

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi semua individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi dalam penelitian ini adalah sediaan *lip cream* dengan pewarna alami ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*).

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan *lip cream* dengan berbagai konsentrasi pewarna alami ekstrak kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak hasil maserasi dari kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*) sebagai zat pewarna alami pada formulasi *lip cream*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel menurut fungsinya dalam penelitian dapat diklasifikasikan berdasarkan pola hubungan sebab akibat menjadi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas merupakan faktor yang dianggap menentukan variabel lainnya. Variabel bebas untuk penelitian ini adalah ekstrak kayu secang dengan berbagai konsentrasi zat warna.

Variabel tergantung yaitu variabel akibat dari variabel utama. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah mutu fisik, keamanan, dan tingkat kesukaan atau uji hedonik dari sediaan *lip cream*.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kondisi laboratorium, kondisi fisik peneliti, waktu panen, umur tanaman, dan waktu pengamatan.

3. Definisi operasional

Pertama, simplisia kayu secang adalah simplisia yang berasal dari tanaman secang (*Caesalpinia sappan L.*) dan sudah mengalami proses pengeringan yang

diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) adalah ekstrak yang diperoleh dari hasil penyarian dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% kemudian dipekatkan menggunakan *vacum evaporator* sampai bebas etanol.

Ketiga, *lip cream* adalah sediaan pewarna bibir dalam bentuk krim yang dibuat dari ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) sebagai zat warna alami.

Keempat, mutu fisik adalah parameter yang diperoleh dari uji organoleptis, uji homogenitas, uji stabilitas, uji pH, viskositas, daya lekat, dan daya sebar untuk mengetahui kualitas dari sediaan *lip cream*.

Kelima, keamanan adalah parameter yang digunakan untuk mengetahui tingkat keamanan dari sediaan *lip cream* melalui uji iritasi pada kulit.

Keenam, hedonik adalah parameter yang digunakan untuk mengetahui tingkat kesukaan dari responden terhadap sediaan *lip cream* dengan pewarna alami ekstrak kayu secang.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Jawa Tengah.

1.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96%, minyak zaitun (*olive oil*), *carnauba wax*, *cetyl alcohol*, *dimethicone*, titanium dioksida, tokoferol, nipagin, nipasol, *oleoum rosae*, aquadestilata, toluen, HCl, serbuk Mg, amil alkohol, etanol 96%, kloroform, asam sulfat, TEA (trietanolamin), BHT (*Butylated Hydroxytoluene*).

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mesin penggiling, blender, ayakan no. 60, seperangkat alat maserasi, beaker glass, batang pengaduk, oven, timbangan digital, botol maserasi, *vacuum rotary evaporator*, alat uji daya

lekat, alat uji daya sebar, mortir dan stamper, pH meter, seperangkat alat kaca, viskometer, piknometer dan *moisture balance*.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan sampel

Kayu secang diambil secara acak dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Jawa Tengah dalam bentuk simplisia kering.

2. Identifikasi simplisia kayu secang

Tahap yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan identifikasi terhadap simplisia kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan tujuan untuk menetapkan kebenaran sampel simplisia kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang didapat dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Jawa Tengah. Identifikasi dilakukan di laboratorium Botani Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta dengan mencocokkan ciri makroskopis dan mikroskopis simplisia dengan ciri yang terdapat pada Materia Medika Indonesia.

3. Pembuatan serbuk kayu secang

Simplisia kayu secang yang didapat kemudian disortasi kering dengan cara membuang pengotor seperti daun kering dan kayu yang diduga bukan kayu secang, setelah disortasi kering kemudian simplisia dilakukan penggilingan dan pengayakan, ayakan yang digunakan adalah ayakan dengan no. 60 sehingga didapat serbuk halus kayu secang (Putri *et al.* 2018).

