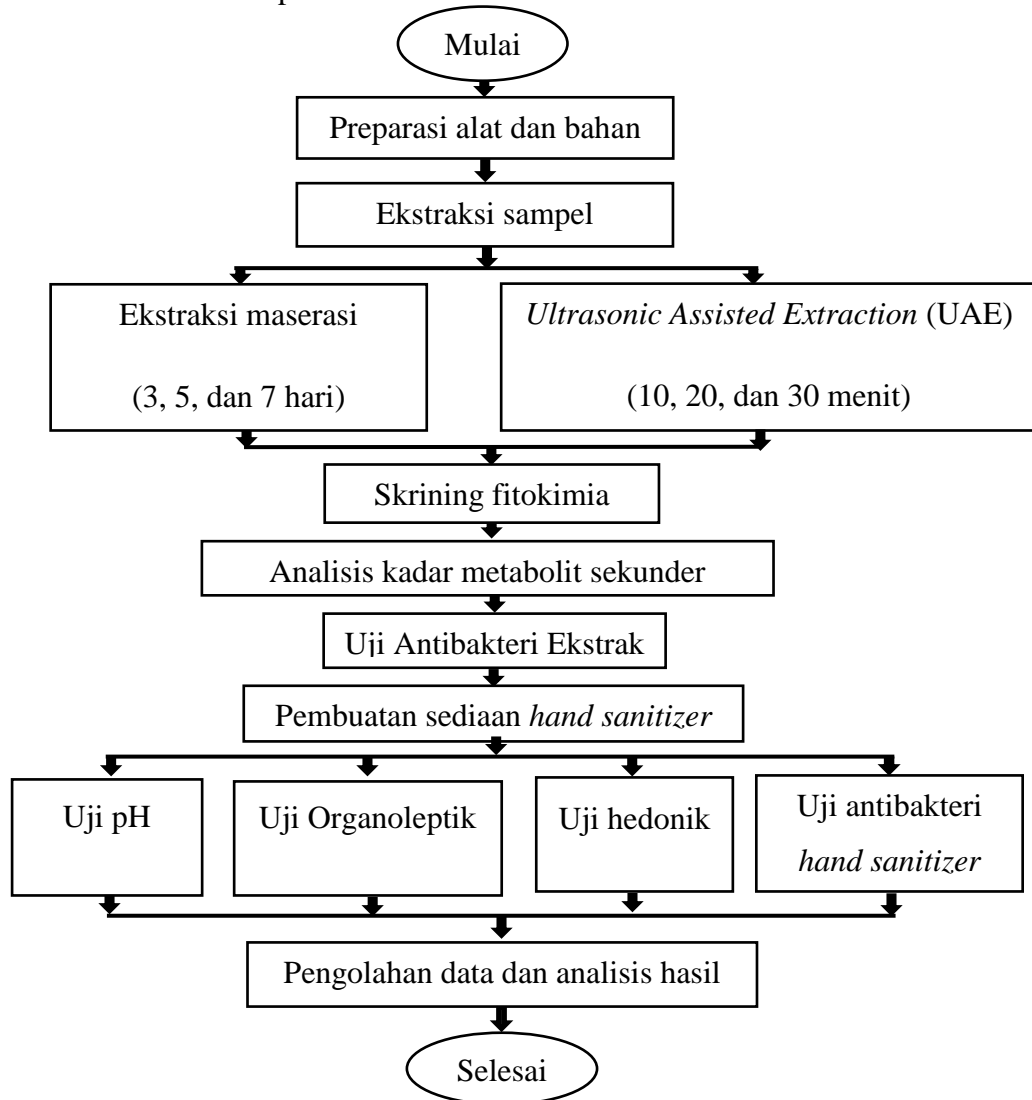


BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu persiapan bahan, ekstraksi, uji kualitatif dan kuantitatif, uji antibakteri, uji Adapun masing – masing tahapan diuraikan pada Diagram alir penelitian yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah seperti Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram Alir Tahapan Penelitian

