

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam kategori penelitian eksperimental yang dikenal sebagai *true experiment*. Pengaruh konsentrasi etanol sebagai pelarut ekstraksi terhadap aktivitas penangkalan radiasi UV daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dilaksanakan di laboratorium menggunakan spektrofotometri UV-Vis secara *in vitro*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

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

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan di bulan Juni-Juli 2024.

C. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan tanaman jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dari perkebunan warga di Desa Kalirejo, Kecamatan Grabag, Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah. Daun jeruk purut dipetik pada sore hari, saat masih segar dan berwarna hijau tua. Daunnya masih utuh serta tidak berlubang atau sobek-sobek, dan dipilih dari urutan ke-4 sampai ke-7 pada setiap ranting dari pucuk (Pratiwi, 2021).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*independent variable*)

Dalam penelitian ini, konsentrasi etanol sebagai pelarut ekstraksi pada ekstrak daun jeruk purut adalah variabel bebas.

2. Variabel terikat (*dependent variable*)

Dalam penelitian ini, nilai SPF, %Te dan %Tp ekstrak daun jeruk purut adalah variabel terikat.

3. Variabel terkontrol (*controlled variable*)

Dalam penelitian ini, durasi maserasi, durasi pengeringan, dan suhu adalah variabel terkontrol.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak kental daun jeruk purut dibuat dari serbuk daun jeruk purut yang sudah di maserasi dalam pelarut etanol 50%, 70%, dan 96%.
2. Nilai *Sun Protection Factor* dihitung menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada rentang panjang gelombang 290-320 nm dengan interval 5 nm. Karakteristik serapan sampel ditentukan dengan persamaan Mansur. Nilai absorbansi (A) yang didapat dikalikan dengan $EE \times I$ dan hasilnya dikalikan dengan nilai faktor koreksi (=10). Dengan demikian, didapatkan hasil nilai SPF.
3. Nilai persen transmisi eritema (%Te) dan persen transmisi pigmentasi (%Tp) diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, untuk transmisi eritema, panjang gelombang 292,5-317,5 nm dan untuk transmisi pigmentasi, panjang gelombang 322,5-372,5 nm. Serapan ditentukan dengan menggunakan rumus %Te dan %Tp. Setelah menentukan nilai absorbansi (A), selanjutnya transmittan (T) dihitung menggunakan rumus berikut ini: $A = -\log T$.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Pada penelitian ini peralatan yang digunakan yaitu alat gelas, ayakan 40 mesh, grinder (Fomac), *hotplate* (IKA® C-MAG HS 7), kain mori, kompor listrik, mikropipet, *moisture balance*, oven (Memmert), pengaduk kayu, rak tabung, sonikator (Cole palmer), spatula, spektrofotometri UV-Vis Genesys, termometer, timbangan analitik (Ohaus), toples, wajan, waterbath.

2. Bahan

Dalam penelitian ini bahan yang digunakan yaitu AlCl_3 1%, amoniak, asam asetat glasial, aquadest, *blue tip*, daun jeruk purut, etanol teknis dan *p.a.*, FeCl_3 10%, H_2SO_4 pekat, HCl 2 N, kertas saring, kloroform, n-heksan, pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, serbuk Mg.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Dalam penelitian ini dilaksanakan identifikasi tanaman untuk memastikan tanaman yang diperoleh tidak terjadi kekeliruan dalam mengambil tanaman yang digunakan untuk penelitian. Tanaman jeruk purut diambil bagian daunnya dengan daun yang masih segar dan memiliki warna hijau tua, daun yang utuh tanpa sobek-sobek atau berlubang, daun yang diambil pada urutan ke-4 sampai ke-7 tiap ranting dari pucuk. Proses identifikasi daun jeruk purut dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan.

2. Penyiapan sampel penelitian

a. Pengolahan dan pembuatan sampel

Sebanyak 2,4 kg daun jeruk purut disortasi basah, dengan dicuci bersih menggunakan air bersih yang mengalir dan diangin-anginkan, selanjutnya dioven selama 2 hari pada suhu 45°C hingga kering dan hancur apabila diremas. Setelah kering, simplisia daun jeruk purut ditimbang untuk menentukan beratnya, sampel diolah menjadi serbuk menggunakan grinder, lalu dilewatkan pada ayakan 40 mesh (Maimunah *et al.*, 2020).

