

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental pada tanaman kol banda dengan melakukan analisis secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif yaitu uji fitokimia. Analisis kuantitatif meliputi uji klasifikasi SPF, %Te, dan %Tp.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Uji kualitatif dan kuantitatif akan dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2022 sampai Januari 2023.

C. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah daun kol banda yang diambil dari Desa Nyemengan, Kecamatan Kasihan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta dengan titik koordinator 110.32384574, -7.82915215917. Daun yang digunakan berwarna hijau cerah.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu variasi konsentrasi ekstrak kol banda.

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu nilai SPF, %Te, %Tp.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu pengaruh dari pengadukan, waktu maserasi, pelarut ekstraksi, suhu pengeringan, dan tempat pengambilan sampel.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol kol banda adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk daun kol banda dengan pelarut etanol 70%.
2. SPF adalah indikator universal yang menjelaskan keefektifan dari suatu tabir surya yang bersifat sebagai UV protektor.
3. %Te adalah nilai yang menggambarkan kemampuan suatu senyawa kimia dalam memproteksi kulit dari sinar UV B (290-320 nm) yang dapat menyebabkan eritema.
4. %Tp adalah nilai yang menggambarkan kemampuan senyawa untuk memproteksi kulit dari sinar UV A (320-375 nm) yang dapat menyebabkan kulit menjadi gelap.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Persiapan sampel
Timbangan analitik (*O'haus*), alat-alat gelas (*Pyrex*), ayakan no 40, blender, sendok kayu, tabung maserasi (botol kaca transparan), termometer, wajan, kompor listrik, kipas angin, *camber*, gelas ukur (*iwaki*), *beaker glass* (*iwaki*), magnet stirer.
 - b. Penentuan nilai SPF, % Te, % Tp
Alat-alat gelas (*Pyrex*), sonikator, *waterbath*, tabung reaksi (*iwaki*), pipet tetes, pipet ukur, pipet volume, labu takar, mikro pipet (*O'haus*), kaca arloji, batang pengaduk, spatula, neraca analitik (*O'haus*), spektrofotometer UV/Vis (*Genesys*).
2. Bahan
 - a. Pembuatan ekstrak
Daun kol banda, etanol 70 % teknis.
 - b. Skrining fitokimia
Kloroform, amonia 10%, asam sulfat (H_2SO_4), reagen Mayer, serbuk magnesium, asam klorida (HCl), aquades, besi (III) klorida ($FeCl_3$), kloroform, asam asetat glasial, etanol *p.a.*

c. Penentuan nilai SPF, % Te, % Tp

Ekstrak kol banda, etanol 70% *p.a*, kertas saring.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi daun kol banda (*Pisonia alba* Spanoghe) dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Penyiapan bahan

a. Pengambilan dan preparasi sampel

Sampel yang digunakan adalah daun kol banda berwarna hijau cerah sebanyak 3,5 kg. Daun dicuci dengan air mengalir, dipotong dan dikeringkan dalam oven suhu 50°C. Setelah kering, daun kol banda dihaluskan dengan blender dan diayak dengan ayakan no 40 mesh..

b. Pembuatan ekstrak

Sebanyak 100 gram serbuk simplisia daun kol banda diekstraksi dengan metode maserasi selama 5 hari, dilakukan pengadukan setiap 3x24 jam. Maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 1000 mL untuk merendam sampel. Sampel yang telah diberi pelarut ditutup dengan rapat dan disimpan ditempat gelap terhindar dari sinar matahari langsung. Filtrat disaring dan kemudian dilakukan remaserasi hingga warna filtrat tidak pekat. Filtrat yang diperoleh dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian dihitung persentase rendemen untuk mengetahui kandungan zat yang tertarik setelah penyaringan dengan membandingkan berat ekstrak kental yang diperoleh terhadap berat serbuk simplisia dikali seratus persen.

1) Analisis kualitatif dan kuantitatif sampel

a) Analisis kualitatif

(1) Pembuatan larutan uji

Pembuatan larutan uji untuk uji fitokimia dilakukan dengan cara melarutkan sebanyak 500 mg ekstrak etanol 70% daun kol

banda dalam 50 mL etanol 70%, kemudian diperoleh larutan uji yang digunakan untuk uji fitokimia.

(2) Uji alkaloid

Ekstrak diambil sebanyak 4 mL, kemudian ditambah 2 mL kloroform, 2,5 ml amonia dan ditetesi dengan 10 tetes asam sulfat (H_2SO_4) sehingga akan terbentuk 2 fase. Diambil fase bagian atas kemudian ditetesi dengan reagen Mayer. Senyawa dinyatakan positif alkaloid jika terbentuk endapan merah (Harbone, 1987).

(3) Uji flavonoid

Ekstrak diambil sebanyak 1 mL, ditambah dengan serbuk magnesium kemudian tetesi dengan 10 tetes asam klorida (HCl) pekat. Adanya senyawa flavonoid dilarutan ditandai dengan terbentuknya warna hitam kemerahan (Harbone, 1987).

(4) Uji tanin

Ekstrak diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambah 10 mL air panas, dan tetesi menggunakan besi (III) klorida ($FeCl_3$). Adanya senyawa tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman pada larutan (Harbone, 1987).

