BAB III
METODELOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang akan digunakan adalah penelitian kuantitatif menggunakan metode eksperimental laboratorium yaitu penelitian dari sampel bunga krisan menggunakan Spektrofotometer-UV Vis dan dinyatakan dalam hasil angka sebagai nilai SPF, %Te, dan %Tp yang dihasilkan sebagai zat untuk bahan tabir surya.

B. Lokasi dan Waktu

1. Lokasi

   Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam, dan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu

   Waktu penelitian dimulai dari pengambilan sampel bunga krisan di Desa Banyukuning, Kec. Bandungan, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah, untuk kemudian dilakukan determinasi di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, selanjutnya dilakukan penelitian di Laboratorium Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta sampai pada pengolahan data hasil penelitian, dilaksanakan dari bulan Mei 2022 hingga bulan Juni 2022

C. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini dikumpulkan berdasarkan spesies bunga, yang digunakan bunga krisan jenis *Chrysanthemum morifolium var. sheena* dan *Chrysanthemum morifolium var. lamet*, diambil secara keseluruhan bagian bunga dan dipilih yang masih segar dan mekar. Sampel diambil dari Desa Banyukuning, Kec.Bandungan, Kabupaten Semarang dengan ketinggian 1073 Mdpl, dengan masa panen 125-130 hari yang dipanen pada bulan Mei 2022.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi jenis bunga krisan dan konsentrasi ekstrak bunga krisan.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

2. Variabel terikat pada penelitian ini adalah penentuan nilai SPF, %Te dan %Tp pada fraksi bunga krisan (*Chrysanthemum*).
3. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah waktu panen, lama waktu maserasi, suhu pengeringan, dan usia panen.

E. Definisi Operasional

1. Bunga krisan

   Bunga yang akan digunakan yaitu spesies *Chrysanthemum morifolium var. sheena* dan *Chrysanthemum morifolium var. lamet*, diambil seluruh bagian bunga, serta dipilih yang masih segar dan mekar.
2. Nilai SPF

   Pengujian dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan mengukur absorbansi dari fraksi kental dari ekstrak bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium var. sheena* dan *Chrysanthemum morifolium var. lamet*) pada panjang gelombang antara 290-320 nm, selanjutnya hasil absorbansi akan dihitung dan dikembangkan menggunakan metode Mansur.
3. Persentase eritema (%Te) dan persentase pigmentasi (%Tp)

   Parameter persentase transmisi pigmentasi (%Tp) digunakan untuk mengetahui kemampuan sampel dalam proteksi pada kulit dari sinar UV A pada panjang gelombang antara 320-375 nm dan persentase eritema (%Te) digunakan untuk mengetahui kemampuan sampel dalam proteksi pada kulit dalam sinar UV B pada panjang gelombang antara 290-320 nm.
4. Konsentrasi larutan uji 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm

   Konsentrasi larutan uji digunakan untuk membandingkan efektivitas konsentrasi sampel dari hasil pengukuran absorbansi dalam menentukan nilai SPF, %Te dan %Tp pada fraksi kental air, etil asetat, dan n-heksana.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
   a. Proses pembuatan serbuk : *herb grinder*, ayakan
   b. Proses ekstraksi : timbangan analitik (Ohaus), gelas ukur (Iwaki dan Pyrex), bejana maserasi, pengaduk kayu, wajan, kompor, gelas beker (Iwaki dan Pyrex)
   c. Proses fraksinasi : spatula, timbangan analitik (Ohaus), gelas beker

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

(Iwaki dan Pyrex), magnetic stirer, hotplate, gelas ukur, corong pisah (Iwaki)

d. Proses pembuatan fraksi kental : hotplate, termometer, lemari asam, cawan porselin

e. Proses uji fitokimia : rak tabung reaksi, tabung reaksi (Iwaki), pipet tetes

f. Analisis SPF : spatula, cawan porselin, pipet tetes, labu ukur, tabung reaksi (Iwaki), gelas beker (Iwaki), rak tabung reaksi, dan spektrofotometer UV-Vis (Genesis 10S UV-Vis)

g. Analisis %Te dan %Tp : spatula, cawan porselin, pipet tetes, labu ukur (Iwaki), tabung reaksi (Iwaki), gelas beker, rak tabung reaksi, dan spektrofotometer UV-Vis (Genesis 10S UV-Vis)

