# BAB IIIMETODE PENELITIAN

## 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental.Sampel yang digunakan adalah kulit alpukat. Data yang dikumpulkan berupa data kuantitatif dan kulitatif yang diambil dari hasil pengumpulan sampel, karakterisasi simplisia, skrining fitokimia, ekstrak, pembuatan lotion, dan pemeriksaan karakteristik sediaan seperti uji organoleptis, homogenitas, viskositas, pH sediaan, daya sebar, daya lekat serta pengukuran nilai SPF.Terhadap ekstrak dan lotion ekstrak etanol kulit alpukat.

### 3.1.1 Variabel Penelitian

 Variabel bebas pada penelitian ini variasi konsentrasi ekstrak etanol kulit alpukat yang digunakan sebesar 1000ppm, 2000ppm, 3000ppm, 4000ppm, dan 5000ppm.Variabel terikat, karakterisasi simplisia, metabolit sekunder, karaktristik sediaan dan pengujian aktivitas tabir surya.

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter penelitian meliputi karaktrisasi simplisia yaitu makroskopik, mikroskopik, kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut dalam air dan kadar sari larut dalam etanol. Uji skrining fitokimia simplisia seperti mengidentifikasi senyawa alkaloid, flavanoid, tanin, saponin dan terpenoid/steroid.Pengujian karakteristik sediaan seperti organoleptis, homogenitas, viskositas, pH sediaan , daya sebar dan daya lekat.

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2023 sampai bulan juni 2023

### 3.2.2 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara AL- Washliyah Medan

## 3.3 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah kulit alpukat, ekstrak kulit alpukat, etanol 96%, asam stearat, parapin cair, setil alkohol, tritanolamin (TEA),propilenglikol (PG), nipagin, nipasol, bunga mawar dan aquadest.

## 3.4 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah alat-alat gelas (gelas ukur, labu ukur, Erlenmeyer, pipet ukur), penangas air, kertas saring, lumpang dan stamfer, pipet tetes, kaca objek, timbangan analitik, lemari pengering, stik pH, stopwatch, pengagaris, spektrofotometri UV-Vis ( *Thermo Scientific*), viscometer Brookfield, *rotary evaporator* (Eyela)

## 3.4 Pembutan Larutan Pereaksi

### 3.5.1 Larutan Pereaksi Bouchardat

Sebanyak 4 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 mL air suling, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 g iodium dan dicukupkan dengan air suling hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### 3.5.2 Larutan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 g raksa (II) klorida, dilarutkan dalam 60 ml air suling, kemudian pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 10 mL air suling. Kedua larutan dicampurkan dan ditambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### 3.5.3 Larutan Pereaksi Dragendorf

Sebanyak 8 g bismut (II) nitrat ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 20 mL asam nitrat pekat. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 27,2 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 50 mL air suling. Kemudian kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna.Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan air suling hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

### 3.5.4 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N

Sebanyak 17 mL asam klorida pekat diencerkan dalam air suling hingga 100 ml (Ditjen POM, 1979).

### 3.5.5 Larutan Pereaksi Lieberman-Burchard

Sebanyak 20 bagian asam asetat anhidrat dicampurkan dengan 1 bagian asam sulfat pekat dan 50 bagian kloroform.Larutan pereaksi harus dibuat baru (Harborne, 1987).

**3.5.6**Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%

 Sebanyak 1 g besi (III) klorida dilarutkan dengan air suling hingga 100 mL (Ditjen POM, 1979).

**3.5.7 Larutan Pereaksi Molish**

Sebanyak 3 g alfa-naftol dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

## 3.6 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

### 3.6.1 Pengumpulan Sampel

Pengumpulan sampel dilakukan secara purposif, yaitu tanpa membandingkan dengan daerah lain. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit alpukat.

### 3.6.2 Uji Determinasi

Determinasi tumbuhan kulit alpukat (*Persea americana*Mill.) di *Herbarium Medanense*(MEDA) Universitas Sumatera Utara Medan.

