

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini ialah penelitian eksperimental yang dilakukan secara *in vitro* di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Metode yang digunakan dalam penelitian ini ialah metode *Response Surface Methodology* (RSM) yang bertujuan untuk mengetahui suhu dan waktu ekstraksi sonikasi yang optimal.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **1. Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biofarmakologi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

##### **2. Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2022 sampai dengan bulan Juni 2022.

#### **C. Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini ialah daun tayuman (*B. purpurea*) yang didapat dari Kecamatan Playen Gunung Kidul Yogyakarta dengan titik koordinat -7.937251,110.543687 yang memiliki kriteria daun masih muda segar dan berwarna hijau muda (urutan ke-2 sampai 4 dari pucuk tanaman).

#### **D. Variabel Penelitian**

##### **1. Variabel bebas**

Suhu dan waktu ekstraksi sonikasi.

##### **2. Variabel terikat**

Nilai SPF, %Te dan %Tp pada ekstrak etanol daun tayuman (*B. purpurea*.)

### 3. Variabel terkontrol

Waktu pengambilan sampel, pemilihan daun, pelarut ekstraksi dan metode ekstraksi.

#### E. Definisi Operasional Variabel

1. Rentang suhu yang digunakan adalah 20°C sampai 50°C.
2. Rentang waktu yang digunakan adalah 15 menit sampai 60 menit.
3. Desain faktorial yang digunakan adalah aplikasi *Minitab Version 17*.
4. Ekstrak daun tayuman (*B. purpurea*) adalah ekstrak hasil ekstraksi sonikasi daun tayuman menggunakan pelarut etanol 70%.
5. Penentuan nilai SPF pada ekstrak etanol daun tayuman dilakukan secara *in vitro* dengan *instrument* spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 290 sampai 320 nm, dan kemudian hasil yang didapat dimasukkan ke dalam persamaan Mansur.
6. Penentuan %Te pada ekstrak etanol daun tayuman dilakukan secara *in vitro* dengan *instrument* spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 290 sampai 320 nm, sedangkan penentuan %Tp dilakukan pada panjang gelombang 320 sampai 370 nm, dan hasil yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam persamaan.

#### F. Alat dan Bahan

1. Alat
  - a. Alat yang digunakan pada proses penyiapan simplisia yaitu grinder dan pisau.
  - b. Alat yang digunakan pada proses pembuatan ekstrak etanol daun tayuman yaitu neraca analitik (Ohaus SW version 10S), alat-alat gelas laboratorium, sonikator (colepalmer) dan penangas air.
  - c. Alat yang digunakan pada proses uji fitokimia yaitu alat-alat gelas laboratorium, micropipet (Eppendorf) dan penangas air.
  - d. Alat yang digunakan pada proses penentuan nilai SPF, %Te dan %Tp yaitu alat-alat gelas laboratorium, neraca analitik, *stopwatch*, sonikator

(colepalmer), dan seperangkat alat spektrofotometer Uv-Vis (Genesys 10s Uv-Vis Spectrophotometer).

## 2. Bahan

- a. Bahan uji pada penelitian ini yaitu daun tayuman muda yang didapat dari Desa Ngawu, Kecamatan Playen, Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta.
- b. Bahan yang digunakan pada proses pembuatan ekstrak etanol daun tayuman yaitu daun tayuman muda, etanol 70%, kertas label, dan kertas saring.
- c. Bahan yang digunakan pada proses uji fitokimia yaitu ekstrak etanol daun tayuman, etanol 70%, kertas saring, serbuk magnesium, HCl 2N, aquadest, FeCl<sub>3</sub>, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, kloroform, CH<sub>3</sub>CHOOH anhidrat dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat.
- d. Bahan yang digunakan pada proses penentuan nilai SPF, %Te dan %Tp adalah ekstrak etanol daun tayuman, etanol p.a dan kertas saring.

## G. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Determinasi sampel daun tayuman

Pada penelitian ini dilakukan determinasi tanaman daun tayuman (*B. purpurea*) di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

### 2. Penyiapan simplisia

Sampel daun tayuman (*B. purpurea*) dicuci dan disortasi basah untuk membersihkan dari partikel asing atau kotoran yang menempel, lalu dipotong kecil-kecil. Daun tayuman kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C. Setelah kering, dihitung kadar air yang ada pada daun tayuman, kemudian daun dihaluskan menggunakan grinder sampai menjadi serbuk. Daun yang sudah menjadi serbuk kemudian diayak menggunakan ayakan 40 mesh sampai serbuk menjadi lebih halus.