2. Bahan

a. Proses pembuatan serbuk : bunga krisan (bagian bunga secara utuh dan mekar, dengan usia tanam antara 125-130 hari)

b. Proses ekstraksi maserasi : serbuk bunga krisan, etanol 70% (*Merck*)

c. Proses fraksinasi : akuabides, etil asetat *pro analisis* (*Merck*), n-heksana *pro analisis* (*Merck*)

d. Proses skrining fitokimia : reagen amonia 0,05 N, asam sulfat 2 N, pereaksi mayer (*Sigma-Aldrich*), pereaksi dragendoff (*Sigma-Aldrich*), magnesium (*Sigma-Aldrich*), HCl pekat (*Mallingckrodt*), $FeCl_3$ 1% (*Merck*)

e. Analisis SPF, %Te dan %Tp : etanol *pro analisis* (*Merck*)

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengumpulan bahan dan determinasi tanaman

Bunga krisan yang diambil yaitu bagian bunga secara keseluruhan, dari bagian dasar bunga sampai mahkota bunga, dipilih bunga yang segar yang mekar, dengan umur tanaman 125-130 hari. Lalu dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Determinasi tanaman ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran spesies bunga krisan yang akan digunakan pada penelitian

2. Persiapan sampel

Bunga krisan yang diambil bagian kelopak bunga, kemudian dilakukan di sortasi basah dengan tujuan untuk menghilangkan kotoran atau bahan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

asing lain. Selanjutnya dilakukan pencucian sampel hingga bersih dengan menggunakan air mengalir, kemudian ditiriskan. Bunga krisan kemudian di sortasi kering dengan tujuan untuk memisahkan adanya pengotor lain yang masih tertinggal. Lalu sampel dipotong kecil- kecil dan selanjutnya dilakukan pengeringan sampel dengan cara oven dengan suhu 50°C selama 3 hari hingga didapatkan simplisia kering bunga krisan. Selanjutnya dibuat serbuk dari simplisia kering bunga krisan dengan menggunakan blender, dan diayak dengan ayakan no 40 mesh.

3. Pembuatan ekstrak dari bunga krisan

   Pada pembuatan ekstrak bunga krisan, dilakukan ekstraksi cara maserasi dengan perbandingan 1:10 (Antarini dkk, 2021) yaitu dengan cara menimbang serbuk bunga krisan sebanyak 300 g lalu dimasukkan dalam bejana maserasi serta ditambahkan pelarut etanol 90% teknis sebanyak 3 liter selama 3 hari, kemudian dilakukan remaserasi dengan jumlah pelarut yang sama dalam waktu 1 hari

4. Uji organoleptik

   Uji organoleptik adalah uji yang didasarkan pada panca indra, dengan cara mengamati bau, bentuk, warna, dan rasa dari ekstrak.

5. Fraksinasi

   Fraksinasi merupakan pemisahan yang dilakukan berdasarkan perbedaan kepolarannya, dengan tujuan untuk mendapatkan senyawa yang lebih murni. Ekstrak etanol bunga krisan ditimbang sebanyak 5 gram, selanjutnya dilarutkan dengan 50 mL aquadest, dengan bantuan magnetic stirer dengan suhu 60°C, dimasukkan dalam corong pisah 100 mL, lalu ditambahkan dengan 25 mL n-heksana, digojog pada lemari asam selama 5 menit, kemudian didiamkan sampai membentuk 2 lapisan, dan diambil fraksi air dan *n*-heksana, perlakuan dilakukan dengan replikasi 2x, selanjutnya, fraksi *n*-heksana yang didapatkan disimpan pada wadah kaca dan ditutup dengan alumunium foil, fraksi air yang didapatkan, dimasukkan ke dalam corong pisah kembali, untuk kemudian ditambahkan dengan etil asetat 25 mL, dan digojog pada lemari asam selama 5 menit, ditunggu hingga terbentuk 2 lapisan, kemudian diambil fraksi air dan fraksi etil asetat, perlakuan dilakukan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

dengan replikasi 2x. Setelah didapatkan semua fraksi, kemudian diuapkan pada lemari asam, dengan suhu 50°C hingga didapatkan fraksi kental yang kemudian dihitung % rendemen yang didapatkan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{Bobot\ fraksi\ yang\ diperoleh}{Bobot\ ekstrak\ yang\ digunakan} \times 100\%$$

