

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian praeksperimental atau Pendekatan one shot case study dengan rancangan acak lengkap (RAL) untuk mengetahui perbedaan nilai SPF dari ketiga fraksi ekstrak kulit buah kecapi, dimana tiap pengujian dilakukan secara tiga kali ulangan.

#### **3.2. Sampel**

Sampel yang digunakan menggunakan kulit buah kecapi yang di ambil secara *purposive sampling* di perkebunan masyarakat di desa Ciwulan Kecamatan Telagasari, Kabupaten Karawang.

#### **3.3. Bahan dan Alat**

##### **3.3.1. Bahan**

Kulit buah kecapi,  $\text{NaNO}_2$  (Brataco),  $\text{AlCl}_3$  (Brataco), Etanol P.a, Metanol p.a, DPPH (p.a), Vitamin c (p.a), Mg, HCL,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  p.a,  $\text{FeCl}_3$ , Eter, Kloroform, Amil Alkohol, KOH, Vanilin, Reagen Dragendrof, Reagen Mayer, a (Brataco), NaOH, , Aquades, Etanol 70%, Etil asetat, N-heksan.

### 3.3.2. Alat

Mortar besar & alu, gelas ukur (pyrex), labu erlenmeyer (pyrex), gelas bekker, cawan porselen, pipet tetes, batang pengaduk, spatula, corong pisah, *rotary evaporator* (Heidolph tipe Hei-VAP), penangas air (Memmert), timbangan analitik (Ohaus), dan Spektrofotometer UV-Vis (Thermoscientific Genesys 150).

## 3.4. Variabel Penelitian

### 3.4.1. Klasifikasi Variabel

#### 3.4.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini adalah tiga fraksi ekstrak kulit buah kecap meliputi: fraksi N-heksan, etil asetat dan air.

#### 3.4.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat meliputi Penapisan kadar fitokimia (alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin, kuinon, saponin, monoterpenoid dan sesquiterpenoid, monoterpenoid dan sesquiterpenoid, triterpenoid dan steroid), proksimat (uji air, uji susut pengeringan, dan uji kadar abu), dan pengukuran kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol terikat meliputi pengukuran total flavonoid ekstrak etanol kulit buah kecap dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Penentuan

efektivitas fraksi ekstrak ethanol kulit buah kecap dilakukan dengan menentukan nilai SPF secara in vitro dengan spektrofotometer UV-Vis.

### 3.4.2. Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3. 1** Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
<b>Variabel Bebas</b>					
1.	Fraksinasi ekstrak	Fraksinasi ekstrak kulit buah kecap	-	Nominal	-
<b>Variabel Terikat</b>					
1.	Skrining fitokimia	Skrining fitokimia adalah metode yang dapat digunakan untuk mengetahui komponen senyawa aktif yang terdapat pada sampel	Reaksi Kimia	-	-
2.	Uji kadar air	Uji kadar air yang ada dalam ekstrak kulit buah kecap menggunakan alat oven dan desikator	Oven dan Desikator	Rasio	%
2.	Uji susut pengeringan	Uji susut pengeringan yang ada dalam ekstrak kulit buah kecap menggunakan alat oven dan desikator	Oven dan Desikator	Rasio	%
4	Uji kadar abu	Uji kadar abu yang ada dalam ekstrak kulit kecap	Tanur	Rasio	%

		menggunakan alat tanur			
5	Total flavonoid ekstrak etanol kulit buah kecap	Pengujian flavonoid dari ekstrak etanol kulit buah kecap	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio	Catechin equivalent (CE) (mg/g)
6	Uji aktivitas antioksidan	Pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol kulit buah kecap menggunakan metode DPPH	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio	$\mu\text{g/L}$
7	Pengukuran Nilai SPF	Penentuan efektivitas fraksi ekstrak etanol kulit buah kecap dilakukan dengan menentukan nilai SPF secara <i>in vitro</i> dengan spektrofotometer UV-Vis.	spektrofotometer UV-Vis.	Rasio	Nm

### 3.5. Prosedur Penelitian

#### 3.5.1. Tahap Persiapan Bahan Baku

Kulit buah kecap di ambil secara *purposive sampling* di perkebunan masyarakat di desa Ciwulan Kecamatan Telagasari, Kabupaten Karawang, serta kulit buah kecap di determinasi terlebih dahulu untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang di pakai. Determinasi dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong. Setelah itu, kulit buah kecap yang di

dapat kemudian di rajang, lalu dibersihkan menggunakan air mengalir kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari.

