

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan obyek penelitian atau objek yang diteliti (Notoatmodjo 2002). Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan *lotion*.

Sampel adalah bagian kecil dari populasi yang dianggap mewakili seluruh populasi dalam penelitian (Notoatmodjo 2002). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *lotion* ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura L.*).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi terdahulu dapat dikelompokkan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel terikat.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perbedaan konsentrasi ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dalam sediaan *lotion*.

Variabel terikat adalah variabel yang faktornya diamati dan diukur untuk menentukan pengaruh yang disebabkan oleh variabel bebas dimana variabel terikat dari penelitian ini adalah stabilitas mutu fisik dan daya aktivitas antioksidan dari *lotion* ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*).

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasi agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah cara pembuatan *lotion*, kondisi penelitian, dan kondisi laboratorium penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah daun yang diperoleh dari Desa Welar, Kecamatan Ngemplak, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah pada Januari 2019.

Kedua, serbuk daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah serbuk dari daun kersen yang sudah dibersihkan, dicuci bersih dan dikeringkan lalu digiling dengan mesin penggiling menjadi serbuk, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) diperoleh dari bagian daun tanaman yang diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% yang kemudian dipekatkan pada *vacuum rotary evaporator* dengan suhu sampai didapatkan ekstrak kental daun kersen (*Muntingia calabura* L.).

Keempat, pengujian antioksidan *lotion* ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dan pengujian mutu fisik pada formula *lotion* yang telah dibuat.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik, oven, spektrofotometer UV-Vis, labu ukur, *rotary evaporator*, alat maserasi, viskometer, pH meter, Erlenmeyer, gelas ukur, *Beaker glass*, mortir, stamper, *moisture balance*, pipet tetes, batang pengaduk, sendok tanduk, cawan porselin dan alat-alat lain yang menunjang penelitian ini.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun kersen (*Muntingia calabura* L.), vitamin C, etanol 70%, basis *lotion* yang digunakan meliputi asam stearat, gliserin, parafin cair, setil alkohol, nipagin, nipasol, aquadest, *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH).

D. Jalannya penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dan deskripsi tanaman dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran sampel tanaman kersen (*Muntingia calabura* L.) yang akan digunakan untuk penelitian ini. Berdasarkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) merupakan daun dari tanaman kersen diperoleh dari Desa Welar, Kecamatan Ngemplak, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah pada Januari 2019.

Pengambilan daun dilakukan pada daun yang masih segar. Daun dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor dan kontaminan yang tidak diinginkan. Lalu kemudian ditiriskan dan kemudian dikeringkan.

3. Pengerinan bahan

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang telah dicuci kemudian dikeringkan di oven pada suhu 50°C. Proses pengerinan bertujuan untuk mengurangi kadar air agar tidak mudah ditumbuhi oleh kapang atau bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang dapat menguraikan zat aktif dan memudahkan proses penggilingan maupun penyimpanan. Daun kersen yang telah kering kemudian dibuat serbuk yang diayak dengan ayakan nomor 40, serbuk yang didapatkan digunakan untuk proses ekstraksi (Anggraeni 2017).

4. Pemeriksaan kelembaban

Penetapan susut pengerinan serbuk daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dilakukan dengan cara menimbang 2 gram serbuk simplisia daun kersen (*Muntingia calabura* L.) lalu hitung susut pengerinan pada alat *moisture balance* MB 23. Setelah itu akan muncul nilai kelembaban dalam persen pada alat (Anggraeni 2017).

5. Pembuatan ekstrak etanol daun kersen

Pembuatan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dilakukan dengan metode ekstraksi yaitu maserasi. Pelarut yang digunakan dalam proses penyarian

adalah etanol 70%. Serbuk 300 gram direndam dengan etanol 70% sebanyak 3000 ml dalam wadah yang tertutup kedap dan disimpan dalam suhu kamar. Disimpan dalam kurun waktu 5 hari sambil sesekali wadah digojok sehingga pelarut dapat melarutkan zat aktif secara optimal. Kemudian disaring ekstrak dan dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator*, kemudian pelarut diuapkan dengan oven pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak yang kental (Anggraeni 2017).

