

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian Pra-eksperimen.

B. Tempat dan waktu penelitian

a. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia, Farmasi Bahan Alam dan Teknologi Sediaan Farmasi Prodi D-III Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang.

b. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai Mei 2025.

C. Populasi dan sampel, dan teknik sampling

a. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) yang berada di Kota Kupang, Nusa Tenggara Timur.

b. Sampel dan Teknik sampling

1) Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) yang diambil dari Kelurahan Liliba, Kecamatan Oebobo, Kota Kupang, Nusa Tenggara Timur.

2) Teknik sampling

Teknik sampling yang digunakan adalah *purposive sampling*, dengan kriteria daun segar, utuh, dan bebas dari hama.

D. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) yaitu 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm.

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai *Sun Protection Factor* (SPF), Transmisi eritema (%Te) dan nilai pigmentasi (%Tp) dari ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus*).

3. Variabel pengganggu

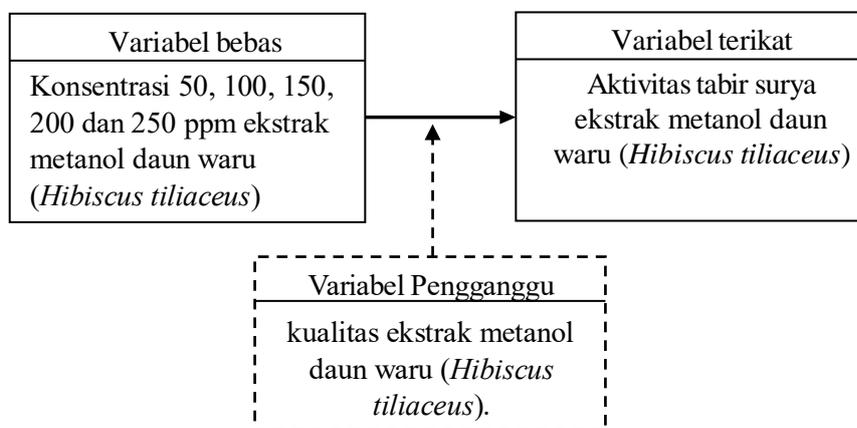
Variabel pengganggu dalam penelitian ini adalah kualitas ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus*).

E. Definisi Operasional

Tabel 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
Tabir surya	Senyawa yang dapat menyerap radiasi sinar UV dan mengubahnya menjadi energi yang kurang berbahaya.	Nominal
SPF	Nilai panjang gelombang sampel yang diteruskan pada panjang gelombang 290-400nm.	Ordinal
Spektrofotometer UV/Vis	Instrumen yang digunakan untuk mengukur panjang gelombang sampel 200-400nm.	Ordinal
Ekstrak metanol daun waru (<i>Hibiscus tiliaceus</i>)	Hasil maserasi daun waru dengan metanol (<i>Hibiscus tiliaceus</i>) yang dievaporasi menggunakan <i>rotary evaporator</i> pada suhu 50°C dan dipekatkan dengan menggunakan <i>waterbath</i> .	Nominal
Uji Aktivitas Tabir Surya	Uji kemampuan ekstrak metanol daun waru dalam menangkal radiasi UV.	Nominal

F. Kerangka Konsep



Keterangan :

—————> : variabel yang diteliti

- - - - - : variabel yang tidak diteliti

G. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah neraca digital, bejana maserasi, batang pengaduk, cawan porselin, *micropipet* 1 mL, tabung reaksi, sendok tanduk, kertas perkamen, labu ukur, *beaker gelas*, penjepit tabung dan rak tabung reaksi. Instrumen yang digunakan adalah Spektrofotometer UV-Vis (UV-1700), *Rotary Evaporator* dan *waterbath*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun waru, metanol dan aquadest.

H. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan bahan

Daun waru diambil di Kelurahan Liliba, Kecamatan Oebobo, Kota Kupang, Nusa Tenggara Timur.

