

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Januari hingga Maret 2025 di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Instrumen 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 spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu), *rotary evaporator* (Biobase), *waterbath* (Biobase), *sentrifuge*, oven, toples kaca, blender (Mitochiba), timbangan analitik, rak tabung, corong, labu ukur, tabung reaksi (Pyrex), gelas beaker (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), cawan porselen, kuvet (Helma), pipet tetes dan spatula.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang temu blenyeh, etanol 96%, etil asetat, n-heksana, akuades, etanol p.a, kertas saring, serbuk magnesium (Mg), asam klorida pekat (HCl), amil alkohol, FeCl_3 1%, asam klorida 2N, kloroform, pereaksi liebermann-burchard, pereaksi mayer, dan pereaksi dragendorff.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental

yang bersifat analisis dengan tujuan mengetahui persentase transmisi eritema, persentase transmisi pigmentasi, dan nilai SPF ekstrak etanol, etil asetat dan n-heksana rimpang temu blenyeh (*Curcuma Purpuracens* Blume).

3.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini yaitu pelarut ekstrak etanol, etil asetat dan n-heksana rimpang temu blenyeh (*Curcuma Purpuracens* Blume).

3.3.3 Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan pada penelitian ini yaitu nilai SPF ekstrak etanol, etil asetat serta n-heksana rimpang temu blenyeh (*Curcuma Purpuracens* Blume).

3.3.4 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol yang digunakan pada penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak etanol, etil asetat serta n-heksana rimpang temu blenyeh (*Curcuma Purpuracens* Blume).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Program Sarjana Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Preparasi Serbuk Simplisia

Sampel yang digunakan yaitu 10 kg rimpang temu blenyeh yang diperoleh dari Wisata Kesehatan Jamu, Kalibakung, Kabupaten Tegal. Sampel yang didapat ditimbang berat basah kemudian disortasi basah. Setelah dilakukan sortasi basah temu blenyeh dicuci dengan air bersih dan mengalir. Selanjutnya temu blenyeh dipotong-potong dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C. Kemudian hasil pengeringan dihaluskan menggunakan blender sampai menjadi serbuk (Malahayati dkk., 2021).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

1. Pembuatan Ekstrak Rimpang Temu Blenyeh

Pembuatan ekstrak temu blenyeh menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda yaitu n-heksana, etil asetat, dan etanol 96%. Ekstraksi dilakukan dengan perbandingan serbuk dan pelarut (1:3) (Sayuti, 2017). Proses ekstraksi dengan pelarut n-heksana menggunakan serbuk simplisia rimpang temu blenyeh sebanyak 500 gram, sedangkan untuk ekstraksi dengan pelarut etil asetat dan etanol 96% masing-masing menggunakan serbuk simplisia rimpang temu blenyeh sebanyak 200 gram. Proses maserasi berlangsung selama 5 hari. Filtrat yang dihasilkan dipekatkan *waterbath* hingga menghasilkan ekstrak yang kental (Pujiastuti dkk., 2022).

2. Rendemen Ekstrak

Rendemen yang diperoleh dapat dihitung dengan rumus (Yani dkk., 2023):

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

3.4.4 Skrining Fitokimia

1. Alkaloid

Sebanyak 1 mg ekstrak diambil kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, ditambahkan 0,5 ml larutan HCl 2%, dan larutan tersebut dibagi menjadi dua tabung. Pada tabung pertama ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff, sementara pada tabung kedua ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Hasil positif untuk alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata, merah, atau jingga pada tabung pertama dengan reagen Dragendorff, serta endapan putih atau kekuningan pada tabung kedua dengan reagen Mayer (Firmansyah & La, 2022).

2. Flavonoid

Sebanyak 1 mg ekstrak diambil, lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi dan diuapkan sampai kering. Setelah itu dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50%. Larutan tersebut kemudian ditambahkan serbuk magnesium (Mg) dan 4-5 HCl pekat, Sampel dikatakan positif jika terbentuk larutan berwarna merah atau jingga menunjukkan adanya flavonoid (Firmansyah & La, 2022).

3. Tanin

Sebanyak 1 mg sampel diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian larutan tersebut ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Perubahan warna menjadi biru atau hijau kehitaman pada larutan menandakan adanya kandungan tanin (Firmansyah & La, 2022).

4. Saponin

Sebanyak 0,5 gram sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 mL akuades. Larutan tersebut dipanaskan kemudian didinginkan. Setelah itu larutan dikocok kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang bertahan selama <10 menit, kemudian ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tersebut tidak hilang, maka ekstrak mengandung saponin (Hasibuan dkk., 2020).

5. Terpenoid

Sebanyak 1 mg ekstrak diambil lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang kering, kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin berwarna kecoklatan atau ungu untuk triterpenoid, serta cincin berwarna hijau kebiruan untuk steroid (Firmansyah & La, 2022).

