

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian deskriptif.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, dan Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Prodi Farmasi, Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2023 sampai bulan April 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun kakao yang berada di Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT).

2. Sampel dan teknik *sampling*

a) Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kakao (*Thebroma cacao* L.) yang diambil dari Desa Niukbaun, Kecamatan Amarasi Barat, Kabupaten Kupang, NTT.

b) Teknik *sampling*

Teknik *sampling* yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik *sampling* non-acak (*non-probability sampling*) jenis *purposive sampling*, dengan kriteria daun berwarna hijau dan segar.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan konsentrasi 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, dan 900 ppm.

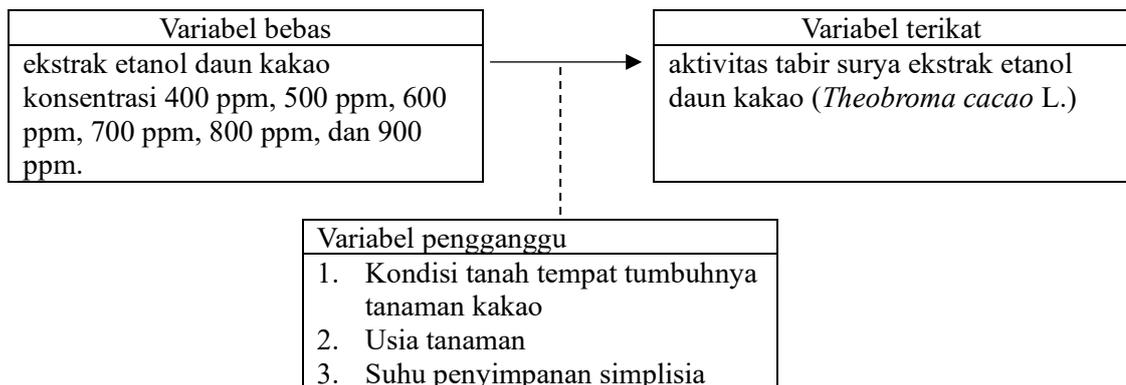
2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas tabir surya ekstrak etanol daun kakao (*Theobroma cacao* L.).

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu dari penelitian ini adalah kondisi tanah tempat tumbuhnya tanaman kakao, usia tanaman dan suhu penyimpanan simplisia.

E. Kerangka Konsep



Keterangan :

(→) variabel bebas dan variabel terikat (diteliti)

(---) variabel pengganggu (tidak diteliti)

Gambar 1. Kerangka konsep

F. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
1.	Aktivitas tabir surya	Kemampuan ekstrak etanol daun kakao dan <i>sunscreen</i> 'X' menangkal sinar UV yang ditentukan berdasarkan nilai <i>Sun Protection Factor</i> (SPF)	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio
2.	Daun kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Daun kakao yang diperoleh dari Desa Niukbaun, Kecamatan Amarasi Barat, Kabupaten Kupang, NTT dengan kriteria daun masih muda, berwarna hijau dan segar.		Nominal
3.	Ekstrak etanol	Ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk simplisia daun kakao menggunakan pelarut etanol 95%		Nominal

G. Alat & Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV-2600), neraca analitik (Sartorius), *vacuum rotary evaporator*, *waterbath*, bejana maserasi 5 L, *beaker glass* (pyrex) 250 mL, gelas ukur (pyrex) 10 mL dan 50 mL, labu ukur 10 mL, 25 mL dan 50 mL, batang pengaduk, cawan porselin 50 mL, pipet ukur 0.5 mL, 1 mL dan 5 mL, pipet tetes, kain saringan putih, kertas saring, tisu (paseo 3ply), dan *aluminium foil*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kakao, produk *sunscreen* merk 'X' SPF 21, etanol 95%, dan aquadest.

H. Prosedur Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman kakao dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Padjadjaran.

2. Pengambilan bahan

Daun kakao diambil di Desa Niukbaun, Kecamatan Amarasi Barat, Kabupaten Kupang, NTT.

3. Pembuatan serbuk simplisia daun kakao

Daun kakao yang diambil yaitu dari daun kakao yang segar ditandai dengan daun kakao berwarna hijau. Daun kakao disortasi basah, ditimbang, dicuci bersih dan ditiriskan, kemudian dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dengan menggunakan sinar matahari secara tidak langsung yang ditutupi menggunakan kain berwarna hitam kemudian dirajang setelah satu hari pengeringan. Simplisia lalu dilakukan sortasi kering lalu ditimbang kembali, kemudian dibuat serbuk simplisia dengan cara dihaluskan menggunakan blender dan diayak, simpan dalam wadah tertutup rapat (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

4. Pembuatan ekstrak sampel

Serbuk simplisia daun kakao diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 95%. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 200 gram dan dimasukkan kedalam wadah kaca (maserator). Ditambahkan etanol 95% sebanyak 2000 mL. Serbuk simplisia daun kakao dan pelarut yang telah tercampur kemudian ditutup rapat dan terlindung dari sinar

matahari. Selanjutnya rendam selama enam jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dan residu dengan cara penyaringan yaitu dengan menggunakan kain saringan putih. Diulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Setelah diperoleh maserat kemudian dikumpulkan untuk dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak yang kental (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Rendemen ekstrak kemudian dihitung dengan persamaan :

$$\%Rendemen = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot total simplisia}} \times 100\%$$

(Tjitda & Nitbani, 2019)

5. Penapisan fitokimia

a. Identifikasi alkaloid

1) Penyiapan ekstrak

Ekstrak sebanyak 0,3 gram ditambah 5 mL HCl 2 N, dipanaskan di atas penangas air selama dua sampai tiga menit, sambil diaduk. Setelah dingin ditambah 0,3 gram NaCl, diaduk rata kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah 5 mL HCl 2 N dan dibagi menjadi empat bagian yang disebut sebagai larutan A, B, C, D (Harahap, 2023).