2. Pembuatan serbuk simplisia daun waru

Daun waru disortasi basah, dicuci bersih dan dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dengan sinar matahari tidak langsung karena daun waru ditutupi dengan kain berwarna hitam. Kemudian simplisia yang telah kering dilakukan sortasi kering untuk memisahkan bahan asing dan pengotor pada simplisia kering. Simplisia diserbukan dan diayak dengan pengayak mesh No.60. Setelah itu serbuk simplisia disimpan pada wadah tertutup rapat.

3. Pembuatan ekstrak metanol daun waru

Sebanyak 400 g serbuk simplisia daun waru diekstraksi menggunakan metanol sebagai pelarut penyari. Serbuk simplisia dimaserasi dengan $\frac{3}{4}$ bagian pelarut atau sebanyak 3000 mL selama 3 hari. Setelah itu, campuran disaring untuk memperoleh filtrat, yang kemudian ditampung dalam wadah tertutup. Sisa residu kemudian dimaserasi kembali dengan sisa pelarut (1000 mL metanol 70%) selama 2 hari, disertai pengadukan satu kali sehari selama 5 menit (Kristiani, Ruth, Susanti, & Mita, 2023). Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut metanol. Kemudian jika masih cair ekstrak dipekatan lagi dengan menggunakan *waterbath*. Hasil ekstrak ditutup dengan *aluminium foil* dalam lemari pendingin. Kemudian ekstrak ditimbang, lalu dihitung persen rendemen ekstrak dengan rumus:

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot total ekstrak}(g)}{\text{Bobot total simplisia}(g)} \times 100\%$$

4. Uji bebas metanol

a. Uji esterifikasi

Sebanyak 2 mL ekstrak daun waru dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan 1 mL CH_3COOH glasial dan 2 tetes H_2SO_4 . Dipanaskan di atas penangas air. Kemudian dihirup bau yang keluar dari tabung reaksi dengan cara tangan dikibaskan pada permukaan tabung. Jika tercium bau menyengat berarti ekstrak masih mengandung metanol (Antonius et al., 2019).

b. Uji Oksidasi

Sebanyak 1 tetes ekstrak metanol daun waru dicampurkan dengan 1 tetes larutan H_2SO_4 pekat. Selanjutnya, ditambahkan 1 tetes larutan KMnO_4 pekat, lalu dibiarkan selama 10 menit. Kemudian, larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pekat ditambahkan secara tetes demi tetes. Ekstrak dianggap bebas metanol jika tidak terjadi perubahan warna menjadi coklat (Pakaya et al., 2023).

5. Penapisan fitokimia

a. Alkaloid

Sebanyak 500 mg ekstrak metanol daun waru dilarutkan dengan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL akuades, kemudian dipanaskan selama 2 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan pereaksi *Mayer*, sedangkan tabung kedua diberi pereaksi *Dragendorff*. Hasil positif ditandai dengan adanya endapan putih pada tabung dengan pereaksi *Mayer* dan endapan jingga pada tabung dengan pereaksi *Dragendorff* (Dewi et al., 2021).

b. Flavonoid

Sebanyak 300 mg ekstrak metanol daun waru dilarutkan dalam 5 mL etanol. Setelah itu, ditambahkan 2 tetes HCl pekat dan 1,5 g serbuk Mg . Hasil positif ditandai dengan munculnya warna merah (Akasia et al., 2021).

c. Polifenol dan Tanin

Sebanyak 100 mg ekstrak metanol daun waru dilarutkan dalam 2 mL etanol 95%, kemudian ditambahkan larutan FeCl_3 10%. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru tua, biru kehitaman, atau hitam kehijauan (Rubianti et al., 2022).

d. Steroid dan Terpenoid

Pengujian dilakukan menggunakan pereaksi *Lieberman-Burchard*. Sebanyak 5 g ekstrak metanol daun waru dilarutkan dalam 10 mL pelarut n-heksan, kemudian disaring. Beberapa tetes filtrat diambil dan dikeringkan pada plat tetes, lalu ditambahkan 3 tetes pereaksi *Lieberman-Burchard*. Hasil positif ditandai dengan munculnya warna merah untuk senyawa golongan terpenoid, sedangkan warna biru untuk senyawa golongan steroid (Emilia, Setiawan, Novianti, Mutiara, & Rangga, 2023).

e. Fenolik

Pengujian kandungan senyawa fenolik dilakukan dengan melarutkan 1 mg ekstrak metanol daun waru dalam 2 mL metanol 70%. Selanjutnya, ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1%. Ekstrak mengandung fenolik jika terjadi perubahan warna larutan dari hijau muda menjadi kehitaman. (Alim, Hasan, Rusman, Jasmiadi, & Zulfitri, 2022).