6. Uji aktivitas fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder dari bunga krisan. Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah fraksi kental dari hasil fraksi air, fraksi etil asetat, fraksi n-heksana. Pengujian yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin

a. Identifikasi Alkaloid

Ditimbang sebanyak 0,5 gram masing-masing fraksi, lalu dilarutkan dengan reagen amonia 0,05 N 3 mL dan asam sulfat 2 N 4 mL, lalu dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan pereaksi Mayer. Selanjutnya pada tabung yang lain fraksi yang telah dilarutkan ditambahkan dengan pereaksi dragendoff.

b. Identifikasi Flavonoid

Ditimbang sebanyak 0,5 gram pada masing-masing fraksi, lalu dilarutkan dengan etanol teknis 4 mL, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 0,1 gram Mg dan 5 tetes HCl pekat.

c. Identifikasi Tanin

Ditimbang sebanyak 0,5 gram pada masing-masing fraksi, lalu dilarutkan dengan aquadest 10 mL, selanjutnya disaring, filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditetesi 3 tetes dengan $FeCl_3$ 1%.

d. Identifikasi Saponin

Ditimbang sebanyak 0,5 gram pada masing-masing fraksi, lalu dilarutkan dengan menggunakan aquadest panas 5 mL dan ditambahkan dengan HCl, dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian dilakukan penggojokan.

e. Identifikasi steroid dan triterpenoid

Ditimbang sebanyak 0,5 gram pada masing-masing fraksi, lalu

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

ditambahkan dengan asam asetat anhidrida sebanyak 2 tetes, dan asam sulfat pekat 1 tetes.

7. Pembuatan konsentrasi larutan uji

   Dibuat larutan uji dengan variasi konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm, yaitu dengan cara ditimbang sebanyak 10 mg, 20 mg, 30 mg pada masing- masing fraksi kental air, etil asetat, dan n-heksana, kemudian dalam 100 mL etanol pro analisis dengan menggunakan labu ukur, sehingga didapatkan larutan uji dengan konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm.

8. Uji penentuan SPF

   Diambil masing-masing larutan uji dengan variasi konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm sebanyak 3 mL dari labu ukur, kemudian dilakukan pengukuran nilai SPF dengan cara mengukur absorbansi pada panjang gelombang 290-320 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan interval kenaikan setiap 5 nm. Blanko yang digunakan adalah etanol pro analisis.

9. Uji penentuan persentase transmisi eritema (%Te)

   Diambil masing-masing larutan uji dengan konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm sebanyak 3 mL dari labu ukur. Kemudian dilakukan pengukuran persentase transmisi eritema, dengan cara diukur absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang antara 290-320 nm setiap interval kenaikan 5 nm. Blanko yang digunakan pada uji adalah etanol pro analisis.

10. Uji penentuan persentase transmisi pigmentasi (%Tp)

    Diambil masing-masing larutan uji dengan konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm sebanyak 3 mL dari labu ukur. Untuk pengukuran persentase pigmentasi, diukur absorbansi dengan panjang gelombang 320-375 nm, setiap interval kenaikan 5 nm. Blanko yang digunakan adalah etanol pro analisis.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan nilai SPF

   Penentuan efektivitas bahan atau zat tabir surya dapat dilakukan dengan cara menentukan nilai SPF dari hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dimana dilakukan pengukuran absorbansi dari

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

sampel uji pada panjang gelombang antara 290-320 nm dengan interval kenaikan setiap 5 nm, digunakan etanol sebagai larutan blanko. Serapan pada larutan uji menunjukan adanya pengaruh zat yang dapat menyerap atau memantulkan sinar UV pada larutan. Selanjutnya hasil dari absorbansi dilakukan perhitungan dengan menggunakan metode dari Mansur, dengan rumus :

$$\text{SPF} = CF \times \sum_{2}^{3} \left(EE(\lambda) \times I\ (\lambda)\right) \times abs\ (\lambda)$$

Ket : CF = Faktor Korelasi (10), EE= Efisiensi Eriterma, I = Spektrum Simulasi Sinar Surya, abs = Hasil Absorbansi

Nilai EE dapat ditunjukkan pada tabel berikut :

Tabel 4. Nilai ketetapan EE x I

No	Panjang Gelombang (nm)	EE x I
1	290	0,0150
2	295	0,0817
3	300	0,2874
4	305	0,3278
5	310	0,1864
6	315	0,0839
7	320	0,0180

