

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Pada penelitian pendahuluan ini, daun melati di ekstrak menggunakan etanol 96%. Ekstrak kemudian dipisahkan dengan fraksinasi cair-cair menggunakan n-heksana, etil asetat, dan air. Kemudian untuk menilai aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi digunakan metode DPPH. Berdasarkan temuan fraksi antioksidan tertinggi, pemisahan kemudian dilakukan menggunakan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) dan metode lain yang sesuai. Dilakukan uji aktivitas tabir surya terhadap ekstrak, fraksi dan subfraksi teraktif menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Subfraksi teraktif di analisis menggunakan GC-MS untuk mengetahui komponen senyawa aktifnya.

#### **B. Subyek Penelitian**

Subyek penelitian yang dilakukan adalah daun melati yang diambil dari Desa pagilaran, Kabupaten Batang, Jawa Tengah. Penelitian dilakukan di Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Kendal dan STIFAR Yayasan Pharmasi Semarang pada bulan April 2025.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi adalah semua objek yang menjadi target dalam penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah daun melati yang diperoleh dari Desa Pagilaran, Kabupaten Batang, Jawa Tengah.

##### **2. Sampel**

Daun melati yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini diperoleh melalui teknik *purposive random sampling* yang merupakan teknik *sampling* dengan mempertimbangkan kriteria tertentu. Kriteria yang dipertimbangkan yaitu daun melati muda.

#### **D. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak, fraksi, dan subfraksi daun melati. Variabel utama kedua penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dan aktivitas tabir surya dari ekstrak, fraksi dan

subfraksi daun melati. Variabel utama ketiga adalah berbagai metabolit sekunder dalam ekstrak, fraksi dan subfraksi serta komponen senyawa pada subfraksi teraktif daun melati.

## **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang sebelumnya telah diidentifikasi dikelompokkan menjadi beberapa jenis berdasarkan pola hubungan sebab-akibat, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja diubah untuk melihat pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Dalam penelitian ini, variabel bebasnya adalah jenis pelarut ekstrak dan fraksi daun melati.

Variabel tergantung adalah fokus utama yang menjadi objek pengukuran dalam penelitian. Pada penelitian ini, variabel tergantung meliputi nilai  $IC_{50}$ , dan nilai SPF.

Variabel kendali adalah variabel yang selain variabel bebas juga berpotensi memengaruhi hasil penelitian, sehingga perlu dikendalikan atau distandarisasi agar hasil yang diperoleh konsisten dan dapat direplikasi dengan akurat oleh peneliti lain, yaitu kondisi pengukuran atau penelitian, laboratorium serta metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% serta lama waktu maserasi 5 hari, metode fraksinasi dengan metode corong pisah fraksinasi cair-cair dan metode subfraksinasi dengan metode kromatografi kolom vakum cair, telaah fitokimia dilakukan menggunakan identifikasi KLT dan analisis komponen senyawa menggunakan GC-MS.

## **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama daun melati adalah daun tanaman melati yang dipanen pada tahun 2024 dari Desa Pagilaran Kabupaten Batang, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun melati dibuat dengan cara menumbuk daun melati kering dan menyaring serbuk yang dihasilkan melalui saringan 40 mesh.

Ketiga, ekstrak daun melati adalah ekstrak yang diperoleh dengan cara remaserasi menggunakan etanol 96% sebagai cairan penyari lalu diuapkan pada suhu  $40^{\circ}\text{C}$  dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

Keempat, Fraksi daun melati diperoleh melalui fraksinasi cair-cair dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan air menggunakan corong pisah.

Kelima, subfraksi daun melati adalah subfraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom vakum cair.

Keenam, Aktivitas antioksidan adalah kemampuan suatu senyawa dalam menghambat radikal bebas, yang diukur menggunakan metode DPPH dan dinyatakan melalui nilai  $IC_{50}$ .