### 3.5.2. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kecapi

Kulit buah kecap yang sudah kering, dihaluskan menggunakan blender dan dimasukkan kedalam erlenmeyer, dan ditambahkan etanol 70% sampai semua kulit buah kecap terendam untuk selanjutnya dimaserasi selama 1 hari. Setelah itu disaring dan dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* selanjutnya dihitung nilai rendemen dengan rumus sebagai berikut (Modifikasi Fitriana *et al.*, 2016) :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak Total}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100 \%$$

### 3.5.3. Skrining Fitokimia

Skrining Fitokimia diawali dengan membuat filtrat A dan B, Filtrat A dibuat dengan cara mencampurkan 1 gram simplisia dengan akuades lalu dipanaskan dan setelahnya didinginkan lalu siap untuk diuji, dan filtrat B dibuat dengan cara 1 gram simplisia dicampurkan dengan eter dan digerus kuat lalu siap untuk diuji. Skrining fitokimia meliputi:

#### 1. Alkaloid

Masing-masing tabung reaksi yang berisi 2-3 mL filtrat A, lalu tambahkan dengan masing-masing 1% amonia dan kloroform. Setelah itu ambil lapisan kloroform dan ditempatkan pada tabung reaksi, lalu ditambahkan HCl 2 N dan kocok kuat hingga terbentuk lapisan. Lapisan

asam di pipet dan dibagi menjadi tiga tabung berbeda, tabung reaksi 1 ditambahkan pereaksi mayer, dan tabung reaksi 2 ditambahkan pereaksi dragendrof dan tabung ke tiga digunakan sebagai blangko. Hasil positif ditunjukkan pada tabung reaksi 1 dengan membentuk endapan putih dan tabung reaksi 2 merah kecoklatan (Tjitraesmi et al., 2020).

## 2. Flavonoid

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan dengan 0,2 gram logam Mg dan 2 tetes HCl 2 N, lalu tambahkan amil alkohol dan kocok kuat, biarkan beberapa menit, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning sampai merah (Harborne, 1987).

## 3. Polifenol

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1% jika terbentuk warna biru kehitaman maka hasil yang didapatkan ialah positif (Tjitraesmi et al., 2020).

## 4. Tanin

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan pelarut gelatin 1% jika terbentuk endapan putih pada larutan menunjukkan hasil yang positif (Tjitraesmi et al., 2020).

## 5. Kuinon

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan larutan KOH 5%. Jika terbentuk warna kuning hingga merah maka menunjukkan hasil yang positif (Tjitraesmi et al., 2020).

## 6. Saponin

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan akuades dan didihkan, lalu filtrat dikocok dan didiamkan selama 15 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa setelah didiamkan atau setelah penambahan HCL (Harborne, 1987; Tjitraesmi et al., 2020).

## 7. Triterpenoid

Masukan filtrat I filtrat B lalu diuapkan hingga kering, lalu ditetaskan pereaksi Lieberman-Burchard. Jika hasil positif senyawa golongan triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu dan senyawa golongan steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru kehijauan (Tjitraesmi et al., 2020).

### 3.5.4. Pengukuran Total Flavonoid

#### 1. Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak kulit buah kecap ditimbang sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan dengan metanol hingga 5.0 mL (konsentrasi larutan 1.000  $\mu\text{g/mL}$ ). Dipipet sebanyak 500  $\mu\text{L}$  larutan uji kemudian methanol hingga 5.0 mL (konsentrasi larutan 100  $\mu\text{g/mL}$ )

#### 2. Pembuatan Larutan Standar

Ditimbang 5 mg quersetin kemudian dilarutkan dengan metanol hingga 5.0 mL (konsentrasi larutan 1.000  $\mu\text{g/mL}$ ). Dipipet 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, dan 500  $\mu\text{L}$  kedalam labu ukur dan didapatkan konsentrasi sampel 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, dan 100  $\mu\text{g/mL}$ . (Leliana NW., 2013).