6. Pemeriksaan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*)

6.1. Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis merupakan pemeriksaan fisik ekstrak dengan menggunakan indra. Pemeriksaan ini meliputi bentuk, warna, bau dan rasa.

6.2. Penetapan kandungan lembab ekstrak daun kersen. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dilakukan dengan cara ditimbang 2 gram ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*) lalu hitung susut pengeringan pada alat *moisture balance* MB 23. Setelah itu akan muncul nilai kelembaban dalam persen pada alat (Anggraeni 2017).

6.3. Identifikasi flavonoid dengan metode KLT. Ekstrak etanol 70 % dan perbandingan (kuersetin) yang telah dilarutkan dengan etanol 70%, ditotolkan bersama-sama pada lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel dan fase gerak n-butanol : asam asetat : air (4:1:5). Bercak kromatografi (noda) yang dihasilkan diamati dengan penampak noda sinar ultraviolet 254 nm dan 366 nm, sebelum dan sesudah disemprot pereaksi sitroborat. Hasil positif mengandung flavonoid jika menunjukkan warna bercak kuning pada latar belakang putih (Depkes RI 1989).

6.4. Identifikasi flavonoid dengan metode uji tabung. Sebanyak 5 ml ekstrak ditambahkan dengan 2 ml air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 ml ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Depkes RI 1989).

6.5. Identifikasi fenolik dengan metode uji tabung. Sebanyak 5 ml ekstrak ditambahkan 10 tetes FeCl₃ 1 %. Uji positif ekstrak mengandung fenol terbentuk menghasilkan warna hitam pekat (Depkes RI 1989).

6.6. Identifikasi saponin dengan metode uji tabung. Dipipet sebanyak 5 ml ekstrak lalu ditambahkan 2 tetes HCl 2 N. Terbentuk busa dan tetap stabil sampai kurang lebih 7 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin (Depkes RI 1989).

7. Rancangan formulasi *lotion* ekstrak daun kersen

Tabel 2 Rancangan formula *lotion* ekstrak daun kersen

Bahan	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5
Ekstrak daun kersen	-	10%	15%	20%	-
Kuersetin	-	-	-	-	3%
Asam Stearat	2%	2%	2%	2%	2%
Paraffin Liq	3%	3%	3%	3%	3%
Gliserin	10%	10%	10%	10%	10%
Setil Alkohol	3%	3%	3%	3%	3%
Nipagin	0,18%	0,18%	0,18%	0,18%	0,18%
Nipasol	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%
TEA	2%	2%	2%	2%	2%
Aquadest	<i>ad</i> 100%				

Keterangan

- F 1 : Kontrol negatif (*lotion* tanpa zat aktif)
 F 2 : Variasi konsentrasi ekstrak etanol daun kersen 10%
 F 3 : Variasi konsentrasi ekstrak etanol daun kersen 15%
 F 4 : Variasi konsentrasi ekstrak etanol daun kersen 20%
 F 5 : Kontrol positif (dengan penambahan kuersetin 3%)

7.1. Pembuatan *lotion* ekstrak etanol daun kersen. Alat dan bahan disiapkan. Masing-masing bahan ditimbang sesuai dengan perhitungan. Fase minyak dibuat dengan melebur berturut-turut asam stearat, setil alkohol, parafin liquid di atas penangas air, kemudian ditambahkan propil paraben. Kemudian fase air dibuat dengan cara melarutkan metil paraben dalam air kemudian ditambahkan gliserin dan TEA kemudian dipanaskan hingga 70°C di atas penangas air. Emulsi dibuat dengan cara menambahkan fase minyak ke dalam fase air sambil diaduk dalam mortir panas hingga terbentuk emulsi yang stabil. Kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit zat aktif (ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.)/ kuersetin) dan tambah sedikit demi sedikit parfume secukupnya, gerus dalam mortir hingga terbentuk emulsi yang homogen. *Lotion* dimasukkan dalam wadah tertutup rapat dan diberi etiket (Daud NS 2016).

8. Pengujian fisik *lotion* dari ekstrak etanol daun kersen

8.1. Pengujian organoleptis. Pengujian organoleptis merupakan pengamatan secara visual. Pengamatan organoleptis meliputi pemeriksaan terhadap warna dan bau. Sediaan yang dihasilkan biasanya memiliki warna yang menarik, bau yang menyenangkan dan kekentalan yang cukup agar nyaman digunakan (Voigt 1994).