3.4.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak rimpang temu blenyeh dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol masing-masing di KLT menggunakan fase diam plat KLT GF254. Untuk analisis flavonoid, fase gerak yang digunakan yaitu campuran methanol : kloroform (1:3). Golongan alkaloid, fase gerak yang digunakan yaitu kloroform : methanol (1:4). Sementara itu untuk tanin, digunakan fase gerak n-heksan : etil asetat (3:2), dan untuk identifikasi saponin fase gerak yang digunakan yaitu kloroform:aseton (4:1). Sedangkan untuk triterpenoid dan steroid, masing-masing menggunakan fase gerak n-heksan:etil asetat (17:3) dan n-heksan:etil asetat (1:4) (Pramiastuti & Murti, 2022).

3.4.6 Penentuan %Te, %Tp, dan Nilai SPF

Sampel ditimbang sebanyak 20 mg, lalu diencerkan dengan etanol p.a hingga mencapai volume 10 mL (konsentrasi 2000 ppm). Larutan 2000 ppm tersebut diencerkan menjadi larutan 100, 200, 300, 400 ppm dengan volume akhir masing-masing 5 mL. Blanko yang digunakan yaitu etanol p.a. Kemudian larutan sampel dan blanko diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 292,5-317,5 nm untuk menentukan nilai %Te, 322,5-372,5 nm untuk menentukan nilai %Tp, dan 290-320 nm untuk menentukan nilai SPF ekstrak. Pengukuran dilakukan dengan interval panjang gelombang setiap 5 nm. Pengujian ini dilakukan tiga kali replikasi untuk masing-masing konsentrasi (Widyawati, Dida Ayuningtyas, dkk., 2019). Hasil

absorbansi pada setiap panjang gelombang dari ekstrak dicatat, lalu nilai %Te, %Tp, nilai SPF dihitung dengan rumus:

1. Transmisi Eritema (%Te)

Perhitungan nilai transmisi eritema dihitung pada panjang gelombang 292,5 – 317,5 nm tiap interval 5 nm. Transmisi eritema (Te) dihitung dengan $Te = T \times Fe$, Fe adalah fluks eritema. Banyaknya fluks eritema yang diteruskan oleh tabir surya (Ee) dihitung dengan $Ee = \Sigma (T \times Fe)$. Sedangkan % transmisi eritema dihitung dengan rumus (Rijar dkk., 2022):

$$\%Te = \frac{Ee}{\Sigma Fe}$$

Keterangan:

$Ee = \Sigma T \times Fe$

T = Nilai transmisi

Fe = Fluks eritema

Nilai fluks eritema merupakan sebuah nilai yang sudah ditetapkan dan nilainya dapat dilihat pada tabel 3.1.

2. Transmisi Pigmentasi (%Tp)

Perhitungan nilai transmisi pigmentasi dihitung pada panjang gelombang 322,5 – 372,5 nm tiap interval 5 nm. Transmisi pigmentasi (Tp) dihitung dengan $Tp = T \times Fp$, Fp adalah fluks eritema. Banyaknya fluks eritema yang diteruskan oleh tabir surya (Ep) dihitung dengan $Ep = \Sigma (T \times Fp)$. Sedangkan % transmisi pigmentasi dihitung dengan rumus (Rijar dkk., 2022):

$$\%Tp = \frac{Ep}{\sum Fp}$$

Keterangan:

$Ep = \sum T \times Fp$

T = Nilai transmisi

Fp = Fluks pigmentasi

Nilai fluks pigmentasi merupakan sebuah nilai yang sudah ditetapkan dan nilainya dapat dilihat pada tabel 3.2

Tabel 3.1 Nilai Fluks Eritema pada Panjang Gelombang 290-320 nm (Namirah dkk., 2024)

Panjang gelombang (nm)	Fluks Eritema ($\mu\text{Watt}/\text{cm}^2$)
290-295	0,1105
295-300	0,6720
300-305	1,0000
305-310	0,2008
310-315	0,1364
315-320	0,1125

Tabel 3.2 Nilai Fluks Pigmentasi pada Panjang Gelombang 320-375 nm (Namirah dkk., 2024)

Panjang gelombang (nm)	Fluks Pigmentasi
320-325	0,1079
325-330	0,1020
330-335	0,0936
335-340	0,0798
340-345	0,0669
345-350	0,0570
350-355	0,0448
355-3560	0,0456
360-365	0,0356
365-370	0,0310
370-375	0,0260

3. Nilai SPF

Penentuan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) berdasarkan persamaan Mansur yaitu (Artini, 2020):

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

Keterangan:

CF = Faktor koreksi (10)

I = Spektrum intensitas sinar

Abs = Absorbansi

EE = Spektrum efek eritema

Nilai EE x I merupakan suatu konstanta yang telah ditetapkan.

Nilai EE x I dapat dilihat pada tabel 3.3.

**Tabel 3.3 Nilai EE x I pada Panjang Gelombang 290-320 nm
(Pratiastuti, 2019)**

Panjang gelombang (nm)	Nilai 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	1,0000

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan SPSS 16.0 *for windows*. Data dapat dianalisis menggunakan uji One Way Analysis of Variance (ANOVA) dengan taraf kepercayaan 95% $P(0,05)$ jika asumsi normalitas (*Shapiro-Wilk Test*) dan homogenitas (*Levene's Test*) data terpenuhi. Jika nilai normalitas dan homogenitas tidak terpenuhi maka data dilanjutkan ke uji non parametik.