

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari hingga Juni 2021. Proses ekstraksi dan uji fitokimia yang dilaksanakan di laboratorium kimia Universitas Lampung dan pembuatan sediaan ekstrak dilaksanakan di Laboratorium Farmasi, ITERA. Pengujian terhadap mencit dilaksanakan di laboratorium Institut Teknologi Sumatera selama 14 hari dan proses pembuatan preparat histopatologis, pengamatan ketebalan epidermis, dan jumlah melanosit terhadap kulit mencit dilaksanakan di Laboratorium Patologi, Balai Veteriner Lampung.

### **3.2 Alat dan Bahan**

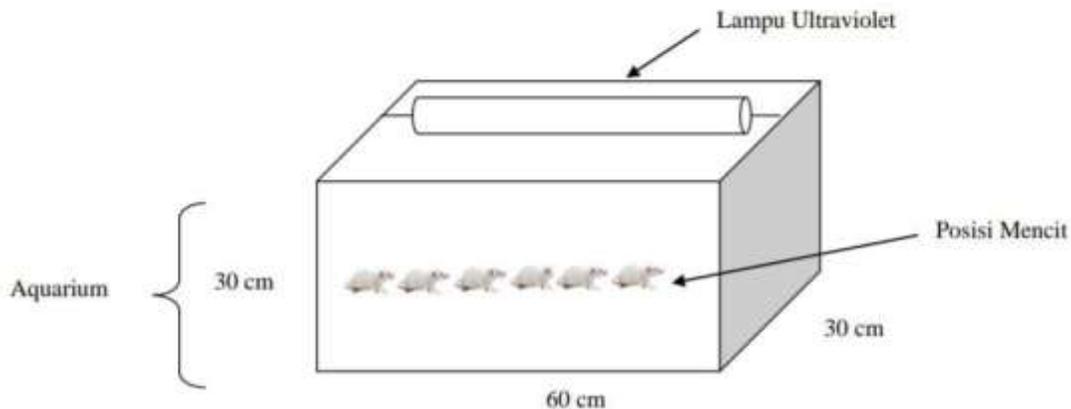
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis, *rotary vacuum evaporator*, lampu TL 20 watt, box aquarium, aluminium foil, botol vial, corong buchner, blender, kertas saring, *staining jar*, wadah sampel, alat diseksi, *tissue cassette*, kaca preparat, *cover glass*, *base mold*, *cassette embedding*, label, *processor embedding*, *hot plate*, mikrotom dan mikroskop.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit pisang kepok mentah, ekstrak propolis, aquadestt, kloroform, formalin 10%, larutan buffer 10%, alkohol, alkohol absolut, xylol, pewarna *Harris-Hematoxylin Eosin* (HE), entellan, parafin cair, propilenglikol, *hydroxypropyl methylcellulose* (HPMC), metil paraben, propil paraben, aquadestt, karbomer, triethanolamine, natrium metabisulfit dan etanol 70%.

### **3.3 Rancangan Penelitian**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan dewasa yang diperoleh dari Balai Veteriner Bandar Lampung. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen laboratorium Rancangan Acak Lengkap, menggunakan 30 ekor mencit

jantan (*Mus musculus*) dengan berat badan 27,8 – 40 gram dan berumur 10 minggu. Mencit ditempatkan dalam kandang plastik berukuran 40 cm x 30 cm dan 18 cm dan ditutup dengan penutup yang terbuat dari kawat logam kawat. Setiap kelompok mencit ditempatkan dalam kandang yang berventilasi baik, siklus terang 12 jam gelap sampai 12 jam terang dan beradaptasi dengan lingkungan selama 1 minggu. Mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah radiasi ultraviolet, dan variabel terikatnya adalah ketebalan epidermis dan jumlah melanosit. Variabel eksternal yang dikontrol adalah mencit dengan umur yang sama, jenis kelamin sama, berat rata-rata mencit yang sama, faktor genetik dari galur yang sama yaitu *Deutschland Denken Yoke* (DDY), dan faktor lingkungan sama. Pada penelitian ini, hewan uji dimasukkan ke dalam aquarium dan disinari dengan lampu ultraviolet 20 watt.



