

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian eksperimental secara *in vitro* ini dilakukan dengan melakukan ekstraksi metode maserasi menggunakan butanol, etanol dan metanol sebagai pelarut ekstraksi daun jambu biji putih, kemudian diukur nilai SPF masing-masing sehingga diketahui SPF paling optimal.

B. Lokasi Penelitian

1. Lokasi : Laboratorium Kimia, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.
2. Waktu : April-Juni 2024

C. Sampel

Daun jambu biji putih yang tumbuh di Kecamatan Grabag, Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah, digunakan sebagai sampel penelitian. Sampel diambil pagi hari saat daun masih segar dan hijau dan dipilih daun muda yang berada pada bagian ke kedua dari pucuk terdekat dengan matahari (Rivai & Putriani, 2010). Koordinat titik lokasi pengambilan sampel adalah 41°24'12.2"N 2°10'26.5"BT.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas penelitian ini pelarut butanol, etanol dan metanol.
2. Variabel terikat penelitian ini adalah nilai SPF
3. Variabel terkontrol penelitian ini adalah lokasi tumbuh daun, lama maserasi dan pengadukan

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun jambu biji putih (*Psidium guajava* L.) diperoleh melalui ekstraksi metode maserasi dengan menggunakan pelarut butanol, etanol, dan metanol.
2. SPF adalah standar umum yang mengukur seberapa baik produk atau zat pelindung UV untuk melindungi kulit. Nilai SPF yang lebih tinggi menunjukkan kemampuan perlindungan sinar matahari yang lebih baik.
3. Nilai SPF masing-masing ekstrak diperoleh dengan mengkalkulasikan absorbansi pada panjang gelombang 290 hingga 320 nm ke dalam persamaan Mansur.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat pengaduk (kayu dan kaca), alat gelas (*Iwaki*), ayakan 40 mesh, baskom, cawan porselin, grinder, kompor Listrik (*Maspion*), oven, panci, pisau, rak tabung (kayu), sonikator (*Cole-Parmer*), spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S*), termometer, timbangan analitik (*Ohaus*), waterbath, wadah maserasi dan wajan penangas.

2. Bahan

Asam sulfat (H_2SO_4) *p.a*, asam klorida (HCl) *p.a*, asam asetat glasial, akuades, butanol *p.a* (*Supelco*) dan teknis, daun jambu biji putih, etanol 96% *p.a* dan teknis, feri klorida (FeCl_3) teknis, kertas saring, kain mori, magnesium serbuk teknis, metanol *p.a* dan teknis, pereaksi Meyer, pereaksi Dragendorff, dan pereaksi Wagner.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi sampel penelitian

Determinasi dilakukan untuk memastikan kesesuaian dan keakuratan dari tanaman yang digunakan dalam penelitian. Proses ini dilakukan di Laboratorium Biologi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta .

2. Penyiapan sampel

Dikumpulkan 500 gram daun jambu biji putih segar, setelah itu sampel dicuci bersih dengan air, dipotong kecil lalu dikeringkan pada suhu 40°C di dalam oven. Kemudian digunakan grinder untuk membuat bubuk dari simplisia yang telah kering, kemudian diseragamkan bubuk yang diperoleh melalui ayakan 40 mesh (Purwanto & Prajitno, 2013)

3. Ekstraksi sampel

Tiga pelarut berbeda digunakan dalam proses ekstraksi penelitian ini: butanol, etanol, dan metanol. 100 gram sampel bubuk ditimbang sebanyak tiga kali, kemudian dimasukkan ke dalam wadah baru yang masing-masing ditambahkan 1 L dari ketiga pelarut (metanol teknis, etanol teknis, dan butanol teknis) dengan perbandingan 1:10. Setiap wadah dibungkus rapat dengan aluminium foil dan terlindung dari cahaya. Setelah itu, aduk tiga kali sehari, atau

setiap delapan jam, selama tiga hari. Tiga hari kemudian, filtrat maserasi yang diperoleh dipisahkan dari residu (Azmi *et al.*, 2021).

Selanjutnya dilakukan remaserasi pada residu dengan masing-masing pelarut (butanol, etanol, dan metanol) menggunakan setengah dari volume pelarut ekstraksi sebelumnya, yaitu 500 mL. Proses remaserasi diulang sebanyak 4 kali. Hasil remaserasi digabungkan, lalu dipekatkan dengan penangas air pada suhu maksimal 50°C. Ekstrak dipekatkan hingga kental, lalu dihitung rendemennya pada (**Persamaan 4**) (Wicaksono & Ulfah, 2017).

