

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu penelitian eksperimental dengan melaksanakan percobaan pengaruh suhu pengeringan rimpang kunyit hitam terhadap aktivitas penangkalan radiasi UV secara *in vitro* di laboratorium dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biofarmakologi, Prodi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Waktu Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2023 hingga Juli 2023.

C. Sampel

Rimpang kunyit hitam yang digunakan diperoleh dari daerah Samirono, Caturtunggal, Kecamatan Depok, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55223 dengan titik koordinat -7.7783083, 110.3805409. Rimpang yang digunakan berupa rimpang yang masih segar dengan usia tanam lebih dari 7 bulan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Suhu pengeringan rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb) adalah variabel bebas penelitian ini.

2. Variabel terikat

Nilai *Sun Protection Factor* (SPF), %Te dan %Tp ekstrak rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb) adalah variabel terikat penelitian ini.

3. Variabel terkontrol

Usia panen, lokasi pengambilan sampel, lama ekstraksi, waktu pengeringan, dan pelarut ekstraksi rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb) adalah variabel terkontrol penelitian ini.

E. Definisi Operasional

1. Rimpang kunyit hitam yaitu rimpang yang diperoleh dari tanaman kunyit hitam yang telah dipisahkan dari daun, bunga, batang dan akar.
2. Ekstrak yaitu sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian seluruh atau sebagian pelarut diuapkan dan diperoleh bobot ekstrak.
3. Nilai SPF yaitu jumlah energi UV yang dibutuhkan untuk menyebabkan eritema (kemerahan yang disertai bengkak) pada kulit yang dilindungi oleh suatu tabir surya, terhadap jumlah energi UV yang dibutuhkan untuk menyebabkan eritema pada kulit yang tidak diberikan perlindungan.
4. Nilai %Te nilai yang menggambarkan kemampuan suatu senyawa dalam memproteksi kulit dari sinar UVB yang dapat menyebabkan eritema atau kemerahan.
5. Nilai %Tp yaitu nilai yang menggambarkan kemampuan senyawa untuk memproteksi kulit dari UVA yang dapat menyebabkan kulit menjadi gelap

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Pada penyiapan simplisia alat yang diperlukan yaitu keranjang, pisau, talenan
 - b. Alat yang digunakan pada pengeringan yaitu oven (Memmert), ayakan 40 mesh (*standard testing sieve*), moisturizer balance (OHAUS USA) dan grinder (FOMAC)
 - c. Alat yang digunakan pada pembuatan ekstrak yaitu toples kaca/wadah maserasi, pengaduk, timbangan analitik (Ohaus SW), termometer, kompor listrik (Maspion) dan wajan.
 - d. Pada uji fitokimia alat yang digunakan yaitu alat gelas (Iwaki), rak tabung reaksi dan mikropipet (Eppendorf).
 - e. Alat yang digunakan pada analisis SPF, % Te, dan % Tp yaitu serangkaian alat spektrofotometer UV-Vis (Genesys), timbangan analitik (Ohaus SW), alat gelas (Iwaki), dan sonikator (Cole-Parmer).

2. Bahan

- a. Bahan pada penelitian ini adalah rimpang kunyit hitam segar yang diperoleh dari daerah Samirono, Caturtunggal, Kecamatan Depok, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.
- b. Bahan yang dipakai untuk membuat ekstrak yaitu serbuk rimpang kunyit hitam, kain flannel/batis dan etanol 70% (teknis).
- c. Bahan yang digunakan pada uji penapisan fitokimia yaitu ekstrak etanol rimpang kunyit hitam, HCl 1%, pereaksi Mayer, aquades, etanol p.a, HCl pekat, serbuk Mg, H₂SO₄, FeCl₃ 10%.
- d. Bahan yang digunakan pada uji SPF, %Te dan %Tp yaitu ekstrak etanol rimpang kunyit hitam, etanol p.a, kertas saring.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi sampel kunyit hitam

