

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan secara ekperimental (*True Experiment*). Penentuan Nilai *Sun Protectif Factor* (SPF) dan Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*) Secara In Vitro Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

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

2. Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di bulan April 2023-Juli 2023.

C. Sampel Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan sampel berupa bunga telang yang diambil di Sumbermulyo, Kabupaten Bantul, DIY. Sampel dari tanaman tersebut kemudian dibuat menjadi ekstrak etanol bunga telang

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebasnya yaitu konsentrasi ekstrak etanol dari bunga telang.

2. Variabel Terikat

Variabel terikatnya yaitu nilai SPF pada ekstrak etanol dari bunga telang.

3. Variabel Terkendali

Variabel ter kendalinya yaitu waktu serta suhu proses ekstraksi sampel ekstrak etanol bunga telang.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak etanol bunga telang didapatkan dengan cara ekstraksi dan menggunakan maserasi dengan pelarut etanol 96%. Bunga telang didapatkan dari tempat budidaya yang berlokasi di daerah Sumbermulyo, Kabupaten Bantul, DIY.

2. Pengukuran nilai SPF ekstrak etanol bunga telang yang memiliki potensi tabir surya bisa dilakukan dengan spektrofotometri UV-VIS yang memakai sumber radiasi elektromagnetik sinar tampak (panjang gelombang maksimal 290-320 nm) digunakan metode spektrofotometri yang hasilnya dihitung menggunakan persamaan Mansur.
3. Konsentrasi yang dianalisa adalah 1000, 1500 dan 2000 ppm.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Kompor, blender, wajan, glasswer set yaitu gelas beaker, labu takar, erlenmeyer, corong, pipet tetes, batang pengaduk, tabung reaksi (*iwaki*), rak tabung reaksi, kertas saring, timbangan digital, chamber, plat KLT, *white tip* untuk penotolan, rotary evaporator (*IKA*), waterbath (*Memmert WNB 45*), spektrofotometer UV-VIS (*Genesys 10S UV-VIS*).

2. Bahan

Bunga telang, pelarut etanol 96% (*teknis*), HCL 1%, pereaksi mayer, serbuk magnesium, HCl pekat, H₂SO₄, FeCl₃ 10%, n-butanol, aquades, asam asetat, silika gel F254. Etanol 96% (*teknis*), kertas saring dan ekstrak etanol bunga telang.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi tumbuhan

Pada penelitian ini dilakukan proses determinasi pada bunga telang untuk memastikan taksonomi dari bunga telang yang diperoleh dari tempat budidaya di daerah Bantul. Bagian dari tumbuhan yang dilakukan determinasi yaitu batang, daun dan bunga dari tanaman bunga telang. Determinasi dilaksanakan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Penyiapan sampel

a. Pengolahan sampel

Sebanyak 500 gram sampel bunga telang segar yang telah berumur 42 hari dan memiliki warna ungu atau biru yang cerah diambil dari petani budidaya di daerah Sumbermulyo Bantul dan dilakukan proses sortasi basah, pencucian,

perajangan, pengeringan serta sortasi kering. Tujuan dilakukan proses sortasi basah yaitu agar mendapatkan kebersihan, kemurnian dari simplisia sesuai dengan standart yang telah ditetapkan, kemudian tujuan dari proses pencucian yaitu agar simplisia bebas dari kotoran ataupun patogen sehingga bunga telang terlihat lebih menarik. Perajangan bertujuan untuk mempermudah proses pengeringan, lalu pengeringan bertujuan untuk menurunkan kandungan air dalam simplisia dan tahap terakhir yaitu sortasi kering yang bertujuan untuk memisahkan bagian tanaman yang tidak diperlukan dan juga kotoran lain yang masih tertinggal pada simplisia (Indah Yulia Ningsih, 2016)