Pada penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu preparasi bahan (simplisia), ekstraksi, serta beberapa uji yang dilakukan. Tahap pertama yaitu preparasi bahan, dimana pada tahap ini dilakukan pengumpulan sampel kulit bawang merah dari limbah rumah tangga lalu memilah kualitas kulit bawang yang bagus (tidak berwarna kehitaman) kemudian dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan dan diayak. Kemudian tahap ketiga adalah proses ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dan menggunakan metode UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*). Setelah itu, tahap keempat adalah skrining fitokimia dengan uji yang dilakukan untuk senyawa fenolik, flavonoid dan saponin. Lalu tahap kelima yaitu menganalisa ekstrak yang telah dibuat dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Tahap keenam dilakukan dengan menguji daya hambat 3 ekstrak yang memiliki kadar senyawa paling tinggi berdasarkan analisa kuantitas yang telah dilakukan sebelumnya. Lalu tahap ketujuh yaitu membuat sediaan *hand sanitizer* kemudian tahap kedelapan yaitu uji aktivitas antibakteri yang dilakukan menggunakan metode difusi pada ekstrak yang memiliki zona hambat paling besar lalu dibuat formulasi dengan konsentrasi ekstrak terhadap sediaan *hand sanitizer* dan *hand sanitizer* komersil dengan menghitung zona hambat yang terbentuk. Formulasi-formulasi *hand sanitizer* yang telah dibuat kemudian dilakukan pengamatan organoleptik perlu dilakukan dari segi bentuk, bau dan warna. Tahap selanjutnya yaitu dilakukan uji hedonik dengan tingkat kepuasan konsumen terhadap masing-masing formulasi serta dilakukan pengukuran pH pada beberapa formulasi yang dibuat dan yang terakhir yaitu melakukan uji homogenitas pada beberapa formulasi tersebut. Untuk uji organoleptik, pengukuran pH, serta uji homogenitas dilakukan selama 8 minggu dengan pengambilan data setiap 2 minggu sekali.

3.2 Prosedur Penelitian

Prosedur dari penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, diantaranya yaitu sebagai berikut:

3.2.1 Preparasi Bahan (Simplisia)

Sampel kulit bawang merah (*Allium cepa* var. *aggregatum*) yang dihasilkan dari pengumpulan limbah rumah tangga, kemudian memilih kulit bawang merah yang kering serta warna kulitnya tidak kehitaman (bawang merah segar). Lalu, mencuci kulit bawang merah pada air yang mengalir serta dirajang untuk memperluas luas permukaan. Pada proses selanjutnya adalah melakukan proses pengeringan dengan menggunakan sinar matahari. Setelah sampel dikeringkan, kemudian menghaluskan sampel dengan menggunakan blender serta diayak dengan menggunakan ayakan 20mesh.

3.2.2 Ekstraksi Sampel

Berikut ini adalah diagram alir proses ekstraksi metode maserasi dan UAE, yaitu:

a. Ekstraksi Maserasi

Sampel bawang merah (*Allium cepa* var. *aggregatum*) yang telah melalui proses preparasi bahan (simplisia), kemudian melakukan ekstraksi maserasi dengan simplisia sebanyak 10 gram yang direndam dalam etanol 96% sebanyak 150 mL. Setelah itu, melakukan variasi pada waktu perendaman yaitu selama 3, 5 dan 7 hari pada suhu ruang serta dilakukan pengadukan sebanyak beberapa kali. Ekstrak yang dihasilkan masukkan kedalam *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut pada suhu 70°C sehingga diperoleh ekstrak kental (Rahayu, *et al.* 2015).

b. *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE)

Dalam penelitian ini, digunakan prosedur *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) serta menggunakan kulit bawang merah (*Allium cepa* var. *aggregatum*) sebagai simplisianya. Kulit bawang yang telah melalui proses preparasi bahan, ditimbang sebanyak 10 gram dan memindahkannya ke gelas beker ukuran 250 mL serta etanol 96% sebanyak 150 mL. Untuk variasi waktu sonikasi yang dilakukan

yaitu 10, 20 dan 30 menit pada suhu 38°C, 48 kHz. Larutan yang dihasilkan dari proses ekstraksi selanjutnya dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator*. Evaporasi dilakukan pada suhu 70°C sampai didapat ekstrak kental.