Pada penelitian ini, dilakukan determinasi tanaman untuk memastikan taksonomi kunyit hitam. Determinasi ini dilaksanakan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Persiapan simplisia

a. Sortasi basah

Tanaman kunyit hitam yang diperoleh dilakukan sortasi basah untuk menghilangkan bahan asing atau kotoran dari tanaman kunyit hitam sehingga diperoleh rimpang kunyit hitam yang layak untuk digunakan. Sortasi basah ini dikerjakan secara manual.

b. Pencucian

Pencucian dilakukan dengan menggunakan air bersih. Pencucian ini dilakukan dengan cara mencuci rimpang kunyit hitam yang diperoleh sebelumnya dengan menggunakan air mengalir.

c. Perajangan

Perajangan dilakukan dengan cara rimpang kunyit hitam yang telah dicuci dipotong/iris menjadi lebih kecil supaya mempercepat proses pengeringan.

3. Pengeringan

Proses ini dilakukan menggunakan oven dengan suhu yang berbeda-beda yaitu suhu 40°C, 50°C, 60°C dan 70°C hingga kadar air < 10% yang diukur menggunakan *moisture balance*. Rimpang kunyit hitam yang telah dikeringkan disortasi kering untuk menghilangkan pengotor dan benda asing yang tertinggal dirimpang. Dihaluskan rimpang yang sudah dikeringkan menggunakan grinder, lalu diayak dengan ayakan 40 mesh untuk diekstraksi.

4. Pembuatan ekstrak

Digunakan perbandingan (1:10) pada masing-masing suhu pengeringan yaitu 100 gram serbuk rimpang kunyit hitam direndam 1000 mL etanol 70% ditoples kaca, lalu dimaserasi selama 3 x 24 jam dengan pengadukan sesekali lalu disimpan di tempat gelap jauhkan dari sinar matahari langsung, kemudian disaring dengan kain flanel/batis. Remaserasi residu yang tersisa sebanyak 2 x (1 x remaserasi dilakukan selama 24 jam) hingga filtrat yang dihasilkan tidak berwarna pekat dan setelah itu disaring. Maserat yang diperoleh dipanaskan pada suhu tidak lebih dari 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental.

5. Uji fitokimia

a. Uji alkaloid

Sebanyak 40 mg sampel ditambahkan beberapa tetes HCl 1 % lalu ditambahkan 1 mL pereaksi Mayer, jika larutan menjadi keruh atau terdapat endapan menunjukkan adanya alkaloid di sampel (Cahyaningrum *et al.*, 2022).

b. Uji flavonoid

Diambil 250 mg ekstrak ditambahkan dengan 1 mL etanol p.a, ditambahkan 50 mg serbuk Mg dan 5 mL HCl pekat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah jingga atau merah ungu pada hasil reaksi (Vonna *et al.*, 2021).

c. Uji Saponin

Diambil 40 mg ekstrak lalu tambahkan 10 mL akuades ditabung reaksi. Dikocok selama 2 menit, lalu ditambahkan 1 tetes HCl pekat bila

terbentuk busa dan busa tidak hilang, maka ekstrak mengandung saponin (Wowor *et al.*, 2022).

d. Uji Terpenoid

Diambil 100 mg sampel ditambahkan 10 mL air hingga larut, bila sudah larut diambil sebanyak 2 mL dan ditambahkan HCl pekat 3 tetes dan H₂SO₄ pekat 1 tetes, bila terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

e. Uji tanin

Diambil 40 mg ekstrak di larutkan dengan 4 mL air hingga larut, selanjutnya ekstrak yang sudah larut diambil sebanyak 2 mL lalu ditambahkan FeCl₃ 10% sebanyak 1 mL. Jika terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan maka sampel positif mengandung tanin (Cahyaningsih *et al.*, 2019).