### 3.6.3 Pembuatan Simplisia

 Kulit alpukat masing-masing dicuci di air yang mengalir kemudian ditiriskan, kulit alpukat yang sudah bersih dari semua kotoran, kemudian di timbang untuk kulit alpukat yang masih basah beratnya 4 kg, setelah ditimbang lalu di potong kecil-kecil di masukkan ke dalam lemari pengering selama 7 hari. Jika sudah kering kulit alpukat di ambil dari lemari pengering. Kemudian di timbang untuk sampel yang sudah kering berat sampel 2 kg, setelah ditimbang langsung diblender, kemudian diayak, ditimbang serbuknya, dan dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup.

## 3.7Pemeriksaan Karakteristik Simplisia

### 3.7.1 Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap kulit alpukatkering*(Persea americana* Mill.*)* dengan cara memperhatikan warna, bentuk, dan ukuran.

### 3.7.2 Pemeriksaan Mikroskopik

 Serbuk kulit alpukat diletakkan diatas kaca objek lalu ditetesi dengan klorahidrat ditutup dengan cover galas, di panaskan sebentar kemudian diamati

### 3.7.3 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotropi (destilasi toluen). Alat terdiri dari labu alas bulat 500 ml, alat penampung dan pendingin, tabung penyambung dan penerima 10 ml.

1. Penjenuhan toluene

Sebanyak 200 ml toluen dan 2 ml aquades dimasukkan ke dalam labu alas bulat, dipasang alat penampung dan pendingin, kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 ml.

1. Penetapan kadar air simplisia

Ditimbang 5 gram serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu alas bulat yang berisi toluen jenuh tersebut, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit.Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik.Setelah semua airterdestilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen.Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhukamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 ml. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (v/b) (Depkes RI, 1995).

% Kadar air simplisia = $\frac{(Volume air akhir - volume air awal)}{berat sampel (g) }$×100 %

### 3.7.4 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air

Ditimbang 5 g serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 ml kloroforom P (2,5 mL kloroforom dalam 1000 mL aquadest) selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata (yang telah ditara) di atas penangas air hingga kering, sisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap.Kadar dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes, 1989).

% Kadar sari larut dalam air = $\frac{Berat sari larut air (g)}{Berat sampel (g) }$× $\frac{100}{20}$× 100 %

### 3.7.5 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol

Ditimbang 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol (96%) dalam labu tersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan penguap berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105ºC hingga bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 96% dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 1979).

% Kadar sari larut dalam etanol = $\frac{Berat sari larut dalam etanol (g)}{Berat sampel (g) }$× $\frac{100}{20}$× 100 %

### 3.7.6 Penetapan Kadar Abu Total

Ditimbang 2 g serbuk dimasukkan kedalam krus porselin yang telah dipijarkan dan ditara kemudian krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pemijaran dilakukan pada suhu 500-600°c selama 3 jam kemudiaan didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Ditjen POM, 1979).

% Kadar abu total =$\frac{Berat abu (g)}{berat sampel (g) }$×100 %

### 3.7.7 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, didinginkan dengan 25 ml asam klorida encer selama 5 menit, sebagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas, residu dengan kertas saring dipijarkan sampai bobot tetap,kemudiaan didinginkan dan ditimbang. Kadar abu tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Ditjen POM, 1979).

% Kadar abu tidak larut dalam asam = $\frac{Berat abu tidak larut asam (g)}{berat sampel (g) }$×100 %

**3.8 Pembuatan ekstrak**

## 3.8 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol kulit alpukat dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam bejana, ditambah pelarut etanol 96% sebanyak 3750 ml, didiamkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk, lalu di peras sehingga diperoleh maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dibilas etanol 96 % sebanyak 1250 ml, pindahkan kedalam bejana tertutup (maserat I dan maserat II) biarkan ditempat yang sejuk terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari, kemudian enap tuangkan atau disaring sehingga diperoleh hasil maserat, lalu dipekatkan dengan cara diuapkan pada rotary evaporatorhingga dipekatkan diatas waterbath diperoleh ekstrak kental (Ditjen POM, 1979).