3.2.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan secara kualitatif terhadap ekstrak kulit bawang merah (*Allium cepa* var. *aggregatum*) yang dihasilkan sebelumnya.

a. Flavonoid

Sebanyak 1 ml ekstrak ditambahkan 2 tetes NaOH 10% didalam tabung reaksi lalu dikocok kuat. Apabila muncul warna kuning, merah atau coklat berarti ekstrak positif mengandung flavonoid. (Lisi et al., 2017)

b. Saponin

Mengambil ekstrak sebanyak 1 gr dan memasukkannya kedalam tabung reaksi lalu menambahkan aquades kedalamnya sampai sampel terendam lalu dididihkan selama 2-3 menit kemudian didinginkan lalu dikocok secara kuat. Jika positif saponin ditunjukkan dengan adanya buih yang stabil. (Sangi et al., 2008)

c. Fenolik

Sebanyak 1 ml ekstrak ditambahkan dengan 2-3 tetes FeCl₃ 5% dan jika larutan berwarna biru kehitaman (Lisi et al., 2017) biru, hijau, hijau kehitaman, ungu, merah atau hitam maka positif mengandung fenolik. (Bayani, 2016)

3.2.4 Analisis Ekstrak

Kandungan ekstrak bawang merah (*Allium cepa* var. *aggregatum*) yang dihasilkan sebelumnya kemudian diuji secara kuantitatif untuk mengetahui kadar metabolit sekunder pada ekstrak kulit bawang merah menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum untuk flavonoid 435 nm (Setiani, dkk. 2017). dan untuk fenolik 750 nm (Sam, dkk. 2016).

a. Analisis Kadar Flavonoid

Analisis kadar flavonoid menggunakan alat Spektrofotometri UV-VIS mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Setiani, *et al.* (2017) yang menentukan kadar flavonoid pada kulit bawang merah.

- Menentukan panjang gelombang maksimum larutan standar kuersetin

Larutan standar kuersetin sebanyak 5 mL didalam etanol konsentrasi 100 ppm, kemudian dimasukkan dalam labu ukur dengan ukuran 50 mL. Menambahkan etanol 70% sebanyak 15 mL, AlCl_3 10% sebanyak 1 mL, dan CH_3COONa 1 M sebanyak 1 mL. Lalu, mengencerkan dengan air suling sampai batas labu ukur. Setelah itu, di aduk dengan cara menggoyangkan sampai homogen dan diamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian, mengukur absorbansinya dengan menggunakan alat Spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 435 nm. (Aminah, dkk. 2017)

- Membuat kurva dari standar kuersetin

Larutan standar kuersetin dibuat pada konsentrasi 2, 4, 6, 8, serta 10 ppm dari larutan 100 ppm, kemudian larutan standar 100 ppm diteteskan dengan menggunakan pipet ke dalam labu ukur dengan ukuran 50 mL. Volume yang digunakan sebanyak 1, 2, 3, 4, dan 5 mL, lalu menambahkan etanol 70% sebanyak 15 mL, AlCl_3 10% sebanyak 1 mL, dan CH_3COONa 1 M sebanyak 1 mL dan mengencerkan dengan air suling sampai batas labu ukur. Setelah itu, di kocok sampai homogen serta diinkubasi pada suhu ruang selama waktu optimalnya. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum memakai Spektrofotometri UV-VIS. Kurva antara nilai absorbansi dengan konsentrasi larutan standar dibuat dari hasil pengukuran absorbansi. Untuk menghitung kadar ekstrak dalam ppm digunakan persamaan regresi linear yang telah dihasilkan sebelumnya ($y = bx + a$). Kadar ekstrak dapat diperoleh melalui

memasukkan nilai absorbansi ekstrak ke 'y' pada persamaan tersebut.