6. Analisis SPF, % Te, % Tp

Diambil 10 mg ekstrak etanol dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a lalu sonikasi 5 menit dan saring menggunakan kertas saring. Diukur larutan yang sudah sonikasi pada panjang gelombang 290 - 320 nm dengan spektrofotometer UV-Vis setiap interval 5 nm dan catat nilai serapan yang didapat dari masing-masing panjang gelombang. Blanko pada penelitian yaitu etanol (Juanita & Juliadi, 2020). Selanjutnya, diukur % Te pada panjang gelombang 292,5–317,5 nm setiap interval 5 nm dan catat nilai yang didapatkan, lalu diukur % Tp pada panjang gelombang 322,5–375,5 nm setiap interval 5 dan catat nilai yang didapatkan (Juanita & Juliadi, 2020).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Analisis data penentuan nilai SPF

Ditentukan nilai SPF dari masing-masing suhu pengeringan (40°C, 50°C, 60°C dan 70°C) ekstrak etanol rimpang kunyit hitam yang dihitung menggunakan persamaan Mansur *et al* (1986) yang dapat dilihat pada (Persamaan 1).

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times abs(\lambda) \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan:

- CF : Faktor Koreksi (ketetapan =10)
- EE : Spektrum Efek Eritema
- I : Spektrum Intensitas Cahaya
- Abs : Absorbansi Sampel

Untuk menghitung nilai SPF, terdapat nilai EE X I yang bersifat konstan serta dapat dilihat pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Nilai EE X I

Panjang gelombang (nm)	EE X I
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180

Sumber: Yulianti *et al* (2015)

2. Analisis data penentuan nilai %Te, dan %Tp

Untuk nilai % transmisi eritema dan % transmisi pigmentasi dihitung dalam persamaan (2) dan (3) (Taupik *et al.*, 2022).

$$\%Transmisi\ Eritema = \frac{\sum(T \times Fe)}{\sum Fe} \dots\dots\dots(2)$$

$$\%Transmisi\ Pigmentasi = \frac{\sum(T \times Fp)}{\sum Fp} \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan:

- T : Nilai Transmisi
- Fe : Fluks Eritema
- Fp : Fluks Pigmentasi

Dalam penentuan nilai presentase transmisi eritema dan pernetase transmisi pigmentasi terdapat nilai fluks eritema (Fe) dan fluks pigmentasi (Fp) yang dapt dilihat pada **Tabel 7** dan **Tabel 8**.

Tabel 7. Nilai Tetapan Fluks Eritema

Panjang gelombang (nm)	Fe
292,5	0,1105
297,5	0,6720
302,5	1,0000
307,5	0,2088
312,5	0,1364
317,5	0,1125

Sumber: Rahardhian *et al* (2019)

Tabel 8. Nilai Tetapan Fluks Pigmentasi

Panjang gelombang (nm)	Fp
322,5	0,1079
327,5	0,1020
332,5	0,0936
337,5	0,0798
342,5	0,0669
347,5	0,0570
352,5	0,0488
357,5	0,0456
362,5	0,0356
367,5	0,0310
372,5	0,0260

