

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium dengan pendekatan kuantitatif untuk menguji nilai *Sun Protection Factor* (SPF), %Tp dan %Te dari beberapa variasi konsentrasi ekstrak etanol daun kupu-kupu dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Desain eksperimen dipilih karena memungkinkan peneliti untuk mencoba dan membandingkan hasil dengan mengontrol variabel-variabel yang terlibat. Metode spektrofotometri UV-Vis digunakan karena dapat mengukur kemampuan ekstrak dalam menyerap sinar UV. Hasil pengukuran ini digunakan untuk menghitung nilai SPF, %Tp dan %Te secara in vitro. Desain eksperimen ini membantu menguji efektivitas ekstrak daun kupu-kupu sebagai bahan tabir surya secara ilmiah dan mendapatkan hasil yang akurat dan dapat diulang.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **1. Lokasi Penelitian**

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

##### **2. Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada periode Mei hingga Juni 2025.

#### **C. Sampel Penelitian**

Penelitian ini menggunakan sampel daun kupu-kupu yang diperoleh dari Desa Kepek, Kecamatan Saptosari, Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta, dengan kriteria daun berwarna hijau muda (bagian daun urutan ke-2 sampai ke-4 dari pucuk tanaman) (Nurhasanah et al., 2024).

#### D. Variabel Penelitian

1. **Variabel bebas** (*Independent Variable*)

Konsentrasi ekstrak etanol daun kupu-kupu merupakan variabel bebas dalam penelitian ini.

2. **Variabel terikat** (*Dependent Variable*)

Nilai SPF, %Te dan %Tp yang diperoleh dari ekstrak etanol daun kupu-kupu merupakan variabel terikat dalam penelitian ini.

3. **Variabel terkontrol** (*Controlled Variable*)

Suhu pengeringan, metode analisis, jenis pelarut ekstraksi, dan waktu panen daun kupu-kupu dikendalikan agar konsisten dalam penelitian ini untuk memastikan akurasi hasil pengukuran SPF.

#### E. Definisi Operasional

1. Konsentrasi ekstrak etanol daun kupu-kupu diperoleh melalui proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi.
2. Pengukuran nilai SPF, %Te dan %Tp dari ekstrak etanol daun kupu-kupu dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.
3. Konsentrasi ekstrak yang dianalisis dalam penelitian ini adalah 800 ppm, 1000 ppm, 1200 ppm, 1400 ppm, dan 1600 ppm.

#### F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu wadah maserasi, neraca analitik (Ohaus SW 10S), baskom, termometer, kompor listrik, grinder (Fomac), wajan, *hot plate*, ayakan mesh 40, alat gelas (Iwaki), oven dan spektrofotometri UV-Vis.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kupu-kupu, aquadest, etanol 70% teknis, etanol proanalysis (*p.a.*), HCl 2N, HCl pekat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, FeCl<sub>3</sub> 10%, asam asetat anhidrat, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, dan serbuk magnesium.

## G. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Determinasi Sampel Daun Kupu-Kupu (*Bauhinia purpurea* L.)

Pada penelitian ini, dilakukan determinasi tanaman untuk memastikan taksonomi daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) yang diperoleh dari Desa Kepek, Kecamatan Saptosari, Kabupaten Gunung Kidul. Proses determinasi dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan.

### 2. Persiapan Sampel Penelitian

#### a. Pengolahan dan Pembuatan Sampel

Daun kupu-kupu sebelum digunakan sebagai sampel, daun mengalami beberapa tahap pengolahan untuk memastikan kualitas dan kemurnian bahan. Tahap pertama adalah sortasi basah, yaitu pemilihan daun yang masih segar dan bebas dari kotoran, hama, atau daun yang rusak. Setelah itu, daun dicuci menggunakan air mengalir hingga benar-benar bersih untuk menghilangkan kotoran dan debu yang menempel.

Setelah tahap pencucian, daun dipotong dengan ukuran lebar 1 cm untuk mempercepat proses pengeringan dan mempermudah proses penghalusan. Daun yang telah dipotong kemudian dijemur di tempat teduh selama 2 jam untuk mengurangi kadar air secara alami. Proses penjemuran dilakukan dengan sirkulasi udara yang baik dan terhindar dari sinar matahari langsung untuk menjaga kandungan senyawa aktif. Setelah dijemur, daun dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C sampai kering. Suhu ini dipilih untuk mencegah kerusakan senyawa aktif yang sensitif terhadap panas tinggi. Setelah pengeringan, dilakukan sortasi kering untuk memisahkan daun yang kurang kering atau rusak selama proses pengeringan (Surendro et al., 2024).

