

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan sampel bunga telang yang diekstraksi berdasarkan perbedaan waktu ekstraksi dengan metode UAE menggunakan pelarut etanol 70% dan termasuk jenis penelitian experimental (*True Experiment*). Kemudian filtrat hasil ekstraksi dipekatan hingga didapat ekstrak yang kental. Ekstrak etanol bunga telang yang didapat selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas penangkal radiasi UV sehingga dapat dihasilkan parameter nilai SPF, %Te dan %Tp. Uji dilakukan dengan variasi waktu ekstraksi, sehingga dapat diperoleh waktu optimal untuk menghasilkan nilai SPF, %Te dan %Tp terbaik.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2023 – Juli 2023.

C. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa mahkota bunga telang yang diperoleh dari petani bunga telang di daerah Sumbermulyo, Kecamatan Bambanglipuro, Kabupaten Bantul, Provinsi DIY, dengan titik koordinat lokasi - 7.929394,110.324035. Sampel yang digunakan memiliki kriteria mahkota bunga telang berwarna ungu segar dan tidak ada kerusakan pada mahkota bunganya dengan masa panen antara 30-49 hari setelah tanam. Sampel tersebut kemudian dibuat menjadi ekstrak etanol bunga telang.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Waktu ekstraksi bunga telang.

2. Variabel Terikat

Nilai SPF, %Te dan %Tp dari ekstrak etanol bunga telang.

3. Variabel Terkendali

Suhu ekstraksi, metode ekstraksi, dan pelarut ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. Rentang waktu ekstraksi yang digunakan adalah 15 hingga 90 menit dengan interval waktu 15 menit.
2. Ekstrak etanol bunga telang adalah ekstrak hasil ekstraksi sampel bunga telang menggunakan *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) yang dilarutkan dengan pelarut etanol 70%.
3. Penentuan nilai SPF, %Te dan %Tp dari ekstrak etanol bunga telang dilakukan secara *in vitro* menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang untuk penentuan nilai SPF yaitu 290 sampai 320 nm dengan jarak 5 nm, panjang gelombang untuk penentuan %Te yaitu 292,5 sampai 317,5 nm dengan jarak 5 nm, dan panjang gelombang untuk penentuan %Tp yaitu 322,5 sampai 372,5 nm dengan jarak 5 nm, dan hasil yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam persamaan.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Pada tahap penyiapan simplisia digunakan alat berupa grinder (Fomac), oven, ayakan 40 mesh, wadah dan pisau.
 - b. Pada tahap pembuatan ekstrak etanol bunga telang digunakan alat berupa neraca analitik (Ohaus SW 10S), sonikator (cole-palmer), penangas air, botol duran, dan alat-alat gelas (Iwaki).
 - c. Pada uji fitokimia digunakan alat berupa alat-alat gelas (Iwaki), neraca analitik (Ohaus SW 10S), dan *stopwatch*.
 - d. Alat yang digunakan pada proses penentuan nilai SPF, %Te dan %Tp yaitu alat-alat gelas (Iwaki), instrumen spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10s UV-Vis), sonikator (Cole-Palmer), dan neraca analitik (Ohaus SW 10S).

2. Bahan
 - a. Bahan uji yang digunakan yaitu mahkota bunga telang segar, didapat dari daerah Sumbermulyo, Kecamatan Bambanglipuro, Kabupaten Bantul, Provinsi DIY.
 - b. Bahan yang dipakai untuk membuat ekstrak etanol bunga telang yaitu bunga telang segar, kertas saring whatman nomor 1, dan etanol 70% (teknis).
 - c. Bahan yang dipakai untuk uji skrining fitokimia yaitu ekstrak etanol bunga telang, etanol 70% (p.a), HCl 1%, pereksi mayer, kertas saring, aquadest, serbuk Mg, HCl pekat, FeCl₃ 10%, NaOH 1%, dan asam sulfat pekat.
 - d. Bahan yang digunakan untuk uji penentuan nilai SPF, %Te dan %Tp yaitu ekstrak etanol bunga telang dan etanol 70% (p.a).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi sampel bunga telang

Pada penelitian ini, dilakukan determinasi tanaman bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) di Laboratorium Sistemika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Penyiapan simplisia

Dikumpulkan bunga telang yang sudah diperoleh, lalu dipilah bunga yang masih segar dan utuh. Dilakukan sortasi agar kotoran yang menempel pada permukaan bunga dapat dihilangkan. Dipisahkan antara mahkota dengan kelopak bunga yang sudah dibersihkan, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C sampai dicapai kadar air simplisia <10%. Jika sudah kering, selanjutnya dihancurkan simplisia dengan grinder dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh.

