

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-Juni 2025 di Laboratorium Bahan Alam, dan Laboratorium Kimia Farmasi Prodi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: Spektrofotometer UV- Vis (*Shimadzu*), oven, *rotary evaporator*, *waterbath*, timbangan analitik, bejana maserasi, erlenmeyer (*pyrex*), chamber, gelas ukur (*pyrex*), tabung reaksi (*iwaki*), batang pengaduk, plat silika GF 254, pipet tetes, dan pipa kapiler.

3.2.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu: rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) yang didapatkan dari WKJ (Wisata Kesehatan Jamu) Kalibakung Kabupaten Tegal, etanol 70%, aquadest, n-heksan, etil asetat, metanol, pereaksi Dragondroff, pereaksi Mayer, HCl 2%, H₂SO₄ pekat, serbuk Mg, dan FeCl₃ 1%, kloroform, n-butanol, dan etanol *pro analyze*.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental murni dengan menentukan efektifitas tabir surya yang berupa nilai SPF dari fraksi rimpang temu blenyeh menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

3.3.2 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah jenis pelarut yang digunakan dalam fraksinasi yaitu n-heksan, etil asetat, dan metanol.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil nilai SPF fraksi n-heksan, etil asetat, dan metanol.

c. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah tempat pengambilan sampel, jenis sampel, suhu ekstraksi, tempat penelitian, metode penelitian, cara pembuatan, serta uji yang dilakukan.

3.4 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan, yaitu determinasi tanaman, pengambilan dan preparasi sampel, pembuatan ekstrak rimpang temu blenyeh, uji karakteristik ekstrak, skrining fitokimia ekstrak dengan pereaksi warna, skrining fitokimia dengan KLT, pembuatan fraksi n- heksan, etil asetat, dan fraksi met

anol, serta penentuan nilai SPF secara *in vitro* menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

3.4.1 Determinasi Tanaman

Tanaman temu blenyeh dideterminasi di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi, yang bertujuan untuk mengetahui dan memastikan kebenaran tanaman yang akan digunakan untuk sampel. Bagian tanaman yang digunakan dalam penelitian ini berupa rimpang. Hasil yang diperoleh dari determinasi meliputi nama latin, nama daerah, dan famili tanaman.

3.4.2 Pengambilan dan Preparasi Sampel

Sebanyak 7 kg rimpang temu blenyeh yang didapatkan dari Wisata Kesehatan Jamu (WKJ) Kalibakung Kabupaten Tegal. Rimpang temu blenyeh dilakukan proses pasca panen meliputi sortasi basah, penucian, penirisan, perajangan, pengeringan, kemudian dilakukan penghalusan hingga diperoleh serbuk simplisia. Tanaman temu blenyeh dideterminasi di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Blenyeh

Ekstraksi yang dipilih dalam penelitian ini adalah maserasi dengan pelarut etanol 70%. Sebanyak 350 gr serbuk simplisia rimpang temu blenyeh dimasukan dalam bejana maserasi, direndam dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3,5 L dengan perbandingan 1:10. Simpan di tempat yang terhindar dari sinar matahari. Proses selanjutnya dilakukan

penyaringan dengan kertas saring. Filtrat yang dihasilkan dipekatkan dengan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Khairunnisa et al., 2022). Proses maserasi dilakukan selama 3 hari (Agusta et al., 2021).

Kemudian dihitung rendemen ekstrak dengan rumus sebagai berikut: (Aira, 2023)

$$\text{Rendemen Ekstrak (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak (g)}}{\text{Berat serbuk simplisia (g)}} \times 100\%$$

3.4.4 Uji Karakteristik Parameter Ekstrak

3.4.3.1 Parameter Spesifik

a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes RI, 2000).

3.4.3.2 Parameter Non Spesifik

a. Susut Pengeringan

Pengukuran susut pengeringan dilakukan dengan menimbang sekitar 1-2 gram ekstrak dan menempatkannya dalam botol timbang dangkal tertutup, yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan ditara.

Sebelum ditimbang, ekstrak diratakan dalam botol dengan cara menggoyangkannya agar membentuk lapisan setebal sekitar 5 hingga 10 mm. Setelah itu, botol dengan tutup terbuka dimasukkan ke dalam ruang pengering dan dikeringkan pada suhu 105°C hingga beratnya stabil. Sebelum setiap proses pengeringan, botol dibiarkan dalam keadaan

tertutup hingga mendingin ke suhu kamar dalam eksikator. Apabila ekstrak sulit mengering atau mencair saat dipanaskan, dapat ditambahkan 1 gram silika pengering yang telah ditimbang secara cermat dan dikeringkan, kemudian disimpan dalam eksikator pada suhu kamar. Silika tersebut dicampurkan merata dengan ekstrak saat masih panas, lalu pengeringan dilanjutkan pada suhu yang ditetapkan hingga beratnya stabil (Depkes RI, 2000).