Daun yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan grinder selama 1 menit hingga menjadi serbuk halus. Untuk memperoleh tekstur serbuk yang seragam, dilakukan pengayakan dengan ayakan berukuran 40 mesh. Hasil akhir berupa serbuk halus daun kupu-kupu yang siap untuk proses ekstraksi (Nurhasanah et al., 2024).

b. Ekstraksi Sampel

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Menurut Harborne (1998), perbandingan 1:10 antara serbuk dan pelarut sering digunakan dalam ekstraksi senyawa bioaktif untuk memastikan kontak yang cukup antara sampel dan pelarut, sehingga meningkatkan difusi senyawa aktif. Sebanyak 500 gram serbuk daun kupu-kupu dimaserasi dengan 5000 mL etanol 70% selama 3x24 jam, dilanjutkan dengan remaserasi selama 2x24 jam menggunakan 2500 mL. Selama proses maserasi dan remaserasi, campuran diaduk setiap 6 jam sekali untuk mempercepat proses difusi senyawa aktif ke dalam pelarut. Maserat dipekatkan menggunakan penangas air pada suhu 50°C (Lestari et al., 2021).

c. Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mendeteksi keberadaan senyawa bioaktif dalam ekstrak etanol daun kupu-kupu. Skrining fitokimia mencakup uji untuk alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, dan tanin. Berikut adalah prosedur uji fitokimia:

1) Alkaloid

Ditimbang 0,5 gram ekstrak ditambahkan 1 ml HCl dan 9 ml aquades, kemudian dipanaskan selama 2 menit, didinginkan, dan disaring. Larutan kemudian dibagi ke dalam 3 tabung reaksi, dan ditambahkan:

- a) Tabung pertama: 2 tetes reagen Mayer. Hasil positif ditandai dengan endapan kuning, menunjukkan adanya alkaloid.
- b) Tabung kedua: 2 tetes reagen Dragendorff. Hasil positif ditandai dengan endapan merah.
- c) Tabung ketiga: 2 tetes reagen Wagner. Hasil positif ditandai dengan endapan cokelat atau kemerahan (Yani et al., 2023).

2) Flavonoid

Ditimbang 0,5gram ekstrak, tambahkan 2 mg serbuk magnesium dan 2 tetes HCl pekat. Hasil positif ditandai dengan

warna kuning, merah, atau jingga, menunjukkan adanya flavonoid (Yani et al., 2023).

### 3) Fenolik

1 mL ekstrak dicampur dengan 2 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  5%. Hasil positif ditandai dengan warna hijau kehitaman atau biru kehijauan, menunjukkan adanya senyawa fenolik (Dewi et al., 2021).

### 4) Saponin

Ditimbang 0,5 gram ekstrak dicampur dengan 10 mL akuades dan dikocok selama 30 detik. Hasil positif ditandai dengan busa yang stabil selama 30 detik, menunjukkan adanya saponin (Dewi et al., 2021).

## 3. Analisis SPF, %Te dan %Tp

Ekstrak kental yang telah didapat, selanjutnya ditimbang masing-masing sebanyak 8 mg, 10 mg, 12 mg, 14 mg, dan 16 mg lalu dilarutkan dengan pelarut etanol (*p.a*) sampai 10 ml dalam labu takar, sehingga di dapatkan konsentrasi 800 ppm, 1000 ppm, 1200 ppm, 1400 ppm, dan 1600 ppm. Nilai *Sun Protection Factor* (SPF) dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan metode Mansur dengan membaca absorbansi sampel pada rentang panjang gelombang 290-320 nm dengan interval tiap 5 nm, penentuan %Te dilakukan dengan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 292,5-317,5 nm, sedangkan %Tp pada panjang gelombang 332,5-375,5 nm dengan interval tiap 5 nm dilakukan replikasi 3 kali (Endahsari et al., 2022).

## H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

### 1. Perhitungan Nilai SPF

Nilai *Sun Protection Factor* (SPF) dihitung menggunakan persamaan Mansur *et al.*, (1986) sebagai berikut:

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

Keterangan:

CF = Faktor koreksi (10)

EE = Spektrum Efek Eritema

I = Spektrum Intensitas Cahaya

Abs = Absorbansi Sampel

Nilai EExI adalah suatu konstanta yang telah ditentukan, berdasarkan literatur (Qonitah et al., 2024) nilai EExI dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5. Nilai EExI dalam Perhitungan SPF**

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
Total	1

## 2. Perhitungan %Transmisi Eritema (%Te)

Perhitungan %Te dapat dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

Te = Nilai persen transmisi eritema

Fe = Fluks eritema pada panjang gelombang (292,5-317,5 nm)

Ee = Banyaknya fluks eritema yang diteruskan oleh tabir surya (Gina et al., 2022).