- Menentukan Kadar Flavonoid pada ekstrak

Ekstrak yang dihasilkan pada proses metode maserasi dan metode UAE sebelumnya diukur masing masing 50 mg, lalu dilarutkan dengan menggunakan etanol 70% sebanyak 50 mL. Larutan tersebut diteteskan dengan menggunakan pipet sebanyak 10 mL kedalam labu ukur dengan ukuran 50 mL, kemudian menambahkan etanol 70% sebanyak 15 mL, AlCl_3 10% sebanyak 1 mL, dan CH_3COONa 1 M sebanyak 1 mL. Lalu, mengencerkan dengan air suling sampai batas labu dengan ukuran 50 mL yang lain dimasukkan 10 mL larutan ekstrak dan etanol yang telah dibuat sebelumnya diencerkan dengan air sampai batas labu. Setelah itu, kedua larutan dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama waktu optimalnya. Absorbansi diukur dengan menggunakan Spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang maksimum.

b. Analisis Kadar Fenolik

Analisis kadar fenolik menggunakan larutan standar berupa asam galat dengan alat spektrofotometri UV-VIS.

- Pengukuran larutan standar asam galat

Larutan standar asam galat 100 ppm larutan dibuat dalam konsentrasi 0, 1, 2, 3, dan 4 ppm lalu menambahkan reagen *Folin Ciocalteu* sebanyak 0,4 mL lalu didiamkan selama 4-8 menit. Kemudian menambahkan Na_2CO_3 lalu dikocok hingga homogen lalu ditambahkan dengan aquades sampai volume keseluruhan 10 mL setelah itu, diamkan selama 2 jam pada suhu ruang. Kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 750 nm (Sam S, dkk. 2016) kemudian kurva dapat dibuat antara konsentrasi asam galat terhadap absorbansi.

- Penentuan kadar fenolik total

Ekstrak sebanyak 10 mg dilarutkan dalam etanol p.a sebanyak 10 mL sampai homogen. Sebanyak 1 mL larutan tersebut dipipet lalu ditambahkan reagen *Folin Ciocalteau* kemudian dikocok lalu didiamkan selama 4-8 menit dan menambahkan Na_2CO_3 sebanyak 4 mL kocok kembali sampai homogen. Tambahkan aquades sampai volume total 10 mL lalu diamkan pada suhu ruang selama 2 jam. Lalu ukur absorbansinya dengan alat menggunakan Spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang maksimumnya.

3.2.5 Uji Antibakteri Ekstrak

Pada Senin (27/2/2017), Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) mengumumkan jenis bakteri berbahaya yang dianggap menimbulkan ancaman terbesar bagi kesehatan manusia. berdasarkan pernyataan WHO tentang prioritas patogen, bakteri *Esherichia coli* ditempatkan pada prioritas 1 atau kritis, serta bakteri tersebut banyak terdapat di tangan manusia. Oleh karena itu digunakan bakteri *Esherichia coli* pada uji antibakteri pada penelitian ini. Penelitian ini dilakukan dengan mengukur zona hambat 3 ekstrak dengan kadar flavonoid dan flavonoid tertinggi terhadap bakteri *Esherichia coli* menggunakan metode difusi. Hasil dari tahap ini untuk mengetahui ekstrak dengan zona hambat terbesar yang selanjutnya akan digunakan pada sediaan *hand sanitizer* untuk diuji antibakteri. Uji ini dilakukan di Laboratorium Sains Pendidikan Biologi Universitas Sultan Ageng Tirtayasa.