### 3. Pembuatan Larutan $\text{NaNO}_2$ 5%

Ditimbang sebanyak 1,25 g  $\text{NaNO}_2$  lalu dilarutkan dengan aquadest hingga 25 mL

### 4. Pembuatan Larutan $\text{AlCl}_3$ 10%

Ditimbang 2.5 g  $\text{AlCl}_3$  lalu dilarutkan dengan aquadest hingga 25 mL

### 5. Pembuatan Larutan $\text{NaOH}$ 1M

Ditimbang 4 g  $\text{NaOH}$ , lalu dilarutkan dengan aquadest hingga 100 mL

### 6. Penentuan Kandungan Flavonoid Total

Dimasukkan 1 mL larutan sampel kedalam vial yang sebelumnya sudah ditambahkan dengan 0.3 mL larutan  $\text{NaNO}_2$  5%, dibiarkan selama 5 menit. Larutan ditambahkan dengan 0.3 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan dibiarkan selama 6 menit, selain itu tambah 2 mL  $\text{NaOH}$  1M, segera ditambah 2.4 mL aquadest, dikocok. Absorbansi diukur pada

panjang gelombang 415 nm. Percobaan dilakukan tiga kali ulangan dan penentuan total flavonoid dinyatakan dalam catechin equivalent (CE) (mg/g) dengan rumus berikut (Zou *et al.*, 2004):

$$\text{Total Flavonoid CE} = c \left( \frac{V}{m} \right)$$

Dimana c adalah konsentrasi total flavonoid dari kurva standar katekin(mg/L), V adalah volume ekstrak (L), dan m = berat ekstrak (g)

### 3.5.5. Standarisasi Ekstrak

#### 1. Uji Kadar Abu

Cawan pengabuan dikeringkan di dalam oven selama 1 jam pada suhu 60°C, kemudian didinginkan selama 15 menit di dalam desikator dan ditimbang hingga didapatkan berat yang konstan. Sebanyak 1 g sampel ekstrak kecap dimasukkan ke dalam cawan pengabuan. Cawan berisi sampel dibakar di atas kompor listrik sampai tidak berasap dan dimasukkan ke dalam tanur pengabuan dengan suhu 600°C selama 1 jam. Selanjutnya cawan tersebut dimasukkan dalam desikator kemudian ditimbang.

$$\text{Kadar abu \%} = \frac{B - A}{C} \times 100 \%$$

Keterangan :

A = Berat cawan abu kosong (g)

B = Berat cawan abu + sampel setelah dikeringkan (g)

C = Berat sampel (g)

## 2. Uji Susut Pengerinan

Lakukan pemanasan cawan pada suhu 105° C selama 30 menit setelahnya ditambahkan 1-2 gr ekstrak, lalu ekstrak diratakan hingga membentuk lapisan setebal 5-10 mm kemudian dipanaskan kembali pada suhu 105° C selama 30 menit, setelahnya masukan ke dalam desikator kemudian ditimbang. Ulangi perlakuan sampai bobot tetap.

Susut pengerinan dihitung dengan rumus dibawah ini:

$$\% \text{ Susut Pengerinan} = \frac{W_1 - W_0 - (W_2 - W_0)}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

Keterangan:

W0 = berat cawan kosong

W1 = berat cawan + ekstrak

W2 = berat cawan + hasil pengerinan

## 3. Uji Kadar Air

Cawan kosong ditimbang menggunakan timbangan analitik kemudian dimasukan sampel ekstrak kecap ke dalam cawan kosong sebanyak 1 g dan timbang, setelah itu cawan berisi ekstrak kecap ditimbang dan dimasukkan dalam oven pada suhu 105° C selama 5 jam sampai bobot konstan. Setelah di oven dimasukkan cawan ke dalam desikator selama 1 jam kemudian ditimbang. Dihitung kadar air pada ekstrak kecap dengan rumus berikut ini :

$$\text{Kadar air } \% = \frac{B_1 - B_2}{B} \times 100 \%$$

Keterangan :

