	% inhibisi	Kemampuan senyawa antioksidan dalam sampel untuk menangkap radikal bebas pada konsentrasi larutan uji	Spektrofotometer UV-Vis	%	Nominal
3.	IC <sub>50</sub>	Konsentrasi yang dapat merendam 50% radikal bebas DPPH.	Spektrofotometer UV-Vis	ppm	Nominal

## 5. Alat dan Bahan Penelitian

### 1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu timbangan analitik, ayakan, kertas saring, failus, blender, cawan, oven, tanur, tabung reaksi, penangas air, beaker glass, labu ukur, pipet tetes, pipet volume, spatula, batang pengaduk, mikropipet, vacuum rotary evaporator, pompa vakum, corong Buchner, moisture balance, dan spektrofotometer UV-Vis

### 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu kulit bawang bombay, umbi bawang bombay, etanol p.a, etanol 96%, pereaksi mayer, pereaksi dragendoff, aquadest, asam asetat, aluminium klorida ( $AlCl_3$ ), Alumunium foil, Magnesium (Mg), asam klorida (HCL),  $FeCl_3$ ,  $H_2SO_4$ , kuersetin, DPPH.

## 6. Prosedur Penelitian

### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Ekologi Dan Diosistemika Fakultas Sains dan Matematika Departemen Biologi Universitas Diponegoro Semarang. Determinasi dilakukan untuk mendapatkan kebenaran identitas dengan jelas dari tanaman Bawang Bombay (*Allium cepa* L.)

### 2. Pembuatan simplisia dan Ekstrak Bawang Bombay (*Allium cepa* L.)

#### a. Pembuatan Simplisia Kulit dan Umbi Bawang Bombay (*Allium cepa* L.)

Sampel bawang Bombay diperoleh dari petani bawang bombay Kecamatan Bandungan, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Bawang Bombay dikupas dipisahkan dengan kulitnya. Kemudian kulit dan umbi bawang bombay dibersihkan dengan cara mencuci menggunakan air bersih, pada bagian umbi bawang bombay dipotong tipis-tipis memanjang dengan lebar 0,5-1cm. selanjutnya kulit dan umbi bawang bombay dilakukan pengeringan dengan cara di angin-anginkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung dan ditutup kain hitam, pada proses pengeringan umbi bawang bombay dibutuhkan waktu selama 2-3 hari dan pengeringan dengan oven selama 3 hari. Selanjutnya kulit dan umbi bawang bombay di blender terpisah serta diayak menggunakan ayakan 40 mesh untuk proses penyerbukan (Amalia & Anggarani, 2022).

### 3. Pembuatan Ekstrak Kulit dan Umbi Bawang Bombay (*Allium cepa* L.)

Pembuatan ekstrak kulit dan umbi bawang bombay (*Allium cepa* L.) dilakukan dengan metode maserasi, menimbang 500 gram serbuk simplisia umbi bawang bombay dan 500 gram serbuk simplisia kulit bawang bombay kemudian dilakukan maserasi. Proses pertama serbuk simplisia umbi dan kulit bawang bombay masing-masing dicampur dengan pelarut etanol 96%, di diamkan selama 5 hari lalu disaring menggunakan kertas saring, setelah itu di remaserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 2 hari dan disaring menggunakan kertas saring. Hasil dari maserasi tersebut diuapkan dari sisa pelarutnya menggunakan vacuum rotary evaporator dengan suhu 60°C sehingga didapatkan ekstrak kental (Pakekong *et al.*, 2016).

### 4. Perhitungan Rendemen

Hasil rendemen ekstrak dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak pekat (g)}}{\text{bobot sampel yang diekstrak (g)}} \times 100\%$$

#### a. Pengujian Kadar Air

Pengujian kadar air dikerjakan dengan menggunakan alat moisture balance. Sebanyak 3 gram sampel bawang bombay dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup dengan suhu 110°C selama 10 menit (Amalia & Anggarani, 2022).

b. Pengujian Kadar Abu

Pengujian kadar abu dengan menimbang 3 gram serbuk kulit dan umbi bawang bombay dimasukkan ke dalam cawan porselin untuk pengabuan. Cawan dan sampel diabukan dalam tanur selama 3 jam pada suhu 600°C. Cawan dan sampel yang sudah menjadi abu ditimbang untuk menghitung kadar abu (Amalia & Anggarani, 2022).

Perhitungan kadar abu dengan cara pengabuan kering :

$$\text{Kadar Abu \%} = \frac{\text{berat abu (gr)}}{\text{berat sampel (gr)}} \times 100\%$$

Diketahui :

Berat abu = berat cawan dan sampel setelah pengeringan – berat cawan kosong.