3. Ekstraksi sampel

Ditimbang secara seksama sebanyak 15 gram serbuk bunga telang dan dilarutkan dengan pelarut etanol 70% sebanyak 150 ml (1:10 b/v) dalam botol duran. Kemudian diekstraksi menggunakan sonikator dengan frekuensi 40 kHz pada suhu 45°C selama rentang waktu 15 sampai 90 menit dengan interval 15 menit. Disaring hasil ekstraksi sampel dengan kertas whatman

nomor 1. Dipekatkan filtrat yang didapat menggunakan penangas air dengan temperatur 45°C hingga diperoleh ekstrak yang kental. Dihitung persen rendemen dari ekstrak kental yang didapat menggunakan rumus:

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

4. Skrining fitokimia

Uji skrining fitokimia secara kualitatif dilakukan dengan tujuan untuk melihat adanya zat aktif dalam bunga telang. Skrining fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini yaitu uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan antrakuinon. Proses pengujian dilakukan sebagai berikut:

a. Uji alkaloid

Diambil ekstrak etanol bunga telang sebanyak 20 mg, kemudian dimasukkan ± 2 tetes asam klorida 1% dan larutkan. Ketika sampel sudah larut ditambahkan 0,5 ml pereaksi mayer. Jika terdapat perubahan yaitu menjadi keruh atau terdapat endapan di larutannya menandakan positif alkaloid.

b. Uji flavonoid

Diambil ekstrak etanol bunga telang sebanyak 20 mg dilarutkan dalam 2 ml etanol, kemudian ditambahkan 1 mg serbuk magnesium dan 0,5 ml asam klorida pekat, kocok kuat. Jika warna larutan berubah menjadi merah, kuning, atau orange menandakan adanya flavonoid.

c. Uji saponin

Diambil 20 mg ekstrak etanol bunga telang, tambahkan 5 ml air, dan kocok dalam waktu 1 menit. Kemudian ditambahkan asam klorida 1 N sebanyak 1 tetes. Jika terlihat busa yang konstan selama ± 7 menit menandakan adanya saponin.

d. Uji terpenoid

Ditimbang ekstrak etanol bunga telang sebanyak 50 mg lalu dilarutkan dengan 5 ml air. Ambil 1 ml ekstrak yang sudah larut, ditambahkan asam klorida pekat 2 tetes dan asam sulfat pekat 1 tetes.

Apabila terdapat warna merah ataupun ungu pada larutan menandakan adanya terpenoid.

e. Uji tanin

Diambil 20 mg ekstrak etanol bunga telang, dilarutkan dengan 0,5 ml aquadest. Kemudian diambil 1 ml dari larutan tersebut lalu ditambahkan 0,5 ml FeCl_3 10%. Hasil yang menunjukkan ekstrak mengandung tanin yaitu terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan.

f. Uji antrakuinon

Diambil 25 mg ekstrak etanol bunga telang, tambahkan dengan 5 ml air lalu dipanaskan dalam waktu 5 menit dan saring. Kemudian larutan dibagi menjadi 2 tabung dan masing-masing tabung diisi 1 ml larutan sebagai berikut:

- 1) Tabung I untuk blanko
- 2) Tabung II diberi larutan natrium hidroksida 1 N beberapa tetes, kemudian apabila terbentuk larutan berwarna merah menandakan adanya antrakuinon.

5. Penetapan nilai SPF

Penetapan nilai SPF ekstrak etanol bunga telang dilakukan dengan ditimbang sampel dari masing-masing waktu sebanyak 10 mg, dimasukkan sampel dalam labu takar, ditambahkan 10 ml etanol 70%, dan dilarutkan. Kemudian disonikasi larutan selama 5 menit dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis yang sebelumnya sudah dikalibrasi dengan etanol 70% (*p.a*). Dilihat nilai absorbansi pada panjang gelombang 290 hingga 320 nm pada jarak 5 nm. Dipakai etanol 70% sebagai larutan blanko. Diulangi perlakuan sebanyak dua kali, kemudian ditentukan nilai SPF berdasarkan persamaan Mansur (1985).

