

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode yang bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui jumlah fenol yang terkandung dalam ekstrak etanol *black garlic (Allium Sativum L)*. Penelitian ini meliputi pengambilan Bawang putih, determinasi, pembuatan *black garlic* atau bawang hitam, menyiapkan sampel, membuat reagen atau larutan induk asam galat, membuat kurva kalibrasi asam galat, Penentuan Kandungan Fenol Total, pengujian Penentuan Kadar Fenolik Ekstrak Etanol *Black Garlic (Allium Sativum L)* menggunakan metoda *Folin – Ciocalteu*.

Metode ini didasarkan pada kemampuan ekstrak etanol untuk mereduksi reagen *Folin-Ciocalteu* yang mengandung senyawa fosfomolibdat dan asam fosfotungstat.

3.2 Populasi dan Sampel penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah *black garlic (Allium Sativum L)* yang diperoleh dari Malang, Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol *black garlic (Allium Sativum L)*.

3.3 Lokasi dan waktu penelitian

3.3.1 Lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

3.3.2 Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari sampai bulan Mei 2019

3.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini dapat diklasifikasikan yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang menjadi penyebab atau mempengaruhi, meliputi faktor-faktor yang diukur, dimanipulasi atau dipilih oleh peneliti.

Variabel terikat adalah faktor-faktor yang diamati dan diukur dalam rangka menentukan pengaruh variabel bebas atau hasil dari variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak *black garlic* (*Allium Sativum L*), sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah penentuan kadar fenolik ekstrak etanol *black garlic* (*Allium sativum L*) menggunakan metoda *Folin – Ciocalteu*.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi variabel	Alat	Hasil ukur	Skala ukur
Bebas : Ekstrak etanol <i>black garlic</i> (<i>Allium Sativum L</i>),	Cairan yang diperoleh dari hasil ekstraksi <i>black garlic</i> (<i>Allium sativum L</i>) yang dibelender dengan penambahan pelarut etanol 96%.	Vacum rotary evaporator	ML	Nominal
Terikat : Kadar fenolik	kadar kurva kalibrasi	spektrofotometer UV – Vis.	MgGAE/g	Nominal

total

3.5 Alat dan bahan

Instrumen penelitian adalah semua alat – alat dan bahan yang digunakan untuk pengumpulan data. Adapun alat dan bahan yang digunakan adalah sebagai berikut :

3.5.1 Alat

Dalam penelitian ini alat - alat yang digunakan meliputi :

Kertas saring, cawan penguap, rotary evaporator, timbangan digital, labu ukur, pipet ukur, magic jar, desikator, kuvet, Erlenmeyer, batang pengaduk, kaca arloji, gelas ukur, tabung reaksi, seperangkat alat spektrofotometer UV – Vis.

3.5.2 Bahan

Bawang putih (*Allium Sativum L*) diperoleh dari malang, etanol 96%, Aquadest, asam galat, reagen *Folin-Ciocalteu*, dan Natrium karbonat.

3.6 Prosedur kerja

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan melalui langkah kerja sebagai berikut :

3.6.1 Determinasi tanaman

Determinasi tanaman bawang putih (*Allium Sativum L*), dilakukan di MMB dilakukan dengan cara melihat kunci determinasi serta membandingkan ciri–ciri morfologi tumbuhan dengan literature.

3.6.2 Pengambilan sampel dan pembuatan *black garlic*

1. Diambil bawang putih sebanyak 2kg dipilih yang berukuran besar, tidak busuk dan masih menyatu dengan siung yang lain.
2. Bawang putih dibiarkan tanpa dikupas dalam keadaan kering tidak lembab kemudian dibersihkan dari kotoran dengan menggunakan kuas kering.
3. Bawang putih sebanyak 2 kg dimasukkan kedalam *magic jar*.
4. Ditutup dan diatur dengan suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$ - 80°C dan dibiarkan selama 21 hari.
5. Setelah hari ke 21 bawang yang sudah dipanaskan dikeluarkan dan diambil *black garlic* yang memiliki kulit siung tidak gosong dan bawang putih didalamnya yang berwarna hitam sehingga didapatkan *black garlic*

3.6.3 Pembuatan ekstrak *black garlic*

1. Kulit bawang hitam dikupas kemudian bawang hitam dihaluskan menggunakan mesin penghalus (*blender*).
2. Serbuk bawang hitam dimasukkan kedalam botol gelap kemudian direndam dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10 (100 g serbuk dalam 1000 ml etanol) didiamkan selama 24 jam.
3. Kemudian disaring dengan menggunakan corong buchner yang dialasi kertas saring.
4. Filtrat kemudian diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator.
5. Filtrat dimasukan kedalam labu alas bulat sampel pada rotor penggerak dan labu destilasi yang diatur sesuai titik didih air yaitu 70°C .
6. sampai diperoleh ekstrak yang dapat dituang , kemudian dihitung berat ekstrak total.