8.2. Uji homogenitas. Pengujian homogenitas terhadap *lotion* ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dilakukan dengan mengambil sedikit sampel sediaan formula *lotion*, kemudian diletakkan sedikit *lotion* di antara kedua kaca objek. *Lotion* dikatakan homogen apabila seluruh permukaannya merata (Depkes RI 1979).

8.3. Uji viskositas. Uji viskositas *lotion* dilakukan dengan menggunakan alat viskometer Cup and Bob. Rotor dipasang pada viskotester dengan menguncinya berlawanan arah jarum jam, lalu masukkan sampel ke dalam mangkuk, kemudian alat dihidupkan. Selanjutnya catat kekentalan sampel setelah jarum pada viskositas stabil. Pengujian viskositas ini diulangi sebanyak tiga kali untuk tiap formula. Pengujian pertama untuk viskositas dilakukan pada hari sediaan *lotion* dibuat. Sediaan *lotion* kemudian disimpan selama tiga minggu dan diuji lagi viskositasnya (Voigt 1994). Syarat nilai viskositas menurut SNI 16-4399-1996 yaitu 200-500 poise.

8.4. Uji daya sebar. Uji ini dilakukan dengan menggunakan alat-alat seperti sepasang lempeng kaca bundar (*extensometer*) dan anak timbang gram. Sediaan ditimbang 0,5 gram diletakkan di tengah kaca bundar, di atas kaca diberi anak timbang sebagai beban dan dibiarkan 1 menit. Diameter *lotion* yang menyebar (dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi) diukur kemudian ditambahkan 50 gram, 100 gram, 150 gram, 200 gram sebagai beban tambahan, setiap penambahan beban didiamkan setelah 1 menit dan dicatat diameter *lotion* yang menyebar seperti sebelumnya. Diulangi cara di atas pada setiap formula masing-masing 3 kali. Pengujian pertama dilakukan pada hari sediaan *lotion* dibuat. Sediaan *lotion* kemudian disimpan selama tiga minggu dan diuji lagi daya sebar (Voigt 1994)..

8.5. Uji daya lekat. Uji ini dilakukan dengan alat tes daya melekat *lotion*. Dua objek glass, stopwatch, anak timbangan gram dan dilakukan dengan cara melekatkan *lotion* secukupnya di atas objek glass yang lain di atas *lotion* tersebut kemudian ditekan dengan beban 0,5 kg selama 5 menit kemudian pasang objek glass pada alat tes setelah itu lepaskan beban seberat 20 gram dan dicatat waktunya hingga kedua objek tersebut terlepas. Diulangi cara di atas pada setiap formula masing-masing 3 kali. Pengujian pertama dilakukan pada hari sediaan *lotion* dibuat. Sediaan *lotion* kemudian disimpan selama tiga minggu dan diuji lagi daya lekatnya (Anggraeni 2017).

8.6. Uji tipe emulsi M/A. Pengujian tipe emulsi dilakukan dengan 3 metode yaitu metode pengenceran, metode pewarnaan dan metode konduktivitas listrik. Berdasarkan metode pengenceran fase, *lotion* dapat diencerkan dengan fase eksternalnya. Dengan prinsip tersebut krim tipe M/A dapat diencerkan dengan air dan tipe A/M dapat diencerkan dengan minyak. Berdasarkan metode pewarnaan *lotion* diberi pewarnaan menggunakan *methylene blue* kemudian dibaca dibawah mikroskop untuk melihat tipe *lotion* M/A atau A/M. Berdasarkan metode konduktivitas listrik, *lotion* diberikan aliran listrik untuk melihat tipe *lotion* M/A atau A/M (Lachman 1994).

8.7. pH *lotion*. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter yang dikalibrasi menggunakan dapar pH 7 dan pH 4. Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam *lotion*, kemudian catat nilai pH yang ditunjukkan oleh pH meter (Anggraeni 2017). Berdasarkan SNI 16-4399-1996 bahwa nilai pH produk pelembab kulit disyaratkan berkisar antara 4,5-8,0.