4. Pembuatan ekstrak kayu secang

Sebanyak 1000 gram serbuk kayu secang dimasukkan ke dalam bejana kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 10000 ml dan didiamkan selama 3 hari dengan melakukan penggojokan setiap 6 jam, bejana maserasi disimpan pada suhu ruang. Penggunaan etanol sebagai bahan pengekstraksian pada proses maserasi. Etanol merupakan pelarut serbaguna untuk ekstraksi pendahuluan. Setelah proses maserasi berakhir, dilakukan pemisahan antara filtrat dengan residu

menggunakan corong *Buchner*. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *vacuum evaporator* pada suhu 55° selanjutnya disebut ekstrak kayu secang (Rina 2013)

5. Karakterisasi ekstrak kayu secang

5.1 Susut pengeringan ekstrak kayu secang. Ekstrak ditimbang dengan seksama sebanyak 2 gram pada *pan* aluminium yang telah disediakan pada alat *moisture analyzers*, kemudian dilakukan pemanasan sampel pada suhu 105°C dan dihitung hingga pemanasan selesai, lalu dicatat hasil yang tertera pada *moisture analyzers*, penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak 3 kali. Susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal mengenai besarnya senyawa yang mudah hilang pada saat proses pengeringan. (Setyawati 2018; Depkes RI 2000).

5.2 Kadar air ekstrak kayu secang. Penetapan kadar air ekstrak dilakukan secara destilasi, disiapkan 150 ml toluen dan 10 ml air, kemudian dilakukan penjuhan toluen dengan cara dicampur dengan air dan digojok kuat setelah itu dipisahkan lapisan airnya. Menimbang sejumlah ekstrak kayu secang yang diperkirakan mengandung 1-4 ml air yaitu 15 gram, dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Dimasukkan toluen jenuh air ke dalam labu alas bulat dan melakukan pemasangan alat, dipanaskan labu selama 15 menit. Setelah semua air tersuling, dibilas bagian dalam pendingin dengan toluene jenuh air dan dilanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dibaca volum air setelah air memisah sempurna dan dihitung kadar air dalam % v/b (Depkes RI 2013).

5.3 Berat jenis ekstrak kayu secang. Penetapan berat jenis ekstrak dilakukan dengan mengencerkan ekstrak sebesar 1% yang kemudian diukur beratnya menggunakan piknometer bersih, kering, dan yang telah dilakukan kalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air pada suhu 25°C . Bobot jenis ekstrak kayu secang ditentukan terhadap hasil yang diperoleh dengan membagi bobot piknometer yang berisikan ekstrak dengan bobot piknometer yang berisikan air (Muhammad 2014; Yulianti 2013).

6. Penapisan fitokimia

6.1 Saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 20 ml aquadetstilata, kemudian larutan dikocok dalam gelas ukur selama 15 menit

terbentuknya lapisan busa yang stabil setinggi 1 cm mengindikasikan adanya senyawa saponin (Tiwari *et al.* 2011).

6.2 Flavonoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 100 ml aquadestilata, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Diambil 5 ml, kemudian ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat dan 5 ml amil alkohol. Kemudian dikocok dan dibiarkan memisah. Bila terbentuk warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Djamil & Wijastuti 2015).

6.3 Tanin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 100 ml aquadestilata, dididihkan selama 15 menit, kemudian didinginkan dan disaring dengan menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh diambil 30 ml, ditambahkan beberapa tetes besi (III) klorida 1 % terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitam-hitaman menunjukkan adanya senyawa tanin (Djamil & Wijastuti 2015).

6.4 Alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dengan etanol. Larutan uji dibagi menjadi 2 tabung dengan tabung pertama diberi reagen *dragendorff* untuk tabung 2 diberi pereaksi *mayer*, hasil positif diperoleh bila terdapat endapan putih kekuningan untuk pereaksi *mayer* dan terbentuk kekeruhan atau endapan coklat pada pereaksi *dragendorff* (Harborne 1987).

7. Uji bebas etanol ekstrak kayu secang

Ekstrak yang telah pekat diuji sudah bebas etanol atau belum dengan cara uji esterifikasi yaitu dengan mengambil sejumlah ekstrak kemudian ditambah asam asetat 1 ml dan asam sulfat pekat 1 ml kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Depskes RI 1995).