Ketujuh, nilai  $IC_{50}$  adalah nilai aktivitas antioksidan didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50 dan memasukkan nilai B dan A.

Kedelapan, Nilai SPF menunjukkan seberapa efektif tabir surya melindungi kulit dari paparan sinar matahari.

Kesembilan, telaah fitokimia adalah Senyawa metabolit sekunder dalam sampel diidentifikasi menggunakan metode KLT.

Kesepuluh, GC-MS adalah metode yang digunakan untuk mengidentifikasi komponen senyawa pada subfraksi teraktif.

## E. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Peralatan maserasi seperti toples, gelas kimia, kain flanel, dan lainnya digunakan dalam penelitian ini, ayakan mesh 40, allumunium foil, bejana tempat hasil maserasi. Alat untuk pembuatan fraksi-fraksi ekstrak etanol daun melati yaitu corong pisah. Alat untuk pembuatan subfraksi aktif daun melati yaitu kromatografi cair vakum. Beberapa alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu lampu UV, *chamber*, seperangkat alat spektfotometri UV-VIS, seperangkat alat GC-MS, neraca analitik, oven, corong pisah, ayakan mesh 40, *blender*, *rotary evaporator*, cawan porselen, *waterbath*, kertas saring, pipa kapiler, pipet tetes, statif, alat-alat gelas lainnya.

### 2. Bahan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh remerasasi, fraksinasi cair-cair, dan subfraksinasi daun melati segar menggunakan kromatografi vakum cair. Desa Pagilaran Kabupaten Batang Jawa Tengah merupakan tempat perkebunan melati.

Daun Melati muda segar, Bahan maserasi yaitu *ethanol grade* 96%. Bahan untuk pembuatan fraksi-fraksi ekstrak etanol daun melati yaitu *grade n-hexane pro analysis*, *ethyl acetate pro analysis* dan aquadest. Bahan untuk pembuatan subfraksi aktif daun melati yaitu kromatografi cair vakum yaitu silica gel kolom. Bahan untuk uji antioksidan yaitu DPPH. Bahan untuk uji KLT yaitu plat silica GSF2<sub>54</sub>,

fase gerak seperti n-butanol, *methanol* dan penampak bercak flavonoid seperti asam sulfat dan sitroborat. Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini yaitu baku quersetin, Mg *powder*, *ether*, asam asetat, asam sulfanilat, formaldehyda, uap amoniak, kloroform, amil alkohol, NaOH, NaNO<sub>2</sub>, HCl, vanilin, anisaldehyda, pereaksi dragendroff, pereaksi meyer dan FeCl<sub>3</sub>.

## **F. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi Tanaman melati**

Identifikasi tanaman adalah langkah awal dan melibatkan pemeriksaan keaslian sampel dengan karakteristik morfologi tanaman melati di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

### **2. Pengumpulan Bahan dan Pembuatan Serbuk**

Daun melati yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari Desa Pagilaran, Kabupaten Batang, Jawa Tengah pada bulan Agustus 2024. Daun melati terlebih dahulu dibersihkan dan dicuci, kemudian dipotong kecil-kecil sebelum dikeringkan dalam lemari pengering simplisia selama 3-4 hari pada suhu 40°C. Daun kering digiling menjadi bubuk dan kemudian dilewatkan melalui ayakan mesh 40. Bagian yang tidak lolos dihaluskan kembali hingga semua serbuk lolos ayakan mesh 40.

### **3. Ekstraksi**

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, di mana serbuk kering simplisia direndam dalam pelarut yang sesuai untuk menyari sebagian besar kandungan metabolit sekundernya. Dalam proses ini, satu bagian serbuk simplisia daun melati dimasukkan ke dalam wadah maserasi, lalu ditambahkan sepuluh bagian etanol 96% sebagai pelarut. Campuran direndam selama enam jam pertama dengan pengadukan sesekali, kemudian dibiarkan selama 18 jam tanpa diaduk. Setelah tahap perendaman selesai, maserat dipisahkan menggunakan teknik filtrasi, dekantasi, atau sentrifugasi. Tahapan ini diulang sedikitnya satu kali menggunakan pelarut yang sama, namun dengan jumlah setengah dari volume pelarut pada penyarian sebelumnya.

