

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan metode eksperimental melalui pembuatan formula krim yang mengandung ekstrak etanol *Muntingia calabura* L. Aktivitas tabir surya sediaan yang dihasilkan diukur secara in vitro melalui pengujian SPF, %Te, %Tp, dan sifat fisik krim yang dihasilkan dievaluasi.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, yang dimulai sejak bulan Mei hingga Juli 2025.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas
Variasi konsentrasi dari ekstrak etanol daun kersen.
2. Variabel terikat
Efektivitas tabir surya (SPF, %Te, dan %Tp) dan sifat fisik krim (pH, viskositas, daya sebar, dan daya lekat).
3. Variabel terkontrol
Suhu pengeringan daun kersen pada oven, waktu ekstraksi, suhu dan waktu penguapan ekstrak etanol daun kersen, serta waktu pengadukan, kecepatan pengadukan, dan suhu pengadukan fase minyak dan fase air saat melakukan pembuatan sediaan krim.

D. Definisi Operasional

1. Tipe formulasi yang dibuat adalah krim yang memiliki kandungan ekstrak etanol *Muntingia calabura* L. yang diperoleh melalui tahap maserasi terhadap daun kersen dengan menggunakan pelarut berupa etanol 70%.

2. Evaluasi efektivitas tabir surya dari sediaan krim yang memiliki kandungan ekstrak etanol daun kersen dilakukan secara *in vitro* menggunakan spektrofotometer Ultraviolet-Visibel terhadap parameter SPF, %Te, dan %Tp.
3. Pengujian sifat fisik dilakukan untuk mengevaluasi kualitas sediaan krim yang mengandung ekstrak etanol daun kersen yang dihasilkan, meliputi uji homogenitas, daya sebar, pH, daya lekat, organoleptis, dan viskositas.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Anak timbangan gram, ayakan 40 mesh (Sieve), bunsen, cawan porselen, grinder (Fomac FGD-Z500), homogenizer (IKA T25 Ultra Turrax), *hotplate* (IKA C-MAG HS7), jangka sorong (Herma), kompor listrik (Maspion S-301), mikropipet (Cova), *moisture balance* (Ohaus MB90), *object glass*, oven, penggaris, pH meter (Thermo Scientific Orion Star A211), pipet tetes, *centrifuge* (Hettich EBA200), sonikator (GT Sonic R9 Ultrasonic), spatula kayu, spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis), *stopwatch*, timbangan analitik (Ohaus), toples, viskometer Brookfield (DV1), wajan, dan alat gelas laboratorium lainnya (Iwaki).

2. Bahan

Akuades, aluminium foil, asam asetat anhidrat (p.a), asam stearat (p.a), *bluetip*, etanol 70% (teknis), etanol (p.a), FeCl₃ (p.a), gliserin (farmasetis), HCl (p.a), H₂SO₄ (p.a), kain saring, kloroform (p.a), metil paraben (farmasetis), pereaksi Dragendorff (p.a), pereaksi Mayer (p.a), pereaksi Wagner (p.a), propil paraben (farmasetis), serbuk magnesium (p.a), setil alkohol (farmasetis), dan TEA (farmasetis).

F. Pelaksanaan Penelitian

1. Penyiapan simplisia

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) diperoleh di daerah persawahan Ambarketawang, Kecamatan Gamping, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta dengan titik koordinat -7.8008120,110.3219450. Proses pembuatan

ekstrak daun kersen dimulai dengan mengambil daun dari urutan nomor 3, 4, dan 5 dari pucuknya (Sulaiman *et al.*, 2017). Daun yang sudah diperoleh kemudian dipisahkan, dicuci dengan menggunakan air mengalir, dan ditiriskan guna mempercepat proses pengeringan. Tahap selanjutnya yaitu pengeringan daun secara diangin-anginkan pada suhu ruang guna meminimalkan risiko kerusakan terhadap senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun kersen (Vonna *et al.*, 2021). Setelah itu, daun kersen dikeringkan kembali dengan menggunakan oven selama kurang lebih 2 hari pada suhu 40°C. Daun kering yang dihasilkan dihaluskan dengan menggunakan grinder, kemudian disaring menggunakan ayakan berukuran 40 mesh untuk mendapatkan serbuk daun kersen (Puspitasari & Wardhani, 2018).

