

## BAB III METODE PENELITIAN

Metode penelitian ini dilakukan dengan fermentasi bawang putih majemuk menggunakan penanak nasi dengan suhu 60-70 °C selama 22 hari dalam mode *warm*. Hasil fermentasi didapat bawang hitam. Setelah itu, dilakukan ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi pada sampel bawang putih dan bawang hitam kemudian dilakukan pengujian perbandingan uji fitokimia, uji flavonoid total pada bawang putih dan bawang hitam. Pembuatan media *Muller Hinton Agar* (MHA) sebagai media perkembang biakan bakteri. Kemudian perbandingan pengujian aktivitas antibakteri bawang putih dan bawang hitam terhadap bakteri *Salmonella typhimurium*.

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 09 Januari – 02 Maret 2023 di Laboratorium Penelitian Kimia Organik Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Gunung Djati Bandung dan untuk pengujian aktivitas antibakteri akan dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran.

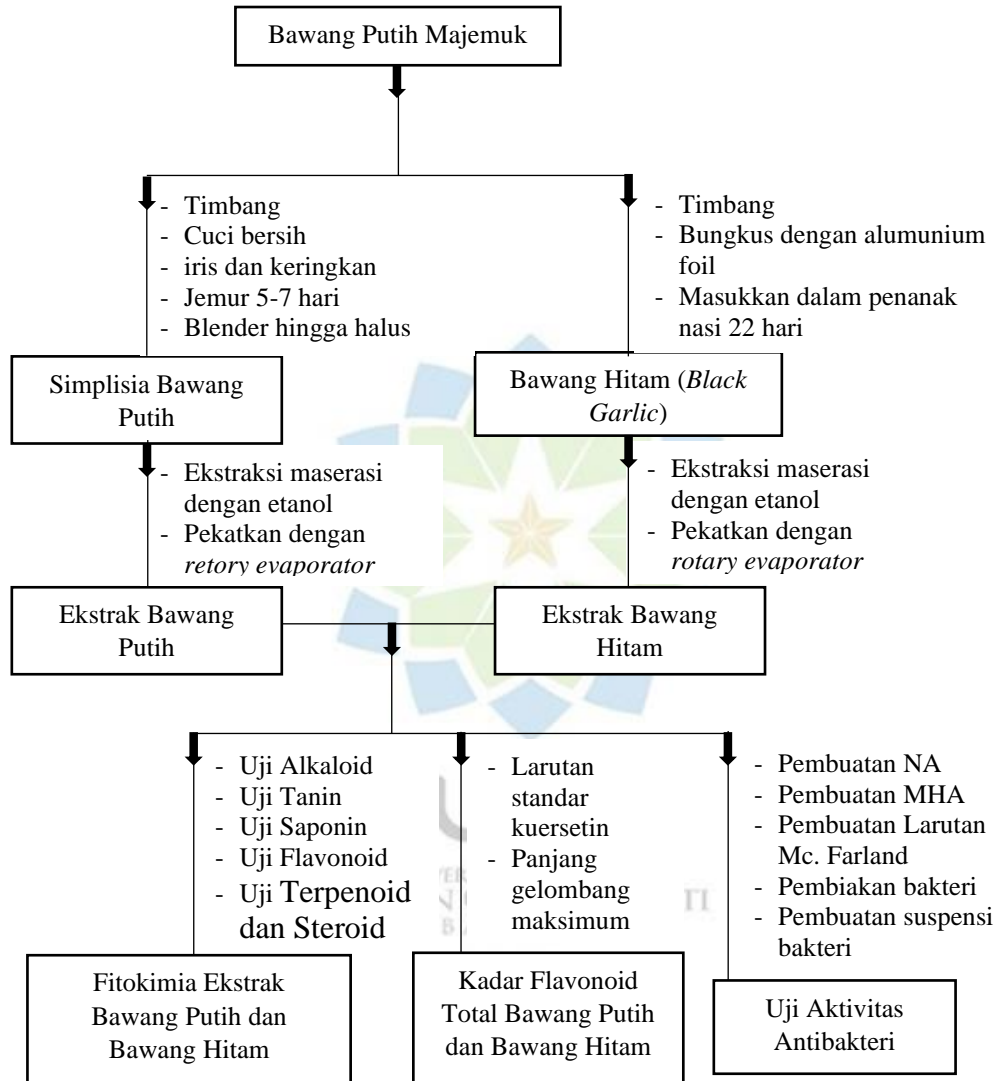
### 3.2 Bahan, Alat, dan Instrumen

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bawang putih majemuk asal Wonosobo, etanol 96%, aquades, aluminium foil, HCl, pereaksi *Dragendorff*, pita magnesium, HCl pekat, FeCl<sub>3</sub> 5%, kloroform, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat (*Merck*), kuersetin, AlCl<sub>3</sub> 10%, K-Na-Tartrat, *Nutrien Agar* (NA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), H<sub>3</sub>SO<sub>4</sub> 0,36N, BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,175%, NaCl 0,9%, DMSO 10%, kertas saring, Bakteri *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Alat-alat yang digunakan meliputi penanak nasi (*Miyako 1,2 liter 350 W*), toples kaca 2 liter, blender (*Cosmos*), *rotary evaporator*, erlenmeyer 250 mL, tabung reaksi (*Iwaki* dan *pyrex*), rak tabung reaksi, gelas kimia (500 mL, 250 mL, 50 mL), gelas ukur (100 mL, 50 mL, 25 mL), labu ukur (10 mL, 25 mL, 100 mL), pipet tetes, pipet ukur (1 mL, 5 mL, 10 mL) (*Iwaki* dan *pyrex*), pipet volume 5 mL dan 10 mL (*Iwaki*), kaca arloji, spatula, batang pengaduk, *ball filler*, cawan petri, kawat oase, autoklaf, kapas lidi, plastic wrap, *paperdisk*, dan penggaris. Untuk

pengujian kadar flavonoid total menggunakan spektrofotometer UV-Vis (*Agilent Technologies Series 200*).