**Gambar 3. 1** Rangkaian Alat Penelitian

Berdasarkan rumus Federer (1967), besar sampel penelitian memiliki nilai 1 agar mendapatkan data yang valid dan hasil yang optimal maka dilakukan replikasi sampel. Terdapat 5 kelompok perlakuan pada penelitian, yaitu satu kelompok kontrol positif (mencit yang dioles sediaan ekstrak propolis), satu kelompok kontrol negatif (mencit tanpa diberi olesan) dan tiga kelompok perlakuan (mencit yang dioles sediaan ekstrak pisang kepok). Estimasi besarnya sampel yang digunakan penelitian sesuai dengan rumus Federer, sebagai berikut :

$$(r-1)(p-1) \geq 15$$

$$(r-1)(4-1) \geq 15$$

$$(r-1)(3) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$r \geq 6$$

$$r \geq 6$$

**Keterangan :**

p = perlakuan

r = jumlah replikasi tiap perlakuan sehingga dari rumus tersebut dapat disimpulkan jumlah mencit yang menjadi replikasi sebanyak 6 ekor.

15 = derajat kebebasan umum

Besar sampel yang digunakan dihitung menggunakan Rumus *Resource Equation Methode* sebagai berikut:

Besar sampel = jumlah total hewan coba – jumlah kelompok perlakuan

Besar sampel = (jumlah replikasi x jumlah kelompok perlakuan) – jumlah kelompok perlakuan

Besar sampel = (6x5) – 5 = 25 ekor

Untuk mengantisipasi adanya mencit yang *drop out* (mati atau sakit), selama penelitian, maka diperlukan adanya mencit cadangan dengan rumus koreksi besar sampel (Sastroasmoro & Ismael, 2011) sebagai berikut:

$$n' = [n/1-f]$$

**Keterangan :**

n' = jumlah sampel penelitian

n = besar sampel yang dihitung

f = perkiraan proporsi drop out, kira-kira 10% (f = 0,1)

Jumlah sampel dalam penelitian ini adalah (n') = 6 / (1-0,1) = 6.6 ≈ 7

Jumlah mencit cadangan = jumlah kelompok x (n' – jumlah replikasi)

Jumlah mencit cadangan = 5 (7 – 6)

Jumlah mencit cadangan = 5 x 1 = 5 ekor

**Keterangan:**

$n'$  = besar sampel terkoreksi

$n$  = besar sampel minimum

$f$  = perkiraan proporsi *drop out* (mati atau sakit), kira-kira 10% ( $f = 0,1$ ) Jadi jumlah sampel keseluruhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor mencit. Keseluruhan mencit akan dibagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok terdiri atas 6 ekor mencit (5 ekor mencit sebagai sampel perlakuan, 1 ekor mencit sebagai cadangan).

**Tabel 3. 1** Jenis perlakuan yang diujikan, jumlah ulangan = 6

Perlakuan	Uraian
P1	Mencit diberikan paparan sinar ultraviolet dan dioles sediaan ekstrak kulit pisang kepok 1,5%
P2	Mencit diberikan paparan sinar ultraviolet dan dioles sediaan ekstrak kulit pisang kepok 5%
P3	Mencit diberikan paparan sinar ultraviolet dan dioles sediaan ekstrak kulit pisang kepok 10%
K+	Kontrol positif, mencit diberikan paparan sinar ultraviolet dan dioles sediaan ekstrak propolis 1,5%
K-	Kontrol negatif, mencit diberikan paparan sinar ultraviolet tanpa adanya penambahan sediaan ekstrak

Pada perlakuan kontrol positif digunakan ekstrak propolis sebagai pembanding karena propolis merupakan produk alami yang juga memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dalam meredam radikal bebas. Untuk perlakuan kelompok kontrol negatif tidak digunakan krim ataupun ekstrak, karena kelompok kontrol ini akan menunjukkan perbedaan antara kelompok kontrol positif dan ekstrak kulit pisang kepok 1,5%, 5%, dan 10% (Wulandari, *et al.*, 2017)

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Kulit pisang diambil dari limbah pisang kepok (*Musa acuminata x balbisiana*) di Bandar Lampung dengan kriteria inklusi yaitu yang memiliki warna hijau tua dengan tekstur daging. Berdasarkan penelitian Saputri, *et al.* (2020) terkait uji antioksidan pada berbagai tingkat kematangan kulit pisang, diketahui bahwa tingkat kematangan mentah merupakan yang paling efektif karena pembentukan pati yang telah mencapai maksimum. Kulit pisang kepok tersebut dibersihkan menggunakan air mengalir hingga bersih. Kemudian kulit pisang kepok dipotong kecil – kecil dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 60°C sampai kering. Kemudian simplisia kulit pisang kepok yang didapat selanjutnya ditimbang untuk proses ekstraksi.