Berat sampel = berat cawan dan sampel sebelum pengeringan – berat cawan kosong.

c. Pengujian Bebas Etanol

Pengujian bebas etanol dilakukan untuk membebaskan ekstrak dari etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi. Pengujian ini dilakukan dengan mereaksikan kalium dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) dengan etanol dalam suasana asam. Jika larutan tidak mengandung etanol maka akan terbentuk warna campuran asli dari larutan ekstrak dan larutan kalium dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) dan ditambahkan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ), jika hasil larutan

mengandung etanol maka larutan akan terbentuk warna biru (Riswana A.P. *et al.*, 2022).

d. Uji Fitokimia

Tahap uji fitokimia meliputi uji alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, tannin, kuinon, steroid dan triterpenoid. Berikut pengujiannya :

a) Uji Alkaloid

Uji alkaloid dengan menimbang sampel sebanyak 0,5 gram, kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml aquadest, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat digunakan untuk uji alkaloid. Diambil 2 tabung reaksi dimasukkan 0,5ml filtrat. Tabung pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, tabung kedua ditambah pereaksi Dragendorff. Terbentuk endapan kuning pada pereaksi Mayer dan endapan merah bata pada pereaksi dragendroff (Hasibuan *et al.*, 2020).

a) Uji Fenolik

Uji fenolik dilakukan dengan penambahan 10 tetes FeCl 1% pada 0,5gr sampel bawang bombay. Terbentuknya warna hijau atau biru pekat menandakan adanya senyawa fenolik (Amalia & Anggarani, 2022).

b) Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan 3 mL etanol 70% ke dalam 0,5 gr sampel kulit dan umbi bawang bombay kemudian dipanaskan dalam penangas dan disaring. Filtrat yang diperoleh



ditambahkan dengan 0,1gram Mg dan 2 tetes HCl 6N. Terbentuknya warna merah menandakan adanya senyawa flavonoid (Amalia & Anggarani, 2022).

c) Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gr sampel kulit dan umbi bawang bombay dididihkan dalam 10 mL air dengan menggunakan penangas air, kemudian dikocok dan didiamkan beberapa saat. Terbentuknya busa yang stabil menandakan adanya kandungan saponin (Amalia & Anggarani, 2022).

d) Uji Tannin

Diambil sampel sebanyak 0,5 gram lalu dilarutkan dengan 10 ml aqudest, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Selanjutnya filtrat yang diperoleh diambil sebanyak 2 ml kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi FeCl<sub>3</sub> 1 %. Jika Terbentuk warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Hasibuan *et al.*, 2020).

e) Uji Kuinon

Uji kuinon dilakukan dengan mendidihkan 1 mL sampel bawang bombay dengan 10 mL aquades dalam penangas air lalu disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah dengan 3 tetes NaOH 1N. Uji positif kuinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning hingga merah (Amalia & Anggarani, 2022).

f) Uji Triterpenoid

Sampel bawang bombay sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 10 tetes  $\text{CH}_3\text{COOH}$  anhidrat dan 2 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Jika terbentuk warna merah, ungu, jingga atau kuning, maka terdapat senyawa triterpenoid dalam sampel (Amalia & Anggarani, 2022).

e. Uji Kuantitatif Penentuan Kadar Flavonoid Total dengan Spektrofotometri Uv-Vis

1. Pembuatan Reagen

a. Pembuatan larutan  $\text{AlCl}_3$  10%

Massa  $\text{AlCl}_3$  : 1 gram

Volume aquadest : 10ml

Sebanyak 1 gram  $\text{AlCl}_3$  padatan dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 10 ml

b. Pembuatan larutan Asam asetat 5%

Massa Asam asetat : 0,5 gram

Volume aquadest : 10 ml

Sebanyak 0,5 gram asam asetat dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian dilarutkan dengan aquadest hingga volume larutan mencapai 10ml

c. Penentuan Standar Induk Kuersetin (1000ppm)

Menimbang serbuk kuersetin sebanyak 0,025 gr dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga volume 25 mL.

2. Penentuan Panjang gelombang maksimum pada larutan standar kuersetin

Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 ml, tambahkan, 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, dan 8 mL asam asetat pada masing-masing konsentrasi. Pembacaan dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis pada Panjang gelombang 350-450 nm (Das *et al.*, 2014).

### 3. Penentuan Operating Time

Larutan kuersetin 80 ppm diambil sebanyak 1 mL kemudian dilakukan penambahan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, dan 8 mL asam asetat. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit dan dilakukan selama 30 menit. (Suharyanto & Prima, 2020).

### 4. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan seri kadar menggunakan kuersetin dengan konsentrasi 1000 ppm sebagai baku standar. Dibuat seri kadar 40, 60, 80, 100, 120 ppm. Ambil 1mL larutan seri kadar masing-masing konsentrasi, direaksikan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, dan 8 mL asam asetat 5% pada masing-masing konsentrasi dan didiamkan selama waktu operating time, pembacaan absorbansi seri kadar dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. (Alifni *et al.*, 2017).