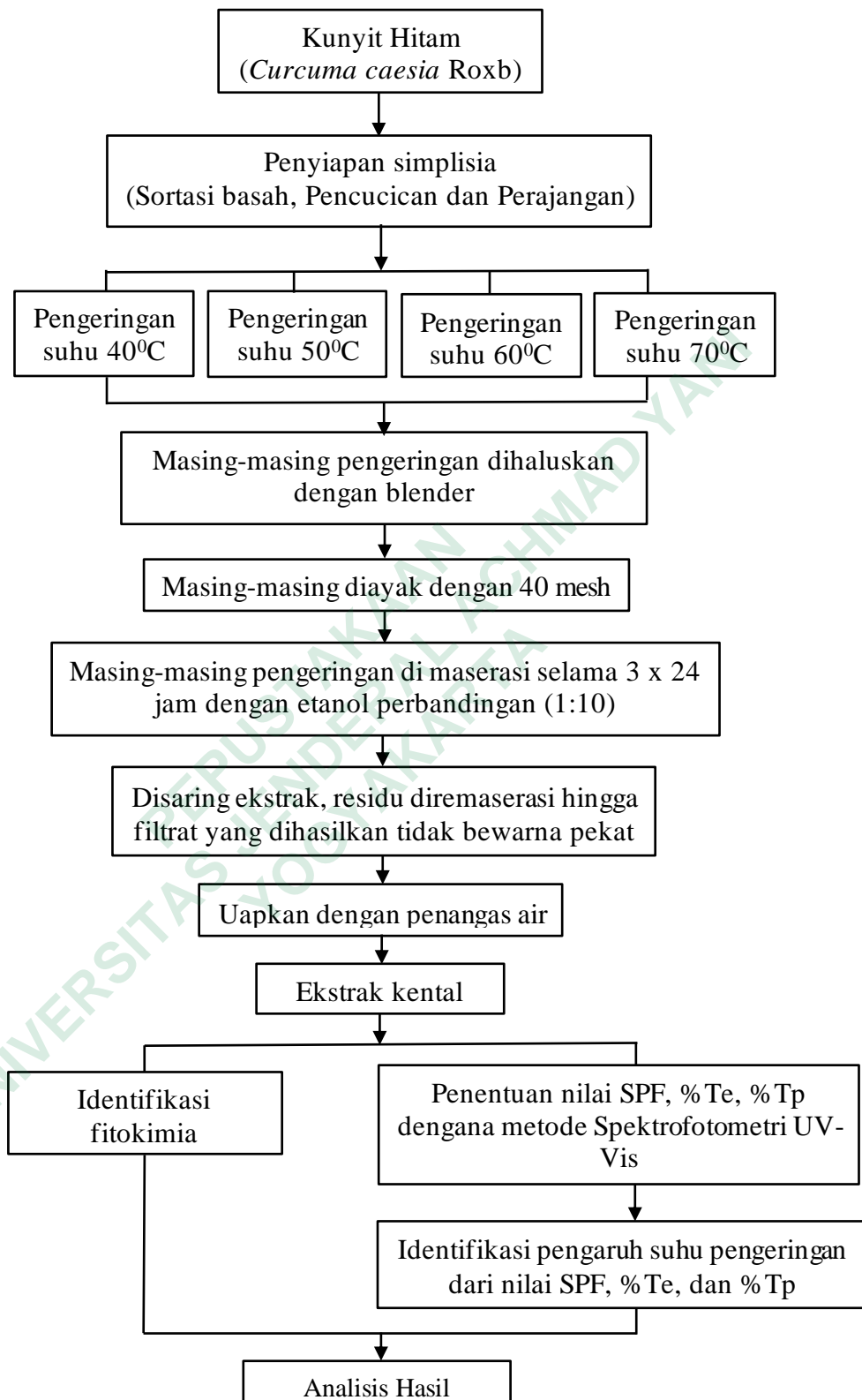
Sumber: Rahardhian *et al* (2019)

3. Analisis data statistik

Semua data yang didapatkan dari hasil penelitian yaitu nilai SPF, % Te dan % Tp, lalu dikumpulkan dan dianalisis statistik. Nilai SPF dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan homogenitas dengan uji *Levene's*. Data dinyatakan normal dan homogen kemudian dilanjutkan dengan uji *one-way ANOVA* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok dan data dinyatakan signifikan dengan nilai $p > 0,05$ kemudian *Post hoc* menggunakan uji *Least Signifikan Difference (LSD)* untuk membuktikan signifikansi pada tiap kelompok.

Nilai %Te dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan homogenitas dengan uji *Levene's*. Data dinyatakan normal dan tidak homogen sehingga dilanjutkan dengan uji non parametrik. Uji non parametrik pada penelitian ini menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan *Post hoc* menggunakan *Pairwise Comparisons* untuk melihat beda signifikan dari tiap kelompok dengan nilai $p < 0,05$.

Nilai %Tp dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan homogenitas dengan uji *Levene's*. Data dinyatakan tidak normal dan tidak homogen sehingga dilanjutkan dengan uji non parametrik. Uji non parametrik pada penelitian ini menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan *Post hoc* menggunakan *Pairwise Comparisons* untuk melihat beda signifikan dari tiap kelompok dengan nilai $p < 0,05$.



Gambar 5. Skema Jalannya Penelitian