6. Pengujian aktivitas tabir surya

a. Pembuatan larutan uji

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan penimbangan 0,2 gram ekstrak metanol daun waru. Ekstrak tersebut kemudian dilarutkan dalam 100 mL etanol 96% di dalam labu ukur sehingga diperoleh larutan induk berkonsentrasi 2000 ppm. Larutan induk tersebut selanjutnya diencerkan dalam labu ukur 25 mL hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm.

b. Pengujian nilai SPF, %Te dan % Tp

Aktivitas tabir surya ekstrak metanol daun waru diuji dengan pengukuran absorbansi dari lima seri larutan uji pada rentang panjang gelombang 280–400 nm dengan interval 5 nm untuk menentukan nilai SPF. Selain itu, persen transmisi eritema (%Te) diukur pada panjang gelombang 292,5–317,5 nm, sedangkan persen transmisi pigmentasi (%Tp) diukur pada panjang gelombang 322,5–372,5 nm.

I. Analisis Data

1. Nilai SPF

Menghitung nilai *Area Under the Curve* (AUC) dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280-400 nm dengan panjang interval 5, menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{AUC (Area Under the Curve)} = \frac{Aa+Ab}{2} \times dP_{a-b}$$

Keterangan :

Aa : Absorbansi panjang gelombang pada Aa nm

Ab : Absorbansi panjang gelombang pada Ab nm

dP_{a-b} : selisih panjang gelombang a dan b

Nilai total AUC dihitung dengan menjumlahkan AUC pada tiap segmen panjang gelombang. Nilai *Sun Protection Factor* dari setiap konsentrasi ditentukan dengan rumus:

$$\log\text{SPF} = \frac{AUC}{\lambda_n - \lambda_1} \times 2$$

Keterangan:

λ_n : Panjang gelombang terbesar

λ_1 : Panjang gelombang terkecil (Tjitda et al., 2021)

Berdasarkan nilai SPF menurut FDA, kategori perlindungan tabir surya adalah: 2-4 (Minimum), 4-6 (Sedang), 6-8 (Ekstra), 8-15 (Maksimum), dan >15 (Ultra). (Yuliani et al., 2024)

2. Persen transmisi eritema (%Te) dan transmisi pigmentasi

Nilai absorbansi yang diperoleh pada pengukuran larutan uji kemudian diubah menjadi %Transmitansi menggunakan persamaan berikut:

$$\%T = \text{antilog}(2 - A)$$

Nilai %T yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung %Te dan %Tp menggunakan persamaan berikut:

$$Ee = \Sigma T \times Fe$$

$$\% \text{Transmisi Eritema (Te)} = \frac{Ee}{\Sigma Fe}$$

$$Ep = \Sigma T \times Fp$$

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

Keterangan:

T : Nilai transmisi

Fe : Fluks Eritema

Ee : Banyak fluks eritema yang diteruskan oleh ekstrak

ΣFe : Jumlah total sinar UV yang menyebabkan eritema

Fp : Fluks pigmentasi

Ep : Banyaknya fluks pigmentasi yang diteruskan oleh ekstrak

ΣFp : Jumlah total sinar UV yang menyebabkan pigmentasi (Tjitda et al., 2021)

Berikut adalah penggolongan tabir surya menurut persen transmisi sinar UV yang dipancarkannya :

Tabel 2 Nilai transmisi eritema dan pigmentasi

Klasifikasi Produk	Persen transmisi sinar ultraviolet (%)	
	<i>Erythematous range</i>	<i>Tanning range</i>
<i>Total block (sunblock)</i>	<1	3-40
<i>Extra protection (proteksi ultra)</i>	1-6	42-86
<i>Regular suntan</i>	6-12	45-86
<i>Fast tanning</i>	10-18	45-86