### 5. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak

Larutan ekstrak 1000ppm diambil 1ml, ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5% didiamkan selama waktu operating time. Dilakukan pembacaan absorbansi pada Panjang gelombang maksimum.

Perhitungan penentuan kadar flavonoid total dilihat dari deret konsentrasi kurva baku kuersetin yang didapat dari hasil absorbansi yang kemudian dihitung dengan regresi linier. Pengulangan 3x replikasi didapat absorbansinya, dihitung rata-rata absorbansi sampel  $\pm$  SD (Alifni *et al.*, 2017).

#### 6. Pembuatan DPPH

Pembuatan DPPH (0,04 mM )

##### a. Penimbangan

Molaritas DPPH yang dibutuhkan 0,04mM =  $4 \cdot 10^{-4}$  M

BM DPPH = 394,32 g/mol

Volume larutan = 100 ml = 0,1 liter

Penimbangan

DPPH = BM DPPH x Vol larutan x Molaritas

DPPH = 394,32 g/mol x 0,1L x  $4 \cdot 10^{-4}$  M

=  $15,8 \times 10^{-3}$  g

= 15,8 mg

b. Cara pembuatan larutan DPPH Ditimbang seksama serbuk DPPH sebanyak 15,8 mg, dimasukkan dalam labu takar 100 ml, dilarutkan dengan etanol p.a sampai tepat 100 ml gojog homogen sehingga didapatkan konsentrasi 0,04 mM (Alifni *et al.*, 2017).

#### 7. Pengujian DPPH

##### a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Sebanyak 4 mL larutan DPPH 0,04 mM ditambahkan dengan 1mL etanol p.a, dihomogenkan dalam tabung reaksi dan dibiarkan selama 30 menit pada ruangan gelap. Setelah itu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer Uv-Vis Panjang gelombang 400-600 nm (Alifni *et al.*, 2017).

b. Penentuan Operating Time DPPH

Larutan DPPH 0,04 mM sebanyak 4 mL ditambahkan larutan kuersetin 3 ppm sampai tanda batas pada labu ukur 10 mL. larutan tersebut diukur absorbansinya pada Panjang gelombang maksimum yang waktu interval 5 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil dan tidak terlihat adanya penurunan absorbansi (Alifni *et al.*, 2017).

c. Pembuatan Larutan Kuersetin Sebagai Pembanding

Larutan seri kadar dibuat dengan menggunakan kuersetin sebagai baku standar dengan kadar 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Sebanyak 4 mL larutan standar 0,04 mM tambahkan larutan standar kuersetin sampai tanda batas pada labu ukur 10 mL, kemudian didiamkan ditempat gelap selama operating yang diperoleh.

d. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit dan Umbi Bawang Bombay

Ekstrak kental yang dilarutkan dengan etanol p.a dibuat dengan lima variasi konsentrasi yaitu 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Dari masing-masing konsentrasi diambil 2 mL dan ditambahkan 4 mL larutan

DPPH 0,04 mM. kemudian dilakukan inkubasi pada larutan sampel selama 30 menit pada suhu 37°C di ruangan gelap (Amalia & Anggarani, 2022).

Nilai absorbansi yang digunakan untuk menghitung persen inhibisi (%I) menggunakan persamaan berikut :

$$\%I = \frac{A_k - A_s}{A_k} \times 100 \%$$

Keterangan :

$A_k$  = Absorbansi kontrol (methanol dan DPPH).

$A_s$  = Absorbansi sampel (sampel dan DPPH).

Kemudian dibuat kurva kalibrasi antara nilai persen inhibisi dan konsentrasi sampel untuk mendapatkan persamaan garis linear yang nantinya dipakai dalam perhitungan nilai IC<sub>50</sub> dari ekstrak umbi dan kulit bawang bombay (Amalia & Anggarani, 2022).

## 7. Analisis Data

Dari hasil pengukuran absorbansi kadar flavonoid dan antioksidan pada ekstrak kulit dan umbi bawang bombay secara spektrofotometri UV-Vis, hasil tersebut dianalisis data menggunakan persamaan regresi linier kemudian di analisa secara statistik menggunakan aplikasi SPSS vs.25 uji statistik *Independent Sample T Test* untuk mengetahui perbedaan signifikan kandungan flavonoid total ekstrak etanol 96% pada kulit dan umbi bawang bombay dan uji

*Oneway ANOVA* untuk mengetahui perbedaan signifikan antioksidan ekstrak etanol 96% kulit dan umbi bawang bombay dibandingkan dengan kuersetin.