

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan eksperimental laboratorium untuk mengetahui nilai optimal SPF (*Sun Protection Factor*) daun kitolod (*Isotoma longiflora*) dari konsentrasi 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, dan 1000 ppm.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Juni 2026 di Laboratorium Kimia Terpadu dan Laboratorium Farmasetika Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Panti Waluya Malang.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini yaitu :

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1) Aluminium foil | 15) Labu ukur 10 ml dan 100 ml |
| 2) Ayakan mesh 40 | 16) Mikropipet |
| 3) Batang pengaduk | 17) Oven |
| 4) <i>Beaker glass</i> 500 ml | 18) Penjepit tabung reaksi |
| 5) Blender | 19) Pisau |
| 6) Botol vial | 20) Pipet tetes |
| 7) Cawan porselen | 21) Rak tabung reaksi |
| 8) Ember | 22) <i>Rotary evaporator</i> |
| 9) Gelas ukur 25 ml dan 10ml | 23) Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu) |
| 10) Kaca arloji | 24) Sudip |
| 11) Kain saring | 25) Tabung reaksi |
| 12) Kain serbet | 26) Talenan |
| 13) Kertas saring | 27) Timbangan analitik |
| 14) Kuvet | 28) Toples kaca bening besar |

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

- 1) Daun kitolod (*Isotoma longiflora*)
- 2) Etanol 70%
- 3) Akuades
- 4) Asam klorida (HCl)
- 5) Magnesium (Mg)
- 6) Es batu

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi

Populasi merupakan keseluruhan elemen dalam penelitian yang meliputi objek dan subjek dengan ciri-ciri dan karakteristik tertentu yang menjadi target kesimpulan dari hasil akhir suatu penelitian (Amin *et al.*, 2023). Populasi pada penelitian ini ialah tanaman kitolod (*Isotoma longiflora*) dari Desa Sidomulyo, Dusun Sukorembung, Kota Batu, Jawa Timur.

3.4.2 Sampel

Sampel merupakan bagian dari populasi yang menjadi sumber data yang sebenarnya dalam penelitian, atau dapat diartikan sebagian dari populasi atau sebagian dari populasi untuk mewakili seluruh populasi (Amin *et al.*, 2023). Sampel pada penelitian ini ialah ekstrak kental etanol 70% daun tanaman kitolod (*Isotoma longiflora*).

1) Kriteria Inklusi Daun Kitolod (*Isotoma longiflora*)

Memiliki daun yang berwarna hijau tua segar, utuh tanpa cacat fisik seperti sobekan atau bercak-bercak coklat/putih, tidak layu, berbentuk lanset dengan ujung yang runcing, pangkal yang menyempit, tepi daun bergerigi sampai melekok, bentuk tunggal, tegak, bertangkai panjang.

2) Kriteria Eksklusi Daun Kitolod (*Isotoma longiflora*)

Daun yang kering, layu, tidak utuh, terdapat hama atau bercak coklat/putih pada daun, berwarna kuning serta memiliki sobekan pada bagian daun.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas (independen) merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi penyebab terjadi perubahan pada variabel terikat (dependen) (Bagus, 2024). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora*).

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat (dependen) adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, atau dengan kata lain merupakan variabel yang diamati atau diukur sebagai respon terhadap perubahan variabel bebas (Bagus, 2024). Variabel terikat yang digunakan adalah hasil uji skrining flavonoid dan nilai SPF tabir surya.

3.5.3 Variabel Terkontrol

Variabel kontrol merupakan variabel yang ditentukan dan dibuat konstan nilainya oleh peneliti, sehingga pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat yang tidak dipengaruhi dari luar tidak diteliti, atau dengan kata lain yakni variabel yang dijaga konstan untuk memastikan bahwa variabel bebas adalah satu-satunya faktor yang mempengaruhi variabel terikat (Bagus, 2024). Variabel terkontrol dalam penelitian ialah konsentrasi pelarut etanol, suhu maserasi, lama waktu maserasi, suhu *rotary evaporator*, ukuran partikel simplisia (mesh no.40), jumlah koreksi (CF = 10) dalam perhitungan SPF, dan panjang gelombang UV pada spektrofotometri UV-Vis, karena nilainya dibuat tetap serta untuk menjaga konsistensi pengukuran.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Operasional	Alat ukur	Skala
Daun Kitolod	Daun kitolod yang digunakan berupa dengan warna daun yang hijau tua segar, utuh, tidak layu, maupun kering.	Secara visual	Ordinal

