

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui nilai SPF, %Te dan %Tp ekstrak metanol dan etil asetat daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) secara *In Vitro* menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

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

2. Waktu penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di bulan Oktober 2023 – November 2023.

C. Sampel Penelitian

Daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) segar dan berwarna hijau muda (urutan 2-4) yang diambil dari Desa Ngawu, Kecamatan Playen, Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variasi pelarut metanol dan etil asetat daun kupu-kupu.

2. Variabel terikat

Nilai SPF, %Te, dan %Tp ekstrak metanol dan etil asetat daun kupu-kupu

3. Variabel kontrol

Pemilihan daun, suhu pengeringan.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak metanol daun kupu-kupu merupakan ekstrak yang didapat dari hasil maserasi daun kupu-kupu dengan pelarut metanol.
2. Ekstrak etil asetat daun kupu-kupu merupakan ekstrak yang didapat dari hasil maserasi daun kupu-kupu dengan pelarut etil asetat.
3. Penentuan nilai SPF, %Te, dan %Tp dari ekstrak metanol dan etil asetat daun kupu-kupu menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Spektrofotometer UV-Visible (*Genesys 10S UV-Vis*), toples kaca, timbangan analitik (*Ohaus*), oven (*Memmert*), grinder, alat-alat gelas, waterbath (*Memmert WNB 45*), mikropipet (*Ohaus*), ayakan ukuran 40 mesh, pengaduk.

2. Bahan

Daun kupu-kupu, metanol (*Teknis*), etil asetat (*Teknis*), HCl 2 N, pereaksi Mayer, Dragendorf dan Wagner, serbuk magnesium, metanol (*p.a*), etil asetat (*p.a*), aquades, HCl pekat, FeCl₃ 1%, kertas saring.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Untuk memastikan identifikasi yang benar terkait dengan ciri-ciri morfologisnya, dilakukan determinasi tanaman kupu-kupu di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

2. Pembuatan ekstrak dan kontrol kualitas ekstrak

- a. Penyiapan sampel

Daun kupu-kupu dipetik pada pagi hari dengan mengambil bagian daun yang masih segar dan berwarna hijau muda (urutan ke-2 hingga 4). Alasan penggunaan daun muda dengan urutan 2-4 adalah karena ketika pucuk daun berkembang menjadi daun muda, proses biosintesis yang optimal dimulai. Sehingga daun muda memiliki kadar metabolit sekunder

yang lebih tinggi daripada daun tua (Rohiqi *et al.*, 2021). Kemudian, sampel daun kupu-kupu yang didapat disortasi basah dan dicuci bersih menggunakan air mengalir, tujuannya untuk menghilangkan kotoran atau partikel asing yang ada melekat didaun. Setelah itu, keringkan sampel dalam oven dengan suhu 50°C, hingga daun benar-benar kering yang menunjukkan bahwa daun mudah hancur saat diremas. Pengeringan menggunakan oven dengan suhu 50°C dikarenakan daun kupu-kupu memiliki kandungan flavonoid yang tidak tahan terhadap suhu panas. Setelah sampel daun mengering, sampel digrinder sampai menjadi serbuk daun kupu-kupu. Setelah itu, serbuk diayak dengan ayakan 40 mesh, kemudian disimpan dalam wadah yang bersih untuk proses ekstraksi (Purwasari, 2021).

b. Pembuatan ekstrak daun kupu-kupu

Dalam penelitian ini, daun kupu-kupu diekstraksi metode maserasi dengan perbandingan 1:10 dalam dua pelarut yang berbeda, yaitu metanol dan etil asetat. Serbuk daun kupu-kupu ditimbang sebanyak 250 gram, kemudian ditambahkan 2,5 L pelarut metanol dan 2,5 L pelarut etil asetat ke dalam masing-masing bejana maserasi. Bejana ditutup rapat dan diamkan selama 3 hari, sambil dilakukan pengadukan sebanyak 3 kali. Setelah 3 hari perendaman, saring campuran pelarut dan ampas. Kemudian, dilanjutkan dengan remaserasi dengan perbandingan 1:5 selama 2x24 jam, tujuannya untuk menarik kandungan senyawa yang tersisa dari proses maserasi sebelumnya. Proses remaserasi bisa dihentikan jika hasil maserat yang diperoleh mulai jernih (Nurjanah, 2019). Selanjutnya, dikumpulkan hasil ekstrak cair yang telah disaring dan uapkan menggunakan penangas air pada suhu 50°C sampai menghasilkan ekstrak kental (Aryantini, 2021). Selanjutnya gunakan rumus berikut untuk mendapatkan hasil rendemen :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

c. Uji organoleptis

Pengujian dengan melakukan observasi secara visual untuk mengetahui bentuk, aroma/bau, dan warna ekstrak daun kupu-kupu.

d. Skrining fitokimia

1) Alkaloid

Ditimbang 100 mg ekstrak dan dicampur dengan 1,0 mL HCl 2 N dan 9,0 mL aquadest, lalu panaskan selama 2 menit dan dinginkan. Selanjutnya, campuran disaring dan filtratnya dibagi menjadi tiga bagian dalam tabung reaksi. Kemudian tambahkan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendrof ke masing-masing bagian (Lalu & Gani, 2017)

2) Flavonoid

Dilakukan pengujian *Shinoda* dengan menimbang 100 mg ekstrak dan ditambahkan serbuk Mg, lalu diteteskan 1-2 tetes HCl pekat. Jika warnanya berubah menjadi merah, maka ekstrak tersebut mengandung senyawa flavonoid (Purwasari, 2021).