#### 3.4.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Pisang Kepok

Kulit pisang kepok yang telah diblender sebanyak 600 gram dimaserasi dengan cara direndam pada tabung maserator yang berisi 2 liter etanol 96%. Keuntungan dari metode maserasi ini adalah sederhana dan mudah dalam pelaksanaannya (Maleta, 2018), serta dapat menghindari kerusakan senyawa terhadap panas (Mukhriani, 2014). Selanjutnya, homogenkan larutan dengan pengaduk dan diamkan selama 24 jam, lalu gunakan corong Buchner untuk menyaring ekstrak yang diperoleh untuk mendapatkan filtratnya, kemudian menggunakan vacuum rotary evaporator untuk menguapkan sehingga diperoleh ekstrak yang pekat. Ekstraksi kulit pisang kepok dilakukan di Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Lampung. Selain itu, dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui metabolit sekunder yang ada pada kulit pisang kepok. Menurut Mukhriani (2014), proses ekstraksi menggunakan pelarut yang sesuai untuk mengekstrak bahan dari campuran. Tujuan ekstraksi adalah menggunakan pelarut organik tertentu untuk mengekstraksi dan memisahkan senyawa yang terdapat dalam bahan alam dengan kelarutan yang berbeda dalam berbagai pelarut (Dirjen POM, 2000).

### 3.4.3 Uji Fitokimia

Langkah konfirmasi kandungan zat aktif terkandung dalam ekstrak kulit pisang kepok yang dihasilkan dengan melakukan pengujian fitokimia. Gunakan reagen deteksi kelompok senyawa dalam tabung reaksi untuk uji fitokimia. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi:

1. Uji Saponin

Siapkan ekstrak kulit pisang kepok sebanyak 0,5 mL dan masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 5 mL aquadest dan kocok selama 30 detik. Amati perubahan yang terjadi pada pembentukan buih, kemudian hasil uji saponin menunjukkan reaksi positif.

2. Uji Steroid

Disiapkan ekstrak kulit pisang kepok sebanyak 0,5 mL dan masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 0,5 mL asam asetat glasial dan 0,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Perubahan warna sampel menjadi biru atau ungu, kemudian hasil uji steroid menunjukkan reaksi positif.

3. Uji Terpenoid

Disiapkan ekstrak kulit pisang kepok sebanyak 0,5 mL, masukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 0,5 mL asam asetat glasial dan 0,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Jika warna sampel berubah menjadi merah atau kuning, hasil uji terpenoid positif.

4. Uji Tanin

Disiapkan 1 mL ekstrak kulit pisang kepok, masukkan ke dalam tabung reaksi, dan tambahkan 3 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 10%. Perubahan warna sampel adalah melihat larutan berwarna biru kehitaman, kemudian hasil uji tanin menunjukkan reaksi positif.

5. Uji Alkaloid

Disiapkan ekstrak kulit pisang kepok sebanyak 0,5 mL, kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 5 tetes kloroform dan 5 tetes pereaksi Mayer (dari 1 g KI dilarutkan dalam 20 mL akuades, tambahkan 0,271 g HgCl<sub>2</sub> hingga larut)

. Perubahan warna sampel yaitu larutan berwarna coklat keputihan tampak seperti endapan, sehingga hasil uji alkaloid menunjukkan reaksi positif.

#### 6. Uji Flavonoid

Disiapkan ekstrak kulit pisang kepok sebanyak 0,5 mL (diekstrak dari 0,5 g serbuk magnesium), kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL HCl tetes demi tetes. Perubahan warna sampel yaitu terjadi perubahan warna menjadi merah atau kuning dengan adanya buih, kemudian hasil uji tanin menunjukkan reaksi positif.

