

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk ke dalam penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui Nilai *Sun Protection Factor* (SPF) Ekstrak Etanol 70% Akar Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd.) Secara In Vitro.

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.1.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam dan Kimia Farmasi Universitas Borneo Lestari.

3.1.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian pada penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari - Februari 2024.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi adalah keseluruhan subjek penelitian yang memenuhi kriteria yang telah ditetapkan (Adawiyah, 2019) Populasi penelitian ini adalah akar tumbuhan kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) yang terdapat di daerah Pemanjatan km.2, Gambut Barat, Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan.

3.2.2 Sampel

Sampel merupakan bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut. Apabila besar dan peneliti tidak mungkin mempelajari semua yang ada pada populasi, karena mempunyai keterbatasan dana, tenaga dan waktu, maka peneliti dapat menggunakan sampel yang diambil dari populasi untuk mewakili (Darmanah, 2014).

Sampel yang akan dipilih dan digunakan pada penelitian ini adalah Akar Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) dengan kriteria akar yang masih segar dan tumbuh subur di tanah gambut karena tanah gambut merupakan tanah dengan kandungan organik $\geq 50\%$ bahkan $\geq 75\%$.

3.3 Variabel

Variabel merupakan sebagai atribut seseorang, atau subyek yang mempunyai variasi antara satu orang dengan orang yang lain atau satu objek dengan objek lain (Purwanto, 2019).

Adapun variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel Independen (bebas) dan Variabel Dependen (terikat) sebagai berikut :

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% akar kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) menggunakan metode soxhletasi.
2. Variabel Terikat pada penelitian ini adalah nilai SPF dari ekstrak etanol 70% akar kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.).

3.4 Definisi Operasional

Tabel 1 Definisi Operasional

No	Jenis Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat Ukur	Skala	Hasil
1.	Bebas	Penentuan Nilai <i>Sun Protection Factor</i> (SPF) Ekstrak Etanol 70% Akar Kelakai (<i>Stenochlaena palustris</i> (Burm.f) Bedd.) Dan Sediaan Salep Hidrofiliknya Secara In Vitro.	Penentuan Nilai <i>Sun Protection Factor</i> (SPF) Ekstrak Etanol 70% Akar Kelakai (<i>Stenochlaena palustris</i> (Burm.f) Bedd.) Dan Sediaan Salep Hidrofiliknya Secara In Vitro.	Cawan Porselen, Timbangan Analitik, <i>Waterbatch</i> , Gelas Ukur.	Ordinal	Ekstrak kental Akar Kelakai
2	Terikat	Data hasil penentuan nilai SPF dari ekstrak akar kelakai (<i>Stenochlaena palustris</i> (Burm.f.) Bedd.).	Nilai Absorbansi	Spektrofotometer UV-Vis	Nominal	1-2 (Proteksi Lemah), 3-7 (Proteksi Sedang), 8-10 (Proteksi Kuat), 10-14 (Proteksi Maksimal), >15 (Proteksi Ultra) (Alhogbi, 2018)

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Alat/Instrumen dan Bahan Penelitian

3.5.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, gelas beaker, Erlenmeyer, gelas ukur, spatel, obyek gelas, timbangan analitik (*OHAUS 8028-SERIES®*), pipet tetes, *waterbath* (*Nesco Lab*), kuvet, spektrofotometer UV-Vis (*PG Instrumen Limited®*).

3.5.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah etanol 70%, ekstrak kental akar kelakai, Besi (III) klorida (FeCl_3) (*EMSURE*®) asam klorida (HCl) Pekat, kloroform, asam sulfat (H_2SO_4) (*EMSURE*®), ammonia, pereaksi *mayer*, pereaksi *dragendorff*, pereaksi *wagner*, etanol *pro-analysis* (*EMSURE*®), aluminium klorida (AlCl_3), kalium asetat (CH_3COOK) dan aquadest .

3.5.2 Jalan/Alur Penelitian

Alur penelitian yang dilakukan meliputi :

3.5.2.1 Penyiapan Simplisia

Cara pembuatan simplisia Akar Kelakai dilakukan dengan mengumpulkan 50 g akar kelakai sebagai bahan mentahnya, kemudian membasahinya dengan cara dicuci dengan air mengalir, setelah itu akarnya diubah bentuknya dengan cara disayat. Kemudian dikeringkan dengan cara disebarkan simplisia tersebut hingga kering, ditutup kain hitam, selanjutnya simplisia tersebut dijemur hingga kering. Akar yang sudah kering dihaluskan dengan blender agar lebih mudah digunakan dalam penelitian (Handayani, 2017).

3.5.2.2 Determinasi Tanaman Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.)

Determinasi dilakukan di laboratorium FMIPA, Universitas Lambung Mangkurat. Determinasi bertujuan untuk menetapkan kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis berdasarkan studi pustaka.

3.5.2.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol Akar Kelakai menggunakan metode sokshletasi yaitu dengan memasukkan serangkaian alat, kemudian serbuk simplisia akar kelakai ditimbang sebanyak 50 g, lalu dimasukkan ke dalam kertas saluran yang disusun, setiap ujung kertas saluran diikat menggunakan benang. atau tali kemudian dimasukkan ke dalam tabung soxhlet. . Bahan larut yang akan digunakan adalah etanol 70%, kemudian bahan larut tersebut dimasukkan ke dalam cawan dasar berbentuk bulat. Toples yang alasnya berbentuk bulat berisi bahan larut dihangatkan, uap hasil bahan larut akan membasahi kertas saluran yang berisi serbuk simplisia akar kelakai. Siklus ekstraksi dilakukan hingga hasil ekstraksi tidak berbayang secara umum. Kemudian diambil cairan ekstrak yang diperoleh, kemudian cairan ekstrak tersebut dihilangkan dengan menggunakan evaporator hingga zat yang dapat larut berkurang drastis. Kemudian diuapkan ekstrak di atas

waterbath dengan menggunakan cawan porselin pada suhu 95°C hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian ekstrak kental yang didapat ditimbang (Handayani, 2017).