 % Rendemen = $\frac{Berat Ekstrak Kental Etanol }{Berat Simplisia Kering }x 100 \%$

## 3.9 Skrining Fitokimia

### 3.9.1 Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak etanol kulit alpukat sebanyak 0,5 gram kemudian ditambahkan 2 ml asam klorida 2 N (suasana asam) dan ditambah akuades sampai 9 ml, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring, filtrat yang diperoleh dipakai untuk uji alkaoida. Ke dalam 3 tabung reaksi dimasukkan 0.5 ml filtrat. Pada masing masing tabung reaksi:

1. Filtrat ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.
2. Filtrat ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.
3. Filtrat ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi dragendrorf, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sekitarnya 2 reaksi dari 3 percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

### 3.9.2 Pemeriksaan Flavonoid

 Serbuk 0,5 g ekstrak etanol kulit alpukat ditambahkan 20 ml aquadest panas, dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 ml lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol lalu dikocok kemudian dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terbentuk warna merah, kuning, dan jingga pada lapisan alkohol (Farnsworth, 1966).

### 3.9.3 Pemeriksaan Tannin

 Ekstrak etanol kulit alpukat ditimbang sebanyak 0,5 g ditambah 10 ml akuades, dikocok dan disaring. Filtrat diencerkan dengan akuades sampai tidak berwarna.Larutan diambil 2 ml ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes RI,1995).

### 3.9.4 Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol kulit alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 ml akuades panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Penambahan 1 tetes larutan HCL 2 N, apabila busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

### 3.9.5 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Sampel ekstrak etanol kulit alpukat ditimbang sebanyak 1 g dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (pereaksi liberman-burchard).Terbentuknya warna ungu sampai merah ungu menunjukkan adanya triterpenoida dan terbentuknya warna biru hijau menunjukkan adanya steroid (Depkes RI, 1995).

### 3.9.6 Pemeriksaan Glikosida

Sebanyak 3 g ekstrak etanol kulit alpukat, kemudian disari dengan 30 ml campuran 7 ml bagian etanol 96% dan 3 bagian aquades ditambah dengan 10 ml HCl 2 N. Direfluks selama 30 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 ml filtrat ditambahkan 25 ml aquades dan 25 ml timbalasetat (II) 0,4 M, dikocok, lalu

 didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari dengan 20 ml campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol dilakukan berulang sebanyak tiga kali. Kumpulan sari air diuapkan pada temperatur tidak lebih dari 50oC. Sisanya dilarutkan dalam 2 ml metanol. Kemudian diambil 0,1 ml larutan percobaan dimasukkan kedalam tabung reaksi, diuapkan di penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes pereaksi molish. Kemudian secara perlahan ditambahkan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI,1995).

## 3.10 Penentuan Nilai *Sun Protection Factor* (SPF) Ekstrak Etanol Kulit Alpukat

1 g ekstrak etanol kulit alpukat di larutkan dengan etanol 96% dalam labu tentukur 50 ml diperoleh 20.000ppm (LIB l). LIB l dipipet 25 ml dan diencerkan dengan etanol 96% dalam labu tentukur 50 ml maka diperoleh konsentrasi 10.000ppm (LIB ll ) LIB ll dipipet masing-masing 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, dan 5 ml lalu encerkan dengan etanol 96% sampai 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000ppm, 2000ppm, 3000ppm, 4000ppm dan 5000ppm, lalu di ukur serapannya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 290- 320 yang menggunakan etanol sebagai blanko.

## 3.11 Pembuatan Sediaan Lotion Tabir Surya

Rancangan formula untuk membuat sediaan Lotion dari ekstrak etanol kulit alpukat dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

**3.11 Pembuatan Sediaan Lotion Tabir Surya**

Tabel 3.1 Formula dasar lotion tabir surya

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| No | Nama bahan | Jumlah bahan yang digunakan |
| F0 | F10,5% | F2 0,6% | F3 0,8% |
| 1 | Ekstrak etanol kulit alpukat | - | 0,3 gram | 0,36 gram | 0,48 gram |
| 2 | Asam stearat | 2 % | 2 gram | 2 gram | 2 gram  |
| 3 | Setil alkohol | 2 % | 2 gram | 2 gram | 2 gram |
| 4 | Paraffin cair | 1 % | 1gram | 1gram | 1gram |
| 5 | Prafin paraben | 0,05 % | 0,05 gram | 0,05 gram | 0,05 gram |
| 6 | Propilenglikol  | 3 % | 3gram | 3gram | 3gram |
| 7 | Metil paraben | 0,15 % | 0,15 gram | 0,15 gram | 0,15 gram |
| 8 | Trietanolamin | 0,2 % | 0,2 ml |  0,2ml | 0,2ml |
| 9 | Oleum rosae | 3tts | 3tts | 3tts | 3tts |
| 10 | Aquadest ad | 60gram | 60gram | 60gram | 60gram |