3.2.6 Pembuatan Sediaan *Hand Sanitizer*

Pembuatan sediaan *hand sanitizer* mengacu pada prosedur penelitian yang dilakukan oleh Wira, *et al.* (2019). Pembuatan *hand sanitizer* dilakukan dengan menimbang karbomer yang dapat memperbesar efektivitas penggunaan sediaan sebagai antibakteri serta memiliki stabilitas yang tinggi dan memiliki toksisitas yang rendah. Kemudian, dicampur ke dalam gelas beker yang berisi 10 mL aquades yang sudah dipanaskan dan mengaduk sampai mengembang. Setelah itu, menambahkan TEA dan mengaduknya kembali. TEA berfungsi

sebagai stabilitas dari sediaan serta dapat menyeimbangkan pH sediaan. Menambahkan metil paraben dan aduk kembali, lalu tambahkan gliserin yang berguna sebagai *emolient* yaitu agar *hand sanitizer* yang dihasilkan tidak terlalu kering saat diaplikasikan pada kulit serta memiliki aktivitas antimikroba dan dapat menjadikan sediaan transparan serta jernih (Asngad dkk, 2018). Metil paraben atau nipagin biasanya dipakai untuk bahan preservatif atau pengawet, perusakan atau pembusukan oleh fungi atau bakteri dalam kosmetik, sediaan atau produk makanan (Widyawati, dkk. 2017). Kemudian, menambahkan aquades. Maka, volume keseluruhan yaitu 50 ml dan semua bahan dihomogenkan.

Table 3.1 Rancangan Formulasi Sediaan *Hand Sanitizer* Ekstrak Kulit Bawang Merah

Bahan	F0	F1	F2	F3	Fungsi
Ekstrak	0 ml	0.25 ml	0.5 ml	0.75 ml	Bahan Aktif
Karbomer	0.25 gr	0.25 gr	0.25 gr	0.25 gr	<i>Gelling Agent</i>
TEA	1 tetes	1 tetes	1 tetes	1 tetes	<i>Alkalizing Agent</i>
Metil Paraben	0.1 gr	0.1 gr	0.1 gr	0.1 gr	Pengawet
Gliserin	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	<i>Emolient</i>
Aquades ad	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	Pelarut

Keterangan : F = Formulasi

3.2.7 Uji Antibakteri *Hand Sanitizer*

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi. Metode difusi ini dipakai untuk menguji adanya daya hambat terhadap bakteri yang akan diuji serta menguji daya hambat dari beberapa formulasi yang dibuat, yaitu *hand sanitizer* merk X sebagai kontrol positif, F0 (0% Ekstrak) sebagai kontrol negatif, dan F1 (0.5% Ekstrak), F2 (1% Ekstrak), serta F3 (1.5% Ekstrak)(Rini, *et al.* 2017). Tahap ini dilakukan di Laboratorium Sains Pendidikan Biologi.

3.2.8 Uji Organoleptik dan Hedonik

Uji organoleptik dilakukan selama 8 minggu dengan beberapa kali pengambilan data pada keempat variasi konsentrasi dengan parameter kontrol adalah bentuk, warna, dan bau. Uji hedonik dilakukan dari pengamatan serta pemakaian *hand sanitizer* ekstrak pada 10 koresponden dengan parameter kontrol adalah bentuk, warna, bau, dan tekstur. Uji ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kepuasan konsumen terhadap produk.

3.2.9 Uji pH

Uji pH dilakukan selama 8 minggu dengan pengambilan data setiap 2 minggu untuk memperlihatkan bahwa sediaan *hand sanitizer* yang dihasilkan aman untuk digunakan serta mempunyai ukuran pH yang sesuai dengan rentang pH kulit menurut standar SNI (1992), yaitu 4,5-6,5.

3.2.10 Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan selama 8 minggu dengan beberapa kali pengambilan data, kualitas *hand sanitizer* dikatakan baik jika telah memenuhi syarat mutu yaitu menunjukkan bahwa sediaan *hand sanitizer* memiliki susunan homogen dan tidak memperlihatkan adanya butiran kasar pada sediaan *hand sanitizer* yang memiliki arti bahwa material penyusun sediaan *hand sanitizer* tercampur dengan bagus sehingga dapat dikatakan memiliki homogenitas yang bagus juga (Ditjen POM, 1979).

