

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental. Penelitian ini melihat pengaruh lama pemanasan bawang hitam terhadap kadar fenolik total dan aktivitas antibakteri *Escherichia coli*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Universitas Ngudi Waluyo Semarang.

- a. Pembuatan ekstrak dilakukan di laboratorium bahan alam
- b. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di laboratorium mikrobiologi.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2025

C. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) yang berasal dari Mertoyudan, Kabupaten Magelang.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bawang hitam yang difermentasikan selama 7 hari, 14 hari dan 21 hari.

D. Definisi operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional1
1.	Bawang hitam	Bawang hitam adalah bawang putih (<i>Allium sativum</i> L.) segar yang telah melalui proses fermentasi alami selama 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Setelah itu dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari dan apabila sudah kering bawang hitam diblender sampai menjadi serbuk halus
2.	Ekstrak bawang hitam	Ekstrak bawang hitam diperoleh dengan menggunakan metode ekstraksi panas yaitu metode sokletasi. Serbuk dimasukan ke tabung soklet dan dimasukkan etanol 70% dengan perbandingan serbuk dengan pelarut 1:10. Proses ekstraksi dilakukan dengan suhu 70°C sampai tetesan siklus menjadi jernih.
3.	Kadar fenolik total	Uji kadar fenolik total bawang hitam menggunakan metode Folin-Ciocalteau dan diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
4.	Uji aktivitas antibakteri	Uji aktivitas antibakteri ekstrak bawang hitam terhadap <i>Escherichia coli</i> menggunakan metode difusi cakram dan hasilnya berupa zona hambat.
5.	Zona hambat	Zona hambat merupakan daerah bening di sekeliling cakram dari media pertumbuhan bakteri yang tidak ditumbuhi oleh bakteri.

E. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini menggunakan ekstrak bawang hitam dengan variasi lama pemanasan 7 hari, 14 hari, dan 21 hari, serta konsentrasi ekstrak 25%, 50%, 75%.

2. Variabel terikat

Kadar senyawa fenolik total ekstrak bawang hitam (*Allium sativum* L) dan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dengan variasi lama fermentasi.

3. Variabel terkontrol

Bawang hitam (*Allium sativum* L), cara pembuatan ekstrak, pelarut yang digunakan, media pertumbuhan, suhu inkubasi, lama inkubasi, metode pengujian antibakteri.

F. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah magicom, tabung soklet, waterbath, Blender elektrik, kertas saring, timbangan elektrik, gelas beker, rotatory evaporator, labu alas bulat, termometer, corong, spatula, pengaduk kaca, kertas label dan plastik wrap, inkubator, bunsen, jarum ose, pipet tetes, cawan petri, botol vial, autoklaf, LAF (*Laminar Air Flow*), Mikropipet, tube, erlenmeyer, gelas arloji, gelas ukur, spektrofotometer Uv-Vis, rak tabung reaksi, tabung reaksi.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bawang lanang, etanol 70%, aquades, etanol p.a, Folin-Ciocalteu (Merck), Na₂CO₃, (Merck), asam galat (Merck), bakteri *Escherichia coli*, media Nutrien Agar (NA), aquades, Kloramfenikol, DMSO (dimetil sulfoksida), H₂SO₄ pekat, NaCl 0,9%, alkohol 95%, safranin, kloroform, amonia, dragendorff, mayer, wagner, magnesium, HCl pekat, FeCl₃ 1%, H₂SO₄ pekat.

G. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan bawang hitam

Bawang putih sebanyak 900 gram dimasukkan dalam rice cooker selama 7 hari, 14 hari, 21 hari dengan suhu 70 °C. Setelah sudah melewati masa fermentasi lalu dikeringkan jemur dibawah sinar matahari secara

langsung, setelah kering dihaluskan dengan blender dan diayak mesh 40 untuk dijadikan sebagai serbuk untuk proses selanjutnya.