2) Reaksi pengendapan

Larutan A ditambah pereaksi Mayer, larutan B ditambah dengan pereaksi Wagner, larutan C ditambah reagen Bouchardat dan

larutan D dipakai sebagai blanko. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih dengan pereaksi Mayer, Endapan coklat dengan reagen Wagner dan endapan jingga dengan reagen Bouchardat (Harahap, 2023).

b. Identifikasi flavonoid

1) Penyiapan sampel

Ekstrak 0,3 gram ekstrak dikocok dengan 3 mL n-heksana berkali-kali sampai ekstrak n heksana tidak berwarna. Residu dilarutkan dalam etanol dan dibagi menjadi tiga bagian, masing-masing disebut sebagai larutan A, B, dan C (Suprpto dkk., 2019).

2) Reaksi warna

a) Uji Bate-Smith dan Metcalf

Larutan A sebagai blanko, larutan B ditambah 0,5 mL HCl pekat dan diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan diamati lagi perubahan warna yang terjadi. Bila perlahan-lahan menjadi warna merah terang atau ungu menunjukkan adanya senyawa leukoantosianin (dibandingkan dengan blanko) (Suprpto dkk., 2019).

b) Uji Wilstater

Larutan A sebagai blanko. Larutan C ditambah 0,5 mL HCl pekat dan serbuk magnesium. Diamati warna yang terjadi. Diencerkan dengan air suling, kemudian ditambahkan 1 mL butanol. Diamati warna yang terjadi di setiap lapisan. Perubahan warna merah

jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan adanya flavonol, merah tua menunjukkan adanya flavonon (Suprpto dkk., 2019).

c. Identifikasi tanin

Timbang 200 mg ekstrak larutkan dalam 5 mL metanol, tambahkan 3 mL larutan FeCl_3 1%. Adanya kandungan tanin ditandai dengan timbulnya warna hijau gelap atau hijau kebiruan (Tjitda & Nitbani, 2019).

d. Identifikasi saponin

1) Uji busa

Timbang 500 mg sampel, masukkan dalam tabung reaksi. Tambahkan 10 mL air mendidih, kocok hingga berbusa. Ekstrak mengandung saponin jika busa tidak hilang setelah dibiarkan lebih dari 10 menit dan busa tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCl 2 M (Ravelliani dkk., 2021).

2) Pereaksi warna

Timbang 500 mg sampel, masukkan dalam tabung reaksi, tambah 5 mL kloroform, panaskan diatas tangas air sambil dikocok, dinginkan. 1 mL filtrat + pereaksi Liebermann Bouchard diamati perubahan warna. (reaksi positif saponin yaitu merah, merah muda atau ungu dan biru perlahan-lahan menjadi hijau) (Ravelliani dkk., 2021).

6. Pengujian tabir surya

a. Penyiapan larutan uji ekstrak etanol daun kakao

Ekstrak etanol daun kakao ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 95% sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan etanol ekstrak daun kakao dari larutan induk tersebut dibuat sebanyak 25 mL pada tiap seri konsentrasi yaitu 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, dan 900 ppm.

b. Penyiapan larutan uji *sunscreen* 'X'

Sunscreen 'X' ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 95% sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan *sunscreen* 'X' dari larutan induk tersebut dibuat sebanyak 25 mL pada tiap seri konsentrasi yaitu 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, dan 900 ppm

c. Penentuan nilai *Sun Protection Factor* (SPF)

Larutan uji yang telah dibuat dalam enam seri konsentrasi kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 290 – 320 nm.

d. Perlakuan replikasi sampel

Pada perlakuan replikasi sampel digunakan rumus Federer, yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$, dengan n adalah jumlah replikasi yang akan dilakukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.

Perhitungan jumlah replikasi yang digunakan dengan rumus Federer adalah:

$$(n - 1)(t - 1) \geq 15$$

$$(n - 1)(6 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1)(5) \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Sehingga, jumlah replikasi minimal yang harus dilakukan pada setiap larutan uji ekstrak etanol daun kakao dan *sunscreen* 'X' adalah sebanyak empat kali.

I. Analisis Data

Hasil pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk menghitung nilai SPF secara *in vitro* menggunakan persamaan mansur kemudian dilakukan uji dengan *Kruskal-Wallis Test* untuk melihat perbedaan nilai SPF antara setiap seri konsentrasi.

Nilai SPF dihitung menggunakan rumus :

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

Keterangan :

CF : Faktor koreksi

EE : Jumlah spektrum efek eritema

I : Spektrum intensitas cahaya

Abs : Absorbansi sampel

(Ulfah dkk., 2022).