#### 3.4.4 Penentuan Nilai SPF (*Sun Protection Factor*)

Konsentrasi ekstrak kulit pisang kepok (*Musa acuminata x balbisiana*) ditetapkan sebesar 1,5%, 5%, dan 10% dalam 10 ml akuades. Ekstrak dibuat konsentrasi dalam 10ml aquadest. Baca absorbansi larutan ekstraksi pada panjang gelombang 290-320 nm setiap 5 nm, blanko yang digunakan adalah aquadest. Hasil absorbansi digunakan untuk menghitung nilai SPF (sun protection factor) menggunakan persamaan Mansur (1986). Grafik nilai SPF (*Sun Protection Factor*) Ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 5.

$$SPF \text{ Spektrofotometer} = CF \times 290 \sum_{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times \text{Absorban}(\lambda)$$

Keterangan :

CF = Faktor koreksi (10)

EE = Spektrum efek eritema

I = Spektrum intensitas matahari

Abs = Absorbansi sampel

### 3.4.5 Pembuatan Sediaan Ekstrak

**Tabel 3.4. 1** Formulasi Sediaan Ekstrak Kulit Pisang Kepok

Bahan	Fungsi	Konsentrasi		
		1,5%	5%	10%
Ekstrak kulit pisang kepok	Bahan aktif	1,5 gram	5 gram	10 gram
Metil paraben	Pengawet	0,2 gram	0,2 gram	0,2 gram
Propilenglikol	Humektan	15 gram	15 gram	15 gram
HPMC	<i>Gelling Agent</i>	1,5 gram	1,5 gram	1,5 gram
Aquadest (ml) ad	Pelarut	+ 100 gram	+ 100 gram	+ 100 gram

(Runtuwene, *et al.*, 2019)

Tahapan pembuatan sediaan ekstrak kulit pisang kepok dilakukan dengan mendispersikan ekstrak, metil paraben ke dalam propilen glikol dengan pengadukan menggunakan stirrer dengan kecepatan 20 rpm pada suhu 30°C selama 5 menit. Lalu dimasukkan HPMC (*hydroxypropyl methylcellulose*) yang sudah dikembangkan dalam gelas beaker yang berisi aquadest. Campuran segera diaduk secara konstan dengan menggunakan stirrer pada kecepatan dan suhu yang sama selama hingga homogen dan membentuk gel (Khairani & Sunarto, 2019). Pada penelitian ini juga digunakan bahan alam juga yaitu propolis sebagai kontrol positif, yang dibuat berdasarkan penelitian yang telah dilakukan (Lampiran 6).

### 3.4.6 Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Perlakuan hewan uji sudah disetujui berdasarkan prosedur *Ethical Clearance* (Lampiran 8). Hewan uji dibagi menjadi empat kelompok yaitu kontrol positif dengan menggunakan ekstrak propolis 1,5% (K1), kontrol negatif atau tanpa perlakuan (K2), perlakuan ekstrak kulit pisang 1,5% (P1), perlakuan ekstrak kulit pisang 5% (P2), dan perlakuan ekstrak kulit pisang 10% (P3). Setiap kelompok berisi enam ekor mencit. Masing – masing dari kelompok tersebut akan diadaptasi terlebih dahulu minimal satu minggu sebelum diberikan perlakuan dan kemudian dilakukan pencukuran rambut mencit pada bagian punggung mencit (area yang mendapatkan

penyinaran) dengan luas 4x2 cm menggunakan pisau cukur (Novitasari, 2018). Kemudian dibiarkan selama satu hari agar terhindar dari efek inflamasi yang disebabkan akibat pencukuran.

Waktu pemaparan UV untuk keempat kelompok adalah 14 hari. Setiap kelompok diiradiasi dengan sinar ultraviolet dengan frekuensi 60 menit per hari melalui lampu TL ultraviolet 20 watt selama 14 hari, jarak penyinaran 30 cm, dan diberikan sediaan ekstrak sebanyak 0,2 gram (Novitasari, 2018). Oleskan sediaan 20 menit sebelum penyinaran (untuk memberikan waktu agar sediaan diserap oleh kulit) dan 4 jam setelah paparan sinar ultraviolet (Dumaria, 2018). Kemudian diambil jaringan kulit pada daerah punggung ketika 24 jam setelah penyinaran terakhir untuk dilakukan pengamatan sediaan histopatologi.

