

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menerapkan desain eksperimental dengan melakukan formulasi sediaan *lip balm* dan mengevaluasi efektivitas tabir surya *lip balm*. Parameter yang diukur dalam penelitian ini yaitu nilai tabir surya dan sifat fisik dari *lip balm* yang dibuat.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Prodi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan April sampai Juni 2025.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : Ekstrak daun kersen
2. Variabel Terikat : Nilai aktivitas tabir surya dan sifat fisik *lip balm* (SPF, %Te, %Tp).
3. Variabel Terkendali : Suhu pengeringan simplisia pada suhu 40 °C, waktu maserasi, waktu pengadukan maserasi, volume pelarut maserasi, suhu pemanasan ekstrak yaitu tidak lebih dari 50°C, dan suhu pemanasan basis pada suhu tidak lebih dari 65°C.

D. Definsi Operasional

1. Ekstrak daun kersen adalah hasil maserasi dari daun kersen (*Muntingia calabura* L.) menggunakan pelarut etanol 70%.
2. *Lip balm* yang mengandung ekstrak daun kersen adalah sediaan yang menggunakan ekstrak daun kersen sebagai bahan aktif.
3. Pengukuran aktivitas tabir surya *lip balm* secara in vitro dilakukan terhadap nilai SPF, %Te, dan %Tp.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Grinder (fomac FGD-Z500), hotplate, kompor listrik (Maspion S-301), mikropipet (*Eppendorf*), oven, timbangan analitik (Ohaus PX224/E), sonikator (GT-Sonic), Spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS), *moisture balance* (Ohaus MB90), ayakan 40 mesh, wajan, bejana, tabung reaksi, sendok tanduk, batang pengaduk, dan alat-alat gelas (iwaki).

2. Bahan

Daun kersen, etanol 70% (teknis), cera alba (farmasetis), gliserin (farmasetis), lanolin (farmasetis), paraffin cair (farmasetis), setil alkohol (farmasetis), pereaksi dragendroft (reagen), pereaksi mayer (reagen), pereaksi wagner (reagen), serbuk magnesium (p.a), etanol (p.a), HCl pekat (p.a), FeCl₃ (p.a), dan asam asetat anhidrat (p.a), asam sulfat pekat (p.a), kertas saring, kertas pH indikator, alumunium foil, dan blue tip.

F. Pelaksanaan Penelitian

1. Pemanenan dan Sortasi Sampel

Daun kersen diambil dari area persawahan di Ambarketawang, Kecamatan Gamping, Kabupaten Sleman Daerah Istimewa Yogyakarta. Daun yang dipetik harus yang segar, datar, dengan tepi bergerigi, dan terletak pada urutan 3, 4, dan 5 dari pucuk. Setelah dipetik, daun dibersihkan dari kotoran dengan air mengalir. Kemudian, daun dikering anginkan. Setelah itu daun dikeringkan dengan oven suhu 40°C selama 2 hari. Setelah kering, simplisia digrinder hingga halus dan diayak dengan ayakan 40 mesh agar menjadi serbuk simplisia yang seragam (Sulaiman *et al.*, 2017).

2. Determinasi Daun Kersen

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta, untuk mengidentifikasi keaslian sampel daun kersen yang digunakan dalam penelitian.

3. Ekstraksi Daun Kersen

Ekstraksi mengacu pada penelitian Sulaiman *et al* (2017) dengan beberapa penyesuaian pada jumlah simplisia dan pelarut yang digunakan. Serbuk simplisia daun kersen (500 g) dimaserasi dengan 5 L etanol 70% selama 3 hari (3x24 jam) di suhu ruang dan terhindar dari sinar matahari langsung dengan pengadukan selama 15 menit setiap 24 jam sekali. Setelah proses maserasi, penyaringan dilakukan untuk memisahkan fitrat dan residu. Residu kemudian diremaserasi selama 2 hari menggunakan 2,5 liter etanol 70%. Setelah itu, filtrat dari kedua proses digabungkan dalam satu wadah dan diuapkan menggunakan kompor listrik pada suhu 40°C. Perhitungan rendemen ekstrak mengacu pada persamaan berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang dihasilkan}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

Perhitungan rendemen sampel penting untuk menentukan jumlah ekstrak yang diperoleh selama proses ekstraksi. Nilai rendemen yang baik jika perhitungan nilai rendemen melebihi 10% (Saerang *et al.*, 2023).