Seluruh hasil maserasi dikumpulkan lalu diuapkan menggunakan alat penguap vakum, penguap bertekanan rendah, atau *rotavapor* hingga terbentuk ekstrak kental. Rendemen dihitung dalam bentuk persentase berat (b/b), yaitu perbandingan antara berat ekstrak

yang dihasilkan dengan berat serbuk simplisia yang digunakan, berdasarkan hasil penimbangan (Kemenkes RI, 2017).

#### **4. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak**

**4.1. Identifikasi Flavonoid.** Metode kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk mendeteksi flavonoid dengan fase diam silika gel GSF254 dan fase gerak campuran n-butanol, asam asetat, serta air (perbandingan 4:1:5). Pada pengamatan dengan sinar UV 254 nm, noda terlihat suram, sedangkan sinar UV 366 nm menghasilkan warna cerah seperti biru, kuning, atau ungu. Untuk memvisualisasikan senyawa tersebut, digunakan pereaksi semprot berupa uap amonia (Harborne, 1987). Untuk mengidentifikasi flavonoid bisa menggunakan kuersetin sebagai baku pembanding.

**4.2. Identifikasi Steroid.** Untuk mengetahui kandungan senyawa steroid dilakukan identifikasi dengan KLT, fase diam silika gel GSF<sub>254</sub> dan fase geraknya n-heksana : etil asetat (7:3) dan pereaksi semprot Lieberman-Burchard untuk mendeteksi bercak hijau yang menunjukkan adanya steroid (Harborne, 1987). Baku pembanding yang digunakan untuk identifikasi steroid adalah sitosterol.

**4.3. Identifikasi Alkaloid.** KLT digunakan untuk identifikasi, menggunakan fase diam silika gel GSF<sub>254</sub>, fase gerak metanol: kloroform (0,5:9,5), dan reagen semprot Dragendorff untuk mengidentifikasi bercak oranye-coklat yang menunjukkan adanya alkaloid. Untuk tujuan mengenali alkaloid, piperin berfungsi sebagai standar.

**4.4. Identifikasi Saponin.** Deteksi saponin dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan silika gel GSF<sub>254</sub> sebagai fase diam dan kloroform:metanol:air (6:3:1) sebagai fase gerak. Warna hijau akan terlihat pada UV 366 dan kuning akan terlihat pada UV 254. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> menghasilkan warna ungu dan tampak biru pada cahaya langsung, sehingga berfungsi sebagai reagen semprot ideal pada anisaldehid (Harborne, 1987).

**4.5. Identifikasi Tanin.** Menggunakan campuran pelarut yang terdiri dari etil asetat : metanol : air (100 : 13,5 : 10), tanin dideteksi melalui kromatografi lapis tipis (KLT) dengan silika gel GF 254 sebagai fase diam. ditemukan seluruhnya hitam pada 366 nm setelah diidentifikasi pada 254 nm (Harborne, 1987). Tanin dapat diidentifikasi menggunakan asam galat sebagai standar.

## 5. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun melati secara Kualitatif

Uji kualitatif untuk melihat aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun melati dilakukan dengan cara menyemprot pelat KLT hasil dari uji identifikasi kandungan kimia ekstrak dengan larutan DPPH 10%. Senyawa yang memiliki sifat antioksidan akan menghasilkan bercak berwarna kuning pucat (Nurfadillah *et al.*, 2016).