8.8. Uji stabilitas *lotion* dengan metode *cycling test*. Uji stabilitas fisik *lotion* dilakukan sebelum dan setelah penyimpanan dipercepat. Metode *cycling test* dilakukan satu siklus pada saat sediaan *lotion* disimpan pada suhu 4° C selama 24 jam lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu 40-42° C selama 24 jam. Percobaan ini diulang sebanyak 6 siklus. Kondisi fisik *lotion* dibandingkan selama percobaan dengan sediaan sebelumnya (Banker 1997).

9. Pengujian aktivitas antioksidan

9.1. Pembuatan larutan stok DPPH. Ditimbang seksama 15,8 mg serbuk DPPH, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda dalam labu takar 100,0 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM, yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol. Labu takar dilapisi aluminium foil.

9.2. Pembuatan larutan stok ekstrak daun kersen. Ekstrak kental ditimbang dengan seksama sebanyak 20 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas dalam labu takar 100,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi 200 ppm. Larutan ekstrak kental konsentrasi 200 ppm kemudian dibuat 5 seri pengenceran yaitu 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, dan 6,25 ppm.

9.3. Pembuatan larutan stok kuersetin. kuersetin ditimbang 5 mg, dimasukkan labu takar 100,0 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas sehingga didapat konsentrasi 50 ppm, selanjutnya disebut sebagai larutan induk. Larutan induk dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3,125 ppm, 1,5625 ppm.

9.4. Pembuatan larutan stok *lotion* ekstrak. Ditimbang seksama 100 mg sediaan *lotion*, kemudian dilarutkan dengan etanol pa sampai tanda batas dalam labu takar 100,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan *lotion* konsentrasi 1000 ppm dibuat seri pengenceran 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm.

9.5. Pembuatan larutan stok *lotion* kuersetin. *Lotion* kuersetin ditimbang 100 mg dan larutkan dengan etanol pa sampai tanda batas labu takar 100,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan *lotion* konsentrasi 1000 ppm dibuat seri pengenceran 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm.

9.6. Penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan stok DPPH 0,4 mM diambil sebanyak 1,0 ml dimasukkan ke dalam labu takar 5,0 ml kemudian tambahkan etanol pa sampai tanda batas dan kocok campuran sampai homogen. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang dimana larutan uji memiliki absorbansi yang maksimum (Molyneux 2003).

9.7. Penentuan *operating time*. Larutan stok DPPH 0,4 mM diambil sebanyak 1,0 ml dimasukkan ke dalam labu takar 5,0 ml kemudian ditambahkan etanol pa sampai tanda batas. Penentuan *operating time* dilakukan pada panjang gelombang maksimal DPPH yang telah diperoleh sebelumnya. Interval waktu penentuan *operating time* yaitu dari menit ke 0 sampai didapatkan absorbansi yang stabil, dan tidak terlihat adanya penurunan absorbansi.

9.8. Uji aktivitas penangkap radikal bebas. Larutan stok sampel yang telah dibuat menjadi 5 seri pengenceran masing-masing diambil 4,0 mL, kemudian ditambahkan 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM. Campuran diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh sebelumnya dan dibaca pada absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH. Absorbansi blanko dapat diperoleh dengan mengukur absorbansi campuran 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM dan 4,0 mL etanol pa pada panjang gelombang maksimum DPPH. Pengujian pertama dilakukan di hari pertama *lotion* dibuat, dan diuji kembali pada minggu ketiga setelah pembuatan (Sharon *et al.* 2013).

10. Teknik analisa

Lotion dari masing-masing formula yang didapat kemudian diuji sifat fisiknya meliputi keadaan organoleptis, pH, homogenitas, viskositas, daya sebar *lotion*, daya lekat *lotion* dan tipe emulsi *lotion*. Analisis hasil pengujian berbagai parameter dilakukan dengan pendekatan statistik yaitu program SPSS. Data uji yang diperoleh dianalisis menggunakan kolmogorov-Smirnov, jika data tersebut termasuk ke dalam distribusi normal maka dilanjutkan dengan analisis two way annova pada taraf kepercayaan 95%. Data uji yang terdistribusi tidak normal, dianalisis menggunakan Kruskal-Walls kemudian dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Pada setiap percobaan diuji statistiknya dan dicari beda signifikan antara hari ke-1 dan hari ke-21 (Anggraeni 2017).