4. Karakterisasi ekstrak kental daun kersen

a. Kadar air

Ekstrak kersen (1 gram) dimasukkan ke dalam *moisture balance* dan diatur suhu alat pada suhu 105°C. Persentase kadar air yang terukur dicatat.

b. Skrining fitokimia

Uji fitokimia terhadap ekstrak dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa aktif yang terkandung dalam daun kersen.

1) Pembuatan larutan stok

Ekstrak kental daun kersen (1 gram) dilarutkan dalam 50 mL etanol 70%.

2) Alkaloid

Dimasukkan 1 mL larutan stok ke dalam tiga tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan 1 mL reagen Wagner, 1 mL reagen Dragendorff, dan 1 mL reagen Mayer. Ekstrak dianggap mengandung alkaloid jika terbentuk endapan coklat hingga hitam pada reagen Wagner, endapan coklat atau oranye pada reagen Dragendorff, dan endapan kuning pada reagen Mayer (Ayu *et al.*, 2024). Hasil positif untuk pengujian alkaloid ditunjukkan jika terjadi pembentukan endapan pada dua dari tiga reagen yang digunakan dalam tes tersebut (Prayoga *et al.*, 2019).

3) Flavonoid

Larutan stok (2 mL) dimasukkan dalam tabung reaksi. Selanjutnya, dilakukan uji dengan menambahkan serbuk magnesium (Mg) dan HCl p.a atau biasa disebut dengan pereaksi Shinoda. Adanya flavonoid ditandai dengan adanya endapan kuning jingga hingga merah (Ayu *et al.*, 2024).

4) Saponin

Larutan stok (1 ml) dimasukkan dalam tabung reaksi, digojok kuat hingga timbul busa 1-10 cm, dan tambah dengan HCl 1N 1 mL. Positif saponin jika busa yang terbentuk tidak hilang (Ayu *et al.*, 2024).

5) Fenol

Larutan stok (5 mL) ditambahkan 1 mL FeCl₃ 5% dalam tabung reaksi. Adanya fenol ditandai dengan perubahan warna biru atau hijau kehitaman (Ayu *et al.*, 2024).

6) Steroid

Sebanyak 2 mL larutan stok dimasukkan dalam tabung reaksi. Selanjutnya, larutan ditambahkan dengan 4 ml kloroform. Tambahkan dengan 2 tetes asam asetat anhidrat diikuti oleh 3 tetes asam sulfat pekat atau disebut dengan pereaksi Lieberman Buchardat. Positif adanya steroid ditunjukkan dengan munculnya warna biru atau hijau (Junito *et al.*, 2018).

5. Formulasi *lip balm* ekstrak daun kersen

Formula sediaan *lip balm* mengacu pada penelitian Oktaria (2020) dengan penyesuaian pada jumlah bahan yang digunakan dan konsentrasi zat aktif yang digunakan. Pada penelitian Widyawati *et al* (2019), ekstrak daun kersen yang digunakan yaitu 2% (2 gram/100 gram losio) mampu menghasilkan nilai SPF dengan kategori proteksi maksimal (10,3). Sehingga, untuk mendapatkan nilai SPF yang lebih optimal, ekstrak yang digunakan yaitu pada konsentrasi 6,67% (1 gram /15 gram *lip balm*). Formula dalam pembuatan *lip balm* dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Formula Sediaan Lip Balm Ekstrak Daun Kersen (Oktaria, 2020)

Bahan	Bobot (gram)		Kegunaan
	F0	F1	
Ekstrak Daun Kersen	0	1	Zat Aktif
Cera Alba	2,5	2,5	Pengeras
Lanolin	2	2	Basis
Setil Alkohol	2	2	Basis
Gliserin	0,75	0,75	Pelembab
<i>Essence Strawberry</i>	1	1	Pengaroma
Parafin Cair	ad 15	ad 15	Humektan

Tahapan pembuatan *lip balm* adalah sebagai berikut :