B = Berat sampel (g)

B1 = Berat (sampel + cawan) sebelum dikeringkan (g)

B2 = Berat (sampel + cawan) setelah dikeringkan (g)

### 3.5.6. Uji Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Kecapi

Uji antioksidan ekstrak kulit buah kecapi terdiri dari pembuatan larutan DPPH, penentuan Panjang Gelombang Maksimum, pembuatan larutan blanko, pembuatan larutan Vitamin C, pembuatan larutan ekstrak kulit buah kecapi dan uji aktivitas antioksidan kulit buah kecapi (Agustini, 2020)

#### 1. Pembuatan larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat dengan konsentrasi 50 ppm yakni dengan menimbang DPPH sebanyak 5 mg kemudian tambahkan metanol p.a sampai 100 mL (0,1 mM)

#### 2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Ambil larutan DPPH sebanyak 4 mL pada kuvet kemudian dimasukkan pada spektrofotometri UV-Vis dan mengukurnya pada panjang gelombang 517 nm untuk mendapatkan absorbansi  $\pm 0,2-0,8$ .

#### 3. Pembuatan Larutan Blanko

Sebanyak 2 mL larutan DPPH di dimasukkan kedalam kuvet lalu ditambahkan dengan metanol p.a sebanyak 2 mL (dengan perbandingan 1:1), kemudian di inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C, lalu diukur

serapan nya pada Panjang gelombang 517 nm. Semua perlakuan di ruangan yang tertutup dan terhindar dari cahaya serta pengerjaan dilakukan replikasi sebanyak 3x.

#### **4. Pembuatan Larutan Vitamin C**

Membuat larutan Vitamin C dengan menimbang sebanyak 5 mg Vitamin c kemudian dimasukan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas, sehingga didapat larutan vitamin c dengan konsentrasi 50 ppm. Lalu dari larutan induk 50 ppm dibuat variasi konsentrasi 8 ppm, 4 ppm, 2 ppm dan 1 ppm. dengan cara memipet larutan induk sebanyak 4 mL, 2 mL, 1 mL, dan 0,5 mL dan dilarutkan kedalam 25 mL metanol p.a.

#### **5. Pembuatan Larutan Ekstrak Kulit Buah Kecapi**

Pembuatan larutan induk pada konsentrasi 10000 ppm lalu dibuat variasi konsentrasi 100 ppm, 250 ppm, 750 ppm, 2500 ppm, 7500 ppm dan masing-masing variasi konsentrasi dilarutkan dalam 25 mL metanol p.a pada labu ukur 25 mL.

#### **6. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Kecapi**

Pengujian dilakukan dengan cara memipet larutan Ekstrak Kulit Buah Kecapi sebanyak 2 mL masing-masing konsentrasi kemudian ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Lalu di inkubasi selama 30 menit. Kemudian ukur absorbansi nya dengan menggunakan spektrofotometri

UV-Vis dan perlakuan dilakukan berulang sebanyak 3x. setelah itu dilakukan pengukuran  $IC_{50}$  dengan rumus sebagai berikut:

$$Y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 - \frac{X}{IC_{50}} \text{ Hill coefficient}}$$

Pengukuran persentase penghambatan dilakukan dengan menggunakan rumus (Agustini, 2020):

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{Ab - As}{Ab} \times 100\%$$

$Ab$  = Absorbansi blanko = nilai absorbansi DPPH

$As$  = Absorbansi sampel = nilai absorbansi sampel

Berdasarkan (Aprilia & Putri, 2015; Fatmawaty *et al.*, 2019; Rosidah & Tjitraresmi, 2017) terdapat klasifikasi antioksidan berdasarkan nilai  $IC_{50}$  pada metode DPPH yang digunakan:

