

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian laboratorium, penelitian ini dilakukan untuk menentukan kadar tanin dan aktivitas antioksidan ekstrak umbi bawang bombai (*Allium cepa* L.) berdasarkan nilai IC_{50} dengan menggunakan metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH).

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan ekstrak umbi bawang bombai dilakukan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo
3. Uji aktivitas antioksidan dan penetapan kadar tanin ekstrak umbi bawang bombai dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo

C. Subjek Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bawang bombai yang diperoleh dari daerah Tanggulanom, Kecamatan Selopampang, Kabupaten Temanggung, Jawa Tengah.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini meliputi :

1. Ekstrak umbi bawang bombai

Ekstrak umbi bawang bombai diperoleh dari proses ekstraksi dengan maserasi serbuk simplisia umbi bawang bombai dalam etanol 96% yang kemudian dilakukan pemekatan ekstrak menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu 50°C.

2. Pengujian kadar tanin dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak umbi bawang bombai (*Allium cepa L.*) dengan variasi konsentrasi tertentu. Uji aktivitas antioksidan menggunakan konsentrasi 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm, sedangkan pada analisis penetapan kadar tanin menggunakan konsentrasi 1500 ppm.

2. Variabel Terikat

Variabel yang ada di dalam hipotesis penelitian dan keragamannya di pengaruhi oleh variabel lain. Variabel terikat pada penelitian ini adalah :

- a. Nilai IC_{50} dari ekstrak umbi bawang bombai yang menyatakan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH.
- b. Kategori aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} dari ekstrak umbi bawang bombai.
- c. Kadar tanin pada ekstrak etanol umbi bawang bombai.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah cahaya, *operating time*, panjang gelombang, suhu pada saat pemekatan dan penguapan ekstrak dengan suhu 50°C, suhu pengujian kadar tanin dan aktivitas antioksidan pada suhu 20 sampai 25°C

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya ayakan mesh 60, batang pengaduk, blender (Philips), botol timbang, botol vial, cawan krus, cawan porselin, corong kaca (Herma), gelas beker (Iwaki), gelas ukur (Iwaki), kuvet, labu ukur (Iwaki), *moisture balanc* (Ohaus), neraca analitik, penangas air, pipet ukur 1 ml (Iwaki), pipet ukur 2 ml (Iwaki), pipet ukur 10 ml (Iwaki), pipet tetes, rak tabung reaksi, *rotary evaporator* (RE100-Pro), spatula, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), toples kaca, tabung reaksi (Iwaki) dan *muffle furnace* (Thermolyne).

2. Bahan

Umbi bawang bombai yang diperoleh dari daerah kabupaten Temanggung, asam tanat, aquabidest, etanol 96% , etanol p.a, reagen folin cioucalteau, FeCl, Na₂CO₃ jenuh, kuersetin dan serbuk DPPH.

G. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tanaman umbi bawang bombai (*Allium cepa* L.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran dan keaslian dari tanaman umbi bawang bombai dengan tujuan untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan utama untuk penelitian.

2. Pembuatan Simplisia Umbi Bawang Bombai

Umbi bawang bombai di peroleh dari desa Tanggulanom, Temanggung, Jawa Tengah. Setelah bahan terkumpul dilakukan sortasi basah dengan cara memisahkan umbi bawang bombai dari pengotor dan bahan asing lainnya. Selanjutnya umbi bawang bombai dicuci/dibersihkan dengan air bersih yang mengalir untuk kemudian dilakukan perajangan tipis-tipis memanjang dengan lebar 0,5 – 1 cm. Pengeringan umbi bawang bombai dilakukan dengan cara dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam. Pengeringan dilakukan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama Setelah

simplisia kering, kemudian disortasi untuk membuang bagian-bagian yang tidak dapat dibersihkan pada saat sortasi sebelumnya. Simplisia yang sudah disortasi kering kemudian dilakukan proses penghalusan. Simplisia yang sudah kering dihaluskan menggunakan *blender*. Pengayakan serbuk simplisia dilakukan menggunakan ayakan mesh 60 berdasarkan penelitian oleh (Anggarani & Amalia, 2022).

3. Pembuatan Ekstrak Etanol Umbi Bawang Bombai

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode maserasi berdasarkan penelitian (Anggarani & Amalia, 2022) yaitu serbuk simplisia umbi bawang bombai dimaserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 200 gram serbuk umbi bawang bombai dimaserasi dengan 2000 mL etanol 96% selama 3 hari dan di remaserasi selama 2 hari dengan etanol 96% sebanyak 1000 mL di suhu ruang terlindung dari cahaya dan sesekali di aduk (Oematan, 2015). Selanjutnya disaring untuk memisahkan filtrat dan residu maserat. Filtrat yang didapat diuapkan dengan *rotary evaporator* dan *water bath* pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental umbi bawang bombai (Wendersteyt *et al.*,2021).

4. Penetapan Parameter Standarisasi Simplisia

a. Parameter Non Spesifik

1) Penetapan Kadar Air

Pengujian kadar air dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Sebanyak 1 gram sampel bawang bombai

dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup dengan suhu 110°C selama 5 menit (Anggarani & Amalia, 2022).

2) Penetapan Kadar Abu

Kadar abu diuji dengan menimbang 2 gram serbuk bawang bombai kemudian dimasukkan ke dalam cawan porselin untuk pengabuan. Cawan dan sampel diabukan dalam tanur selama 3 jam pada suhu 550°C. Cawan dan sampel yang sudah menjadi abu ditimbang untuk menghitung kadar (Anggarani & Amalia, 2022).

b. Parameter Spesifik

1) Pemeriksaan Organoleptik

Pemeriksaan organoleptik dilakukan dengan tujuan memberikan pengenalan awal serbuk simplisia dan ekstrak umbi bawang bombai secara objektif berupa bentuk, warna, bau dan rasa (Depkes RI, 2000).