3.5.2.4 Skrining Fitokimia

Uji fenol dilakukan dengan sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan 3-4 tetes FeCl₃ terjadinya perubahan warna hitam kebiruan hingga hitam pekat menunjukkan adanya kandungan fenol (Cahaya, 2023).

Uji flavonoid dengan 1 gram dilarutkan dalam 100 mL air panas selama 5 menit, Sebanyak 5 mL susunan ini ditempatkan ke dalam tabung gelas dan ditambahkan 0,1 gram magnesium, 1 mL HCl dan 5 mL cairan amil. Setelah tercampur, diamkan hingga terbentuk larutan yang terpisah satu sama lain. Berkembangnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan cairan amil menunjukkan bahwa contohnya adalah flavonoid (Mardiyanto, 2021).

Uji alkaloid dilakukan dengan sebanyak 0,5 g ekstrak kemudian ditambahkan kloroform sebanyak 2 mL, amonia sebanyak 10 mL serta 10 tetes H₂SO₄. Campuran dikocok dan dibiarkan hingga membentuk dua lapisan. Lapisan H₂SO₄ yang terbentuk dipindahkan dalam tiga tabung reaksi dengan volume masing-masing tabung 2,5 mL. Ketiga larutan diuji dengan pereaksi *Mayer*,

Dragendorff, dan *Wagner*. Hasil positif pereaksi *Mayer* ditandai dengan terbentuknya endapan putih, pada pereaksi *Dragendorff* terdapat endapan berwarna merah atau jingga sedangkan untuk pereaksi *Wagner* terdapat endapan berwarna coklat (Sukirawati, 2023).

Uji Steroid-Triterpenoid Ekstrak sebanyak 0,1 gram ditambahkan 2-3 mL kloroform dan 10 tetes asam asetat anhidrat serta 2-3 tetes H_2SO_4 pekat (pereaksi *Lieberman-Burchard*) melalui dinding tabung. Uji positif steroid memberikan warna biru sampai hijau, sedangkan terbentuknya warna merah atau ungu menandakan bahwa ekstrak positif mengandung triterpenoid (Ramadhan *et al.*, 2020)

3.5.2.5 Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Akar Kelakai

Dibuat larutan induk ekstrak etanol akar kelakai konsentrasi 2500 ppm dengan cara ditimbang 250 mg ekstrak, dilarutkan dalam 100 mL etanol p.a. Kemudian dibuat 7 seri larutan konsentrasi dari konsentrasi 2500 ppm yaitu 50, 100, 150, 200, 250, 300 dan 350 ppm dengan diambil sebanyak 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, dan 1400 μ L dari larutan induk 2500 ppm, lalu diadkan sampai 10 mL dengan pelarut etanol p.a (Riansyah, 2023).

3.5.2.6 Penentuan Nilai SPF Ekstrak Akar Kelakai

Dimasukkan masing-masing sampel sediaan yang telah diencerkan kedalam kuvet dan ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan 3 kali replikasi. Etanol p.a sebagai blanko setiap interval 5 nm pada rentang panjang gelombang 290-320 nm. Catat hasil absorbansi kemudian hitung nilai SPF nya (Adawiyah, 2019).

3.6 Pengolahan Data

Pengolahan dari data yang dihasilkan yaitu data hasil nilai SPF dari ekstrak akar kelakai yang kemudian data akan dihitung menggunakan rumus SPF dan dianalisis dengan menggunakan SPSS (Sukirawati, 2023).

3.7 Analisis Data

3.7.1 Analisis Data Uji SPF

Dalam menentukan nilai SPF dapat menggunakan persamaan sebagai berikut :

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

Keterangan :

EE : *Erythermal effect spectrum*

I : *Solar intensity spectrum*

Abs : *Absorbance of sunscreen product*

Cf : *Correction Faktor (=10)*

Nilai $EE \times I$ adalah nilai konstanta yang telah ditentukan (Yulianti, 2015):

Tabel 2 Nilai $EE \times I$ Dalam Perhitungan SPF

Panjang Gelombang (nm)	$EE \times I$
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

3.7.2 Analisis Data SPSS

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis kuantitatif, data yang akan dianalisis adalah data hasil nilai SPF dari ekstrak akar kelakai yang dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu untuk menguji data terdistribusi normal atau tidak digunakan uji *Shapiro Wilk*. Apabila data terdistribusi normal digunakan uji *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan pada kelompok konsentrasi. Apabila data tidak terdistribusi normal digunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui perbedaan pada kelompok konsentrasi. Apabila data menggunakan uji *One Way Anova*, maka dilakukan uji lanjutan *post hoc*, sebelum melakukan uji *post hoc* kita harus mengetahui homogenitasnya dengan *Levene Test*, jika data yang didapat homogen maka uji lanjutannya menggunakan LSD, tetapi jika tidak homogen maka digunakan uji *Games Howell*

untuk mengetahui kelompok konsentrasi yang berbeda secara signifikan. Apabila data menggunakan uji *kruskal-wallis*, maka dilakukan uji lanjutan *mann-whitney* untuk mengetahui kelompok konsentrasi yang berbeda secara signifikan.