2. Ekstraksi bawang hitam

Serbuk umbi bawang hitam ditimbang sebanyak 100 gram dan dibungkus dengan kertas saring, ikat kedua bagian ujungnya dengan benang, lalu masukkan ke dalam tabung soklet (*thimble*), tambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 1000 mL yang dibagi menjadi 2 bagian, 500 mL dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan 500 mL dimasukkan ke dalam tabung soklet untuk membasahi sampel. Proses ekstraksi dilakukan dengan suhu 70°C sampai 4 siklus atau sampai tetesan menjadi jernih. Hasil ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dan kecepatan 60 rpm selama 2 jam hingga sebagian besar pelarut terpisah dari ekstrak. Ekstrak diuapkan kembali dengan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental.

3. Uji rendemen

Untuk mengetahui efisiensi proses ekstraksi, dilakukan perhitungan rendemen menggunakan rumus perbandingan berat ekstrak kental yang dihasilkan dengan berat sampel awal (Widiawati *et al.*, 2023). Hasil perhitungan ini dinyatakan dalam satuan persen untuk menggambarkan perolehan ekstrak dari biomassa yang digunakan (Dewatisari *et al.*, 2018).

$$\text{Rumus rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

4. Uji kadar air

Pengukuran kadar air dari ekstrak dilakukan dengan mengeringkan cawan porselin di oven pada suhu 105°C selama satu jam, dan kemudian ditimbang beratnya. Sampel yang beratnya 2 g ditimbang menggunakan neraca analitik, lalu dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama tiga jam. Setelah itu, sampel didinginkan dalam desikator selama 20 menit sebelum ditimbang beratnya (Syafriada *et al.*, 2018).

Rumus % kadar air sebagai berikut:

$$\text{kadar air ekstrak (\%)} = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel setelah pemanasan (gram)

5. Uji bebas etanol

Ekstrak bawang hitam diambil sebanyak 1 gram lalu tambahkan 1 mL kalium dikromat dan 2 tetes H₂SO₄ pekat. Hasil positif etanol ditandai dengan adanya perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan (Scottish Water, 2020).

6. Uji fitokimia

- a. Uji alkaloid dilakukan dengan mengambil sebanyak ± 1 g sampel direaksikan dengan 1 ml kloroform dan 1 ml amonia dalam tabung reaksi. Campuran dipanaskan di atas penangas air, dikocok kuat, lalu disaring untuk mendapatkan filtrat. Filtrat kemudian dibagi ke dalam tiga tabung berbeda dan masing-masing ditambahkan 3 tetes H₂SO₄ 2N. Setelah didiamkan hingga terbentuk dua lapisan, fase atas (supernatan) diambil untuk diuji secara spesifik menggunakan pereaksi Dragendorff, Mayer, dan Wagner (Widiawati *et al.*, 2023)
- b. Uji flavonoid dilakukan dengan cara mencampurkan ± 1 g sampel ke dalam etanol 96%, yang dilanjutkan dengan proses pengocokan, pemanasan, dan penyaringan. Lalu ambil filtrat hasil penyaringan dan ditambahkan serbuk magnesium (Mg) sebanyak 0,1 g serta 2 tetes HCl pekat ke dalam filtrat tersebut. Perubahan warna yang terjadi menjadi indikator keberadaan senyawa golongan flavonoid (Widiawati *et al.*, 2023).
- c. Uji tanin dilakukan dengan cara ambil sebanyak ± 1 g sampel direbus dalam 10 ml air melalui penangas air. Filtrat yang telah disaring kemudian ditetaskan pereaksi FeCl₃ 1% sebanyak 2-3 tetes.

- d. Uji fenolik dilakukan secara langsung dengan menambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1% ke dalam ± 1 g sampel untuk mengamati adanya kompleks warna yang terbentuk (Widiawati *et al.*, 2023).
- e. Uji saponi kandungan saponin dideteksi melalui uji busa. Sampel sebanyak ± 1 g dididihkan bersama 10 ml air di atas penangas air. Filtrat hasil rebusan dikocok secara vertikal selama beberapa saat, kemudian didiamkan selama 15 menit untuk mengamati stabilitas busa yang dihasilkan (Widiawati *et al.*, 2023).
- f. Uji terpenoid: Dilakukan dengan mereaksikan ± 1 g sampel dengan 2 ml kloroform, yang diikuti dengan penambahan 3 ml H_2SO_4 pekat (Widiawati *et al.*, 2023).