2. Determinasi daun kersen

Determinasi terhadap daun tumbuhan *Muntingia calabura* L. yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.

3. Pembuatan ekstrak kental daun kersen

Proses ekstraksi daun kersen dilakukan dengan merendam 500 gram daun kersen dalam 5 liter pelarut etanol 70% (1:10) secara berurutan ke dalam toples menggunakan metode maserasi. Untuk melindungi dari paparan sinar matahari langsung, toples dilapisi dengan menggunakan aluminium foil. Perendaman dilakukan selama 3 hari dengan pengadukan sebanyak 3 kali sehari selama lebih kurang 15 menit. Setelah tiga hari, maserat pertama disaring, lalu ampas penyaringan diremaserasi (1:5) dengan tambahan 2,5 L pelarut etanol 70% dan direndam lagi selama satu hari. Setelah itu, hasil remaserasi disaring kembali untuk mendapatkan maserat kedua. Kedua maserat tersebut didiamkan selama satu malam, lalu dipekatkan dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 40°C hingga terbentuk ekstrak kental daun kersen (Sari & Rahmiati, 2023). Ekstrak etanol yang didapatkan tersebut kemudian dihitung nilai rendemennya dengan menggunakan persamaan (1).

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{Bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

4. Karakterisasi ekstrak etanol daun kersen

a. Penetapan kadar air ekstrak etanol daun kersen

Satu gram ekstrak etanol daun kersen dimasukkan dalam *moisture balance* dengan suhu 105°C. Penetapan kadar air ekstrak etanol daun kersen dilakukan dan dicatat kadar air yang terukur. Kadar air dinyatakan memenuhi kriteria apabila ekstrak tidak mengandung air melebihi batas 10% (Pakiding, 2022).

b. Skrinning fitokimia ekstrak etanol daun kersen

Satu gram ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) ditimbang, lalu dilarutkan dalam 100 mL etanol untuk membuat larutan stok yang digunakan dalam uji fitokimia kualitatif (Lisdiani *et al.*, 2022).

1) Uji flavonoid

Dipanaskan 2 mL larutan stok ekstrak etanol daun kersen selama kurang lebih 5 menit, ditambahkan 0,1 mg serbuk magnesium dan 5 tetes HCl p.a. Larutan akan membentuk warna kuning, merah, atau oranye sebagai tanda bahwa ekstrak yang dihasilkan positif mengandung flavonoid (Lisdiani *et al.*, 2022).

2) Uji fenol

Ditambahkan 3-4 tetes FeCl₃ 1% ke dalam 5 mL larutan stok ekstrak etanol daun kersen. Larutan akan membentuk warna merah, hijau, biru, ungu, atau hitam sebagai tanda bahwa ekstrak yang dihasilkan positif mengandung fenol (Lisdiani *et al.*, 2022).

3) Uji alkaloid

2 mL ekstrak etanol daun kersen dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi yang berbeda. Tabung A ditetesi dengan 1 mL pereaksi Dragendroff, tabung B ditetesi dengan 1 mL pereaksi Wagner, dan tabung C ditetesi dengan 1-2 tetes pereaksi Mayer. Pada tabung A terbentuk endapan merah jingga, pada tabung B muncul endapan berwarna merah kecoklatan, dan pada tabung C terlihat endapan berwarna coklat. Tanda ekstrak positif

mengandung alkaloid adalah jika positif 2 dari 3 reagen yang digunakan (Nandini *et al.*, 2020).