8. Formula lip cream

Lip cream dibuat sebanyak 4 formula dengan berbagai konsentrasi pewarna dari ekstrak kayu secang yaitu 0%, 4%, 6%, dan 8% pemilihan konsentrasi ekstrak dari penelitian sebelumnya Dammayyanti (2014) yang menggunakan ekstrak kayu secang sebagai pewarna pada *lipstick*, namun dalam penelitian ini menggunakan kontrol negative sebagai pembanding apakah formula

yang dapat menghasilkan warna. Masing-masing formula dibuat sebanyak 100 gram. Formula *lip cream* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Formula sediaan *lip cream*

Bahan	Formula (%)				Fungsi
	1	2	3	4	
Ekstrak kayu secang	0	4	6	8	Pewarna
<i>Carnauba wax</i>	6	6	6	6	<i>Thickener agent</i>
Setil alkohol	5	5	5	5	Surfaktan
<i>Dimethicone</i>	5	5	5	5	<i>Emollient</i>
Titanium dioksida	1	1	1	1	Pigmen
BHT	0,1	0,1	0,1	0,1	Antioksidan
Parfum	0,04	0,04	0,04	0,04	Pewangi
Nipagin	0,18	0,18	0,18	0,18	Pengawet
Nipasol	0,02	0,02	0,02	0,02	Pengawet
TEA	8	8	8	8	<i>Emulsifying agent</i>
Minyak zaitun	30	30	30	30	<i>Emollient</i>
Aquadestilata add	100	100	100	100	Pelarut

Keterangan :

Formula 1 : *lip cream* tanpa ekstrak kayu secang

Formula 2 : *lip cream* mengandung ekstrak kayu secang 4%

Formula 3 : *lip cream* mengandung ekstrak kayu secang 6%

Formula 4 : *lip cream* mengandung ekstrak kayu secang 8%

9. Proses pembuatan *lip cream*

Menimbang bahan kemudian melebur fase minyak yang terdiri dari minyak zaitun, *carnauba wax*, setil alkohol, *dimethicone*, dan nipasol menjadi satu dalam cawan porselen pada suhu 70°C dilakukan pengadukan sampai homogen. Panaskan fase air yang terdiri dari campuran aquadestilata, titanium dioksida, trietanolamin (TEA), ekstrak kayu secang, serta nipagin, dilakukan pendinginan sampai suhu 40°C kemudian mencampur fase air ke dalam fase minyak pada mortir hangat sampai homogen, tambahkan *oleum rossae* dan butylated hydroxytoluen (BHT) aduk sampai tercampur dengan baik dan homogen, sediaan yang sudah jadi kemudian dituangkan ke dalam wadah *lip cream*, dan dilakukan uji terhadap mutu fisik serta stabilitas, keamanan, dan uji hedonik dari sediaan *lip cream*.

10. Evaluasi mutu fisik dan stabilitas *lip cream*

Evaluasi mutu fisik dilakukan terhadap masing-masing formula *lip cream* dari setiap formula sesaat setelah formula dibuat dan evaluasi mutu fisik terhadap masing-masing formula *lip cream* sesudah dilakukan uji stabilitas. Uji stabilitas

dengan menggunakan metode *cycling test* yaitu menyimpan sampel pada suhu 40°C selama 24 jam lalu dipindahkan ke dalam oven yang bersuhu 40°C selama 24 jam. Perlakuan ini adalah 1 siklus. Perlakuan diulangi sebanyak 6 siklus dan dilakukan pengamatan dengan parameter uji organoleptis, uji homogenitas, uji pH, uji daya sebar, uji daya lekat, dan uji viskositas (Mardikasari *et al.* 2017).

10.1 Uji organoleptis. Pengamatan dilakukan terhadap bentuk, bau, dan warna yang terbentuk dari masing-masing sediaan (Anvisa 2005).

10.2 Uji homogenitas. Pengujian dilakukan dengan cara mengoleskan sejumlah tertentu sediaan pada kaca yang transparan. Sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butir-butir kasar (Anvisa 2005).

10.3 Uji pH. Sebanyak 1 gram sediaan diencerkan dengan aquadestilata hingga 10 ml, pengujian dilakukan dengan menggunakan alat pH meter. Alat terlebih dahulu dikalibrasi dengan menggunakan larutan dapar standar netral (pH 7,01) dan larutan dapar pH asam (pH 4,01), kemudian dilakukan pengukuran terhadap nilai pH sediaan (Panjaitan 2012).

10.4 Pemeriksaan viskositas. Penentuan viskositas bertujuan untuk mengetahui adanya perubahan kekentalan pada tiap formula krim. Penentuan viskositas dilakukan menggunakan viskometer Rion VT-03F/04F.