b. Ekstraksi sampel

Bunga telang sebanyak 300 gram yang telah bersih kemudian keringkan dalam oven bersuhu 50⁰C, digunakan suhu 50⁰C karena bunga telang mengandung senyawa flavonoid yang tidak tahan terhadap suhu diatas 50⁰C. Setelah itu didapatkan bunga telang yang telah kering diblender agar partikelnya lebih kecil dan pada saat ekstraksi kontak antara padatan dan pelarut lebih luas sehingga jumlah ekstrak yang diperoleh lebih optimum. Serbuk yang telah kering dimaserasi dengan pelarut etanol 96% (1:10) selama 3x24 jam pada suhu ruang, gelap, terhindar dari cahaya matahari dan rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk kemudian diamkan selama 18 jam. Sebanyak 300 gram simplisia dimasukkan kedalam etanol 96% sebanyak 3000 ml. Kemudian dilakukan proses remaserasi selama 2x24 jam dengan pelarut etanol 96% (1:5). Maserat yang didapatkan selanjutnya dilakukan proses pengentalan dengan suhu 50⁰C menggunakan penangas air hingga mendapatkan ekstrak kental dengan konsentrasi yang tinggi. Ekstrak kental yang didapatkan dihitung rendemen dengan rumus
$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$
 (Afner Otniel Paongan & Rissa Laila Vifta, 2022)

c. Uji fitokimia

Uji skrining fitokimia secara kualitatif dilakukan dengan tujuan untuk melihat zat aktif apa saja yang terdapat pada bunga telang secara kualitatif.

1. Alkaloid

Diambil ekstrak etanol bunga telang sebanyak 40 mg dan tambahkan sedikit larutan HCL 1%, lalu tambahkan reagen mayer. Hasil positif apabila jika ditambahkan reagen mayer menghasilkan endapan dan berwarna keruh (Sudjarwo & Hukmiyah Mas'uliyatul O.M, 2017). Sampel juga dikatakan positif alkaloid apabila ditambahkan dengan reagen wagner menghasilkan endapan coklat dan apabila ditambahkan reagen *dragendroff* menghasilkan warna merah jingga (Simaremaere, 2014).

2. Flavonoid

Diambil ekstrak etanol bunga telang sebanyak 40 mg lalu tambahkan air panas 100 ml dan didihkan dalam waktu 5 menit setelah itu saring. Filtrat diambil 5 ml lalu tambahkan 0,05 mg serbuk magnesium dan asam klorida pekat sebanyak 1 ml kemudian kocok secara kuat. Apabila warna larutan terjadi perubahan warna merah, jingga atau kuning, maka menandakan terdapat flavonoid (Putra Wijaya et al., 2014).

3. Saponin

Diambil ekstrak etanol bunga telang sebanyak 40 mg dan tambahkan air 10 ml, lalu kocok selama 1 menit, dan tambahkan HCl 1 N sebanyak 2 tetes. Jika terdapat busa yang stabil selama ± 7 menit, maka menandakan adanya saponin pada ekstrak (Putra Wijaya et al., 2014).

4. Terpenoid

Diambil ekstrak etanol bunga telang sebanyak 100 mg lalu larutkan dengan 10 ml air. Kemudian diambil ekstrak yang telah larut sebanyak 2 ml dan tambahkan asam klorida pekat 3 tetes dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika terdapat perubahan warna menjadi ungu atau merah, maka terdapat senyawa terpenoid dalam ekstrak (Ergina et al., 2014).

5. Tanin

Diambil ekstrak etanol bunga telang sebanyak 40 mg lalu larutkan dengan 4 ml air, lalu ambil 2 ml ekstrak yang telah larut dan tambahkan $FeCl_3$ 10% sebanyak 1 ml. Apabila timbul warna hitam kehijauan atau biru tua pada larutan, maka menandakan adanya tanin (Simaremaere, 2014).

d. Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan KLT

Fase gerak yang akan digunakan adalah etanol, kloroform serta etil asetat yang menggunakan perbandingan 1:4,25:0,75 yang akan dibuat dalam 6 mL. Kemudian dilakukan penjuhan yang bertujuan untuk menyamaratakan tekanan uap dari fase gerak sehingga pemisahan dapat berjalan baik yang menggunakan kertas saring sebagai indikator jenuh dari fase gerak. Fase diam yang digunakan yaitu plat silika gel F254 dengan ukuran 9 x 3 cm serta berikan garis menggunakan pensil juga penggaris lalu berikan batas atas dan bawah masing-masing 0,5 cm. Setelah itu 250 mg ekstrak dilarutkan dengan etanol p.a sebanyak 5 ml (50.000 ppm). Setelah dibuat larutan sampel selanjutnya dibuat larutan standar kuersetin dengan cara ditimbang 10 mg kuersetin dan larutkan dalam metanol sebanyak 10 ml untuk mencapai konsentrasi 1000 ppm. Lalu *white tip* dicelupkan ke larutan ekstrak dan larutan standar dengan melakukan penotolan tipis dan tidak terlalu lebar, lalu dilakukan 2-3 kali sampai totonan tampak jelas. Kemudian dicelupkan plat ke chamber berisi fase gerak yang telah dijenuhkan sebelumnya kemudian ditutup lalu diamkan sampai eluen merambat ke plat mencapai tanda atas. Setelah itu, angin-anginkan plat hingga kering dan lakukan visualisasi dibawah sinar UV 254nm dan 365nm kemudian hitung nilai Rf sampel dan Rf standar.

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

3. Analisis SPF

1. Penyiapan kontrol positif dan negatif

Kontrol positif yang digunakan yaitu kuersetin 90 ppm yang dilarutkan dalam etanol 96% karena kuersetin merupakan golongan senyawa flavonoid yang dapat larut dalam pelarut etanol, kemudian kontrol negatif yaitu pelarut etanol 96% yang dibaca pada spektrofotometer UV-VIS.

2. Penyiapan sampel ekstrak bunga telang

Ekstrak bunga telang dibuat larutan induk 5000 ppm dengan cara mengambil 125 mg ekstrak dan larutkan dengan etanol 96% sebanyak 25 ml.

Setelah larutan induk jadi kemudian dibuat 3 rentang konsentrasi yaitu 1000, 1500 dan 2000ppm dengan cara mengambil sebanyak 2 ml, 3 ml dan 4 ml larutan induk ekstrak etanol bunga telang lalu dimasukkan kedalam labu takar dan larutkan dengan menggunakan etanol 96% hingga 10 ml dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

3. Pengukuran absorbansi

Pada setiap konsentrasi larutan ekstrak bunga telang diukur absorbansi menggunakan panjang gelombang 290-320 nm dengan interval 5 nm memakai spektrofotometer UV-Vis. Etanol 96% digunakan sebagai blanko.

H. Analisis Data

1. Perhitungan nilai SPF

Penentuan nilai SPF dapat di kalkulasikan memakai persamaan Mansur. Nilai absorbansi yang didapatkan lalu dikali dengan nilai $EE \times I$ untuk tiap interval. Hasil $EE \times I$ yang didapat kemudian dikali dengan faktor koreksi yang jumlahnya 10 untuk memperoleh nilai SPF sampel yang akan diuji.

Rumus

$$SPF_{spectrophotometric} = CF \times \sum EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

CF merupakan faktor koreksi yang berjumlah 10, lalu $EE(\lambda)$ merupakan efektivitas eritema radiasi pada λ nm dan $Abs(\lambda)$ merupakan absorbansi sampel dari spektrofotometri di panjang gelombang λ , Nilai $EE \times I$ sudah ditetapkan. Absorbansi yang diperoleh kemudian dikali dengan masing-masing nilai $EE \times I$. Kemudian jumlahnya dihitung dan dikalikan dengan faktor koreksi.

CF = Faktor koreksi (10)

EE = Efektivitas eritema disebabkan dari sinar UV di λ nm

Abs = Absorbansi sampel

I = Intensitas sinar UV di panjang gelombang λ nm

Tabel 3. Ketetapan Nilai EE X I

No	Panjang Gelombang	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

Hasil perhitungan kemudian disesuaikan dengan klasifikasi nilai SPF di bawah ini:

