

## **BAB III**

### **METODELOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Sahid Surakarta yang bertujuan untuk mengetahui potensi tabir surya ekstrak etanol daun jeruk purut dan perbedaan potensi tabir surya ekstrak etanol daun jeruk purut dari Klaten dan Boyolali. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus sampai September tahun 2021.

#### **3.2 Populasi dan Sampel**

##### **3.2.1 Populasi**

Populasi pada penelitian ini adalah daun jeruk purut segar yang berasal dari wilayah Kabupaten Klaten Kecamatan Jatinom dan Kabupaten Boyolali Kecamatan Cepogo.

##### **3.2.2 Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC).

#### **3.3 Instrumen Penelitian**

##### **3.3.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik (ACiS), alat-alat gelas (Pyrex), oven (Memmer), kertas saring, aluminium foil (heavy duty), rotary evaporator (Biobase), waterbath

(*Memmer*), mikro pipet (*Dragonlab*), sendok tanduk, sendok besi, dan alat spektrofotometer *UV-Vis* (*Gynesys 10S*).

### **3.3.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk purut, etanol 95 % (*Medika*), *aqusdest*,  $\text{FeCl}_3$  (*Merck*), serbuk magnesium (Mg), asam klorida (HCl) pekat (*Merck*), pereaksi *dragendorf*, pereaksi *lieberman burchard*, dan etanol p.a (*Merck*).

## **3.4 Variabel Penelitian**

Variabel penelitian ini dibagi menjadi dua, yaitu :

### **3.4.1 Variabel bebas**

Variabel bebas atau variabel independen adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab timbulnya variabel dependen. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC).

### **3.4.2 Variabel terikat**

Variabel terikat atau variabel dependen adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai SPF (*Sun Protection Factor*), persen transmisi eritema, dan persen transmisi pigmentasi.

## **3.5 Definisi Operasional**

- a. Konsentrasi ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) adalah konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm dari ekstrak

etanol 95 % daun jeruk purut yang berasal dari wilayah Klaten dan Boyolali.

- b. Nilai SPF adalah nilai untuk menunjukkan efektivitas suatu zat atau sediaan tabir surya.
- c. Nilai persentase transmisi eritema adalah nilai yang menggambarkan kemampuan suatu senyawa kimia dalam memproteksi kulit dari sinar *UV B* yang dapat menyebabkan kemerahan pada kulit.
- d. Nilai persentase transmisi pigmentasi adalah nilai yang menggambarkan kemampuan suatu senyawa kimia dalam memproteksi kulit dari sinar *UV A* yang dapat menyebabkan bercak gelap pada kulit.

### **3.6 Rencana Jalannya Penelitian**

#### **3.6.1 Determinasi Tanaman**

Tahap pertama penelitian adalah dilakukan determinasi tanaman daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC). Determinasi bertujuan untuk menetapkan kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi secara makroskopis tanaman daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) terhadap kepustakaan. Tanaman daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dilakukan determinasi di UPT. Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

#### **3.6.2 Pembuatan Serbuk Simplisia**

Daun jeruk purut dipisahkan dari kotoran dan dicuci bersih, lalu dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan tidak terkena sinar matahari langsung, kemudian dioven pada suhu 60

°C selama 2 hari, lalu diblender hingga menjadi serbuk, kemudian diayak dengan ayakan 60 mesh (Alfariq, 2015).

### **3.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut**

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:5, sebanyak 300 gram serbuk simplisia daun jeruk purut dimasukkan kedalam alat maserator, ekstrak direndam dengan penambahan etanol 95 % sebanyak 1500 mL sesekali diaduk selama tiga hari, disaring dan filtrat (I) di tampung dalam erlenmayer. Kemudian dilakukan remaserasi kembali satu kali selama dua hari dengan 1500 mL etanol 95 %, rendaman disaring kembali sehingga didapatkan filtrat (II), maserat yang terkumpul diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 75 °C sampai diperoleh ekstrak kental, kemudian diuapkan sisa-sisa pelarut yang masih tersisa diatas *water bath* (Depkes RI, 2008; Kusmiati *et al.*, 2019).

### **3.6.4 Uji Pendahuluan Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut**

#### **a. Identifikasi Senyawa Fenol**

Sedikit sampel ekstrak etanol daun jeruk purut dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl<sub>3</sub>, kemudian dikocok perlahan. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman atau warna biru yang kuat (Manongko *et al.*, 2020).

### **b. Identifikasi Senyawa Flavonoid**

Sedikit sampel ekstrak etanol daun jeruk purut dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambah dengan air panas secukupnya, kemudian dididihkan selama 5 menit, kemudian ditambahkan tiga tetes HCl pekat dan 0,05 mg serbuk magnesium (Mg), kemudian dikocok kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga (Lanisthi *et al.*, 2015).

### **c. Identifikasi Senyawa Tanin**

Sedikit sampel ekstrak etanol daun jeruk purut ditambah dengan 10 mL *aquadest* panas lalu berikan 5 mL FeCl<sub>3</sub>, kemudian dikocok perlahan. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman (Hanina dan Sarah, 2020).

### **d. Identifikasi Senyawa Alkaloid**

Sedikit sampel ekstrak etanol daun jeruk purut dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi *dragendorf*. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga atau merah kecoklatan (Hanina dan Sarah, 2020).