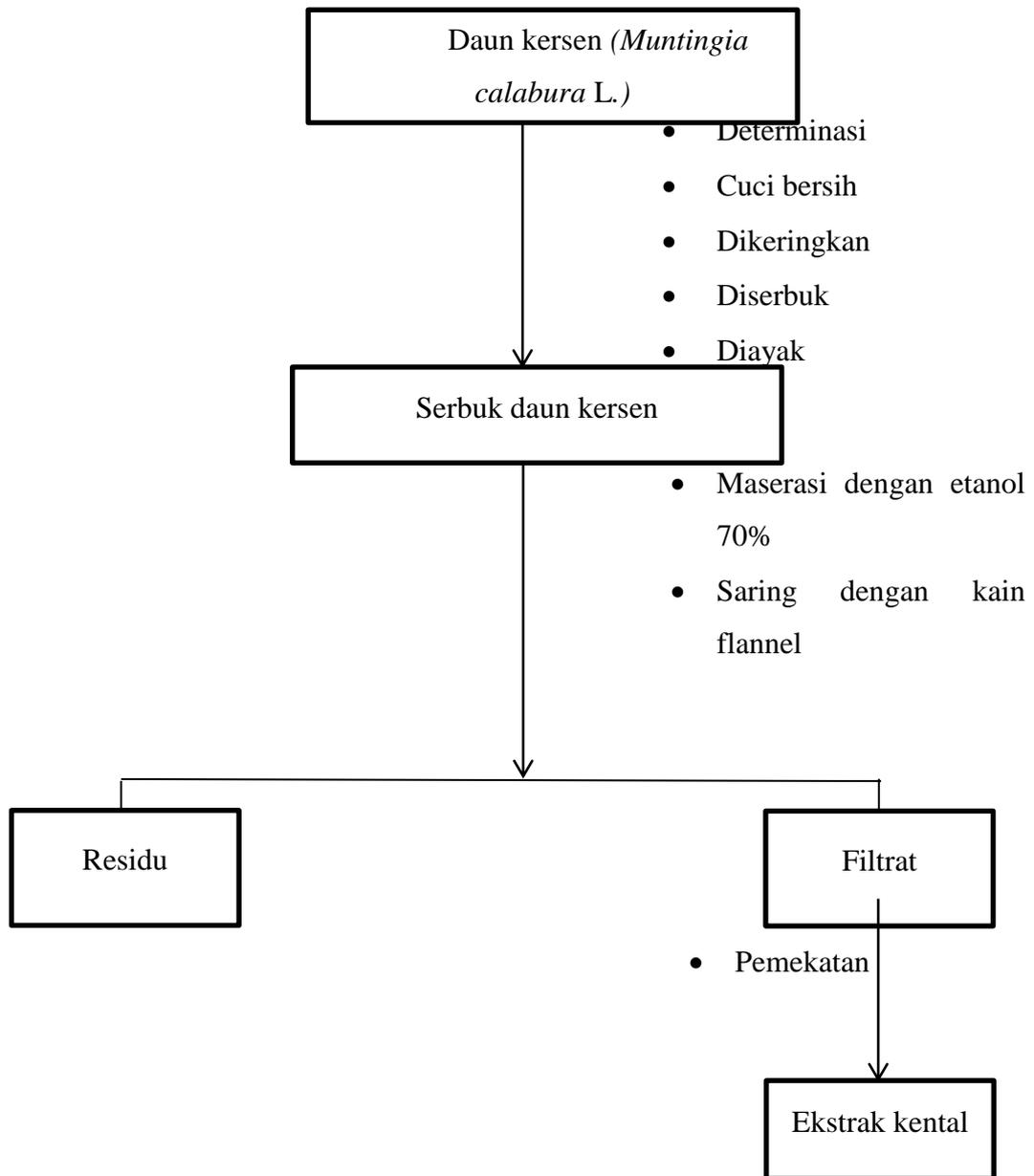
11. Penentuan IC50

Data aktivitas antioksidan radikal DPPH (%) ekstrak maupun *lotion* ekstrak daun kersen dihitung dengan metode probit dari persamaan regresi linier dan ditentukan IC50 nya. Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dihitung dengan rumus sebagai berikut :