7. Uji kadar fenolik total

Pengujian untuk menentukan jumlah fenolik total dilaksanakan dengan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Andriani dan Murtisiwi dengan beberapa penyesuaian.

a. Pembuatan larutan induk 1000 ppm

Buatkan larutan induk 1000 ppm dengan cara timbang sebanyak 10 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a.

b. Penyiapan standar

Buat larutan standar asam galat dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 ppm. Yang diambil dari larutan induk lalu diencerkan menjadi konsentrasi 10 sampai 50 ppm.

c. Penyiapan sampel

Buatkan larutan induk 1000 ppm dengan cara timbang sebanyak 10 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a diencerkan menjadi 100 ppm. Diambil 0,25 mL larutan sampel dan kemudian ditambahkan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu 10%. Setelah dibiarkan selama 3 menit, ditambahkan lagi 3 mL Na_2CO_3 7,5% ke dalam setiap campuran, kemudian dicampur dengan cara divortex selama 3 detik, dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruangan.

d. Pengukuran absorbansi

Diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 755 nm. Proses ini diulang sebanyak 3 kali.

e. Perhitungan kadar fenolik total

Data absorbansi yang didapatkan kemudian dipetakan pada kurva standar yang berasal dari larutan asam galat. Total kandungan fenolik dinyatakan dalam mg setara asam galat (GAE)/g sampel dan dihitung menggunakan persamaan.

$$FT = \frac{C \times FP \times V}{M}$$

Keterangan:

FT : Fenolik total (mg/g)

C : Konsentrasi dari kurva standar (mg/mL)

FP : Faktor pengenceran

V : Volume sampel (mL)

M : Massa Sampel (g)

8. Uji aktivitas antibakteri

a. Sterilisasi alat dan media

Semua peralatan dan media yang digunakan dalam penelitian ini akan disterilkan terlebih dahulu. Alat yang tidak terbuat dari kaca dapat disterilkan dengan metode autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sementara itu, peralatan kaca disterilkan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 1 jam. Peralatan dan bahan yang disterilkan adalah yang dapat bertahan dan tidak rusak pada suhu tinggi. Meja dan lemari aseptis dibersihkan terlebih dahulu sebelum disemprot dengan etanol 70% dan pinset serta jarum ose dipanaskan di atas nyala lampu bunsen.

b. Pembuatan media nutrisi agar

Media NA seberat 20 g ditimbang, lalu dilarutkan dalam aquades sebanyak 1000 ml. Setelah itu, media NA dipanaskan di atas bunsen, dengan adukan terus-menerus hingga tercampur merata dan menunggu sampai mendidih. Selanjutnya, media ini disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

c. Identifikasi bakteri

Langkah awal adalah mengambil NaCl dan meneteskan ke dalam objek kaca, lalu dikeringkan; ose disterilkan dengan bunsen, kemudian ambil satu ose biakan bakteri *Escherichia coli* dan letakkan bakteri tersebut di atas objek kaca. Pada langkah selanjutnya, tambahkan pewarna kristal violet ke dalam objek kaca dan biarkan selama 2 menit, setelah itu tiriskan dengan aquadest yang mengalir. Kemudian, pada langkah ketiga, teteskan lugol dan biarkan selama 1 menit, lalu bilas kembali dengan aquadest yang mengalir; setelah itu, gunakan alkohol 95% sebagai pemucat warna selama 1 menit dan bilas menggunakan aquadest yang mengalir. Langkah keempat adalah meneteskan safranin dan membiarkannya selama 2 menit. Setelah itu, cuci preparat dengan aquadest yang mengalir, keringkan, dan amati morfologi serta warna sel di bawah mikroskop. Bakteri akan dikategorikan sebagai gram positif jika selnya menunjukkan warna ungu dan gram negatif jika selnya berwarna merah (Amalia, 2013).