4) Uji steroid

Diambil 2 mL larutan stok ekstrak etanol daun kersen, lalu tambahkan dengan kloroform dan beberapa tetes CH_3COOH (asam asetat) anhidrat. Kemudian diteteskan dengan 1 tetes asam sulfat melalui dinding tabung reaksi. Larutan akan membentuk warna biru atau hijau sebagai tanda bahwa ekstrak yang dihasilkan positif mengandung steroid (Lisdiani *et al.*, 2022).

5) Uji saponin

2 mL ekstrak etanol daun kersen dilarutkan dalam air panas dan didinginkan hingga suhu ruang. Kemudian, ekstrak dikocok dengan kuat selama kurang lebih 10 detik hingga terbentuk busa. Larutan uji yang membentuk busa kemudian ditambahkan dengan HCl 1%. Jika busa yang terbentuk tidak hilang selama kurang dari 10 menit, maka ekstrak yang dihasilkan menunjukkan hasil positif saponin (Nandini *et al.*, 2020).

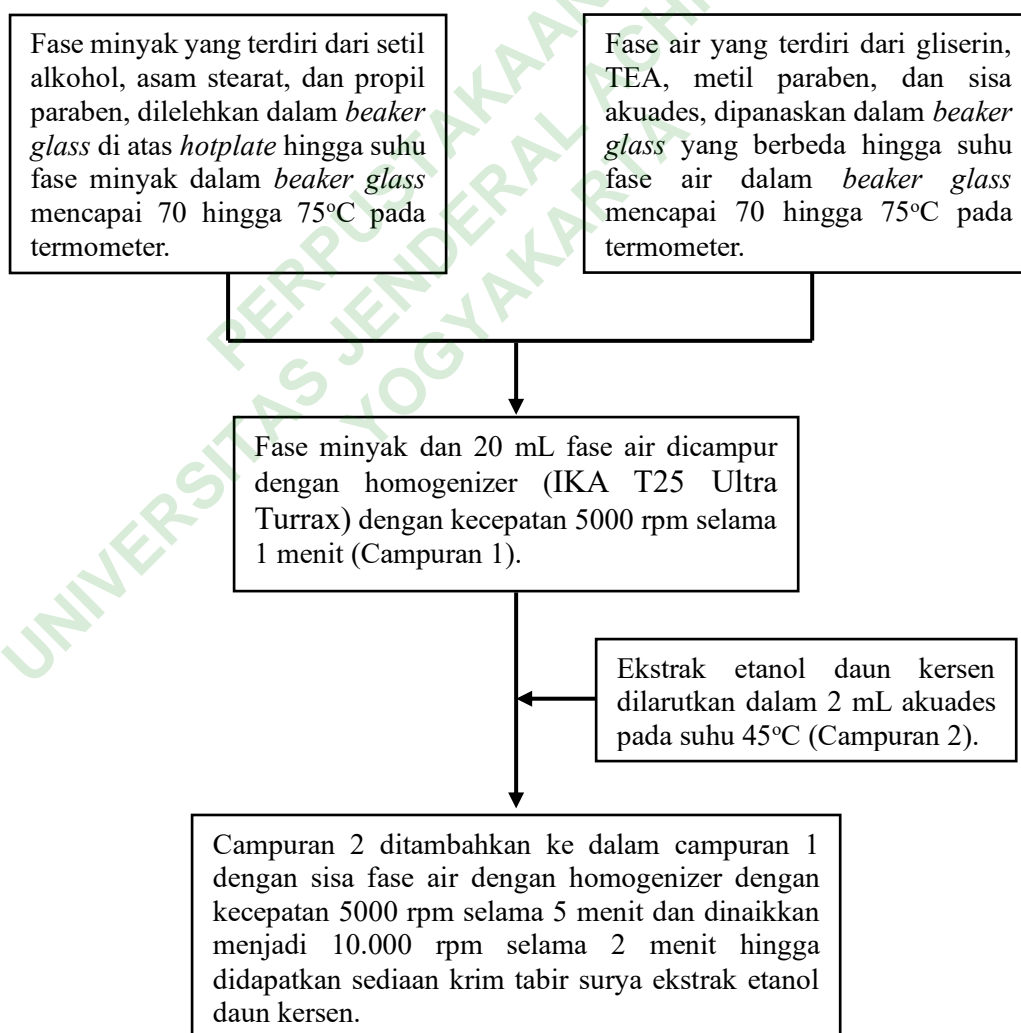
5. Formulasi krim tabir surya ekstrak etanol daun kersen