#### 3.4.7 Pembuatan Preparat Histologi Kulit Metode Parafin

Hewan uji mencit yang telah mendapat perlakuan, dikorbankan dengan dilakukan pembedahan pada mencit yang telah dibius menggunakan kloroform. Pembuatan preparat jaringan kulit dilakukan dengan metode parafin dan pewarnaan Harris-Hematoxylin Eosin (HE) berdasarkan panduan Balai Veteriner Lampung (2018). Jaringan kulit mencit diambil sebesar 2 x 2 cm untuk dibuat preparat histologi. Pada jaringan kulit hasil pembedahan segera dicuci dan difiksasi dengan larutan formalin 10% dan larutan buffer 10% selama 24 jam. Sampel selanjutnya dilakukan proses pemotongan jaringan (*trimming*) dengan ketebalan sekitar  $\pm 4$ mm, kemudian sampel dimasukkan ke dalam *tissue cassette* dan dialiri dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa-sisa formalin dan larutan buffer. Kemudian sampel didehidrasi di dalam seri larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat (80%, 90%, 100%) selama 24 jam. Sampel selanjutnya dijernihkan (*clearing*) dengan xylol I dan xylol II, masing – masing selama 1 jam. Setelah proses penjernihan dilakukan embedding dengan parafin yang telah dilelehkan pada 58 – 60 °C selama 2 jam. Kemudian organ dikeluarkan dari *tissue cassette* lalu dimasukkan ke dalam base mold dan parafin dituangkan ke dalam base mold lalu ditutup dengan *cassette embedding* dan beri label lalu diletakkan dibagian dingin pada alat processor embedding.

Blok parafin dipotong secara terus menerus pada ketebalan 3  $\mu\text{m}$  dengan menggunakan mikrotom. Blok parafin dipotong dengan pisau mikrotom kasar hingga mendapatkan permukaan yang rata. Setelah permukaan rata, pisau mikrotom diganti dengan pisau halus kemudian jaringan dipotong kembali dan dipilih potongan terbaik. Potongan jaringan diambil menggunakan kuas/jarum ose kemudian diapungkan ke dalam wadah air yang sudah berisi larutan pengapung. Pindahkan potongan jaringan menggunakan slide kaca preparat ke dalam wadah berisi air hangat kemudian dipilih posisi penempatan terbaik pada slide kaca preparat. Sediaan selanjutnya diwarnai dengan teknik pewarnaan Hematoxylin-Eosin dengan waktu 5 menit pada setiap tahapan pencelupannya. Dalam pewarnaan sediaan setelah dihilangkan parafinnya dan berturut-turut dicelupkan beberapa kali ke dalam xylol I, xylol II, xylol III, alkohol 80%, 80%, 90%, alkohol absolut, alkohol absolut, alkohol absolut III, pewarna harris, dan dilanjutkan pencucian sediaan dengan air mengalir, kemudian dilanjutkan pencelupan ke eosin, alkohol 80%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 90%, xylol I, xylol II, xylol III. Selanjutnya sediaan ditetesi dengan entellan dan ditutup dengan *cover glass* lalu diberi label.

#### 3.4.8 Pengamatan Histopatologi

Parameter pengamatan adalah dengan mengukur ketebalan epidermis dan menghitung jumlah melanosit berdasarkan 10 lapang pandang dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi dan pengamatan ketebalan epidermis menggunakan mikrometer okuler dengan perbesaran 400x.