b. Ekstraksi sampel

Ekstraksi daun jeruk purut dilakukan dengan metode maserasi. Masing-masing 100 gram serbuk simplisia kering, dilarutkan dalam 1000 mL pelarut (etanol 50%, etanol 70%, dan etanol 96%) dengan perbandingan 1:10 dalam tiga wadah yang berbeda. Tutup rapat wadah maserasi dan simpan di tempat gelap selama tiga hari dan diaduk setiap 6 jam sekali selama 1 menit. Selanjutnya, hasil maserasi disaring untuk diambil filtratnya menggunakan

kain mori (filtrat 1). Kemudian ampas diremaserasi menggunakan pelarut yang sama dengan volume pelarut setengah dari volume awal selama 1 hari dan diaduk setiap 6 jam. Setelah itu, disaring filtrat menggunakan kain mori (filtrat 2). Lalu campurkan filtrat pertama dan kedua, dipanaskan filtrat di atas penangas air pada suhu 45-60°C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan ditimbang serta dihitung rendemennya (Ilyas *et al.*, 2020).

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot total ekstrak kental (g)}}{\text{Bobot total simplisia (g)}} \times 100\% \dots \dots \dots (4)$$

c. Uji kadar air

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,7 gram ekstrak ke dalam wadah. Kemudian ekstrak diletakkan pada cawan menggunakan *moisture balance*. *Moisture balance* dinyalakan pada suhu 105°C dan dicatat hasil kadar air yang tertera (Luthfiani *et al.*, 2018).

3. Skrining fitokimia

a. Identifikasi senyawa alkaloid

Ekstrak etanol daun jeruk purut masing-masing ditimbang seberat 30 mg dilarutkan dengan kloroform secukupnya. Larutan tersebut kemudian ditambahkan dengan amoniak dan kloroform masing-masing diambil 10 mL, setelah itu ditambahkan H₂SO₄ 10 tetes. Campuran tersebut kemudian dikocok sampai homogen dan dibiarkan sampai membentuk dua lapisan. Lapisan bagian atas diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi dengan jumlah pengambilan yang sama. Tiap tabung tersebut ditambahkan dengan pereaksi Wagner, Mayer dan Dragendorf masing-masing diambil 1 mL. Hasil positif mengandung alkaloid menggunakan pereaksi Mayer, ditunjukkan dengan adanya endapan putih. Sedangkan pereaksi Wagner akan menunjukkan endapan berwarna kuning, dan pereaksi Dragendorf akan membentuk endapan warna jingga. Dikatakan positif mengandung alkaloid, jika dari ketiga pelarut tersebut terdapat dua pereaksi yang menunjukkan nilai positif (Subaryanti *et al.*, 2022).

b. Identifikasi senyawa saponin

Ekstrak etanol daun jeruk masing-masing ditimbang seberat 20 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan dengan *aquadest* panas 2 mL, digojog kuat kurang lebih 10 detik sampai homogen. Hasil positif ditandai oleh munculnya busa yang stabil dengan ketinggian 1-10 cm dalam kurun waktu >10 menit dan jika ditetesi dengan HCl 2 N busa tersebut tidak akan hilang (Andasari *et al.*, 2020).

c. Identifikasi senyawa tanin

Pada tabung reaksi yang sudah berisi ekstrak sebanyak 0,5 gram, ditambahkan 2 mL larutan FeCl₃ 10%. Warna yang terbentuk adalah hitam kehijauan, biru kehitaman atau biru tua. Hal ini menunjukkan adanya senyawa tanin (Rubianti *et al.*, 2022).

d. Identifikasi senyawa flavonoid

Masukkan 20 mg ekstrak kental daun jeruk purut ke setiap tabung reaksi, lalu larutkan dengan 2 mL etanol *p.a*, lalu ditambahkan AlCl₃ 1% sebanyak 5 mL. Jika membentuk warna kuning menandakan bahwa sampel tersebut mengandung flavonoid (Marpaung & Wahyuni, 2018).

e. Identifikasi senyawa fenolik

Ambil masing-masing 20 mg ekstrak etanol daun jeruk purut kemudian dilarutkan dengan etanol *p.a* 2 mL lalu ditetesi dengan FeCl₃ 1% sebanyak 5 tetes sampai terlihat perubahan warna. Adanya kandungan fenol apabila membentuk warna hitam kebiruan hingga hitam pekat (Salsabila, 2018).

f. Identifikasi senyawa terpenoid dan steroid

Ekstrak etanol daun jeruk purut masing-masing ditimbang 20 mg lalu dilarutkan dengan n-heksan. Setelah itu, sedikit larutan dituangkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 mL asam asetat glasial dan 1 mL asam sulfat pekat. Jika terbentuk cincin coklat kemerahan pada batas antara kedua pelarut, itu menandakan adanya terpenoid, sedangkan cincin hijau, menunjukkan adanya senyawa steroid (Fajriaty *et al.*, 2018).