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang di dapat}}{\text{Berat simplisia yang di ekstraksi}} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

4. Pemeriksaan fitokimia

a. Pemeriksaan alkaloid

Ditempatkan 1 mL sampel masing-masing pada 3 tabung reaksi. Setiap tabung reaksi kemudian diisi dengan 10 tetes asam sulfat pekat, kocok kuat, kemudian masukkan pereaksi Meyer ke tabung 1, Dragendorff ke tabung 2, dan Wagner ke tabung 3. Akan terbentuk endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan kemerahan pada pereaksi Dragendorff, dan endapan kuning pada pereaksi Wagner jika hasil uji positif alkaloid (Simbolon *et al.*, 2021).

b. Pemeriksaan flavonoid

Ditempatkan 1 mL sampel, 2 tetes HCl pekat, dan diikuti dengan pengocokan yang kuat. Tambahkan bubuk magnesium secukupnya. Jika flavonoid terdeteksi, warnanya akan berubah menjadi merah atau kuning (Satiyarti *et al.*, 2019).

c. Pemeriksaan saponin

Ditempatkan 1 mL sampel dalam tabung reaksi bersama dengan 5 mL air suling, dipanaskan, kemudian diangkat dan dikocok kuat dengan dua tetes HCl. Jika saponin menghasilkan busa selama lima belas menit, maka efektif. Namun jika tidak ada busa maka tidak ada saponin (Badaring *et al.*, 2020).

d. Pemeriksaan tanin

Ditempatkan 1 mL sampel dalam tabung reaksi dan dipanaskan dengan

waterbath. Selanjutnya, gunakan pipet penetes untuk menambahkan 2 hingga 3 tetes FeCl_3 ke dalam tabung reaksi. Akan muncul warna hijau tua kebiruan atau hijau kehitaman jika uji senyawa tanin positif (Simbolon *et al.*, 2021).

e. Pemeriksaan fenol

Ditempatkan 1 mL sampel dalam tabung reaksi bersama dengan FeCl_3 2 hingga 3 tetes. Selanjutnya, amati perubahan warnanya. Menurut (Badaring *et al.*, 2020) perubahan warna menjadi biru kehijauan menunjukkan senyawa fenolik bekerja dengan baik.

f. Pemeriksaan steroid dan terpenoid

Ditempatkan 1 mL sampel dalam tabung reaksi bersama dengan asam asetat glasial dan H_2SO_4 2 hingga 3 tetes. Hasil positif untuk steroid menunjukkan perubahan warna menjadi biru atau ungu. Jika hasil terpenoid untuk sementara positif, maka akan berubah menjadi merah atau kuning (Satiyarti *et al.*, 2019).

5. Pembuatan Larutan Uji

Ditimbang masing-masing ekstrak butanol, etanol dan metanol dan ekstrak daun jambu biji putih sebanyak 15 mg dan dilarutkan dengan 100 mL butanol *p.a.*, etanol *p.a.* dan metanol *p.a.* yang dimasukkan ke dalam labu takar berbeda-beda sesuai dengan masing-masing pelarut ekstraksi daun jambu biji putih. Lalu dilakukan sonikasi selama 5 menit untuk meningkatkan kelarutan dan disaring menggunakan kertas saring (Amsiyah & Mardiyanti, 2021).

6. Penentuan Nilai SPF

Setelah dibuat larutan uji dari masing-masing pelarut butanol, etanol dan metanol. Sampel dibaca absorbansinya gunakan set spektrofotometer UV-vis untuk mencatat pembacaan setiap 5 nm pada panjang gelombang 290–320 nm (290, 295, 300, 305, 310, 315, 320 nm). Untuk setiap konsentrasi, pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali. Tergantung pada pelarut yang digunakan, blanko seperti butanol, etanol, dan metanol digunakan. Setelah mencatat data serapan tiap konsentrasi, dihitung nilai SPF (Widyawati *et al.*, 2019).

H. Analisis Data

1. Perhitungan nilai *Sun Protection Factor* (SPF)

Setelah perolehan data serapan pada masing-masing panjang gelombang 290 hingga 320 nm, yang diukur setiap 5 nm. Selanjutnya dengan menggunakan pendekatan Mansur pada persamaan pada (**Persamaan 1**) ditentukan nilai Sun Protection Factor (SPF) :

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

Keterangan :

Abs = Absorbansi

CF = Faktor koreksi (=10)

I = Intensitas Sinar UV pada panjang gelombang λ (nm)

EE = Spektrum efek eritema (Yulianti *et al.*, 2015)

2. Analisis statistika

Analisis statistik dilakukan terhadap data nilai SPF yang dikumpulkan menggunakan perangkat lunak SPSS di komputer. Tujuan analisis statistik adalah untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan nilai SPF yang signifikan pada masing-masing ekstrak. Tahapan analisis statistik yang dilakukan adalah Uji normalitas Shapiro-Wilk dan uji homogenitas Levene. Uji normalitas Shapiro-Wilk memberikan hasil yang tepat dan akurat bila digunakan pada ukuran sampel kecil, seringkali kurang dari lima puluh sampel. Data yang diperoleh terdistribusi secara teratur atau normal, ditunjukkan dengan nilai sig >0,05. Sedangkan homogenitas atau keseragaman data dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan Uji Homogenitas Levene. Tingkat signifikansi >0,05 menunjukkan data yang diperoleh mempunyai hasil yang seragam (Lestari & Prajuwita, 2021).

Uji *One Way* ANOVA digunakan dalam proses analisis statistik karena data yang dikumpulkan homogen dan normal. Data SPF dinyatakan berbeda signifikan dengan nilai sig <0,05. Uji *Post Hoc* LSD digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antar ekstrak karena ditemukan signifikansi <0,05 (Septiadi & Ramadhani, 2020).