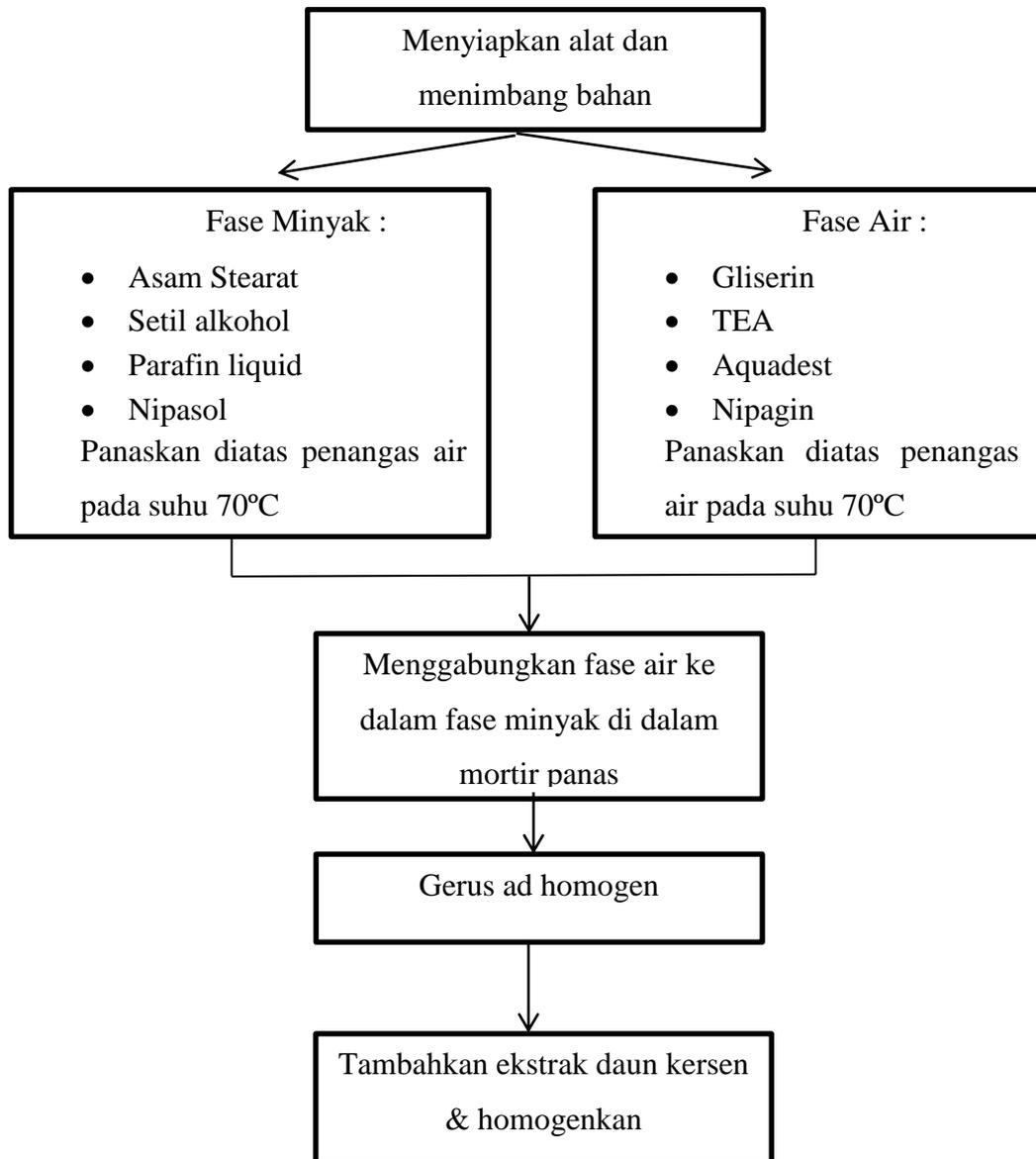
$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs.kontrol} - \text{Abs.sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Abs kontrol : Absorbansi pada DPPH tanpa sampel