### 3. Desain faktorial

Jenis penelitian ini ialah penelitian eksperimental yang menggunakan dua faktor yaitu suhu dan waktu ekstraksi, serta memiliki dua level yakni level

rendah (-1) dan level tinggi (+1), seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 5**. Hasil kombinasi faktor dan level akan mendapatkan total perlakuan sebanyak 14 yang ditunjukkan pada **Tabel 6**.

**Tabel 5.** Faktor dan level yang digunakan dalam penelitian

Faktor	Level (-1)	Level (+1)
Suhu (A)	20°C	50°C
Waktu (B)	15 menit	60 menit

**Tabel 6.** Kombinasi Perlakuan

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Rendemen	SPF	% Te	% Tp
1	1	1	1	20	15				
2	2	1	1	50	15				
3	3	1	1	20	60				
4	4	1	1	50	60				
5	5	0	1	35	37,5				
6	6	0	1	35	37,5				
7	7	0	1	35	37,5				
8	8	-1	2	13,7868	37,5				
9	9	-1	2	56,2132	37,5				
10	10	-1	2	35	5,6802				
11	11	-1	2	35	69,3198				
12	12	0	2	35	37,5				
13	13	0	2	35	37,5				
14	14	0	2	35	37,5				

#### 4. Ekstraksi sampel

Ditimbang 10 gram serbuk simplisia daun tayuman dan larutkan dalam 100 ml etanol 70%. Dilakukan proses sonikasi dengan frekuensi 40 kHz pada suhu dan waktu yang ditentukan. Setelah selesai proses sonikasi, sampel disaring dan filtrat yang didapat dipekatkan di atas penangas air pada suhu 50°C hingga didapatkan ekstrak yang kental (Suryanto & Taroreh, 2020). Setelah itu dihitung persen rendemen dari ekstrak kental yang didapat dengan rumus sebagai berikut :

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

#### 5. Uji fitokimia

Pengujian fitokimia dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui senyawa aktif yang ada didalam daun tayuman (*B. purpurea*). Pengujian ini

terdiri dari uji fenol, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan alkaloid. Pengujian ini diawali dengan menimbang ekstrak sebanyak 200 mg, kemudian dilarutkan dengan masing-masing pelarut pada tiap-tiap uji dan dilakukan proses skrining fitokimia sebagai berikut :

a. Uji fenol

Diambil beberapa ekstrak sampel dan larutkan dengan air suling. Masukkan sampel ke dalam droplet dan tambahkan  $\text{FeCl}_3$  sebanyak 1-2 tetes. Apabila ketika penambahan larutan  $\text{FeCl}_3$  pada larutan menghasilkan warna hijau hingga biru kehitaman maka hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak sampel positif mengandung senyawa fenol (Chandra dkk., 2019).

b. Uji flavonoid

Diambil beberapa ekstrak sampel dan larutkan dengan etanol. Masukkan sampel ke dalam droplet dan tambahkan dengan serbuk magnesium dan HCl 2N sebanyak 3 tetes. Apabila terjadi perubahan warna pada larutan menjadi warna jingga, merah atau kuning maka hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak sampel positif mengandung senyawa flavonoid (Lestari & Prajuwita, 2021).

c. Uji tanin

Diambil beberapa ekstrak sampel dan larutkan dengan air suling. Masukkan sampel ke dalam droplet dan tambahkan dengan  $\text{FeCl}_3$  sebanyak 1-2 tetes. Apabila larutan berubah warna menjadi warna biru atau hijau maka hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak sampel positif mengandung senyawa tanin (Lestari & Prajuwita, 2021).

d. Uji saponin

Diambil beberapa ekstrak sampel dan larutkan dengan aquadest panas, kemudian dinginka. Masukkan sampel ke dalam tabung reaksi dan tambahkan HCl 2 N sebanyak 1 tetes dan dikocok kuat. Apabila terdapat buih dengan tinggi 1 hingga 10 cm yang tidak hilang selama 10 menit maka hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak sampel positif mengandung senyawa saponin, (Lestari & Prajuwita, 2021).