## 3.12 Pembuatan sediaan lotion

 Dibuat dengan cara memisahkan antara fase minyak dan fase air. Di fase minyak (meleburkan asam stearat, etil alkohol, paraffin cair dan nipasol sampai mencair massa1). Fase air (dipanaskan propilenglikol, trietanolamin, nipagin massa 2). Panaskan lumpang dengan air panas, hingga panas, kemudian campurkan massa 1 dan massa 2, setelah homogen ekstrak kulit alpukat dimasukan kedalam lumpang yang berbeda, ekstrak diencerkan dengan aquadest di tambahkan basis lotion sedikit demi sedikit kemudian aduk hingga homogen dan dicukupkan dengan aquadest ad 60 ml.

## 3.13 Evaluasi Sediaan Lotion Tabir Surya

### 3.13.1 Uji Organoleptis

Pengamatan dilakukan meliputi pengamatan warna yang dilakukan secaravisual, pengamatan bau dengan mencium aroma dari sediaan, dan pengamatan bentuk dengan cara melihat bentuk sediaan yang dihasilkan

### 3.13.2 Pemeriksaan Homogenitas

Lotion yang akan diuji dioleskan diatas kaca objek, kemudian ditutup dengan kaca objek yang lain dan dilihat apakah lotion tersebut homogen atau tidak (Depkes RI, 1979).

### 3.13.3 Pemeriksaan pH

Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan pH stik universal.Lotion ekstrak etanol kulit alpukat dioleskan pada pH stik universal kemudian hasilnya dibandingkan dengan standard warna pada kemasan pH stik universal.Dicatat hasil pH lotion. Syarat pH sediaaan adalah 4,5-8 (SNI, 1996).

### 3.13.4 Pemeriksaan Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan cara sediaan dimasukkan ke dalam wadah berupa tabung silinder kaca (gelas piala) dan spindle yang sesuai dimasukkan sampai garis batas lalu diputar dengan kecepatan rpm tertentu sampai jarum viskometer menunjukan skala yang konstan. Syarat viskositas sediaan adalah 2000-50.000 Cps (SNI, 1996)

### 3.13.5 Pengukuran Daya Sebar

Ditimbang lotion sebanyak 0,5 gram diletakkan diatas kaca, ditutup dengan kaca lainnya. Selanjutnya diberi beban 50 gram.Biarkan selama 1 menit.Diukur diameter sebar lotion (Tambunan, 2018).Daya sebar lotion yang baik antara 5-7 cm (Garg et al., 2002).

### 3.13.6 Uji Daya Lekat

Ditimbang sebanyak 0,5 gram sediaan lotion diletakkan di titik tengah luasan gelas objek yang telah ditandai dan tutup dengan gelas objek lain. Diberi beban 1 kg selama 5 menit lalu kudus gelas objek yang telah saling melekat 1 sama lain di pasang pada alat uji yang di beri beban 80 gram. Setelah itu di catat waktu yang diperlukan hingga terpisah 2 gelas objek tersebut

### 3.13.7 Pengukuran Sediaan Lotion Rentang Nilai SPF Lotion Ekatrak Etanol Kulit alpukat Dengan Spektrofotometri UV

Ditimbang sediaan lotion sebanyak 1 g masing-masing konsentrasi 0,3%, 0,36%, 0,48% kemudian dilarutkan dengan etanol 96% 10 ml. Lalu diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV

## 3.14 .8 Analisa Data

Perhitungan nilai SPF mengikuti persaman Mansur (1986). Persamannya: adalah sebagai berikut :

SPF $=CF x \sum\_{290}^{320} EE \left(λ\right) x I \left(λ\right) x A (λ)$

Keterangan :

CF : Faktor koreksi bernilai 10

EE : Efek eritmogenik radiasi pada panjang gelombang ($λ)$

I : Spektrum simulasi sinar surya ($λ)$

A :Nilai absorbansi pada panjang gelombang $\left(λ\right)$