Nilai fluks eritema adalah suatu konstanta yang telah ditentukan, berdasarkan literatur (Qonitah et al., 2024) nilai fluks eritema dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6. Nilai Fluks Eritema**

Panjang Gelombang (nm)	Fluks Eritema
292,5	0,1105
297,5	0,6720
302,5	1
307,5	0,2008
312,5	0,1364
317,5	0,1125
Total	2,2332

### 3. Perhitungan %Transmisi Pigmentasi (%Tp)

Perhitungan %Tp dapat dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

Tp = Nilai persen transmisi pigmentasi

Fp = Fluks pigmentasi pada panjang gelombang (322,5-272,5 nm)

Ep = Banyaknya fluks pigmentasi yang diteruskan oleh tabir surya (Gina *et al.*, 2022).

Nilai fluks pigmentasi adalah suatu konstanta yang telah ditentukan, berdasarkan literatur (Qonitah *et al.*, 2024) nilai fluks pigmentasi dapat dilihat pada Tabel 7.

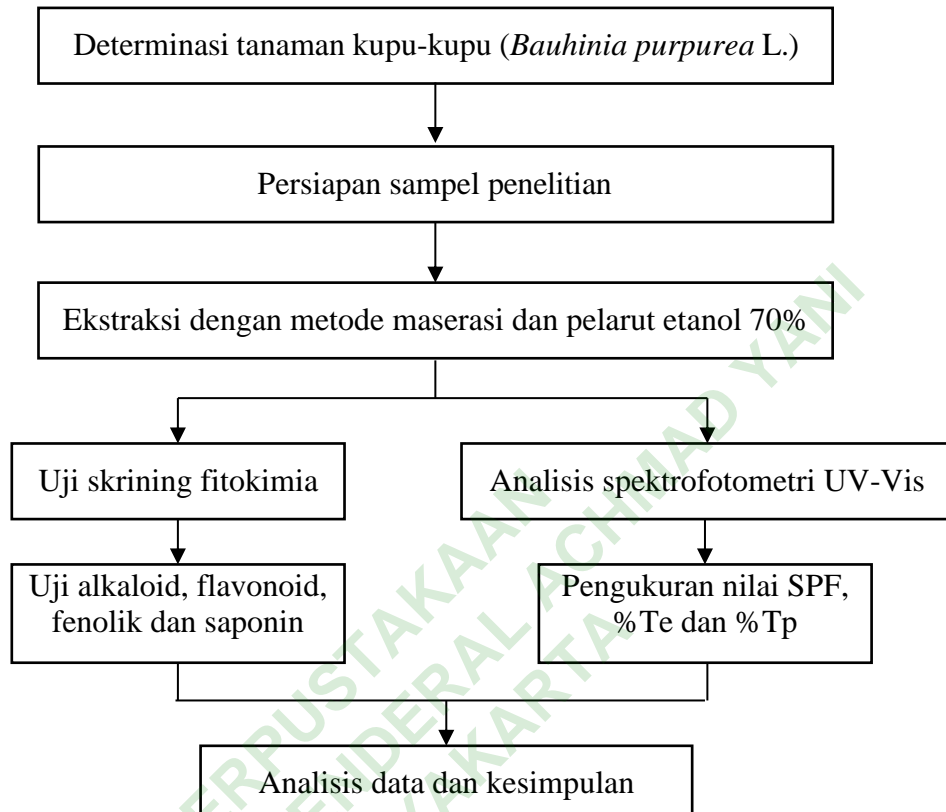
**Tabel 7. Nilai Fluks Pigmentasi**

Panjang Gelombang (Nm)	Fluks Pigmentasi
322,5	0,1079
327,5	0,1020
332,5	0,0936
337,5	0,0798
342,5	0,0669
347,5	0,0507
352,5	0,0448
357,5	0,0456
362,5	0,0356
367,5	0,0310
372,5	0,0260
Total	0,6942

#### 4. Analisis Data

Analisis statistik pada penelitian ini data dimulai dengan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* yang menunjukkan bahwa data nilai SPF, % Te dan % Tp berdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan (*Levene's Test*) untuk menguji kesamaan varian antar kelompok ( $p < 0,05$ ), sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik. Berdasarkan hasil tersebut, dilakukan uji One Way ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% yang menunjukkan adanya perbedaan rata-rata nilai SPF, % Tp dan % Te yang signifikan antar kelompok konsentrasi ekstrak ( $p < 0,05$ ). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan, dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD Apabila hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD (Least Significant Difference). Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara beberapa kelompok perlakuan (Lestari et al., 2021). Dengan demikian, uji statistik akan memperkuat validitas dan reliabilitas hasil penelitian terkait potensi ekstrak daun kupu-kupu sebagai agen fotoprotektif.

### I. Skema Pelaksanaan Penelitian



Gambar 3. Skema Pelaksanaan Penelitian