10.5 Uji daya sebar. Pengujian dilakukan dengan cara menimbang sediaan sebanyak $\pm 0,5$ gram dan diletakkan di tengah kaca bundar. Kemudian diatas sediaan diletakkan kaca yang sebelumnya sudah ditimbang dan dibiarkan selama 1 menit. Diameter sediaan kemudian diukur dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi. Kemudian ditambahkan 50 gram, 100 gram, dan 150 gram sebagai beban tambahan. Setiap penambahan beban dидiamkan selama 1 menit dan dicatat diameter krim seperti sebelumnya (Ansel 1989).

10.6 Uji daya lekat. Pengujian dilakukan dengan cara sebanyak 0,25 gram sediaan diletakkan di titik tengah luasan gelas objek yang telah ditandai dan ditutup dengan gelas objek lain. Diberi beban 1 kg selama 5 menit lalu kedua gelas objek yang telah saling melekat 1 sama lain dipasang pada alat uji yang diberi beban 80 gram. Setelah itu dicatat waktu yang diperlukan hingga terpisahnya 2 gelas objek tersebut (Martin *et al.* 1983).

11. Evaluasi keamanan (uji iritasi). Uji iritasi dilakukan secara tertutup terhadap 10 orang sukarelawan yang terpilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi merupakan dewasa yang berumur 20 – 40 tahun, tidak merokok dan tidak menderita penyakit kronis, sedangkan kriteria eksklusi merupakan relawan yang tidak memiliki luka, jerawat dan penyakit kulit lain, bukan merupakan wanita hamil, menyusui dan menopause.

Bahan penutup terdiri dari kertas saring berbentuk bulat dengan diameter 2,5 cm, aluminium foil dan plaster. Bahan uji terdiri dari keempat formula *lip cream* kemudian sediaan diambil 0,2 mL dengan *cutton bud* dan di letakkan pada bahan penutup. Bahan uji ditempelkan pada lengan kanan bagian atas dari 10 sukarelawan selama 24 jam. Kulit tempat aplikasi diamati pada 0, 24, dan 48 jam. Penilaian derajat iritasi dengan cara memberi skor 0 sampai 4 tergantung tingkat keparahan reaksi eritema dan edema pada kulit yang terlihat. Tanpa eritema: 0, sangat sedikit eritema (diameter < 25 mm): 1, eritema jelas terlihat (diameter 25,1-30 mm): 2, eritema sedang (diameter 30,1-35 mm): 3, eritema berat (gelap merah dengan membentuk eskar, Diameter > 35 mm): 4. Tanpa edema: 0, sangat sedikit edema (hampir tidak terlihat): 1, edema tepi berbatas jelas (ketebalan < 1 mm): 2, edema sedang (tepi naik ± 1 mm): 3, edema berat (tepi naik lebih dari 1 mm dan meluas keluar daerah pejanan): 4. Selama penilaian sukarelawan diperbolehkan membasuh kulit tempat aplikasi dengan menggunakan air tanpa sabun, deterjen atau produk kosmetik. Hasil dari masing-masing sediaan uji kemudian dilakukan analisa dengan menghitung indeks iritasi menggunakan rumus sebagai berikut:

Indeks Iritasi =

$$\frac{(\text{skor eritema } 0 + 24 + 48 \text{ jam}) + (\text{skor edema } 0 + 24 + 48 \text{ jam})}{\text{jumlah sukarelawan}}$$

Indeks iritasi yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan skor derajat iritasi untuk mengetahui keparahan reaksi iritasi, tidak mengiritasi: 0,0, sangat sedikit iritasi: 0,1-0,4, sedikit iritasi: 0,41-1,9, iritasi sedang: 2,0-4,9, iritasi parah: 5,0-8,0 (Sukandar 2006; Ali *et al.* 2013; Laras *et al.* 2014; Pansang *et al.* 2010).