## 6. Fraksinasi

Sebanyak 60,0 gram ekstrak etanol kental dari daun melati menjalani proses fraksinasi cair-cair menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air. Prosedur fraksinasi diawali dengan melarutkan ekstrak kental ke dalam campuran n-heksan dan air suling dengan perbandingan 1:1. Setelah dicampur dan dikocok selama 10–15 menit dalam corong pemisah, lapisan air akan mengendap di bagian bawah, sedangkan lapisan n-heksan mengapung di atas. Fraksinasi ini dilakukan berulang kali pada kedua lapisan untuk memastikan semua senyawa metabolit sekunder terpisah dengan baik. Selanjutnya, air yang masih tersisa dalam fraksi n-heksan difraksinasi kembali dengan etil asetat menggunakan perbandingan 1:1 (etil asetat : aquadest). Corong pemisah diguncang secara menyeluruh untuk menghasilkan pemisahan yang optimal. Fraksi air yang tersisa merupakan lapisan aquadest yang akan dipisahkan dari etil asetat pada tahap fraksinasi ketiga. Setelah proses pemisahan, pelarut dalam masing-masing fraksi (n-heksan, etil asetat, dan air) diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk memperoleh fraksi kental dari masing-masing pelarut.

## 7. Pemisahan Fraksi dengan Kromatografi Kolom Cair Vakum (KCV)

**7.1 Pemisahan Fraksi.** Sebanyak 5 gram fraksi etil asetat daun melati yang dipilih berdasarkan hasil uji aktivitas ditimbang dengan teliti, kemudian dicampurkan dengan sekitar 5 gram silika gel sebagai fase diam kolom, lalu diaduk hingga membentuk campuran serbuk homogen. Selanjutnya, campuran difraksinasi ulang menggunakan kromatografi kolom vakum dengan silika gel sebagai fase diam dan kombinasi pelarut sebagai fase gerak, berdasarkan hasil terbaik dari analisis KLT, dengan volume 50 mL pada awal penambahan (Gritter, 1991). Pelarut elusi digunakan secara bertahap mulai dari non-polar (n-heksana), kemudian ke polar (etil asetat), dan kembali ke non-polar (metanol), sehingga polaritas pelarut meningkat

secara berurutan. Untuk mendapatkan kerapatan maksimal, sampel ditempatkan di bagian atas kolom dan didistribusikan secara merata sebelum kertas saring diletakkan di atasnya, lalu perangkat vakum diaktifkan. Setelah pengumpulan tiap eluate, kolom dikosongkan sepenuhnya (Hostettmann et al., 1995). Hasil eluat dari kromatografi kolom vakum dikumpulkan dalam wadah kaca, lalu dianalisis kembali menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan silika gel GSF254 sebagai fase diam serta campuran n-heksana, etil asetat, dan metanol sebagai fase gerak yang optimal. Fraksi-fraksi yang menunjukkan pola bercak serupa di bawah sinar UV digabungkan untuk membentuk subfraksi yang lebih sederhana. Perbandingan eluen yang digunakan dapat dilihat pada tabel berikut (Rahimah, 2013) :

**Tabel 4. Perbandingan Eluen KCV**

Eluen	Komposisi Eluen	Volume (mL)	Total Volume (mL)
n-heksan	100%	2 x 50	100
n-heksan : etil asetat	8 : 2	2 x 50	100
n-heksan : etil asetat	6 : 4	2 x 50	100
n-heksan : etil asetat	4 : 6	2 x 50	100
n-heksan : etil asetat	2 : 8	2 x 50	100
Etil asetat	100%	2 x 50	100
Etil asetat : methanol	8 : 2	2 x 50	100
Etil asetat : methanol	6 : 4	2 x 50	100
Etil asetat : methanol	4 : 6	2 x 50	100
Etil asetat : methanol	2 : 8	2 x 50	100
Metanol	100%	2 x 50	100

## **8. Persiapan Bahan untuk Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH)**

**8.1 Pembuatan Larutan DPPH.** Setelah menambahkan 50 mg serbuk DPPH ke dalam labu ukur 50,0 mL, methanol p.a., diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Sampel diencerkan 10 kali dengan menggunakan pipet 5,0 mL dan methanol p.a. mencapai konsentrasi 100 ppm sampai batas labu volumetrik berukuran 50,0 mL.