Konsentrasi yang digunakan mengacu pada Udzma (2023), bahwa 1% ekstrak etanol daun kersen memiliki nilai SPF sebesar 37,86 (proteksi ultra), sehingga krim tabir surya yang dibuat akan menggunakan tiga variasi konsentrasi dari ekstrak daun kersen, yaitu 1%, 2%, dan 3%. , bahwa 1% ekstrak etanol daun kersen memiliki nilai SPF sebesar 37,86 (proteksi ultra), sehingga krim tabir surya yang dibuat akan menggunakan tiga variasi konsentrasi dari ekstrak daun kersen, yaitu 1%, 2%, dan 3%. Pemilihan konsentrasi tersebut bertujuan untuk mengevaluasi dan membandingkan efektivitas perlindungan terhadap sinar UV pada tingkat konsentrasi yang berbeda, sehingga konsentrasi yang lebih tinggi diharapkan dapat memberikan perlindungan yang lebih baik. Formula krim dan prosedur pembuatan krim yang digunakan mengacu pada studi yang dilakukan oleh Puspitasari *et al.* (2018), sebagaimana yang tercantum pada Tabel 4.

Adapun prosedur pembuatan krim secara detail dapat ditemukan pada Gambar 12.

Tabel 4. Formula krim tabir surya ekstrak etanol daun kersen (Puspitasari *et al.*, 2018)

Bahan	Konsentrasi (%b/b)			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak etanol daun kersen	-	1	2	3
Asam stearat	10	10	10	10
Setil alkohol	3	3	3	3
Gliserin	10	10	10	10
TEA	2	2	2	2
Metil paraben	0,2	0,2	0,2	0,2
Propil paraben	0,05	0,05	0,05	0,05
Akuades ad	100	100	100	100



Gambar 12. Prosedur pembuatan krim tabir surya ekstrak etanol daun kersen

6. Evaluasi sifat fisik sediaan krim

a. Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan melalui pengamatan terhadap aroma, warna, serta bentuk dari sediaan krim yang telah diformulasikan (Puspitasari & Wardhani, 2018).

b. Homogenitas

Krim yang dihasilkan, ditimbang sebanyak 0,1 gram (100 mg), lalu dioleskan secara tipis secara merata pada kaca objek. Selanjutnya, diamati apakah terdapat butiran kasar pada permukaan kaca objek. Sediaan krim yang baik harus menunjukkan homogenitas tanpa adanya titik-titik atau bintik kasar (Wijayanti & Maulana, 2023).

c. Daya sebar

Pengujian daya sebar dilakukan dengan langkah awal yaitu melakukan penimbangan 0,5 gram krim dan meletakkannya pada bagian tengah dari lapisan kaca yang digunakan. Selanjutnya, lapisan kaca lain yang sudah ditimbang diletakkan di atas sediaan tersebut. Setelah didiamkan dalam kurun waktu 1 menit, diameter penyebaran krim diukur secara horizontal, vertikal, dan diagonal. Kemudian, penambahan beban seberat 50 gram ditambahkan. Setiap kali beban ditambah, krim dibiarkan selama 1 menit dan diameter diukur hingga total beban mencapai 200 gram (Puspitasari & Wardhani, 2018). Sediaan krim dianggap memiliki daya sebar yang baik jika diameter penyebarannya termasuk ke dalam rentang 5 sampai 7 cm (Tari & Indriani, 2023).

d. Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan memanfaatkan alat viskometer Brookfield, diawali dengan pemasangan spindel nomor 6 pada perangkat tersebut. Kemudian, sediaan krim yang akan diuji diletakkan dalam *beaker glass*. Spindel ditempatkan tepat di tengah *beaker glass* yang berisi krim dan alat dinyalakan dengan kecepatan 50 rpm. Nilai viskositas dapat dibaca langsung pada skala yang ditampilkan di layar dengan satuan cPs (*centipoise*). Sediaan krim dikatakan memiliki kualitas yang baik jika nilai

viskositasnya berada dalam rentang 2.000 hingga 50.000 *centipoise* (cPs) (Tungadi *et al.*, 2023).

e. pH

Pemeriksaan tingkat keasaman (pH) terhadap sediaan krim yang dihasilkan dilakukan dengan menggunakan alat berupa pH meter. Untuk memastikan keakuratannya, pH meter yang akan digunakan dalam pengujian perlu dilakukan kalibrasi terlebih dahulu dengan menggunakan larutan dapar pada tingkat keasaman (pH) 4, 7, dan 10 (Alrosyidi & Syaifiyatul, 2021). Kemudian, elektroda alat tersebut dimasukkan ke dalam sediaan krim yang dihasilkan. Sediaan topikal seharusnya memiliki pH antara 4,5 sampai 8,0 yang sesuai dengan pH (tingkat keasaman) normal kulit (Tungadi *et al.*, 2023).

f. Daya lekat

0,1 gram krim ekstrak etanol daun kersen ditempatkan di antara dua kaca objek, kemudian diberikan beban seberat 1 kg selama 5 menit. Selanjutnya, diangkat pemberat tersebut dan diposisikan kaca objek berisi krim pada alat uji. Dipasang beban sebesar 80 gram yang segera dilepaskan, dan waktu yang dibutuhkan hingga krim terpisah dari kedua kaca dicatat (Putra & Septiari, 2023). Hasil uji yang didapatkan digunakan untuk menilai daya lekat sediaan pada kulit. Makin lama sediaan bertahan, makin besar peluang zat aktif untuk dilepaskan dari basis dan menembus lapisan kulit (Puspitasari & Wardhani, 2018). Krim dikategorikan memiliki mutu yang baik apabila waktu lekat melebihi 4 detik (Tambingon *et al.*, 2023).

g. Uji sentrifugasi

Uji stabilitas dipercepat sediaan krim yang dihasilkan diamati menggunakan uji sentrifugasi. Uji sentrifugasi dilakukan pada suhu 25°C dengan memasukkan 10 gram sediaan krim ke dalam tabung *centrifuge*. *Centrifuge* dijalankan dengan kecepatan 3750 rpm selama 5 jam sebagai indikasi bahwa sediaan yang dibuat dapat stabil selama kurang lebih satu tahun pada suhu ruang. Sediaan krim yang memiliki konsistensi yang tetap (stabil) ditunjukkan dengan tidak adanya pemisahan fase setelah proses

sentrifugasi (Khar *et al.*, 2016). Pemisahan fase yang dihasilkan kemudian dihitung rasio pemisahannya dengan menggunakan persamaan (2) (Kartika *et al.*, 2018).

$$F = \frac{H_u}{H_o} \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan:

F = Rasio pemisahan fase

H_o = Tinggi emulsi mula-mula

H_u = Tinggi emulsi yang stabil pada waktu pengamatan

7. Uji aktivitas tabir surya pada ekstrak etanol daun kersen dan sediaan krim

Aktivitas tabir surya dapat diketahui melalui beberapa parameter, seperti nilai SPF (*Sun Protection Factor*), uji pigmentasi (%Tp), dan uji eritema (%Te), baik pada ekstrak maupun formula sediaan yang digunakan (Widhihastuti *et al.*, 2024).