**Tabel 3. 2** Klasifikasi Kekuatan Antioksidan

Nilai	Tingkatan
$IC_{50} < 50 \mu\text{g}/\text{Ml}$	Sangat Kuat
$IC_{50} 50-100 \mu\text{g}/\text{Ml}$	Kuat
$IC_{50} 101-250 \mu\text{g}/\text{mL}$	Sedang
$IC_{50} 250-500 \mu\text{g}/\text{Ml}$	Lemah
$IC_{50} > 500 \mu\text{g}/\text{Ml}$	Tidak Aktif

### 3.5.7. Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Kecapi

Ekstrak kental dilarutkan dengan air panas dan difraksinasi dengan berbagai pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya. Sampel dimasukkan dalam corong pisah. Proses fraksinasi diawali dengan pelarut non polar yaitu n-heksan dan dilakukan 4 kali pengulangan, sehingga akan di dapat 2 fraksi yaitu fraksi n-heksan dan fraksi air. Fraksi air dilanjutkan dengan pelarut semi polar yaitu etil asetat secukupnya dilakukan 4 kali pengulangan, sehingga di dapat 2 fraksi yaitu fraksi etil asetat dan fraksi air. kemudian masing-masing fraksi diuapkan dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator hingga menjadi ekstrak kental.( Nofa Putriani et al., 2020; Eka Junita et al., 2019)

### 3.5.8. Penentuan nilai SPF

Menurut Modifikasi Noviarda et al, (2019) Penentuan efektivitas tabir surya dilakukan dengan menentukan nilai SPF secara in-vitro dengan spektrofotometri UV-Vis. Masing-masing fraksi ekstrak kulit buah kecap dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 25 mL, dicampur hingga homogen. Lalu disaring dan di endapkan menggunakan alat sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, setelahnya lakukan penyaringan larutan menggunakan kertas Whatman No.1 (Widyawati et al., 2019; Ermawati et al., 2020). Setelah itu ditentukan

absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 290, 295, 300, 305, 310, 315 dan 320 nm untuk penentuan nilai SPF pada setiap interval 5 nm dan bandingkan menggunakan etanol sebagai blanko, serta dilakukan tiga kali penentuan pada setiap titik panjang gelombang lalu dilanjutkan dengan penghitungan nilai SPF setelah itu hitung efek perlindungannya dalam perlindungan dari radiasi UV-B. Sebelum dilakukan pengujian maka dilakukan kalibrasi spektrofotometri UV-Vis terlebih dahulu dengan menggunakan etanol p.a. (Dutra et al., 2004; Widyawati et al., 2019). Berikut ini persamaan Mansyur:

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

Keterangan :

CF : Faktor Koreksi (10)

EE : Spektrum Efek Eritema

I : Spektrum Intensitas Matahari

Abs : Absorbansi Sampel

Pada nilai EE x I adalah konstanta, maka ditentukan dengan tabel dibawah ini (Sinala & Salasa, 2019):

**Tabel 3. 4** Nilai EE (Erythemal effect spectrum) x I (Solar intensity)

Panjang Gelombang ( $\lambda$ nm)	Nilai EE $\times$ I
-----------------------------------	---------------------

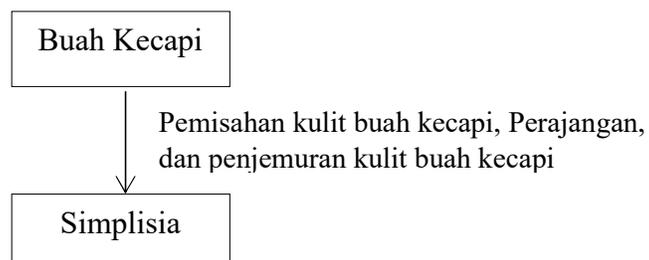
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