e. Uji steroid

Diambil beberapa ekstrak sampel dan larutkan dengan kloroform, setelah itu masukkan ke dalam droplet dan biarkan kloroform nya menguap. Tambahkan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  anhidrat sebanyak 2 tetes, dan aduk sampai larut. Tambahkan 2 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Apabila larutan berubah warna menjadi warna biru atau hijau maka hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak sampel positif mengandung senyawa steroid (Lestari & Prajuwita, 2021).

f. Uji alkaloid

Diambil beberapa ekstrak sampel kemudian tambahkan dengan  $\text{HCl}$  2 N dan air suling. Setelah itu masukkan sampel ke dalam droplet dan tambahkan dengan masing-masing pereaksi dragendorff dan pereaksi mayer. Pada uji dragendorff apabila terdapat endapan yang berwarna merah bata maka hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak sampel mengandung senyawa alkaloid, sedangkan pada uji mayer apabila terdapat endapan yang berwarna putih atau kuning maka hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak sampel mengandung senyawa alkaloid (Lestari & Prajuwita, 2021).

**6. Penentuan nilai SPF**

Ditimbang 10 mg sampel kemudian masukkan ke dalam labu takar, dan larutkan dengan 10 ml etanol p.a, lalu sonikasi larutan hingga larut dan diukur nilai serapannya menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Sebelumnya spektrofotometri UV-Vis dikalibrasi lebih dulu menggunakan etanol p.a. Nilai serapan diukur pada panjang gelombang 290 sampai 320 nm dengan interval tiap 5 nm, pada proses ini digunakan etanol p.a sebagai blanko. Diulangi perlakuan yang sama sebanyak tiga kali. Setelah itu tentukan nilai SPF menggunakan persamaan Mansur (Ramdani dkk., 2021).

**7. Penentuan %Te dan %Tp**

Ditimbang 10 mg ekstrak sampel dan masukkan ke dalam labu takar, kemudian dilarutkan dengan 10 ml etanol p.a. lalu sonikasi larutan hingga larut. Setelah itu ukur nilai serapannya untuk %Te pada panjang gelombang 290 sampai 320 nm, sedangkan %Tp pada panjang gelombang 320-370 nm dengan interval tiap 5 nm, pada proses ini digunakan etanol p.a sebagai blanko.

Diulangi perlakuan yang sama sebanyak tiga kali. Setelah itu tentukan nilai %Te dan %Tp dengan rumus yang telah ditentukan (Lalu dkk., 2017).

## H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

### a. Penentuan nilai SPF

Penentuan nilai SPF dapat dilakukan dengan menghitung menggunakan metode Mansur dkk, (1986) dengan rumus sebagai berikut :

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Dimana :

CF : faktor koreksi (10)

EE ( $\lambda$ ) : efek eritematogenik dari radiasi panjang gelombang

I ( $\lambda$ ) : intensitas radiasi matahari pada panjang gelombang

Abs ( $\lambda$ ) : absorbansi spektrofotometri pada panjang gelombang

Nilai (EE x I) merupakan nilai tetap. Nilai tersebut ditetapkan oleh Sayre et al. (1979) yang didapatkan dari pengukuran pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 290-320 nm dengan interval 5 nm.

### b. Penentuan %Transmisi Eritema (%Te)

Penentuan %transmisi eritema dapat dilakukan dengan menghitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{Transmisi eritema} = \frac{Ee}{\sum Fe} = \frac{\sum(T \times Fe)}{\sum Fe}$$

Dimana :

T : nilai transmisi

Fe : fluks eritema pada panjang gelombang 290 sampai 320 nm

Ee : jumlah fluks eritema yang diteruskan oleh ekstrak

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

### c. Penentuan %Transmisi Pigmentasi (%Tp)

Penentuan %transmisi pigmentasi dapat dilakukan dengan menghitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{Transmisi eritema} = \frac{E_e}{\sum F_p} = \frac{\sum (T \times F_p)}{\sum F_p}$$

Dimana :