Ekstrak daun Kitolod	Sediaan pekat yang diperoleh dari hasil ekstraksi senyawa aktif simplisia daun kitolod dengan pelarut etanol 70%.	Secara visual (bentuk cair)	Ordinal
Kandungan Flavonoid (kualitatif)	Hasil uji skrining fitokimia yang menunjukkan keberadaan flavonoid melalui perubahan warna dari coklat atau kehijauan menjadi kekuningan atau jingga.	Secara visual (warna)	Ordinal
Panjang Gelombang UV dan Vis	Panjang gelombang acuan yang dipakai UV yaitu 190-380 nm dan Vis yaitu 380-780 nm.	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio (angka panjang gelombang)
<i>Sun Protection Factor</i> (SPF)	Nilai kemampuan ekstrak dalam melindungi kulit dari radiasi UV-B (290-320 nm), dihitung dengan rumus Mansur dari data absorbansi larutan uji.	Spektrofotometer UV- Vis, kuvet kuarsa, perangkat lunak atau lembar perhitungan SPF	Rasio (angka SPF)
Kondisi Optimal	Nilai SPF optimum yang digunakan yaitu SPF 15-50, karena nilai SPF 50 dianggap optimal untuk iklim Indonesia dan SPF 15 berada di atas kategori perlindungan minimal.	Nilai SPF	Rasio (angka SPF)

3.7 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini dilakukan secara *post control* dengan menggunakan *blanko* (etanol) sebagai kontrol negatif dan kontrol positifnya yakni larutan ekstrak etanol daun kitolod dengan variasi konsentrasi 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, dan 1000 ppm, yang dilakukan 3 kali replikasi pada panjang gelombang UV.

3.7.1 Identifikasi Tumbuhan

Determinasi merupakan proses identifikasi dan penetapan kebenaran spesies tanaman yang digunakan sebagai bahan penelitian berdasarkan karakteristik morfologi, anatomi, maupun taksonomi, yang dilakukan oleh lembaga atau ahli botani yang kompeten. Determinasi pada penelitian daun tanaman kitolod ini dilakukan di Materia Medika Batu (MMB).

3.7.2 Preparasi Simplisia

Pengambilan sampel daun kitolod (*Isotoma longiflora*) yang akan diambil dari daerah Desa Sidomulyo, Batu Jawa Timur, pada bulan April 2026 waktu pagi hari karena metabolit sekundernya masih tinggi karena belum banyak terdegradasi oleh sinar matahari dan panas. Sampel yang telah dipetik dimasukkan ke dalam plastik sampel yang bersih. Sampel kemudian disortasi basah dengan memilah daun yang berwarna hijau tua segar, utuh, tidak layu, atau bebas gulma yang selanjutnya dilakukan pencucian dengan air mengalir, dirajang kecil-kecil dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50 °C hingga diperoleh simplisia yang bila diremas bergemerisik dan berubah menjadi serpihan lalu dilanjutkan dengan sortasi kering. Simplisia daun kitolod kemudian dihaluskan menggunakan blender. Serbuk simplisia daun kitolod diayak dengan ayakan mesh no 40.

3.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol 70%

Proses ekstraksi daun kitolod dengan cara maserasi menggunakan etanol 70%. Maserasi dilakukan dengan memasukkan simplisia daun kitolod yang sudah diayak mesh no.40 ke dalam bejana, kemudian menambahkan etanol 70% dengan perbandingan ekstrak dan etanol (1 : 5) (b/v). Disimpan selama 3 x 24 jam pada suhu kamar dan sesekali diaduk lalu disaring. Kemudian filtrat hasil penyaringan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu tidak lebih dari 60 °C hingga diperoleh ekstrak kentalnya.

Rendemen dalam persentase berat produk akhir yang dihasilkan per berat bahan olahan yang dirumuskan sebagai berikut :

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

Etanol 70% juga digunakan sebagai *blanko* pada uji SPF dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis karena merupakan pelarut utama dalam pembuatan larutan sampel sehingga *blanko* yang digunakan harus sama dengan pelarut tersebut agar pembacaan absorbansi hanya berasal dari zat uji bukan dari pelarutnya, karena bersifat stabil dan tidak menyerap signifikan pada panjang gelombang UV, dan mampu melarutkan senyawa aktif seperti flavonoid dengan baik.