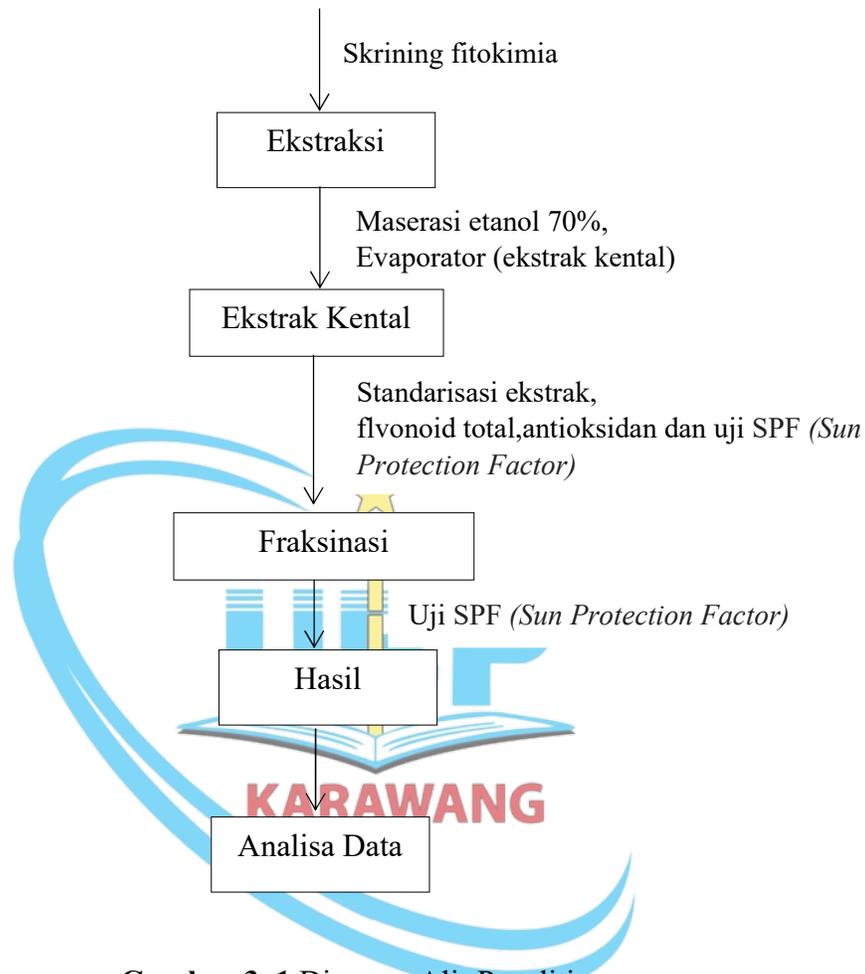
Berikut ini tabel nilai fotoproteksi tabir surya berdasarkan nilai SPF (Latha *et al.*, 2013; Donglikar and Deore, 2016):

Nilai SPF	Level Proteksi
2-4	Proteksi lemah
4-8	Proteksi sedang
8-15	Proteksi maksimal
15-24	Proteksi sangat maksimal
25-39	Proteksi ultra
40-50+	Proteksi power

### 3.6. Diagram Alir Penelitian

Berikut ini merupakan diagram alir penelitian:





**Gambar 3. 1** Diagram Alir Penelitian

### 3.7. Analisis Data

Analisis univariat digunakan untuk memperoleh gambaran distribusi meliputi pengukuran Total Flavonoid, Uji Aktivitas Antioksidan metode DPPH dan Uji SPF (*Sun Protection Factor*). Data ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik.

Analisis bivariat digunakan untuk menentukan Perbedaan nilai SPF dari hasil fraksi apabila terdistribusi normal maka digunakan uji ANOVA, apabila distribusi tidak normal maka menggunakan uji Kruskal-Wallis dengan pos hoc Man-Whitney.

Uji *post hoc Tamhane* merupakan uji kelanjutan dari uji ANOVA digunakan untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antara masing-masing kelompok perlakuan.

### **Cara Penafsiran dan Penyimpulan Data**

H<sub>0</sub> : Tidak terdapat aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol kulit buah kecapi. dan aktivitas *Sun Protection Factor* (SPF) dari ekstrak dan fraksi ekstrak etanol kulit buah kecapi.

H<sub>a</sub> : Terdapat aktivitas antioksidan dan dari ekstrak etanol kulit buah kecapi. dan aktivitas *Sun Protection Factor* (SPF) dari ekstrak dan fraksi ekstrak etanol kulit buah kecapi.