### 3.3 Prosedur



**Gambar III.1** Rancangan Alur Penelitian

Secara umum, penelitian ini akan dilakukan beberapa tahapan prosedur yaitu: pembuatan simplisia bawang putih, pembuatan bawang hitam dengan pemanasan dalam penanak nasi, ekstraksi sampel simplisia bawang putih dan bawang hitam menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, pengujian senyawa metabolit sekunder (alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan terpenoid/steroid) menggunakan uji penapisan fitokimia, penentuan kadar flavonoid total sampel simplisia bawang putih dan bawang hitam dengan

menggunakan Spektrofotometer UV-Vis, dan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram. Adapun rancangan alur penelitian dapat dilihat pada **Gambar III.1**.

### 3.3.1 Pembuatan Simplisia Bawang Putih

Sampel bawang putih majemuk ditimbang sebanyak 500 gram. Kemudian dikupas kulitnya dan dicuci bersih. Kemudian, sampel bawang putih diiris dan dikeringkan dengan cara dijemur selama 5-7 hari. Setelah kering, sampel bawang putih diblender hingga halus sampai diperoleh serbuk simplisia.

### 3.3.2 Pembuatan Bawang Hitam

Sampel bawang putih majemuk ditimbang sebanyak 500 gram. Kemudian setiap satu buah bawang putih majemuk di bungkus dengan menggunakan aluminium foil, lalu dimasukkan ke dalam penanak nasi dengan *warm mode* pada rentang suhu 60-65 °C selama 22 hari.

### 3.3.3 Ekstraksi Metode Maserasi

Sampel simplisia ditimbang sebanyak 200 gram kemudian dimasukkan ke dalam wadah kaca yang berisi 500 mL larutan etanol 96% pada maserasi pertama dan kedua, kemudian 350 mL pada maserasi ketiga dan keempat. Proses ekstraksi dilakukan selama 4x24 jam pada temperatur ruang dan diaduk setiap harinya. Lalu dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring kemudian hasil filtrat ditampung dalam labu erlenmeyer. Setelah itu filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kental.

Bawang hitam ditimbang sebanyak 200 gram dihaluskan menggunakan alu dan mortal hingga diperoleh halus. Serbuk bawang hitam dimasukkan ke dalam wadah kaca yang berisi 500 mL larutan etanol 96% pada maserasi pertama dan kedua, kemudian 350 mL pada maserasi ketiga, keempat dan kelima, kemudian 250 mL pada maserasi keenam. Proses ekstraksi dilakukan selama 6x24 jam pada temperatur ruang dan diaduk setiap harinya. Lalu dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring kemudian hasil filtrat ditampung dalam labu erlenmeyer. Setelah itu filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kental.

### 3.3.4 Uji Fitokimia Ekstrak Bawang Putih dan Bawang Hitam

#### 1. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan kedua ekstrak sampel masing-masing sebanyak 1 mL. Lalu, dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi *Dragendorff* sebanyak 2-3 tetes. Keberadaan alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata.