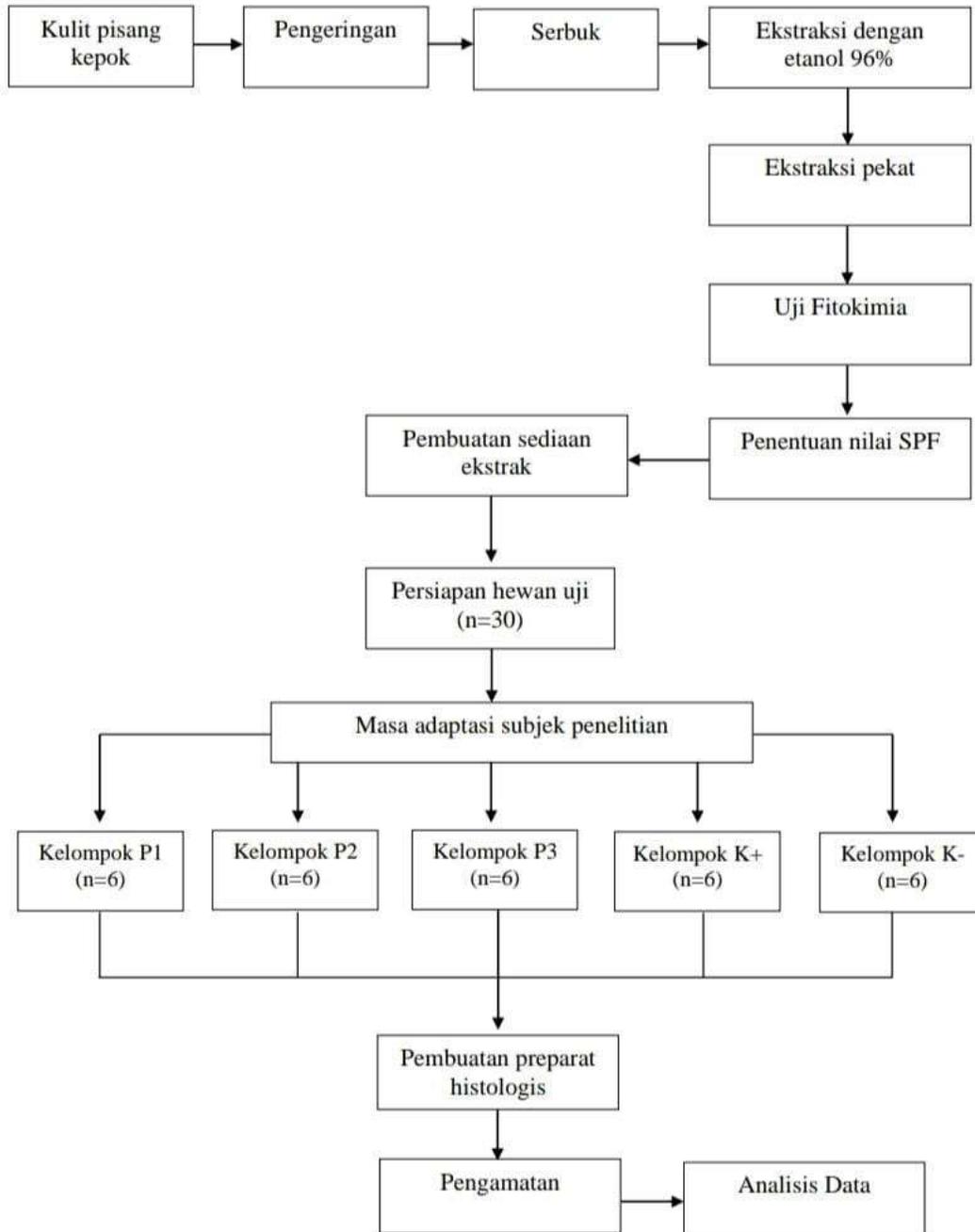
#### 3.4.9 Persetujuan Kaji Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan kaji etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK), Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor lolos kaji etik No: /256/UN26.18/PP.05.02.00/2021.

### 3.5 Analisis Data

Data ketebalan epidermis dan jumlah melanosit dilakukan uji normalitas data menggunakan uji normalitas *Shapiro – Wilk*. Kemudian apabila data tidak berdistribusi normal dilanjutkan pengujian statistik non parametrik menggunakan uji *Kruskall – Wills*. Data penelitian selanjutnya dilakukan uji korelasi *Spearman* (untuk sebaran data yang tidak normal atau nonparametrik). Uji korelasi *Spearman* digunakan untuk mengetahui arah hubungan antar kedua variabel penelitian, apakah positif, negatif, atau tidak saling berkaitan atau negatif. Seluruh uji dalam penelitian dilakukan dengan menggunakan program analisis statistik R versi 4.5.0.

### 3.6 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3. 2 Alur Penelitian