3.7.4 Skrining Fitokimia Flavonoid

Ekstrak daun kitolod dilakukan uji identifikasi senyawa flavonoid. Untuk skrining fitokimia flavonoid pada ekstrak etanol daun kitolod menggunakan uji *Shinoda* yaitu dengan dilakukan memasukkan larutan ekstrak daun kitolod ke tabung reaksi, lalu ditambahkan Mg ke dalam tabung. Kemudian masukan HCl pekat ke tabung, lalu tabung dikocok ringan dan biarkan bereaksi beberapa menit. Hasil positif untuk flavonoid jika muncul warna jingga atau kekuningan dalam beberapa menit, serta hasil negatif jika tidak terjadi perubahan warna.

3.7.5 Pembuatan Larutan Induk Dan Variasi Konsentrasi

Larutan induk dibuat dengan konsentrasi 10.000 ppm. Kemudian larutan senyawa ekstrak etanol daun kitolod diencerkan menjadi variasi konsentrasi 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm dan 1000 ppm dengan cara masing-masing diambil dengan jumlah yang sudah ditentukan. Selanjutnya masing-masing larutan yang sudah diambil ditambahkan dengan etanol sampai tanda batas dalam labu ukur.

3.7.6 Pengukuran Nilai Absorbansi dan Penentuan Nilai SPF

Skrining panjang gelombang dilakukan untuk menentukan daerah serapan maksimum larutan ekstrak sebelum dilakukan pengukuran nilai absorbansi secara spektrofotometri UV-Vis. Tahap ini bertujuan untuk memastikan bahwa pengukuran dilakukan pada rentang panjang gelombang yang sesuai dengan daerah serapan sinar UV-B, yaitu wilayah yang berperan dalam terjadinya eritema pada kulit. Nilai SPF ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan mengukur absorbansi dari konsentrasi 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, dan 1000 ppm larutan ekstrak etanol pada panjang gelombang UV dengan etanol sebagai *blanko*. Pengukuran pada masing-masing sampel dicatat dan dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Nilai absorbansi yang diperoleh kemudian digunakan untuk penentuan nilai SPF.

Penentuan SPF dilakukan secara kuantitatif dalam bentuk perhitungan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) dan juga dilakukan secara deskriptif dengan merujuk pada tabel klasifikasi nilai SPF dan kategori proteksi tabir surya. Hasil nilai absorbansi masing-masing sampel dicatat dan dilakukan perhitungan nilai SPF mengikuti persamaan Mansur (1986) dalam Susanti, 2019. Persamaannya yaitu (Luthfi *et al.*, 2024) :

$$SPF = CF \times \sum EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Keterangan :