#### 2. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan kedua ekstrak sampel masing-masing sebanyak 1 mL. Kemudian ditambahkan dengan  $\text{FeCl}_3$  5% sebanyak beberapa tetes dan diamati. Keberadaan tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru atau hitam.

#### 3. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan metode *Forth*, dimana kedua ekstrak sampel masing-masing sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 1 mL air panas dan dikocok dengan kuat selama 30 detik. Hasil positif senyawa Saponin akan terbentuk busa yang stabil tidak hilang selama 30 detik.

#### 4. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan kedua ekstrak sampel masing-masing sebanyak 1 mL ditambahkan 5 mL etanol 96%. Kemudian diambil 2 mL larutan sampel, ditambahkan 0,1 gram pita Mg dan 10 tetes HCl pekat dari sisi tabung. Kemudian, dikocok perlahan hingga terbentuk warna merah, kuning atau jingga yang menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid.

#### 5. Uji Terpenoid dan Steroid

Uji terpenoid dan steroid dilakukan dengan menggunakan metode *Salkowski*. Kedua ekstrak sampel masing-masing sebanyak 1 mL dan ditambahkan kloroform, kemudian ditambahkan dengan beberapa tetes asam sulfat pekat dan asam asetat anhidrat. diamati perubahan warna yang terjadi. Jika terdapat warna biru/hijau pada lapisan bawah maka mengandung senyawa steroid dan jika terbentuk warna merah/ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid.

### 3.3.5 Uji Kadar Flavonoid Total

#### 1. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Dibuat larutan induk kuersetin 100 µg/mL dengan ditimbang sebanyak 0,0025 mg dan dilarutkan dengan etanol sebanyak 25 ml ke dalam labu ukur, kemudian dikocok hingga homogen. Sebanyak 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 mL larutan standar 100 µg/mL masing-masing diencerkan dengan etanol dalam labu ukur 10 ml sampai tanda batas dan dihomogenkan untuk membuat larutan standar 10, 20, 30, 40 dan 80 µg/mL.

Larutan standar 30 µg/mL dan etanol dipipet sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan  $AlCl_3$  (10%) sebanyak 0,1 ml, K-Na-Tartrat sebanyak 0,1 mL, dan aquades sebanyak 2,8 mL. Lalu, dikocok hingga tercampur kemudian diinkubasi selama 30 menit. Dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimal dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 300-500 nm, dengan etanol sebagai blanko.

Masing-masing larutan standar dan etanol dipipet sebanyak 2 mL, kemudian masing-masing ditambahkan  $AlCl_3$  (10%) sebanyak 0,1 ml, K-Na-Tartrat sebanyak 0,1 mL, dan aquades sebanyak 2,8 mL. Lalu, dikocok hingga tercampur kemudian diinkubasi selama 30 menit. Dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 418 nm, dengan etanol sebagai blanko.

#### 2. Pengujian Kadar Flavonoid Total

Ekstrak bawang putih dan bawang hitam diambil sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan  $AlCl_3$  (10%) sebanyak 0,1 ml, K-Na-Tartrat sebanyak 0,1 mL, dan aquades sebanyak 2,8 mL. Lalu, dikocok hingga tercampur kemudian diinkubasi selama 30 menit. Dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 418 nm dan dihitung nilai absorbansinya.

### 3.3.6 Uji Aktivitas Antibakteri

#### 1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

#### 2. Penyediaan Bakteri Uji

Bakteri uji ditanamkan di atas permukaan media agar (*Nutrien agar/Mueller Hinton Agar*) dengan memilih beberapa koloni bakteri menggunakan kawat ose steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam.

#### 3. Persiapan dan Standarisasi Suspensi Bakteri

Bakteri yang sudah dibiakan diambil menggunakan kawat oase dan disuspensikan ke dalam media agar (*Nutrien Broth/Mueller Hinton Broth*). Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Kemudian, kekeruhan suspensi bakteri distandarisasi setara dengan standar 0,5 Mc Farland.

#### 4. Uji Aktivitas Antibakteri

Cawan petri berisi agar disiapkan pada suhu kamar selama 10-15 menit. Vortex suspensi bakteri hingga homogen kemudian dimasukkan kapas lidi steril kedalam suspensi, dioleskan pada lapisan agar secara merata. Kemudian biarkan selama 5 menit sampai bakteri berada pada media agar. Kemudian disiapkan *paperdisk* steril, teteskan sebanyak 15 µL sampel pada *paperdisk* steril dan di letakkan pada media agar yang telah dioles bakteri. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 16-18 jam dan dilakukan pengamatan zona hamba hambat yang terbentuk.