(5) Uji saponin

Ekstrak diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambah 10 mL aquades dan kocok \pm 1 menit. Lalu diamkan selama 10 menit dan amati gelembung yang terbentuk. Adanya senyawa saponin pada sampel ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung stabil setinggi 3 cm selama 10 menit (Harbone, 1987).

(6) Uji steroid

Ekstrak diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambah 2 mL kloroform dan kocok. Tetesi larutan yang didapat dengan masing-masing 2 tetes asam asetat glasial dan asam sulfat pekat. Reaksi positif ditunjukkan dengan berubahnya warna merah menjadi biru dan hijau pada larutan (Harbone, 1987).

b) Analisis kuantitatif

(1) Penyiapan sampel

Dibuat larutan induk 10.000 ppm, dengan ekstrak daun kol banda ditimbang sebanyak 250 mg dan pelarut etanol *p.a* 70% sebanyak 25 ml. Kemudian larutan disonikasi hingga larut (\pm 12 menit), dan disaring. Sampel ekstrak daun kol banda dibuat dalam 4 macam konsentrasi dengan rentang 1000 ppm hingga 2500 ppm dengan jarak masing-masing 500 ppm yakni menjadi 1000 ppm, 1500 ppm, 2000 ppm, dan 2500 ppm.

(2) Penetapan nilai SPF

Nilai SPF ditentukan dengan mengambil larutan dari masing- masing konsentrasi 1000 ppm, 1500 ppm, 2000 ppm, dan 2500 ppm dengan urutan 10 mg, 15 mg, 20 mg, dan 25 mg. Kemudian dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 290-320 nm. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali untuk setiap konsentrasi. Absorbansi dibaca pada setiap interval 5 nm dengan hasil pengukuran yang diperoleh kemudian untuk dihitung nilai SPF menggunakan rumus Mansur.

(3) Penentuan % Te dan % Tp

Nilai % Te dan % Tp ditentukan dari masing masing konsentrasi 1000 ppm, 1500 ppm, 2000 ppm, dan 2500 ppm yang telah dipersiapkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 292,5-317,5 untuk mengukur %Te, dan panjang gelombang 322,5-372,5 untuk mengukur %Tp dengan interval panjang gelombang 5 nm. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali untuk setiap konsentrasi (Widyawati *et al.*, 2019).

H. Analisis Data

1. Analisis hasil SPF menggunakan perhitungan mansur, yaitu: (Dutra, 2004)

$$\text{SPF spectrophotometric} = \text{CF} \times \sum \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

Keterangan:

CF : Faktor koreksi (10)

EE : Spektrum efek eritema

I : Intensitas spectrum matahari pada panjang gelombang

Abs : Absorbansi produk tabir surya

Panjang gelombang (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,087
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1

2. % Transmisi eritema (Widyawati *et al.*, 2019).

Penentuan nilai transmittan dapat ditentukan dengan cara berikut:

- a. Besarnya fluks eritema yang diteruskan oleh bahan aktif yang berfungsi sebagai tabir surya (Ee) dihitung dengan rumus Ee =

$$\sum T \cdot Fe$$

Lalu, untuk perhitungan % Transmisi eritema dapat dihitung dengan rumus:

$$\frac{Ee}{\sum Fe} = \frac{\sum(T \times Fe)}{\sum Fe}$$

Keterangan:

T : nilai transmisi

Fe : fluks eritema

E : $\sum T \cdot Fe$ = banyaknya fluks eritema yang diteruskan oleh ekstrak pada panjang gelombang 292,5 – 317,5

$\sum Fe$: jumlah total energi sinar UV yang menyebabkan eritema

3. % Transmisi pigmentasi (Widyawati *et al.*, 2019)

Penentuan nilai transmittan dapat ditentukan dengan cara berikut:

- a. Besarnya fluks pigmentasi yang diteruskan oleh bahan aktif yang berfungsi sebagai tabir surya (E_p) dihitung dengan rumus $E_p =$

$$\sum T \cdot Fp$$

Lalu, untuk perhitungan % Transmisi pigmentasi dapat dihitung dengan rumus:

$$\frac{E_p}{\sum Fp} = \frac{\sum(T \times Fp)}{\sum Fp}$$

Keterangan:

T : nilai transmisi

Fp : fluks pigmentasi

E_p : $\sum T \cdot Fp$ = banyaknya fluks pigmentasi yang diteruskan oleh ekstrak pada panjang gelombang 322,5 – 372,5 nm

$\sum Fp$: Jumlah total energi sinar UV yang menyebabkan pigmentasi

4. Analisis statistika

Dari ketiga parameter uji SPF, %Te dan, %Tp, nilai yang didapat masing-masing dilakukan uji normalitas menggunakan Shapiro Wilk untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak, hasil dikatakan normal jika mempunyai nilai sig >0,05. Dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan uji Levene's, hasil dikatakan homogen jika mempunyai nilai sig >0,05. Data SPF, %Te dan, %Tp yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen lalu dilanjutkan dengan analisa One Way ANOVA dengan sig < 0,05 maka H_0 diterima. Lalu dilakukan Uji *Post Hoc Test* LSD untuk mengetahui apakah suatu kelompok memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok lainnya. (Sari & Fitrianiingsih, 2020).