d. Pembuatan konsentrasi ekstrak bawang hitam

Pembuatan konsentrasi ekstrak bawang hitam dibuat dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75%. Dipipet berturut-turut sebanyak 1,25 gr, 2,5 gr, dan 3,75 gr dan dicukupkan dengan larutan DMSO sampai tanda batas menggunakan labu ukur 5 ml.

e. Larutan uji kontrol positif dan negatif

Kontrol positif yang diterapkan dalam studi ini adalah disk kloramfenikol. Kontrol negatif memanfaatkan DMSO (dimetil sulfoksida).

f. Peremajaan bakteri uji

Ambil NA masukkan ke tabung reaksi lalu miringkan tabung reaksi di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) yang telah disemprot dengan etanol 70% dan tunggu hingga agar mengeras, kemudian gunakan jarum ose yang sudah disterilkan untuk mengoleskan bakteri *Escherichia coli* di atas agar. Inkubasi dalam alat inkubator selama 24 jam pada suhu 37 °C.

g. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri *Escherichia coli* diperoleh melalui peremajaan di media NA di dalam tabung reaksi. Bakteri *Escherichia coli* yang dipergunakan berada dalam bentuk suspensi. Suspensi dihasilkan dengan mengambil 1-2 ose masing-masing dari isolat, biakan bakteri *Escherichia coli* kemudian ditempatkan ke dalam tabung reaksi steril yang telah diisi dengan larutan NaCl 0,9%. Campuran tersebut dihomogenkan menggunakan vortex, dan kekeruhan dari campuran tersebut dibandingkan dengan kekeruhan standar *Mc.farland* 0,5.

h. Inokulasi

Uji kegiatan mikroba dilakukan dengan teknik difusi menggunakan kertas cakram. Sebanyak 1 ml (1000 µl) dari suspensi *Escherichia coli* yang telah diatur sesuai standar *Mc.farland* dimasukkan ke dalam cawan petri, selanjutnya tambahkan media NA dan dihomogenkan, setelah itu dibiarkan hingga media setengah padat. Selanjutnya, cawan petri dibagi menjadi lima bagian yang masing-masing diberi label, lalu kertas cakram dicelupkan ke dalam berbagai konsentrasi ekstrak bawang hitam. Setelah dicelup, kertas cakram yang sudah terendam dalam konsentrasi ekstrak bawang hitam dikeringkan dengan udara dan kemudian ditempatkan di atas media NA yang sudah mengandung bakteri penguji dan dibiarkan mengeras. Kontrol positif menggunakan cakram kloramfenikol dan DMSO (dimetil sulfoksida) sebagai kontrol negatif.

i. Inkubasi

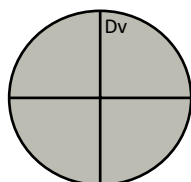
Proses inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C.

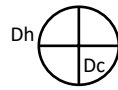
j. Pengamatan

Diameter zona penghambatan yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

Berikut adalah rumus pengukuran zona hambat (Magvirah *et al.*, 2019)

$$\text{Zona hambat} = \frac{(Dv - Dc) + (Dh - Dc)}{2}$$





Keterangan :

Dv : diameter vertikal

Dh : diameter horizontal

Dc : diameter cakram

H. Analisa Data

Data hasil uji kadar fenolik dan uji aktivitas antibakteri yang terkumpul dianalisis menggunakan SPSS for Windows versi 25 untuk menentukan apakah terdapat perbedaan yang signifikan dalam data yang diperoleh. Normalitas dianalisis terlebih dahulu, jika nilai P lebih besar dari 0,05, yang menunjukkan bahwa data terdistribusi normal, maka akan dilanjutkan dengan pengujian one-way ANOVA. Namun, jika nilai P kurang dari 0,05, yang menandakan bahwa data tidak terdistribusi normal, maka pengujian akan dilanjutkan dengan metode non-parametrik (Purnamasari *et al.*, 2018).