12. Uji Hedonik

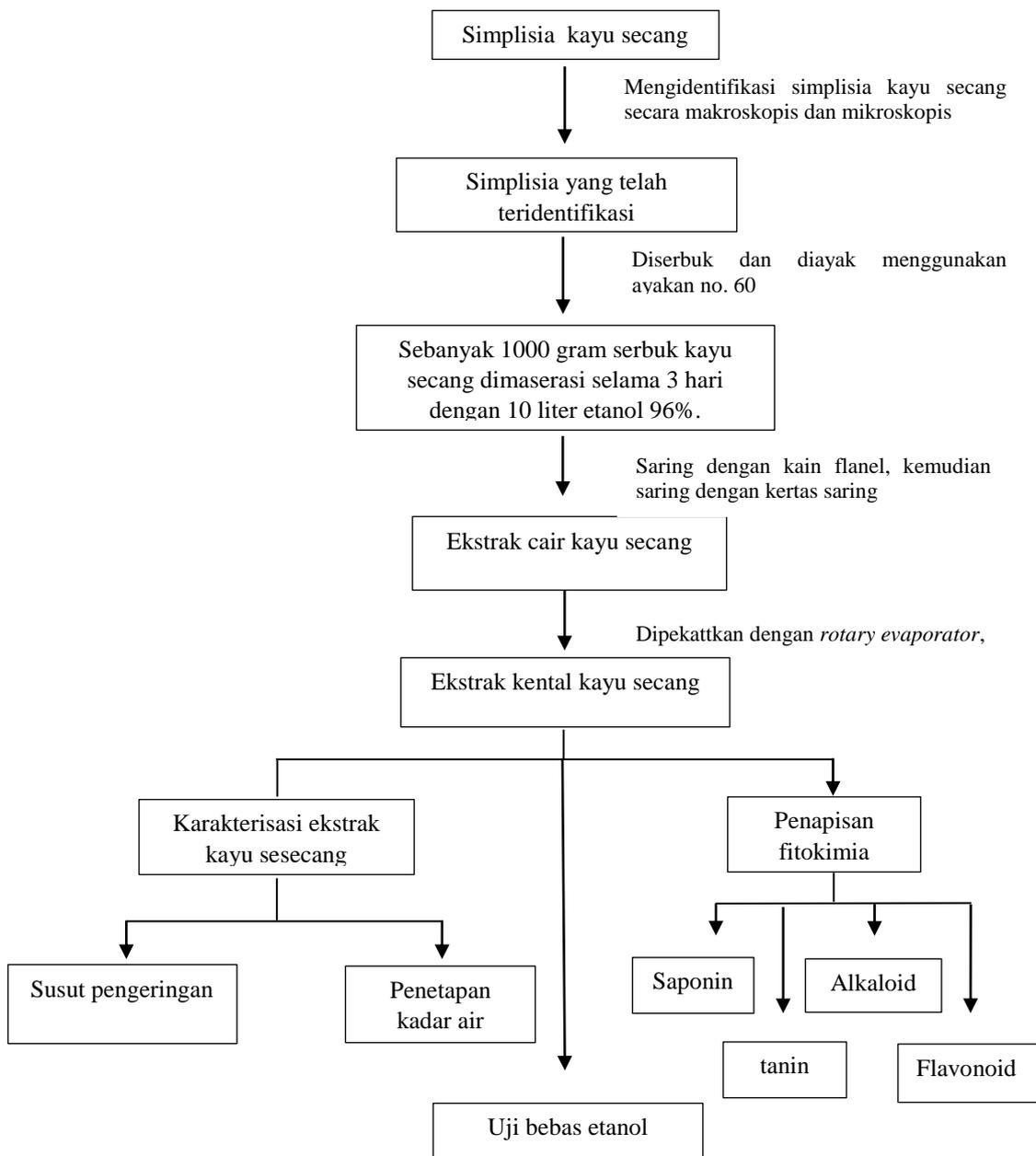
Uji hedonik atau uji kesukaan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui formula mana yang disukai oleh responden. Uji hedonik dilakukan secara visual terhadap 10 orang panelis. Setiap panelis diminta untuk mengoleskan *lip cream* yang dibuat dengan berbagai konsentrasi pewarna dari ekstrak kayu secang. Masing-masing formula dioleskan pada kulit punggung tangan para panelis. Panelis kemudian diminta untuk menilai dan mengisi kuisioner dengan (1) bila tidak suka (2) bila sedikit suka, (3) bila suka, dan (4) bila sangat suka. Kemudian dihitung persentase kesukaan terhadap masing-masing sediaan dan dianalisis secara statistik untuk penarikan kesimpulan (Amalia *et al.*2017).