3) Tanin

Diambil 100 mg ekstrak, lalu tambahkan 2,0 mL aquadest dan dididihkan. Kemudian tambahkan filtrat dengan larutan feri klorida 1%, lalu digojog. Munculnya warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menandakan ekstrak tersebut mengandung senyawa tanin (Aryantini, 2021).

4) Saponin

Ditimbang 100 mg ekstrak dicampur dengan 10 mL aquadest. Campuran tersebut kemudian dikocok secara intens selama 1 menit, dan didiamkan untuk mengamati busa yang terbentuk. Jika terdapat buih yang stabil, maka menunjukkan keberadaan saponin dalam ekstrak tersebut (Fadhli *et al.*, 2019).

5) Fenolik

Ditimbang 100 mg ekstrak dan tambahkan tiga hingga empat tetes FeCl_3 hingga terjadi perubahan warna menjadi hitam kebiruan

sampai hitam pekat yang menunjukkan ekstrak mengandung senyawa fenol (Sulistyarini *et al.*, 2022).

3. Aktivitas penangkal radiasi UV

Timbang masing-masing ekstrak metanol dan etil asetat sebanyak 0,1 gram dan larutkan dalam 100 mL pelarut yang sesuai (metanol p.a dan etil asetat p.a) hingga didapat larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 290 – 320 nm untuk SPF, 292,5-317,5 nm untuk %Te, dan 322,5-372,5 nm untuk %Tp. Metanol p.a dan etil asetat p.a digunakan sebagai blanko. Setelah itu, nilai serapan dicatat tiap interval 5 nm. Perlakuan diulangi sebanyak 3 kali. (Prameswari, 2022).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan Nilai SPF

Nilai SPF bisa ditentukan menggunakan persamaan Mansur dengan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan :

SPF = *Sun protecting factor*

CF = Faktor koreksi = 10

EE (λ) = Efek eritemogenik dari radiasi panjang gelombang

I (λ) = Intensitas sinar UV pada panjang gelombang

ABS (λ) = Absorbansi sampel

Nilai EE x I merupakan nilai konstan yang telah ditetapkan, ditunjukkan pada tabel berikut (Rosniah *et al.*, 2016) :

Tabel 1. Nilai EE x I

Panjang Gelombang (nm)	EE x I
290	0,015
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,018

2. Penentuan Persentase Transmisi Eritema (%Te)

Nilai %Te bisa dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Alunpah, 2018):

$$\% \text{ Transmisi eritema} = \frac{EE}{\Sigma Fe} = \frac{\Sigma(T \times Fe)}{\Sigma Fe}$$

Keterangan :

T = Nilai transmisi

Fe = Fluks eritema

Ee = $\Sigma T \cdot Fe$ = banyaknya fluks eritema yang diteruskan oleh ekstrak pada panjang gelombang 292,5 sampai 317,5 nm.

Tabel 2. Nilai Tetapan Fluks Eritema

Panjang Gelombang (nm)	Fluks Eritema
292,5	0,1105
297,5	0,6720
302,5	1,0000
307,5	0,2008
312,5	0,1364
317,5	0,1125
Total	2,2322

Sumber: (Rahardhian *et al.*, 2019)

3. Penentuan Persentase Transmisi Pigmentasi (%Tp)

Nilai %Tp bisa dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Alunpah, 2018) :

$$\% \text{ Transmisi pigmentasi} = \frac{Ep}{\Sigma Fp} = \frac{\Sigma(T \times Fp)}{\Sigma Fp}$$

Keterangan :

T = Nilai transmisi

F_p = Fluks pigmentasi

$E_p = \Sigma T.F_p$ = banyaknya fluks pigmentasi yang diteruskan oleh ekstrak pada panjang gelombang 322,5 sampai 372,5 nm

ΣF_p = Jumlah total fluks pigmentasi sinar matahari

Tabel 3. Nilai Tetapan 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	0,0570
352,5	0,0488
357,5	0,0456
362,5	0,0356
367,5	0,0310
372,5	0,0260
Total	0,6942

Sumber: (Rahardhian *et al.*, 2019)

4. Analisis data

Dilakukan analisis data menggunakan perangkat lunak SPSS untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antara ekstrak metanol dan etil asetat dari hasil nilai SPF, %Te dan %Tp. Sebelumnya, dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel yang digunakan < 50 (Agustin & Permatasari, 2020). Setelah itu, dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene's* untuk menguji variasi data di seluruh kelompok (Suryadi *et al.*, 2021). Uji T independent dapat digunakan pada data yang dianalisis normal dan homogen.