Tabel 4. Kategori Perlindungan Sediaan Tabir Surya Berdasarkan Nilai SPF

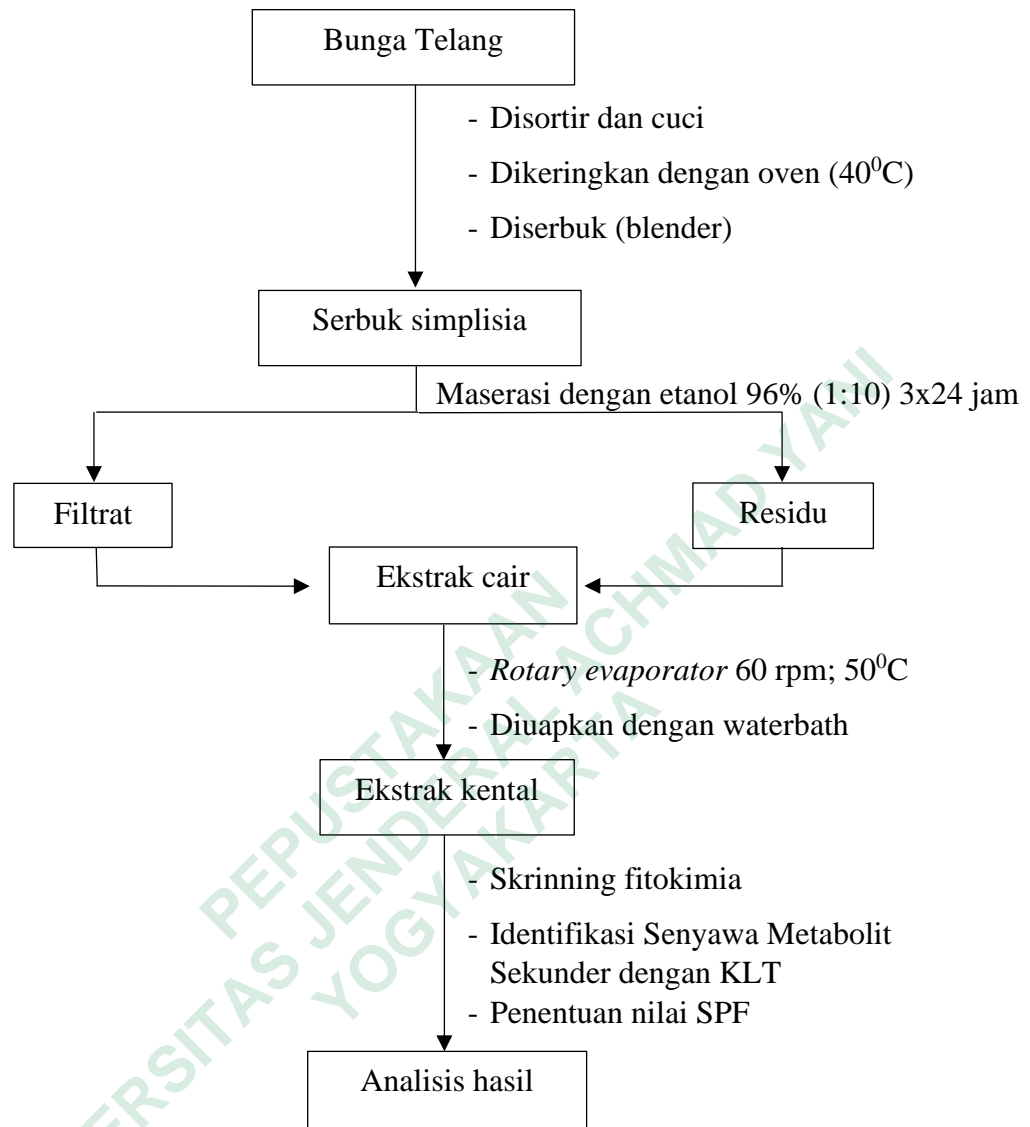
No	Nilai SPF	Kategori Perlindungan Tabir Surya
1	2-4	Minimal
2	4-6	Sedang
3	6-8	Ekstra
4	8-15	Maksimal
5	≥ 15	Ultra

2. Analisis statistik

Analisis dari data hasil penelitian dilakukan menggunakan software SPSS untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan dari variasi konsentrasi ekstrak etanol bunga telang dengan terlebih dahulu melakukan uji normalitas dengan Shapiro Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50, kemudian uji homogenitas dengan *Levene's* untuk menguji varian data

dari semua kelompok. Apabila data yang dianalisis normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji *one-way* ANOVA.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
PEPUSTAKAAN
YOGYAKARTA



Gambar 8. Skema jalannya penelitian