CF : Faktor koreksi bernilai 10

EE : Efek eritmogenik radiasi pada panjang gelombang (λ) nm

I : Intensitas sinar UV pada panjang gelombang (λ) nm

Abs : Nilai absorbansi pada panjang gelombang (λ) nm

Tabel 3.2 Klasifikasi nilai SPF Dan Kategori Proteksi Tabir Surya

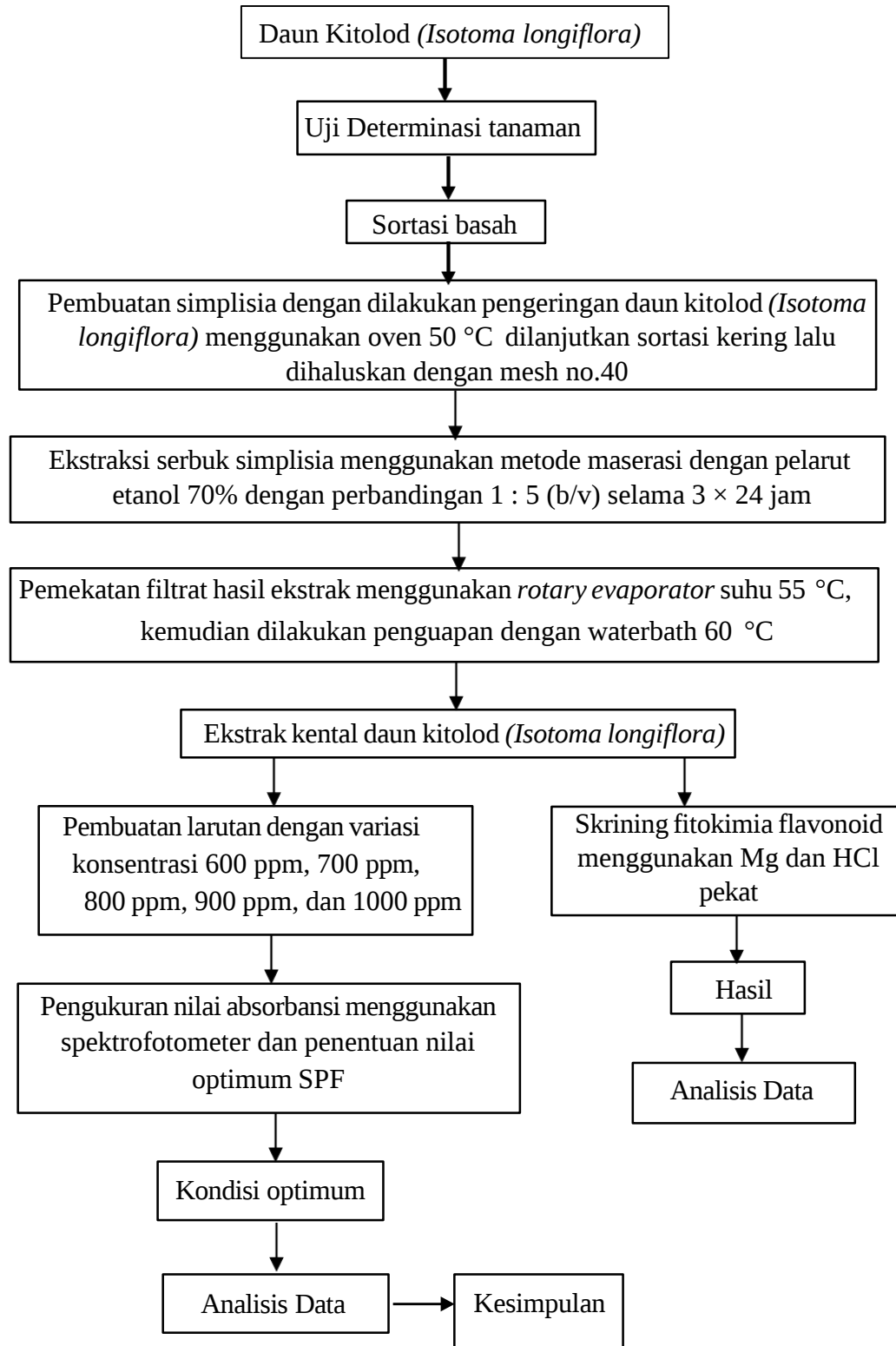
Sumber : (Suhaenah *et al.*, 2019)

Nilai SPF	Kategori Tabir Surya
2 - 11	Proteksi rendah (<i>low</i>)
12 - 29	Proteksi sedang (<i>medium</i>)
30 - 50	Proteksi tinggi (<i>high</i>)

3.7.7 Analisis Data

Setelah diperoleh nilai *Sun Protection Factor* (SPF) dari masing-masing konsentrasi sampel, kemudian dilakukan uji normalitas untuk memastikan data sudah berdistribusi normal dan dilanjutkan dengan uji homogenitas. Selanjutnya dilakukan analisis statistik menggunakan uji *One-Way ANOVA* menggunakan SPSS untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan nilai SPF dari variasi konsentrasi yang di uji. Uji ANOVA (*One-Way ANOVA*) digunakan karena data terdiri dari lebih dari dua kelompok perlakuan dengan variabel bebas konsentrasi ekstraksi daun kitolod (*Isotoma longiflora*) (600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, dan 1000 ppm). Jika hasil ANOVA (*One-Way ANOVA*) menunjukkan nilai $p < 0,05$, maka terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Selanjutnya dilakukan uji *post hoc Tukey* untuk menentukan kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan (Pasuch Gluzezak *et al.*, 2024).

3.8 Kerangka Operasional



Gambar 3.1 : Kerangka Operasional