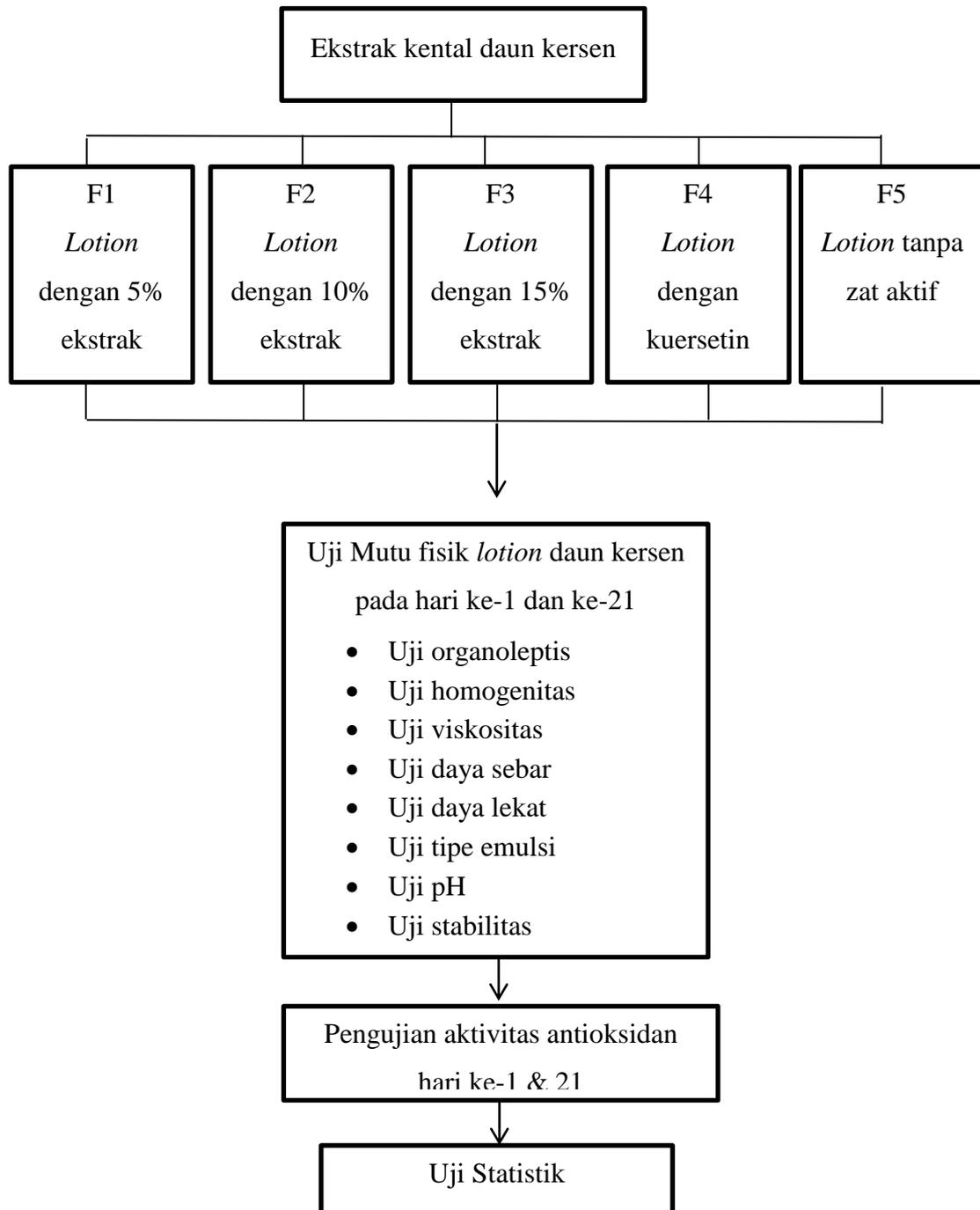
Abs sampel : Absorbansi pada DPPH setelah ditambah sampel

E. E. Skema kegiatan penelitian

Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.)



Gambar 3 Skema Pembuatan Lotion Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*)



Gambar 4 Skema Pengujian Mutu Fisik Ekstrak *Lotion*