2) Uji Tanin

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 FeCl₃. Jika Terbentuk warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Hasibuan *et al.*, 2020)

5. Penentuan Kadar Tanin Total

a. Pembuatan larutan standar asam tanat 1000 ppm

Asam tanat ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan aquadest dalam gelas kimia. Selanjutnya dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambah aquadest sampai tanda batas. Larutan tersebut dijadikan sebagai larutan induk 1000 ppm, dari larutan tersebut dibuat larutan standar dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25 dan 30 ppm (Pratama *et al.*, 2019).

b. Pembuatan reagen folin-ciocalteu

Larutan folin-ciocalteu diambil sebanyak 1,0 ml. Larutan ini kemudian ditambahkan aquadest hingga volume 10,0 ml dan dicampur hingga homogen (Agustina *et al.*, 2014)

c. Pembuatan larutan Na_2CO_3 jenuh

Pembuatan larutan Na_2CO_3 jenuh dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 7,5 gram Na_2CO_3 kemudian dilarutkan dengan aquadest dalam gelas kimia dan dipanaskan pada suhu 60°C . Larutan Na_2CO_3 yang sudah larut sempurna dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL (Pratama *et al.*, 2019)

d. Penetapan panjang gelombang serapan maksimum

Larutan baku asam tanat dengan konsentrasi 25 ppm diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang yang menunjukkan nilai serapan tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum (Agustina *et al.*, 2014).

e. Penentuan *operating time*

Larutan asam tanat 25 ppm diambil sebanyak 1 ml, ditambahkan dengan 1 ml reagen folin-ciocalteu (1:10), kemudian digojog dan didiamkan selama 3 menit. Larutan tersebut kemudian ditambahkan dengan Na_2CO_3 jenuh sebanyak 1, diukur absorbansi larutan dalam waktu 30 menit pada panjang gelombang 716 nm.

f. Pengukuran larutan standar asam tanat

Larutan standar dari masing-masing konsentrasi 10, 15, 20, 25 dan 30 ppm diambil sebanyak 1 ml selanjutnya dicampur dengan 1 ml reagen folin-ciocalteu. Campuran dibiarkan selama 3 menit kemudian ditambah dengan Na_2CO_3 jenuh sebanyak 1 mL dan diletakkan di tempat yang tidak terkena cahaya.

Setelah itu, dilakukan pengukuran dengan spektrofotometri sinar tampak pada panjang gelombang maksimal. Hasil pembacaan serapan yang diperoleh digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi standar terhadap konsentrasi dari larutan standar asam tanat (Pratama *et al.*, 2019).

g. Analisis kadar tanin

Sebanyak 30 mg ekstrak etanol umbi bawang bombai ditimbang dan dilarutkan dengan aquabidest sampai 10 ml dan diperoleh konsentrasi 3000 ppm, dilakukan pengenceran kembali dengan memipet 5 mL larutan 3000 ppm ke dalam labu 10 mL hingga diperoleh konsentrasi sebesar 1500 ppm dan dibuat replikasi

sebanyak 3 kali. Masing-masing dari replikasi dipipet sebanyak 1 ml ditambahkan 1 mL pereaksi folin-ciocalteu, kemudian ditambahkan 1,0 ml larutan Na_2CO_3 jenuh kemudian dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimal (Pratama *et al.*, 2019).

6. Pengujian Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH 40 ppm

Ditimbang 6 mg serbuk DPPH, diencerkan dengan etanol p.a dalam labu ukur 150 mL, dibuat dengan konsentrasi 40 ppm (Artanti *et al.*, 2018)

b. Skrining panjang gelombang maksimal

Larutan DPPH 40 ppm lalu dibiarkan 30 menit, diukur pada spektrofotometri uv-vis, sehingga diperoleh panjang gelombang maksimal dan nilai absorbansinya (Artanti *et al.*, 2018).

c. Penentuan *operating time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan larutan DPPH 40 ppm, diukur absorbansi larutan dalam waktu 30 menit pada panjang gelombang 517 nm.

d. Uji aktivitasn antioksidan

Larutan kontrol positif : kuersetin ditimbang sebanyak 1 mg di masukkan ke dalam labu 10 ml didapatkan larutan induk 100 ppm dan diencerkan hingga diperoleh larutan seri 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm.

Larutan sampel uji berupa ekstrak umbi bawang bombai dibuat larutan induk 1000 ppm dengan cara melarutkan 25 mg ekstrak ke

dalam 25 ml labu ukur dan diencerkan hingga diperoleh larutan seri 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm.

e. Pengukuran absorbansi sampel

Masing-masing larutan uji dipipet 2 mL, ditambahkan 2 mL DPPH 40 ppm diukur serapannya pada panjang gelombang optimumnya. Setiap konsentrasi dilakukan replikasi 3x (Artanti *et al.*, 2018).

G. Analisis Data

Untuk menentukan kadar tanin dan aktivitas antioksidan ekstrak umbi bawang bombai hasil pengujian yakni data seri konsentrasi yang dibuat dari hasil baku pembandingan tanin dan aktivitas antioksidan, lalu dihitung persamaan kurva baku. Persamaan kurva baku $y = bx + a$, dimana y = absorbansi dalam nm, x = kadar dalam ppm (mg/L). Absorbansi ekstrak umbi bawang bombai yang dihasilkan kemudian dimasukkan ke persamaan kurva baku sehingga diperoleh kadar tanin dan aktivitas antioksidan umbi bawang bombai