**8.2 Pembuatan Larutan Standar Quersetin.** Larutan induk kuersetin berkonsentrasi 100  $\mu$ g/ml disiapkan dengan menimbang secara tepat 10 mg kuersetin, kemudian dilarutkan dalam 100 ml metanol p.a. dan dikocok hingga larut sempurna. Larutan ini selanjutnya diencerkan untuk memperoleh konsentrasi bertingkat, yaitu 1, 2, 3, 4, 5, dan 6  $\mu$ g/ml. Sebanyak 1000  $\mu$ l dari masing-masing larutan kuersetin tersebut dipindahkan ke dalam enam tabung reaksi. Ke setiap tabung kemudian ditambahkan 1000  $\mu$ l larutan DPPH (100  $\mu$ g/ml

dalam metanol p.a.). Volume total dalam masing-masing tabung disesuaikan menjadi 4 ml menggunakan metanol p.a., dikocok hingga homogen, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah inkubasi, absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm.

**8.3 Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak.** Larutan sampel disiapkan dalam seri konsentrasi 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm dengan melarutkannya dalam metanol p.a. Dari tiap konsentrasi, diambil 2 mL larutan yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Campuran tersebut dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 10 detik, lalu dibiarkan selama waktu operasional yang telah ditentukan dalam kondisi gelap. Setelah waktu inkubasi, absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum 517 nm saat kondisi larutan sudah stabil sesuai waktu operasional. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak tiga ulangan guna memperoleh data absorbansi dari campuran larutan DPPH dengan ekstrak etanol daun melati pada berbagai konsentrasi.

**8.4 Pembuatan Larutan Sampel Fraksi.** Larutan fraksi disiapkan dalam deret konsentrasi 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm dengan pelarut metanol p.a. Sebanyak 2 mL dari masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung, kemudian ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Campuran tersebut dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 10 detik, lalu didiamkan sesuai waktu reaksi (*operating time*) dan disimpan di tempat gelap. Setiap perlakuan dilakukan dalam tiga kali replikasi.

**8.5 Pembuatan Larutan Sampel Subfraksi.** Larutan subfraksi disiapkan dalam seri konsentrasi 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm dengan menggunakan metanol p.a. Sebanyak 2 mL dari tiap konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Campuran tersebut dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 10 detik, lalu dibiarkan selama waktu operasional yang telah ditentukan dalam kondisi gelap. Setiap pengujian pada larutan fraksi dilakukan dalam tiga kali pengulangan.

## **9. Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode 1,1-diphenyl-2-*picrylhydrazyl* (DPPH) secara Spektrofotometri UV-Vis**

**9.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.** Absorbansi maksimum ditemukan dengan mengukur absorbansi 2 mL

larutan stok DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang dikalibrasi antara 400 dan 800 nm. Absorbansi larutan sampel diukur pada panjang gelombang maksimumnya.

**9.2 Penentuan *Operating time* Larutan Uji.** Larutan uji sebanyak 2 mL ditambahkan 2 mL DPPH untuk menentukan *operating time*. Larutan dicampur dengan baik setelah 10 detik vortex, dan absorbansi diukur pada spektrofotometer UV-Vis per menit. Prosedur yang sama digunakan pada setiap ekstrak, fraksi, dan standar quersetin untuk menentukan waktu terbaik spektrofotometer UV-Vis.

