

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan metode ekstraksi maserasi dan ultrasonik untuk menetapkan nilai SPF, %Te dan %Tp ekstrak daun alpukat dengan pelarut etanol 96% Secara *In Vitro* Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Dilaksanakan di Laboratorium Prodi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Dilaksanakan pada bulan Juni 2023 – Agustus 2023.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini ialah daun alpukat (*Persea americana Mill*) diambil dari petani Kecamatan Purwosari, Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta

2. Penelitian ini menggunakan sampel dari pohon buah alpukat bagian daun alpukat (*Persea americana Mill*).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas
Metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) dan Maserasi yang dimodifikasi.
2. Variabel terikat
Nilai SPF, %Te, %Tp pada ekstrak daun alpukat.
3. Variabel terkendali
Pengaruh waktu panen, suhu pengeringan, waktu dan suhu ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun alpukat didapatkan dari proses ekstraksi menggunakan metode ultrasonikasi dan maserasi yang dimodifikasi dengan pelarut etanol 96%. Daun alpukat (*Persea americana Mill*) diperoleh dari petani di Kecamatan Purwosari, Kabupaten Gunung Kidul Daerah Istimewa Yogyakarta.
2. Maserasi yaitu suatu metode ekstraksi yang biasa dikenal sebagai metode peredaman, karena prosesnya dilakukan dengan cara merendam sampel dalam pelarut tanpa mengalami proses lain kecuali penggojogan atau pengadukan.
3. *Ultrasound Assisted Extration* (UAE) atau Ultrasonik yaitu metode ekstraksi menggunakan gelombang ultrasonik (gelombang akustik) 16 sampai 20 kHz.
4. Pengukuran nilai SPF, %Te dan %Tp suatu ekstrak etanol daun alpukat yang berpotensi sebagai tabir surya dapat dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis yaitu menggunakan sumber radiasi elektromagnetik. Panjang gelombang SPF (290-320 nm), %Te (292,5-317,5 nm), %Tp (332,5-375,5 nm) dengan menggunakan instrumen spektrofotometer yang hasilnya dimasukkan ke dalam persamaan.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, glinder, *ultrasonic bath (cole-parmer)*, batang pengaduk, neraca analitik (Ohaus px/224), tabung reaksi (*iwaki*), *beaker glass (iwaki)*, pipet tetes, spektrofometer UV-Vis *Single Beam (thermo scientific genesis 10S)*, *hot plate*,

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini daun alpukat, etanol 96% (teknis), etanol 70% (teknis), kertas saring, kloroform (teknis), asam sulfat 2 N, amoniak 0,05 N, metanol (teknis), HCl (teknis), FeCl₃ (reagen), akuades, dietil eter (teknis), KI, CH₃COOH glasial (teknis), Preaksi *dragendorff (reagen)*, *Mayer (reagen)*, *Wagner (reagen)*

G. Pelaksanaan penelitian

1. Determinasi sampel daun alpukat

Determinasi dilakukan untuk menentukan benar tidaknya sampel daun alpukat yang diperoleh dari perkebunan. Bagian tumbuhan yang dilakukan determinasi yaitu daun dari tanaman alpukat. Determinasi dilaksanakan di Laboratorium Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Penyiapan sampel penelitian

a. Pengolahan sampel

Sebanyak 3 kg daun alpukat diambil daun tua dengan kriteria berwarna hijau tua dan bagian yang utuh, diambil \pm 1 meter dari pucuk. Dilakukan sortasi basah dan pencucian, yang bertujuan untuk mendapatkan sampel yang bersih. Tahap selanjutnya, dilakukan perajangan yang bertujuan untuk mempermudah proses pengeringan. Pengeringan bertujuan untuk menurunkan kandungan air dalam simplisia sehingga tidak mudah ditumbuhi bakteri. Pengeringan menggunakan oven dengan suhu 40°C dikarenakan daun alpukat memiliki kandungan senyawa flavonoid yang tidak

tahan terhadap suhu diatas 50⁰C. Tahap selanjutnya sortasi kering untuk memisahkan benda asing atau bagian yang tidak digunakan yang masih tertinggal disimplisia. Tahap terakhir yaitu dihaluskan dengan grinder agar didapatkan partikel yang lebih kecil untuk mempermudah proses ekstraksi (Gafur & Rizki, 2021).

b. Ekstraksi sampel

Sampel diekstraksi dengan *Ultrasound Assisted Extration* (UAE) dan Maserasi yang dimodifikasi

1) Ekstraksi dengan UAE

Serbuk daun alpukat dengan perbandingan 1:10 dilarutkan dengan etanol 96% dalam botol duran. Diekstraksi dengan *ultrasonic bath* frekuensi 40 KHz dengan suhu 40⁰C, dan waktu 30 (Buanasari *et al.*, 2019). Larutan disaring dengan kertas saring. Didapatkan ekstrak cair lalu dipekatkan dengan penangas air suhu 40⁰C hingga didapatkan ekstrak kental.

2) Ekstraksi dengan Maserasi yang dimodifikasi

Serbuk daun alpukat dengan perbandingan 1:10 dilarutkan menggunakan etanol 96%. Diekstraksi dengan metode maserasi yang dimodifikasi dengan bantuan kompor listrik pada suhu 40⁰C dan waktu 30 menit. Larutan disaring dengan kertas saring. Didapatkan ekstrak cair lalu dipekatkan dengan penangas air suhu 40⁰C hingga didapatkan ekstrak kental.

Perhitungan persen rendemen dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (gram)}}{\text{bobot serbuk (gram)}} \times 100\%$$

Skrining fitokimia

Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa aktif meliputi, flavonoid, tanin, saponin, ialah kandungan dalam daun alpukat secara kualitatif.

1) Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram diekstraksi dengan metanol kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi. Selanjutnya dilarutkan dengan penambahan etanol 70% sebanyak 2 ml kemudian ditambahkan magnesium, 4 tetes HCL pekat. Terdapat flavonoid ditandai dari timbulnya warna merah, kuning.

2) Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan beberapa tetes larutan besi (III) klorida 3%. Jika terjadi perubahan warna coklat keruh menuju hitam menunjukkan adanya tanin.

3) Saponin

Sebanyak 0,5 gram tambahkan aquades panas sebanyak 10 ml ditunggu hingga dingin lalu dikocok kuat sekitar 10 detik sampai 15 detik. Terbentuk busa dengan tinggi antara 3 cm sampai 5 cm, bertahan sampai 5 menit membuktikan hasil positif saponin, dan sebaliknya.

4) Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram sampel daun alpukat diekstraksi dengan KI 5 mL dan ditambahkan CH_3COOH glasial 5 mL. Sampel dimasukan kedalam tabung reaksi sebanyak 10 tetes, tambahkan pereaksi mayer pada tabung reaksi. Endapan putih/kuning yang terbentuk menandakan positif adanya alkaloid, selanjutnya ekstrak daun alpukat ditambahkan pereaksi Bouchardat terbentuk endapan coklat

hingga hitam dikatakan positif alkaloid. Ekstrak daun alpukat direaksikan dengan pereaksi dragendrof sehingga terbentuk endapan coklat hingga hitam dikatakan positif alkaloid.

3. Analisis *Sun Protection Factor* (SPF)

1) Persiapan sampel ekstrak daun alpukat

Ekstrak daun alpukat dari hasil ekstraksi UAE dan Maserasi yang dimodifikasi dibuat larutan induk 3000 ppm dengan cara mengambil 75 mg ekstrak daun alpukat dan dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 25 mL, dibuat dalam konsentrasi yaitu 1000 ppm dengan cara mengambil sebanyak 3,3 mL larutan induk ekstrak etanol daun alpukat kemudian dimasukkan ke dalam labu takar lalu dilarutkan menggunakan etanol 96% sampai 10 mL.

2) Analisis SPF, %Te, %Tp

Penentuan nilai SPF secara *in vitro* dengan alat spektrofotometer UV-Vis. Setelah itu dibuat kurva serapan uji dalam kuvet, dengan panjang gelombang antara 290-320 nm, gunakan etanol 95% sebagai blanko setiap interval 5 menit dicatat nilai serapan, %Te diukur pada panjang gelombang 292,5–317,5 nm setiap interval 5 nm dan catat nilai yang didapatkan, lalu diukur %Tp pada panjang gelombang 322,5–375,5 nm setiap interval 5 dan catat nilai yang didapatkan.

H. Analisis Data

1. Perhitungan SPF

a) Persamaan Mansur

Nilai SPF dapat dihitung dengan persamaan Mansur. Nilai absorbansi ditulis tiap interval 5 nm pada panjang gelombang 290 sampai 320 nm. Nilai dari absorbansi yang didapatkan dikalikan dengan $EE \times 1$ pada tiap-tiap interval $EE \times 1$. Jumlah $EE \times 1$ diperoleh dikalikan dengan faktor koreksi yang nilainya

10 agar didapatkan nilai SPF pada sampel yang diuji. Hasil perhitungan nilai SPF selanjutnya disesuaikan pada klasifikasi nilai SPF sebagai berikut:

Tabel 5. Normalized Product Function

No	Panjang Gelombang (λ nm)	EE X 1
1	290	0,0150
2	295	0,0817
3	300	0,2874
4	305	0,3278
5	310	0,1864
6	315	0,0839
7	320	0,0180

(Soraya *et al.*, 2015)

b) Nilai Persentase Transmisi Eritema

Nilai transmisi eritema (%Te) dihitung menggunakan rumus:

$$\%Te = \frac{Ee}{\Sigma Fe} = \frac{\Sigma T x Fe}{\Sigma Fe}$$

Dimana T = nilai transmisi pada berbagai panjang gelombang 292,5 – 317,5 nm, Fe adalah fluks eritema yang nilainya pada panjang gelombang tertentu, Ee = $\Sigma T \cdot Fe$ = banyaknya fluks eritema (Ahmad, 2015).

c) Nilai transmisi pigmentasi (%Tp)

Nilai transmisi pigmentasi dihitung menggunakan rumus:

$$\%Tp = \frac{Ep}{\Sigma Fp} = \frac{\Sigma T x Fp}{\Sigma Fp}$$

Dimana T = nilai transmisi pada berbagai panjang gelombang, Fp adalah fluks pigmentasi yang nilainya pada panjang gelombang tertentu, Ep = $\Sigma T \cdot Fp$ = banyaknya fluks pigmentasi (Ahmad, 2015).

2. Analisis statistik

Semua data yang didapatkan dari penelitian dikumpulkan selanjutnya di analisis dengan cara *Statistical Program Service Solution* (SPSS) versi 25. Dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* ($P > 0,5$). Uji homogenitas *Leavene's*. Data terdistribusi normal dan homogen maka diuji dengan uji T. Data tidak terdistribusi normal dilakukan uji non parametrik yaitu *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok. Data dinyatakan berbeda signifikan apabila $p < 0,05$. Pada pengukuran nilai SPF diperoleh data normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji T *Independent*. Pada pengukuran nilai %Te diperoleh tidak normal dan tidak homogen maka dilanjutkan uji non parametrik dengan *Mann-Whitney*. Pada pengukuran nilai %Tp diperoleh data normal dan tidak homogen maka dilanjutkan uji non parametrik dengan *Mann-Whitney*.