1. Diatur suhu *hotplate*, lalu diletakkan beker glass di atasnya. Setelah itu, dimasukkan cera alba dan dicek suhu menggunakan termometer agar tetap terkontrol (tidak lebih dari 65°C), lalu ditunggu hingga cera alba meleleh.
2. Setelah cera alba meleleh, diturunkan suhu (tidak lebih dari 45°C), lalu ditambahkan lanolin dan setil alkohol.
3. Kemudian, setelah campuran meleleh, gliserin dan paraffin cair dimasukkan dan diaduk hingga homogen.
4. Selanjutnya ditambahkan ekstrak daun kersen dan diaduk hingga homogen.
5. *Essence strawberry* dimasukkan.
6. Campuran yang telah homogen dimasukkan ke dalam wadah dan dibiarkan pada suhu ruang hingga sediaan memadat.

6. Evaluasi sifat fisik *lip balm* ekstrak daun kersen

a) Uji organoleptik

Uji ini disebut uji panca indera. Parameter yang diamati yaitu bau, warna dan bentuk (Cahyani *et al.*, 2024).

b) Uji homogenitas

Uji dilakukan dengan meletakkan 0,5 g produk *lip balm* di atas kaca obyek kemudian ditutup dan ditekan dengan kaca obyek yang lain dan mengamati apakah ada butiran yang terlihat dalam sediaan itu. Sediaan dianggap homogen jika tidak ada butiran kasar yang muncul dalam formulasi tersebut (Cahyani *et al.*, 2024).

c) Uji pH

Untuk mengukur pH, kertas indikator pH universal dioleskan pada *lip balm* setelah *lip balm* memadat. Setelah itu, warna kertas dibandingkan dengan skala warna yang tertera pada kemasan. Nilai pH pada bibir yang dianggap adalah berkisar antara 4,5-6,5 (Ambari *et al.*, 2020).

d) Uji Daya Sebar

Sampel *lip balm* (0,5 gram) diletakkan di atas cawan petri dan cawan petri lain ditutupkan di atasnya (bobot cawan ditimbang). Setelah menunggu 1 menit, diameter penyebaran diukur secara diagonal, horizontal dan vertikal. Pengukuran dilakukan dengan menambahkan beban secara bertahap yaitu 50, 100, 150 dan 200 gram, kemudian diameter penyebaran diukur setelah didiamkan 1 menit untuk setiap penambahan beban (Endriyatno *et al.* 2024). Syarat daya sebar *lip balm* yaitu 5-7 cm (Atmaja *et al.*, 2022).

e) Uji Daya Lekat

Sampel *lip balm* (0,5 gram) ditempatkan di atas kaca objek. Kaca objek lain dilekatkan di atasnya dan beban 1 kg diletakkan di atas kedua kaca objek selama 1 menit. Setelah itu, beban 80 gram dijatuhkan. Waktu yang diperlukan sampai kedua kaca preparat terpisah dicatat (Endriyatno *et al.* 2024). Daya lekat *lip balm* dikatakan baik yaitu lebih dari 1 detik (Ardhana *et al.*, 2024).

f) Uji Titik Lebur

Lip balm (1 gram) dalam gelas beaker 10 mL dimasukkan ke dalam oven yang telah diatur suhu 50°C selama 15 menit, dan diamati proses pelelehannya. Selanjutnya, saat *lip balm* mulai meleleh dicek suhu *lip balm* dengan termometer dan dicatat suhu (Agustiana & Herliningsih, 2019). Titik lebur *lip balm* pada umumnya berada pada kisaran 55-75°C (Tampubolon, 2023).

7. Uji aktivitas tabir surya (SPF, %Te dan %Tp) *lip balm* ekstrak daun kersen

Metode spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk menghitung nilai aktivitas tabir surya (SPF, %Te, dan %Tp) dari sediaan *lip balm*. Sebanyak 0,5 gram *lip balm* (F0 dan F1) ditimbang, dimasukkan ke labu ukur 10 mL, dan dilarutkan dengan etanol p.a. hingga tanda batas (Kresnawati, 2024). Kemudian, larutan yang diperoleh disonikasi selama 5 menit dan disaring. Absorbansi sampel diukur menggunakan etanol p.a. dengan interval 5 nm pada rentang panjang gelombang 290–320 nm untuk nilai SPF, panjang gelombang 290–320 nm untuk %Te, dan 320–370 nm untuk %Tp. Pengujian diulang tiga kali untuk setiap pengujian (Endriyatno *et al.*, 2024; Widyawati *et al.*, 2019).

G. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Perhitungan Nilai SPF

Nilai absorbansi dari setiap panjang gelombang *lip balm* yang mengandung ekstrak daun kersen, dianalisis secara *in vitro* menggunakan metode Mansur. Perhitungan nilai SPF, menggunakan metode Mansur dengan persamaan 2. Nilai EE x I dapat dilihat pada tabel 5.

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan :

EE : Spektrum efek eritemal

- I : Intensitas spektrum cahaya
 A : Penyerapan tabir surya produk
 CF : Faktor koreksi (10)

Tabel 5. Nilai EE x I (Puspitasari & Setyowati, 2019)

Panjang Gelombang (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
TOTAL	1

2. Perhitungan Nilai %Te (Transmisi Eritema) dan %Tp (Transmisi Pigmentasi)

Menurut Widyawati *et al* (2019), nilai %Te dan %Tp dapat dihitung menggunakan persamaan 3 dan 4. Pengukuran nilai %Te dan %Tp dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis, yaitu dengan mencatat intensitas cahaya yang berhasil melewati sediaan tabir surya pada rentang panjang gelombang 290–375 nm. Hasil pengukuran tersebut kemudian dikalikan dengan fluks eritema atau fluks pigmentasi yang tercantum pada Tabel 6.

$$\% \text{ Transmisi eritema} = \frac{E_e}{\sum F_e} = \frac{\sum(T \times F_e)}{\sum F_e} \dots\dots\dots (3)$$

$$\% \text{ Transmisi pigmentasi} = \frac{E_p}{\sum F_p} = \frac{\sum(T \times F_p)}{\sum F_p} \dots\dots\dots (4)$$

Dimana :

T : Nilai transmisi (T = antilog (2 - absorbansi))

Fe : Fluks eritema

Ee : Fluks eritema panjang gelombang 290-320 nm

Fp : Fluks pigmentasi

Ep : Fluks pigmentasi panjang gelombang 320-375 nm

Tabel 6. Nilai Fluks Eritema Dan Pigmentasi (Suharsanti *et al.*, 2019)

Panjang gelombang (nm)	Fluks eritema	Fluks pigmentasi
290-295	0,1105	-
295-300	0,672	-
300-305	1	-
305-310	0,2008	-
310-315	0,1364	-
315-320	0,1125	-
320-325	-	0,1079
325-330	-	0,1020
330-335	-	0,0936
335-340	-	0,0798
340-345	-	0,0669
345-350	-	0,0570
350-355	-	0,0488
355-360	-	0,0456
360-365	-	0,0356
365-370	-	0,0310
370-375	-	0,0260
Total	2,2322	2,92644

3. Analisis data statistik

Data sifat fisik *lip balm* disajikan dalam bentuk tabel, kemudian dianalisis dan dibandingkan dengan standar yang ditetapkan untuk masing-masing parameter fisik *lip balm*. Data aktivitas tabir surya, meliputi nilai SPF, %Te, dan %Tp, dari sediaan *lip balm* yang mengandung ekstrak (F1) serta basis *lip balm* tanpa ekstrak (F0), juga disajikan dalam bentuk tabel yang mencantumkan nilai rata-rata dan SD. Selanjutnya, analisis data tabir surya ini dilakukan menggunakan SPSS. Langkah pertama dimulai dengan uji homogenitas menggunakan *Levene's Test*, diikuti dengan uji normalitas melalui *Shapiro-Wilk* untuk jumlah data <50. Data yang terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *T independent* untuk mengetahui perbedaan aktivitas tabir surya antara F0 dan F1. Namun, apabila data tidak terdistribusi normal atau tidak homogen, maka digunakan uji alternatif berupa *Mann-Whitney*. Dari hasil uji *T independent* maupun *Mann-Whitney*, data (*lip balm* F0 dengan F1) disebut memiliki perbedaan yang signifikan apabila nilai signifikansi (P) yang didapat yaitu $P \leq 0,05$.