**9.3 Penentuan Aktivitas Antioksidan.** Aktivitas antioksidan dilakukan pada ekstrak daun melati dalam etanol 96%, serta fraksi daun melati dalam n-heksana, etil asetat, dan air hingga fraksi aktifnya. Ada berbagai macam konsentrasi yang akan diukur. Setiap larutan uji dibiarkan dalam keadaan gelap selama *operating time* dan sebelumnya divortex selama 10 detik supaya homogen. Larutan dapat dideteksi menggunakan spektrofotometer UV-Vis, lalu diukur absorbansi DPPH (kontrol) dan dibandingkan dengan baku pembanding yaitu kuersetin.

## **10. Pengukuran Aktivitas Tabir Surya secara Spektrofotometri UV-Vis**

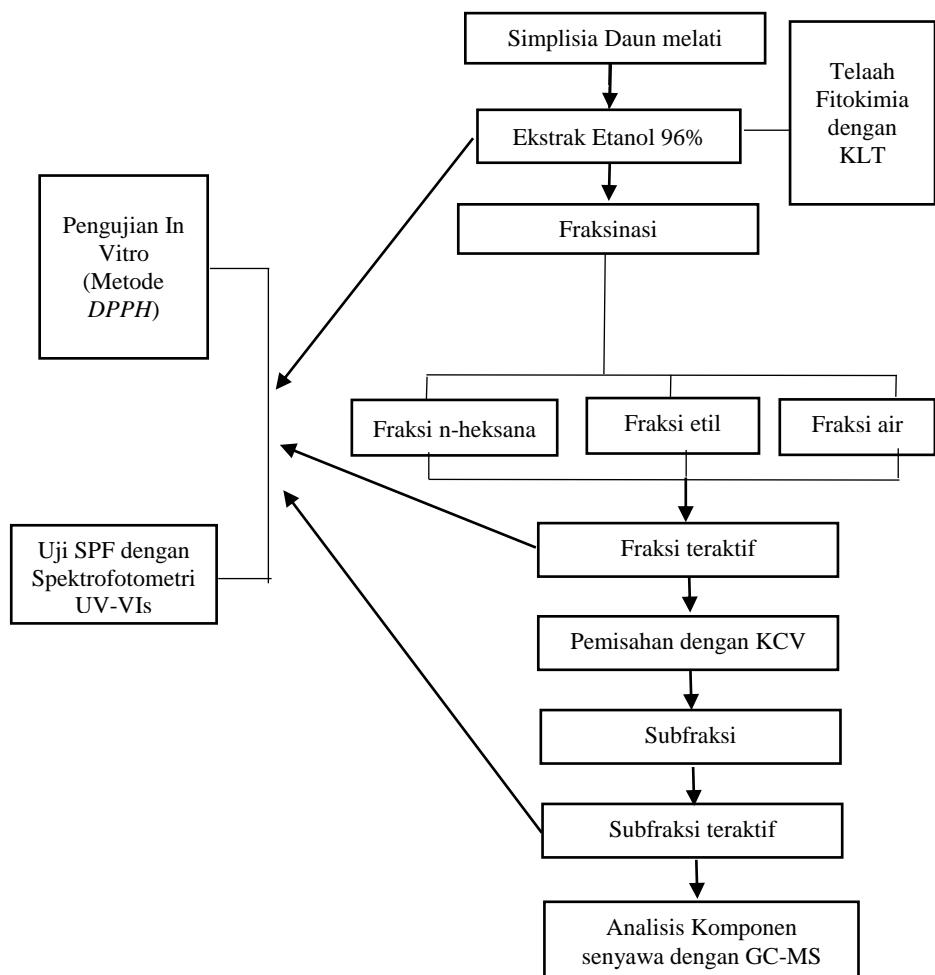
Penentuan nilai SPF dalam penelitian ini dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 290 hingga 320 nm dengan interval pengukuran setiap 5 nm, menggunakan etanol p.a sebagai larutan blanko. Sebanyak 50 mg ekstrak dan fraksi daun melati ditimbang, lalu masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan etanol p.a hingga homogen, kemudian volume ditambahkan sampai tanda batas untuk memperoleh larutan stok dengan konsentrasi 500 ppm. Selanjutnya, larutan stok dipipet masing-masing sebanyak 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL, dan 10 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan hingga mencapai volume akhir. Dari tahap ini diperoleh lima konsentrasi uji, yaitu 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Setiap larutan dengan konsentrasi berbeda diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah ditetapkan.