T : nilai transmisi

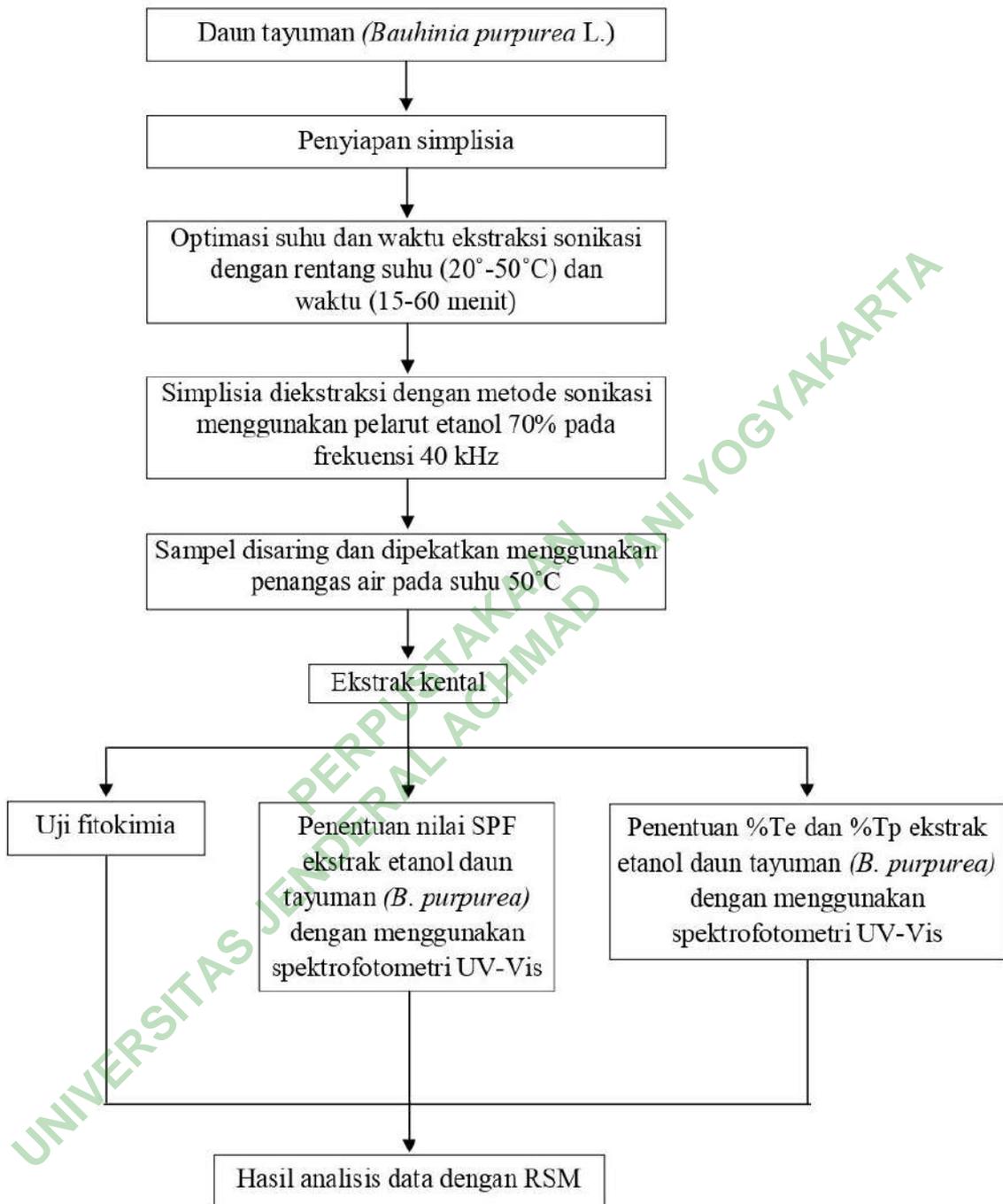
F<sub>p</sub> : fluks pigmentasi pada panjang gelombang 320 sampai 370 nm

E<sub>p</sub> : jumlah fluks pigmentasi yang diteruskan oleh ekstrak

∑F<sub>p</sub> : jumlah total energi sinar UV yang dapat menyebabkan pigmentasi

### d. Analisis data

Analisis statistik pada penelitian ini menggunakan metode RSM (*Response Surface Methodology*) tipe CCD (*Central Composite Design*) pada aplikasi *Minitab Version 17*. Rancangan ini dipergunakan untuk mengetahui ada atau tidak pengaruh suhu dan waktu ekstraksi terhadap nilai SPF, %Te dan %Tp pada ekstrak etanol daun tayuman (*B. purpurea*) dan diperoleh nilai prediksi kondisi optimal untuk ekstraksi. Hasil prediksi dan aktual kemudian dibandingkan dengan T-test perbedaan signifikan jika  $P < 0,05$ .



**Gambar 4.** Skema Penelitian