### **e. Identifikasi Senyawa Saponin**

Sedikit sampel ekstrak etanol daun jeruk purut dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 50 mL *aquadest*, panas kemudian kocok dengan kuat. Tambahkan 1 tetes HCl pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih > 1 cm dan stabil (Hanina dan Sarah, 2020).

## f. Identifikasi Senyawa Steroid

Sedikit sampel ekstrak etanol daun jeruk purut dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan pereaksi *lieberman burchard*. Hasil positif mengandung steroid / triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau ungu (Hanina dan Sarah, 2020).

### 3.6.5 Pembuatan Larutan Uji

Sebanyak 50 mg ekstrak kental daun jeruk purut dilarutkan dalam etanol pa 25 mL sehingga diperoleh konsentrasi 2000 ppm. Larutan induk diencerkan menjadi berbagai konsentrasi yaitu 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm.

### 3.6.6 Penentuan Aktivitas Tabir Surya

#### a. Uji nilai SPF

Larutan dari ekstrak etanol daun jeruk purut yang telah dibuat dalam lima seri konsentrasi, dibaca kadar serapannya pada panjang gelombang 290 - 320 nm setiap interval 5 nm, blanko yang digunakan adalah etanol pa. Nilai SPF yang diperoleh nanti akan dikategorikan dalam tabel 2.2 (Zakiah, 2015).

Penentuan nilai *Sun Protection Factor* berdasarkan persamaan Mansur yaitu :

$$SPF_{Spectrophotometric} = CF \times \left[ \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \right]$$

Keterangan :

EE : Spektrum efek eritema

I : Spektrum intensitas matahari

Abs : Absorbansi produk tabir surya

CF : Faktor koreksi (=10)

\*nilai EE x I adalah suatu konstanta dan telah ditetapkan.

**Tabel 3. 1 Nilai EE x I pada Panjang Gelombang 290-320 nm**

Panjang gelombang ( $\lambda$ 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
<b>Total</b>	<b>1,0000</b>

(Pramiastuti, 2019)

Cara perhitungan nilai SPF menurut (Yulianti, *et al.*, 2015).

a) Nilai serapan yang didapat dikalikan dengan nilai  $EE \times I$  untuk masing-masing panjang gelombang yang tertera pada tabel di atas.

b) Hasil perkalian penyerapan dan  $EE \times I$  dijumlahkan.

c) Kemudian dikalikan dengan faktor koreksi yang nilainya 10 untuk mendapatkan nilai SPF.

#### **b. Uji nilai persentase transmisi eritema dan pigmentasi**

Larutan dari ekstrak etanol daun jeruk purut yang telah dibuat dalam lima seri konsentrasi diukur absorbansinya pada panjang gelombang 292,5 - 372,5 nm. Nilai yang diperoleh nantinya akan dikategorikan dalam tabel 2.1 (Zakiah, 2015).

Cara perhitungan nilai persen transmisi eritema dan pigmentasi menurut Widyawati *et al.*, (2019) :

a) Nilai transmisi eritema adalah  $T.Fe$ . perhitungan nilai Transmisi eritema tiap panjang gelombang (panjang gelombang 292,5 - 317,5 nm).

b) Banyaknya fluks eritema yang diteruskan oleh bahan tabir matahari ( $E_e$ ) dihitung dengan rumus :

$$E_e = F_e \times T$$

c) Kemudian % transmisi eritema dihitung dengan rumus :

$$\% \text{Transmisi eritema} = \frac{\sum E_e}{\sum F_e}$$

Keterangan :

T : Nilai transmisi

$F_e$  : Fluks eritema

$E_e$  : Banyaknya fluks eritema yang diteruskan pada panjang gelombang 292,5 - 317,5 nm

d) Nilai transmisi pigmentasi adalah  $T.Fp$ . perhitungan nilai transmisi pigmentasi tiap panjang gelombang (panjang gelombang 322,5 - 372,5 nm).

e) Banyaknya fluks pigmentasi yang diteruskan oleh bahan tabir matahari ( $E_p$ ) dihitung dengan rumus :

$$E_p = F_p \times T$$

f) Kemudian % transmisi pigmentasi dihitung dengan rumus :

$$\% \text{Transmisi pigmentasi} = \frac{\sum E_p}{\sum F_p}$$

Keterangan :

T : Nilai transmisi

Fp : Fluks pigmentasi

Ep : Banyaknya fluks pigmentasi yang diteruskan pada panjang gelombang 322,5 - 372,5 nm

### 3.7 Analisa Data

Pada penelitian ini data yang diperoleh yaitu nilai SPF (*Sun Protection Factor*), persen transmisi eritema (%Te) dan persen transmisi pigmentasi (%Tp) dari ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dari Klaten dan Boyolali kemudian dilakukan analisis menggunakan program SPSS dengan uji normalitas yaitu uji *shapiro wilk* untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak. Pengujian homogenitas dilakukan dengan uji *levene test* untuk menguji apakah populasi *homogeny* atau data memiliki varian yang sama. Hasil pengujian dalam penelitian ini data terdistribusi normal tetapi tidak homogen, sehingga dilanjutkan uji nonparametrik yaitu uji *wilcoxon* yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan potensi tabir surya dari dua sampel yaitu ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) yang berasal dari wilayah Klaten dan Boyolali.