3.6.3 Identifikasi Senyawa ekstrak etanol 96% *Black Garlic*

3.6.3.1 Uji flavonoid

1. Sebanyak 5ml *black garlic* (*Allium sativum L*) dimasukkan kedalam 2 tabung reaksi, tabung 1 ditambahkan 3 tetes larutan NaOH
2. Terbentuk warna kuning intens yang menjadi tidak berwarna dengan penambahan asan encer menunjukkan adanya flavonoid, (Ramadani, 2015)
3. Tabung ke 2 ditambahkan 0,1 g serbuk Mg tetes HCl pekat, terbentuk warna jingga menunjukkan adanya flavonoid (Setyowati *et al.*, 2014)

3.6.3.2 Uji Alkaloid

Sebanyak 5 ml Ekstrak *black garlic* (*Allium sativum L*) dilarutkan dengan 10 ml khloroform amoniak ditambahkan H₂SO₄2N dikocok sampai terbentuk 2 lapisan, ambil lapisan kemudian dibagi kedalam 3 tabung Reaksi :

1. Tabung 1 ditetesi dengan pereaksi Dragendroff 2-3 tetes hasil positif terbentuk endapan atau kekeruhan yang berwarna hitam.
2. Tabung 2 ditetesi dengan pereaksi mayer 2-3 tetes hasil positif terbentuk endapan putih atau kekuningan
3. Tabung 3 ditetesi dengan pereaksi wagner 2-3 tetes hasil positif terbentuk endapan coklat kemerahan (Kristanti *et al.*, 2008)

3.6.3.3 Uji saponin

Sebanyak 2 ml ekstrak *black garlic* (*Allium sativum L*) dimasukan kedalam tabung reaksi.

1. Tambahkan 10 ml Aquadest kedalam tabung reaksi berisi ekstrak dan lakukan pengocokan kuat selama 30 menit kemudian amati perubahan yang terjadi

2. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm tidak hilang selama 30 detik, maka identifikasi menunjukkan adanya senyawa saponin.
3. Uji penegasan dilakukan dengan menambahkan 1 Tetes asam klorida 2N, jika buih tidak hilang maka identifikasi menandakan adanya senyawa Saponin.

3.6.3.4 Uji Tanin

Sebanyak 5 mL *balck garlic* ditambahkan dengan 5 ml aquades kemudian dididihkan selama 5 menit. Kemudian di saring, filtrat ditambahkan 5 tetes FeCl_3 1%. Apabila terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Shahputra, 2008).

3.6.4 Pembuatan reagen

3.6.4.1 Pembuatan larutan induk asam galat (5 mg/ml)

1. Ditimbang asam galat sebanyak 0,25mg
2. Dimasukkan kedalam beaker glass tambahkan 5 ml etanol 96%
3. Dimasukkan kedalam labu takar 50ml.
4. Ditambahkan aquadest sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.
5. Sehingga diperoleh konsentrasi 5mg/ml (Waterhouse, 1999).

3.6.4.2 Pembuatan larutan Na_2CO_3 20%

1. Ditimbang 5 gr Na_2CO_3
2. Dimasukan kedalam beaker glas tambahkan 25 ml Aquadest (Waterhouse, 1999).

3.6.5 Pembuatan kurva kalibrasi asam galat dengan Reagen *Folin – Ciocalteu*

1. Dari Konsentrasi larutan induk asam galat dipipet sebanyak 6, 8, 10, 12, 14ml dan diencerkan dengan Aquadest sampai volume 100ml. Sehingga dihasilkan konsentrasi 300, 400, 500, 600, dan 700mg/ml asam galat

2. Dari masing – masing konsentrasi diatas di pipet 0,2 ml tambahkan 15,8ml Aquadest, 1ml Reagen *Folin Ciocalteu* kemudian dikocok.
3. Didiamkan selama 8 menit.
4. Ditambahkan 3ml larutan Na_2CO_3 kemudian dikocok sampai homogen.
5. Diamkan selama 2 jam pada suhu kamar
6. Diukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm, lalu buat kurva kalibrasinya hubungan antara konsentrasi asam galat (mg/L) dengan absorban. (Waterhouse, 1999).

3.6.6 Penentuan Kandungan Fenol Total dengan Metoda *Folin –Ciocalteu*

1. Ditimbang 0.3gram ekstrak
2. Dilarutkan sampai 10 ml dengan etanol 96% : Air (1:1)
3. Dipipet 0,2 ml larutan ekstrak, dan tambahkan 15,8ml aquadest, tambahkan 1ml reagen Folin – Ciocalteu, kemudian dikocok.
4. Diamkan selama 8 menit
5. Ditambahkan 3 ml larutan Na_2CO_3 20% kedalam campuran
6. Didiamkan selam 2 jam pada suhu kamar.
7. Diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm yang akan memberikan kompleks biru
8. Dilakukan 3 kali pengulangan sehingga kadar fenol yang diperoleh hasilnya didapat sebagai mg ekuivalan galat/g sampel (Orak 2006).

3.7 Analisis data

Kandungan fenolik total ekstrak *Black garlic* dinyatakan sebagai mg ekivalen asam galat (GAE) per g ekstrak etanol *Black garlic*. Nilai absorbansi larutan uji yang telah didapatkan dimasukkan kedalam persamaan kurva persamaan regresi linear asam galat, sehingga diperoleh nilai ekivalensi larutan uji terhadap asam galat. Kandungan fenolik total diperoleh berdasarkan Rumus:

Konsentrasi ekstrak Black garlic $\frac{\text{volume larutan uji}}{\text{massa ekstrak yang ditimbang}}$