## **11. Analisis senyawa aktif antioksidan subfraksi teraktif daun melati menggunakan GC-MS**

Subfraksi daun melati yang menunjukkan aktivitas antioksidan paling tinggi dianalisis lebih lanjut menggunakan metode Gas

Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS). Sampel sebanyak 1  $\mu\text{L}$  diinjeksi ke dalam instrumen GC-MS yang dilengkapi kolom kapiler berdimensi 30 meter panjang, diameter dalam 0,25 mm, dan ketebalan film 0,25  $\mu\text{m}$ . Suhu oven dinaikkan secara bertahap mulai dari 70 °C hingga 250 °C selama total waktu 30 menit. Helium digunakan sebagai gas pembawa dengan tekanan 12 kPa, laju alir total 30 mL/menit, serta rasio split yang diatur sebesar 1:50 (Novitasari *et al.*, 2016).

## 12. Alur Penelitian



**Gambar 3. Alur penelitian**

## G. Analisa Hasil

### 1. Penentuan *Inhibitory Concentration 50 (IC<sub>50</sub>)*

Nilai absorbansi dari daun melati kemudian digunakan untuk menghitung persentase aktivitas penangkal radikal bebas dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{Abs Kontrol}-\text{Abs Sampel})}{\text{Abs Kontrol}} \times 100\%$$

Setelah diperoleh persentase inhibisi dari setiap replikasi, dilakukan perhitungan regresi linier antara konsentrasi sampel (ppm) sebagai variabel X dan persentase inhibisi DPPH (%) sebagai variabel Y, sehingga diperoleh persamaan:

$$Y = BX + A$$

Nilai IC<sub>50</sub> dihitung dengan menentukan nilai X saat Y sama dengan 50, menggunakan nilai B dan A dari persamaan tersebut. Perhitungan yang sama juga dilakukan pada baku kuersetin.

### 2. Penentuan Nilai SPF

Absorbansi yang diperoleh dari pengukuran menggunakan spektrofotometri UV-Vis kemudian dihitung menggunakan rumus

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

sebagai berikut:

Keterangan:

CF : Faktor koreksi (10)

EE : Efektifitas eritema

I : Spektrum intensitas sinar

Abs : Absorbansi sampel

Nilai EE x I yang merupakan karakteristik standar untuk panjang gelombang 290-320 nm dengan peningkatan 5 nm. Nilai EE x I dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 5. Nilai EE x I

Panjang Gelombang (nm)	EE x I
290	0,015
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,018
TOTAL	1

Cara Perhitungan :

Nilai absorbansi masing-masing panjang gelombang yang ditemukan pada tabel di atas dikalikan dengan nilai  $EE \times I$ . Hasil perkalian absorbansi dan  $EE \times I$  kemudian dijumlahkan dan kemudian dikalikan dengan faktor koreksi 10. Dengan demikian, nilai SPF diperoleh (Aris dan Adriana, 2022).

### 3. Analisa Data

Analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) versi 21.0. Langkah awal mencakup uji normalitas dan konsistensi data terhadap seluruh sampel. Jika data menunjukkan distribusi normal dan bersifat homogen, maka digunakan analisis varian (ANOVA), yang selanjutnya diikuti dengan uji post hoc apabila ditemukan perbedaan yang signifikan. Uji *Mann-Whitney U* digunakan untuk membandingkan perbedaan statistik antara dua kelompok, sedangkan uji *Kruskal-Wallis* non-parametrik digunakan untuk mengevaluasi distribusi data apakah normal atau tidak.