E. Analisis data

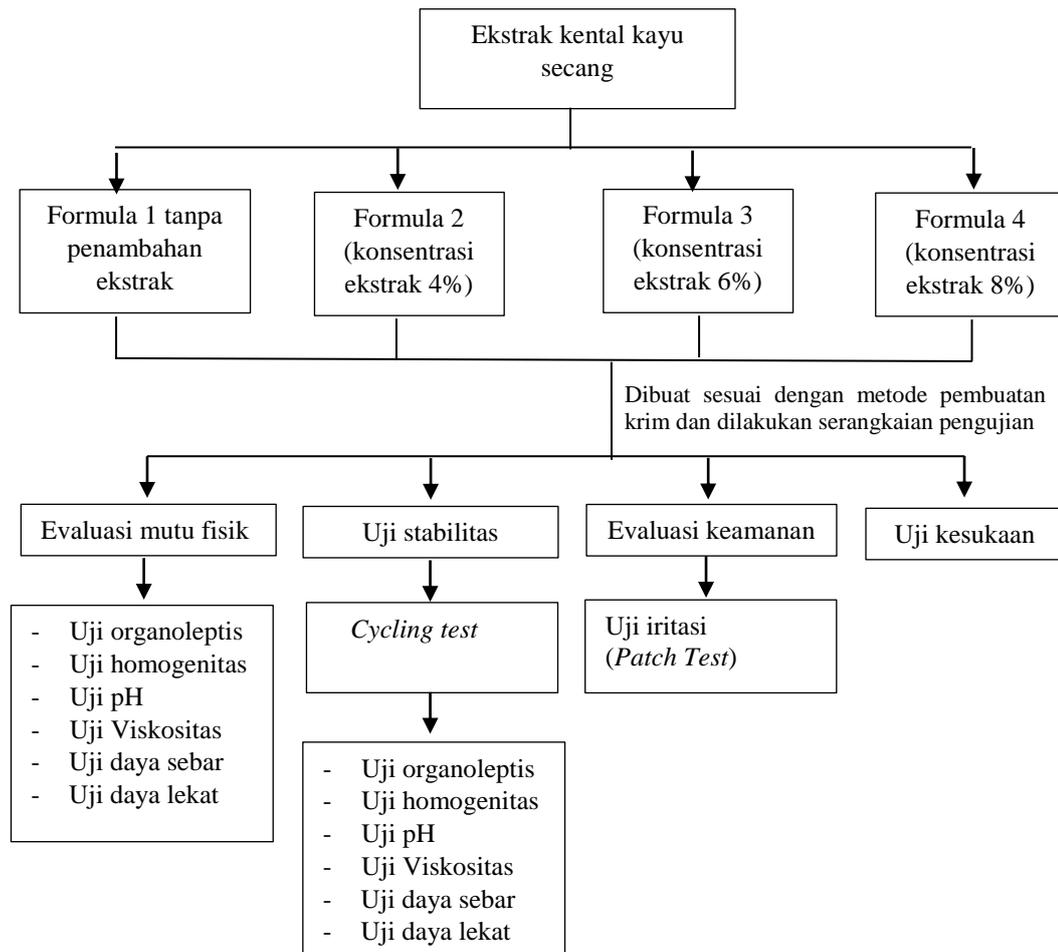
Analisis data dilakukan terhadap hasil evaluasi mutu fisik *lip cream* sebelum dan sesudah dilakukan uji stabilitas serta analisis data dari uji hedonik (kesukaan). Data yang diperoleh dari evaluasi mutu fisik *lip cream* (uji pH, viskositas, uji daya sebar, dan uji daya lekat) kemudian dianalisa dengan menggunakan metode *Kolmogorv-Smimov*, jika hasil yang diperoleh terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan *Paired-samples T Test* untuk melihat apakah ada pengaruh dari perlakuan (uji stabilitas) atau tidak. Untuk analisis data terhadap uji hedonik atau kesukaan menggunakan metode data mean (rata-rata) dan menggunakan *one-way anava* untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan atau tidak antara rata-rata dari setiap formula sediaan *lip cream* dengan parameter tekstur dan warna.

F. Skema Penelitian

Proses pembuatan ekstrak kayu secang beserta penapisan fitokimia dapat dilihat pada gambar 2, dan untuk pembuatan *lip cream* beserta uji mutu fisiknya dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak kayu secang



Gambar 3. Skema pembuatan lip cream