Rumus perhitungan penetapan susut pengeringan sebagai berikut:

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{\text{Berat awal (g)} - \text{Berat akhir (g)}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

b. Kadar Air

Sebanyak 1 gram ekstrak dimasukkan pada piringan alat *moisture analyzer* dengan suhu yang sudah diatur 105°C. Dipanaskan selama 10 menit sampai alat memberikan hasil pengukuran kadar air dalam satuan persen (%) (Saraswati et al., 2025).

c. Kadar Abu

Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang dengan cermat dimasukkan ke dalam krus silikat yang sudah dipijarkan dan ditara, lalu diratakan. Ekstrak kemudian dipijarkan perlahan hingga seluruh arang terbakar habis.

Setelah itu, krus didinginkan dan ditimbang. Apabila arang masih belum habis dengan metode ini, tambahkan air

panas dan saring menggunakan kertas saring bebas abu. Sisa arang dan kertas saring kemudian dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat yang diperoleh dimasukkan kembali ke dalam krus, diuapkan, dan dipijarkan hingga bobot tetap, kemudian ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000).

Rumus perhitungan penetapan kadar abu total sebagai berikut:

$$\text{Kadar Abu Total} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 : Berat cawan kosong (gram)

W1 : Berat cawan + ekstrak (gram)

W2 : Berat cawan + ekstrak setelah diabukan (gram)

3.4.5 Skrining Fitokimia dengan Pereaksi Warna

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa bioaktif yang terkandung dalam rimpang temu blenyeh. Skrining fitokima pada penelitian ini meliputi:

a. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara 0,5 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1 mL HCl 2% dan 9 mL aquadest. Kemudian dipanaskan selama 2 menit, dididihkan dan disaring. Larutan dibagi menjadi 2 tabung. Pada tabung 1 ditambahkan dengan reagen Mayer 2 tetes, pada tabung 2 ditambahkan dengan reagen Dragondroff 2 tetes. Hasil positif alkaloid yang diuji dengan reagen

Mayer adalah terbentuknya endapan putih kekuningan. Sedangkan yang diuji dengan reagen Dragondroff adalah terbentuknya endapan jingga (Dewi et al., 2021).

b. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara 1 gram ekstrak ditambahkan dengan serbuk Mg dan HCl pekat, kemudian dipanaskan diatas penangas air selama kurang lebih 15 menit. Hasil positif uji ini adalah terbentuknya larutan berwarna merah atau kuning (Muthmainnah, 2019).

c. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan cara 0,1 gram ditambahkan dengan 10 mL aquadest dan didiamkan selama 5 menit. Kemudian disaring dan ditambahkan 5 tetes FeCl_3 1%. Hasil positif uji ini adalah terbentuknya larutan berwarna hijau kehitaman atau biru (A. W. Ningsih et al., 2020)

d. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara memasukan 0,1 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquades 10 mL. Kemudian dikocok kuat selama 30 detik,. Hasil positif uji ini adalah jika terbentuknya busa kurang lebih 1 cm (A. W. Ningsih et al., 2020).

e. Uji Triterpenoid dan Steroid

Uji triterpenoid dan steroid dilakukan dengan cara memasukan

0,5 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Kemudian ditambahkan 1-2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung. Hasil positif triterpenoid adalah terbentuknya larutan ungu, sedangkan hasil positif steroid adalah terbentuknya warna hijau dan biru kehitaman (Firsty et al., 2024).

3.4.6 Skrining Fitokimia dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sebanyak 2 gram ekstrak etanol 70% dilarutkan dengan 10 mL etanol *pro analyze*, disaring dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian di totolkan pada fase diam yang telah diaktifkan untuk setiap uji. Kemudian hasil dideteksi di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm untuk mengidentifikasi nilai R_f (Sri et al., 2018).

a. Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan menggunakan fase diam plat silika gel GF 254, fase gerak etil asetat : metanol (3:2), dan menggunakan kuersetin sebagai baku pembanding. (Natasa et al., 2021).

b. Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menggunakan fase diam plat silika gel GF 254 dengan fase gerak etil asetat : etanol : n-heksan (2:1:3) (Kapondo et al., 2019). Digunakan piperin sebagai baku pembanding (Novia et al., 2020).

c. Tanin

Uji tanin dilakukan dengan menggunakan fase diam plat silika gel GF 254 dengan fase gerak n-butanol : etil asetat : aquadest (4:1:5) (Sri et al., 2018). Digunakan katekin sebagai baku pembanding (Juliyanti et al., 2024).

d. Saponin

Uji saponin dilakukan dengan menggunakan fase diam plat silika gel GF 254 dengan fase gerak kloroform : etanol : air (10:6:1) (Firawati & Pratama, 2018). Digunakan saponin sebagai baku pembanding (Novia et al., 2020).

e. Triterpenoid

Uji triterpenoid dilakukan dengan menggunakan fase diam plat silika gel GF 254 dengan fase gerak n-heksan : etil asetat (7:3). (Elisa et al., 2018)

f. Steroid

Uji steroid dilakukan dengan menggunakan fase diam plat silika gel GF 254 dengan fase gerak n-heksan : etil asetat (1:4) (Pramiastuti & Murti, 2022).