6. Penentuan %Te dan %Tp

Penentuan %Te dan %Tp pada ekstrak etanol bunga telang dilakukan dengan ditimbang 10 mg sampel dari masing-masing waktu, dimasukkan sampel ke dalam labu takar lalu dilarutkan dalam 10 ml etanol 70%, kemudian disonikasi larutan selama 5 menit. Penentuan nilai %Te dilakukan dengan

diukur absorbansi pada pajang gelombang yang dapat menyebabkan bercak kemerahan yaitu 292,5 hingga 317,5 nm dengan jarak 5 nm. Penentuan nilai %Tp diukur absorbansi pada panjang gelombang yang mampu menyebabkan timbulnya pigmentasi yaitu 322,5 hingga 372,5 nm dengan jarak 5 nm. Diulangi perlakuan sebanyak dua kali.

H. Analisis Data

1. Penentuan nilai SPF

Penentuan nilai SPF ekstrak etanol bunga telang dilakukan dengan cara menghitung menggunakan metode Mansur (1986) sebagai berikut:

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

Dimana,

CF : Faktor koreksi (10)

Abs : Absorbansi sampel

EE : Efektivitas eritema yang disebabkan sinar UV pada λ nm

I : Intensitas sinar UV pada panjang gelombang λ nm

2. Penentuan Persentase Transmisi Eritema (%Te)

Penentuan %Te pada ekstrak etanol bunga telang dapat dilakukan dengan cara menghitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Transmisi Eritema} = \frac{E_e}{\Sigma F_e} = \frac{\Sigma(T \times F_e)}{\Sigma F_e}$$

Dimana,

T : Nilai transmisi

Fe : Fluks eritema pada panjang gelombang 292,5 sampai 317,5 nm

Ee : Jumlah fluks eritema yang diteruskan oleh ekstrak

Σf_e : Jumlah total energi sinar UV yang dapat menyebabkan eritema

3. Penentuan Persentase Transmisi Pigmentasi (%Tp)

Penentuan %Tp pada ekstrak etanol bunga telang bisa dilakukan dengan cara menghitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Transmisi Pigmentasi} = \frac{E_e}{\Sigma F_p} = \frac{\Sigma(T \times F_p)}{\Sigma F_p}$$

Dimana,

T : Nilai transmisi

Fe : Fluks pigmentasi pada panjang gelombang 322,5 – 372,5 nm

Ee : Jumlah fluks pigmentasi yang diteruskan oleh ekstrak

Σfe : Jumlah total energi sinar UV yang menyebabkan pigmentasi

4. Analisis data

Data-data hasil penelitian yang didapatkan kemudian dikumpulkan dan diolah secara statistik untuk melihat waktu ekstraksi terbaik dari ekstrak etanol bunga telang signifikan atau tidak. Dilakukan Uji Normalitas menggunakan *Shapiro Wilk* sebab total sampel kurang dari 50. Uji homogenitas dilakukan dengan uji *Levene's test* untuk memastikan bahwa kelompok yang membentuk sampel bersumber dari populasi yang sama dengan melihat signifikansinya.

Pada analisis data SPF dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas dengan *Levene's test*. Data yang didapat dinyatakan normal dan homogen sehingga analisis dilanjutkan dengan uji *one-way ANOVA* dan didapat nilai signifikansi $<0,05$ maka dilakukan uji *Post Hoc* menggunakan uji *Least Significant Difference* (LSD) untuk membuktikan adanya perbedaan yang signifikan pada tiap kelompok dengan nilai signifikansi $<0,05$. Kemudian untuk analisis data %Te dan %Tp dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas dengan *Levene's test*. Data yang didapat dinyatakan tidak homogen dan tidak normal sehingga dilanjut dengan uji non-parametrik yaitu *Kruskal-Wallis*, lalu diuji *Post Hoc* dengan *Pairwise Comparisons* untuk melihat signifikansinya.