Berdasarkan rumus di atas, maka untuk mendapatkan nilai SPF, dilakukan perhitungan yaitu dengan cara nilai hasil Absorbansi yang diperoleh kemudian dikalikan dengan nilai EE x I, untuk masing-masing panjang gelombang yang terdapat pada tabel. Selanjutnya hasil perkalian absorbansi dan EE x I yang didapatkan kemudian dijumlahkan. Kemudian hasil penjumlahan yang didapatkan dikalikan dengan faktor koreksi yang nilainya 10, selanjutnya dapat ditentukan nilai SPF yang didapatkan dari masing-masing fraksi kental ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium var. sheena* dan *Chrysanthemum morifolium var. lamet*). Selanjutnya hasil perhitungan SPF yang didapatkan kemudian di klasifikasikan menurut FDA untuk mengetahui kemampuan sampel tersebut dalam memberikan perlindungan terhadap radiasi sinar UV.

Setelah didapatkan hasil pada perhitungan nilai SPF pada masing-masing fraksi kental ektrak etanol bunga krisan, selanjutnya dilakukan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

perbandingan pada 2 spesies bunga krisan yang digunakan, apakah terdapat hasil yang signifikan pada perbedaan dua spesies bunga krisan tersebut, untuk selanjutnya disimpulkan fraksi manakah yang memiliki nilai SPF paling baik.

2. Penentuan nilai %Te dan %Tp

Pada penentuan nilai persentase transmisi eritema (%Te) dan persentase transmisi pigmentasi (%Tp) dapat dilakukan dengan cara mengukur absorbansi sampel uji pada masing-masing fraksi yang diperoleh menggunakan spektrofotometri UV-Vis, dimana pada panjang gelombang antara 290-320 nm dengan interval tiap 5 nm digunakan untuk menentukan nilai persentase transmisi eritema (%Te), dan pada panjang gelombang antara 320-370 nm dengan interval tiap 5 nm digunakan untuk menentukan nilai persentase transmisi pigmentasi (%Tp).

Tabel 5. Nilai Ketetapan %Te (Cumpelik, 1972)

%Te	
Panjang Gelombang	Fluks Eritema
290-295	0.1105
295-300	0.6720
300-305	1
305-310	0.2008
310-315	0.1364
315-320	0.1125
Jumlah	22.332

Tabel 6. Nilai Ketetapan %Tp (Cumpelik, 1972)

%Tp	
Panjang Gelombang	Fluks Pigmentasi
320-325	0.1079
325-330	0.1020
330-335	0.0936
335-340	0.0798
340-345	0.0669
345-350	0.0570
350-355	0.0448
355-360	0.0456
360-365	0.0356
365-370	0.0310
Jumlah	0.6642

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Hasil yang diperoleh setelah dilakukan pengukuran, selanjutnya data tersebut akan dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\%Te = \frac{Ee}{\Sigma Fe} = \frac{\Sigma\ (T\ x\ Fe)}{\Sigma\ Fe}$$

$$\%Tp = \frac{Ep}{\Sigma Fp} = \frac{\Sigma\ (T\ x\ Fp)}{\Sigma\ Fp}$$

Keterangan :
T = Transmisi
Fe = Fluks eritema pada panjang gelombang tertentu
Ee = Banyaknya fluks eritema yang diteruskan oleh tabir surya
Fp = Fluks pigmentasi pada panjang gelombang tertentu
Ep = Banyaknya fluks pigmentasi yang diteruskan oleh tabir surya