3.3 Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu sebagai berikut:

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya sebagai berikut:

- a. Air sebagai pelarut
- b. AlCl_3 10% sebagai pereaksi geser pada analisis flavonoid
- c. Asam galat, sebagai larutan standar analisis fenolik

- d. Aquades sebagai pelarut
- e. CH_3COONa 1 M digunakan pada analisis flavonoid
- f. Etanol 70% sebagai pelarut analisis flavonoid
- g. Etanol 96% sebagai pelarut pada ekstraksi maserasi
- h. Etanol p.a sebagai pelarut
- i. FeCl_3 1% untuk pereaksi pada uji fenolik
- j. Gliserin sebagai *emollient*
- k. Karbomer sebagai gelling agent
- l. Kuersetin untuk membuat larutan baku analisis flavonoid
- m. Kulit bawang merah sebagai sampel
- n. Logam magnesium untuk mereduksi inti benzopiron dalam struktur flavonoid pada uji flavonoid
- o. Na_2CO_3 untuk menciptakan suasana basa agar terjadi reaksi reduksi *Folin Ciocalteu* oleh gugus hidroksil pada analisis fenolik
- p. Reagen *Folin Ciocalteu* sebagai reagen analisis fenolik
- q. TEA sebagai *alkilazing agent*
- r. Metil paraben sebagai pengawet
- s. Kertas saring untuk menyaring ekstrak setelah proses ekstraksi.

3.3.2 Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya sebagai berikut:

- a. Ayakan 20 mesh untuk mengayak sampel
- b. Erlenmeyer untuk mencampur dan menyimpan cairan dan digunakan sewaktu ekstraksi UAE
- c. Gelas beker untuk mengaduk dan mencampur bahan
- d. *Heater* untuk memanaskan air pada pembuatan sediaan
- e. *Ice bath* untuk menjaga suhu larutan tetap konstan
- f. Labu ukur 50 ml untuk mencampur larutan
- g. Tabung reaksi untuk uji fenolik, flavonoid dan saponin
- h. *Rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut

- i. pH Universal untuk mengukur pH larutan
- j. Pipet tetes untuk mengambil larutan dalam skala tetesan
- k. Spatula untuk mengambil bahan kimia padat
- l. Spektrofotometri UV-VIS untuk analisis kadar senyawa
- m. Tabung reaksi untuk mereaksikan bahan kimia
- n. *Ultrasonic Bath* untuk proses ekstraksi UAE
- o. Termometer untuk mengukur suhu
- p. Timbangan digital untuk menimbang bahan

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini meliputi variabel tetap, variabel berubah dan variabel kontrol. Variabel tetap dalam penelitian ini yaitu kulit bawang merah, sedangkan variabel berubah dalam penelitian ini adalah rasio ekstrak F0 (0% ekstrak), F1 (0,5% ekstrak), F2 (1,0% ekstrak), dan F3 (1,5% ekstrak), metode ekstraksi (maserasi dan UAE), waktu maserasi (3, 5, dan 7 hari), waktu UAE (10, 20 dan 30 menit) dan variabel kontrol dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli*, bau, warna, tekstur, pH, homogenitas *hand sanitizer* ekstrak kulit bawang merah.

3.5 Metode Pengumpulan dan Analisis Data

Analisa yang digunakan pada penelitian ini adalah analisa kualitatif ekstrak menggunakan skrining fitokimia, analisa kuantitatif kadar fenolik dan flavonoid dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis, analisa kualitas ekstrak kedua hasil metode ekstraksi, analisa aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi, analisa organoleptik, uji hedonik, analisa pengukuran pH dengan menggunakan alat universal pH meter dan analisa homogenitas.