3.4.7 Pembuatan Fraksi Rimpang Temu Blenyeh

Pembuatan fraksi n-heksan, etil asetat, dan metanol dari ekstrak etanol rimpang temu blenyeh dilakukan dengan metode tritulasi. diawali menimbang sebanyak 10 gram ekstrak kental dari rimpang temu blenyeh dalam Erlenmeyer, ditambahkan 100 mL pelarut n-heksan kemudian

diaduk menggunakan batang pengaduk dan didiamkan 10 menit hingga bagian yang tidak larut mengendap. Fase larut (n-heksan) dipisahkan dan dipindahkan ke wadah lain, sementara residu yang tidak larut kembali ditriturasi menggunakan n-heksan hingga larutan menjadi bening. Setelah proses dengan n-heksan selesai, residu yang tersisa ditriturasi lebih lanjut dengan 100 mL etil asetat dengan pengulangan hingga larutan menjadi bening. Selanjutnya, fraksi tidak larut dari etil asetat dipartisi menggunakan 100 mL metanol hingga bening. Setiap filtrat yang dihasilkan, yaitu fraksi larut n-heksan, fraksi larut etil asetat, dan fraksi larut metanol, diuapkan dengan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Pramiastuti et al., 2025; Wahdaningsih et al., 2017).

Hasil rendemen fraksi dihitung dari berat fraksi yang di peroleh dari ekstrak kental dengan rumus sebagai berikut: (Aira, 2023).

$$\text{Rendemen Fraksi (\%)} = \frac{\text{Berat fraksi (g)}}{\text{Berat ekstrak (g)}} \times 100\%$$

3.4.8 Identifikasi Senyawa Flavonoid dan Tanin pada Fraksi

a. Identifikasi dengan Pereaksi Warna

Uji flavonoid pada fraksi dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes HCl pekat dan serbuk magnesium kedalam masing-masing tabung yang berisi fraksi. Hasil positif uji flavonoid ditandai dengan terjadinya perubahan larutan menjadi warna merah, kuning atau jingga (Astuti et al., 2024; Suryadi et al., 2021).

Sedangkan uji tanin dilakukan dengan menambahkan 2-3 tetes FeCl_3 1% kedalam masing-masing tabung yang berisi fraksi. Hasil

positif uji flavonoid ditandai dengan perubahan larutan menjadi warna coklat kehitaman, hitam kebiruan atau hijau (Putri et al., 2022; Suryadi et al., 2021).

b. Identifikasi dengan KLT

Identifikasi senyawa flavonoid dan tanin menggunakan KLT dilakukan dengan menggunakan fase diam plat silika gel GF 254. Pada uji flavonoid menggunakan fase gerak metanol : kloroform (1:3). Sedangkan uji tanin menggunakan fase gerak n-heksan : etil aetat (3:2) (Pramiastuti & Murti, 2022).

3.4.9 Penentuan Nilai SPF (*Sun Protection Factor*)

Penentuan nilai SPF (*Sun Protection Factor*) pada penelitian ini dilakukan secara in vitro menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan cara tiap-tiap sampel fraksi fraksi n-heksan, fraksi etil aasetat, dan fraksi metanol dilarutkan dengan etanol 70% dengan konsentrasi 50, 100, 200, 400, 800 ppm. Spektrofotometer UV-Vis dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan Larutan etanol 70%. Untuk pengukuran nilai SPF, serapan sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis setiap 5 nm dalam rentang panjang gelombang 290 nm hingga 320 nm, dengan tiga kali pengukuran pada setiap poinnya. Selanjutnya, data tersebut dianalisis menggunakan persamaan Mansur (Nopiyanti & Aisiyah, 2022).

Rumus persamaan Mansur sebagai berikut: (Chakraborty & Nalanda, 2022).

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

Keterangan:

EE : Spektrum Efek Eritema

I : Spektrum Intensitas Cahaya

Abs : Absorbansi sampel tabir surya

CF : Faktor Koreksi (=10)

Nilai EE x I adalah konstan dan ditunjukkan pada **tabel 3.1**

Tabel 3.1 Nilai EE X I (konstanta)
(Yulianti et al., 2015)

No	Panjang gelombang (nm)	EE X I
1.	290	0,0150
2.	295	1,0817
3.	300	0,2874
4.	305	0,3278
5.	310	0,1864
6.	315	0,0839
7.	320	0,0180
8.	Total	1

Cara perhitungan:

1. Nilai serapan yang diperoleh dikalikan dengan nilai EE × 1 pada setiap panjang gelombang yang tercantum dalam tabel 3.1.
2. Hasil perkalian antara nilai serapan dan EE × 1 kemudian dijumlahkan.
3. Jumlah tersebut dikalikan dengan faktor koreksi sebesar 10 untuk mendapatkan nilai SPF.

3.5 Analisis Data

Analisis data penelitian ini dilakukan dengan menggunakan program SPSS. Data yang diperoleh berupa nilai SPF dari fraksi n-heksan, etil asetat, dan metanol dianalisis dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk menguji normalitas data dan Uji *Levene* untuk menguji homogenitas. Selanjutnya, dilakukan analisis data dengan *One Way ANOVA* untuk membandingkan nilai SPF (Karina et al., 2015; Yohanes, 2022).