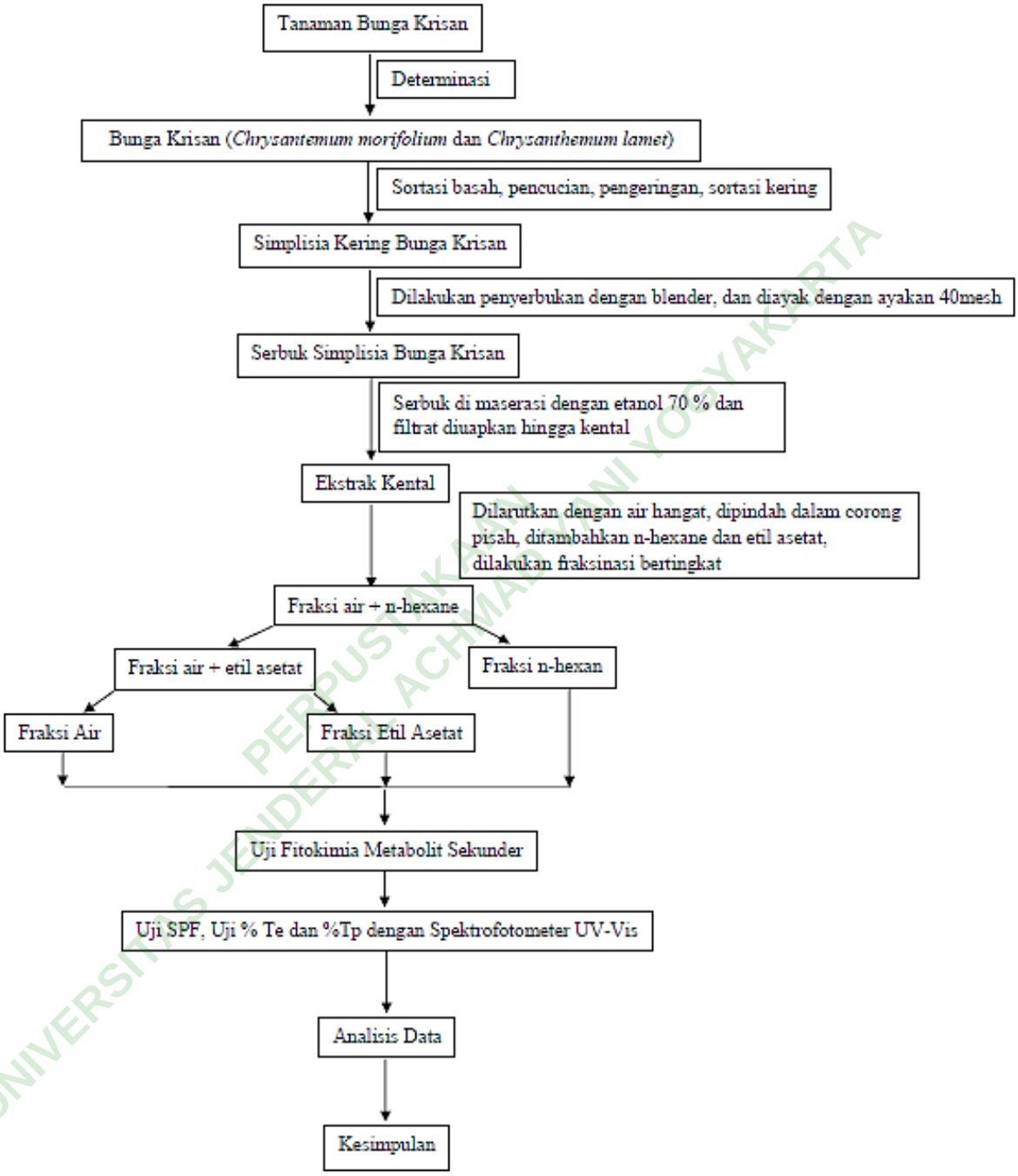
Setelah didapatkan hasil dari perhitungan tersebut, selanjutnya dilakukan evaluasi perbandingan dari masing-masing fraksi yang telah dilakukan pengukuran dengan 2 spesies bunga krisan yang berbeda dan konsentrasi uji yang berbeda. Selanjutnya diambil kesimpulan, fraksi manakah yang memiliki nilai %Te dan %Tp yang paling baik.

3. Analisis Statistik

Setelah didapatkan hasil dari pengukuran nilai SPF, %Te dan %Tp kemudian dilakukan uji SPSS dengan menggunakan *software* dengan tujuan untuk menguji perbedaan homogenitas dengan tujuan mengetahui sebaran data yang berasal dari dua varian atau lebih dan berasal dari populasi yang homogen maupun tidak. Kriteria pengujian nilai sig > α dengan taraf α = 0,05 yang dapat dihitung menggunakan *software*. Untuk uji distribusi normal dpat dilihat dari hasil atau nilai signifikan nilai dikatakan normal apabila > 0,05. Uji Kruskal Wallis digunakan sebagai alternatif untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antar 2 spesies bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium var. sheena* dan *Chrysanthemum morifolium var. lamet*) serta perbedaan konsentrasi pada masing-masing fraksi air, etil asetat, n- heksana yang digunakan untuk selanjutnya diambil kesimpulan apakah terdapat perbedaan antara perbandingan fraksi, konsentrasi dan spesies yang digunakan dalam penelitian ini.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

I. Skema Pelaksanaan Penelitian



UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA
PERPUSTAKAAN

Gambar 3. Skema pelaksanaan penelitian