4. Analisis SPF, %Te dan %Tp

a. Pembuatan larutan uji

Ditimbang seksama 50 mg sampel ekstrak daun jeruk purut dari etanol 50%, 70% dan 96%, lalu larutkan menggunakan etanol *p.a* dalam labu takar dan dicukupkan sampai 10 mL (5000 ppm). Larutan sampel kemudian di ultrasonifikasi selama 15 menit dan disaring dengan kertas saring. Selanjutnya diambil 1,0 mL filtrat dan tambahkan sampai 10 mL etanol *p.a* (500 ppm) pada labu takar. Perlakuan ini sama untuk ketiga variasi jenis pelarut dan dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Selanjutnya, dilakukan pengukuran pada nilai SPF, %Te dan %Tp ekstrak etanol daun jeruk purut (Putri *et al.*, 2022 dengan modifikasi peneliti).

b. Penentuan nilai *Sun Protection Factor*

Perhitungan nilai SPF dilakukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis yang mengukur serapan dengan panjang gelombang 290-320 nm pada interval 5 nm, dengan menggunakan pelarut etanol *p.a* sebagai blanko. Nilai SPF diperoleh dari pengukuran absorbansi larutan uji ekstrak etanol daun jeruk purut dengan konsentrasi pelarut etanol 50%, 70%, dan 96%.

c. Penentuan nilai %Te dan %Tp

Nilai %Te dan %Tp diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Nilai absorbansi (A) dicatat setiap interval 5 nm, dengan nilai absorbansi diambil pada panjang gelombang transmisi eritema 292,5-317,5 nm dan transmisi pigmentasi 322,5-372,5 nm. Nilai %Te dan %Tp ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan uji dari ekstrak kental daun jeruk purut dengan konsentrasi pelarut etanol 50%, 70%, dan 96%.

H. Analisis Data

1. Perhitungan nilai *Sun Protection Factor*

Dihitung nilai SPF dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada interval 5 nm dengan panjang gelombang 290–320 nm. Menghitung nilai SPF, menggunakan rumus Mansur berikut.

$$\text{SPF} = \text{CF} \sum_{320}^{290} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{absorbansi}(\lambda) \dots \dots \dots (5)$$

Keterangan:

EE : *Erythema Effect Spectrum*

I : *Light Intensity Spectrum*

Abs : *Sample Absorbance*

Cf : *Correction Factor (=10)*

2. Perhitungan nilai %Te dan %Tp

Pada masing-masing ekstrak, absorbansi diukur dalam interval 5 nm dalam rentang panjang gelombang 292,5-317,5 nm, yang dapat menyebabkan eritema, dan dalam rentang panjang gelombang 322,5-372,5 nm, yang dapat menyebabkan pigmentasi, dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Satyawati *et al.*, 2023).

Nilai persen transmisi eritema (%Te) dihitung dengan rumus:

$$\% \text{Te} = \frac{\text{Ee}}{\sum \text{Fe}} = \frac{\sum (\text{T} \times \text{Fe})}{\sum \text{Fe}} \dots \dots \dots (6)$$

Keterangan:

T : *Transmission value in the wavelength range of 292,5-317,5 nm*

Fe : *Erythema flux*

Ee : $\sum \text{T} \cdot \text{Fe}$: *Amount of erythema flux*

Nilai persen transmisi pigmentasi (%Tp) dihitung dengan rumus:

$$\% \text{Tp} = \frac{\text{Ep}}{\sum \text{Fp}} = \frac{\sum (\text{T} \times \text{Fp})}{\sum \text{Fp}} \dots \dots \dots (7)$$

Keterangan:

T : *Transmission value in the wavelength range of 322,5-372,5 nm*

Fp : *Erythema flux*

Ep : $\sum \text{T} \cdot \text{Fp}$: *Amount of erythema flux* (Rahardhian *et al.*, 2019).

Hasil SPF, %Te dan %Tp dari tiga kali replikasi, kemudian dihitung nilai rata-rata, SD, CV, dan SEM.

3. Analisa SPSS

Dalam penelitian ini, pengujian homogenitas dilakukan menggunakan *Levene's test* dan pengujian normalitas dengan *Shapiro Wilk*, Jika data memenuhi kriteria yang ditetapkan, analisis dilanjutkan dengan *One Way ANOVA* pada tingkat kepercayaan 95% ($P < 0,05$) serta uji *Post Hoc LSD*. Namun, apabila data tidak memenuhi salah satu atau kedua syarat homogenitas dan normalitas, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Post Hoc Pairwise Comparisons*. Hasil data ini digunakan untuk menilai pengaruh variasi konsentrasi etanol pada ekstrak daun jeruk purut terhadap nilai SPF, %Te dan %Tp.

PERPUSTAKAAN
JENDERAL ACHMAD
YOGYAKARTA