a. Uji aktivitas tabir surya ekstrak etanol daun kersen

Setiap konsentrasi ekstrak (1%, 2%, dan 3% b/b) dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL, kemudian dilarutkan menggunakan etanol p.a. Larutan yang diperoleh disonikasi selama 5 menit dan dilanjutkan dengan proses penyaringan. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan etanol p.a sebagai larutan blanko. Pengamatan dilakukan pada panjang gelombang 290-320 nm dengan interval 5 nm untuk penentuan nilai SPF dan %Te, serta pada panjang gelombang 320-375 nm dengan interval 5 nm untuk analisis %Tp (Udzma, 2023).

b. Uji aktivitas tabir surya krim basis dan krim ekstrak etanol daun kersen

Sediaan yang akan diuji aktivitas tabir suryanya ditimbang seberat 1 gram (1000 mg) dilarutkan dengan menggunakan 5 mL etanol p.a, sebelum diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Puspitasari & Wardhani, 2018). Larutan disonikasi selama 5 menit dan kemudian disaring.

Sediaan krim diamati serapannya setiap rentang 5 nm pada panjang gelombang yang berbeda, di mana untuk mengamati nilai SPF maka rentang panjang gelombang yang digunakan adalah 290-320 nm, rentang %Tp adalah 320-375 nm, dan rentang %Te adalah 290-320 nm (Widhihastuti *et al.*, 2024).

4. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Metode pengolahan

a. Perhitungan nilai SPF

Penilaian nilai SPF dilakukan dengan 3 (tiga) kali pengulangan (replikasi) untuk setiap formula. Data hasil pengukuran selanjutnya dianalisis menggunakan rumus Mansur sebagaimana tercantum pada persamaan (2) (Puspitasari & Wardhani, 2018). Nilai $EE \times I$ merupakan suatu hal yang konstan dan ditunjukkan pada Tabel 5.

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

Keterangan:

CF = Faktor koreksi (10)

EE = Spektrum Efek Erytemal

I = Spektrum intensitas dari matahari

Abs = Absorbansi dari sampel

Tabel 5. Nilai $EE \times I$ (Puspitasari & Wardhani, 2018)

Panjang Gelombang (λ nm)	$EE \times I$
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180
Total	1

b. Perhitungan nilai eritema dan pigmentasi

Banyaknya persentase eritema (%Te) dan pigmentasi (%Tp) yang diteruskan oleh bahan aktif yang digunakan pada suatu tabir surya dapat dihitung berdasarkan persamaan (3) dan (4) sebagaimana yang disebutkan oleh Kusmita *et al* (2023). Nilai Fluks Eritema (Fe) dan Fluks Pigmentasi (Fp) disajikan pada Tabel 6.

$$\%Te = \frac{\sum(T \times Fe)}{\sum Fe} \dots\dots\dots(3)$$

$$\%Tp = \frac{\sum(T \times Fp)}{\sum Fp} \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan:

T = Nilai persentase transmisi eritema/pigmentasi

Fe = Nilai tetapan fluks eritema

Fp = Nilai tetapan fluks pigmentasi

$\sum Fe$ = Jumlah nilai total fluks eritema sinar matahari

$\sum Fp$ = Jumlah nilai total fluks pigmentasi sinar matahari

$\sum(T \times Fe)$ = Jumlah Fe yang diteruskan pada λ 290-320 nm

$\sum(T \times Fp)$ = Jumlah Fp yang diteruskan pada λ 320-375 nm

Tabel 6. Nilai fluks eritema dan pigmentasi pada sediaan tabir surya (Kusmita *et al.*, 2023)

Panjang Gelombang (λ nm)	Fluks Eritema (Fe)	Fluks Pigmentasi (Fp)
290-295	0.1105	-
295-300	0.6720	-
300-305	1.0000	-
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

Panjang Gelombang (λ nm)	Fluks Eritema (Fe)	Fluks Pigmentasi (Fp)
360-365	-	0.0356
365-370	-	0.0310
370-375	-	0.0260

2. Analisis data statistik

Pengujian homogenitas pada data aktivitas tabir surya (transmisi eritema (%Te), *Sun Protection Factor* (SPF), dan transmisi pigmentasi (%Tp)) serta parameter fisik krim (viskositas, daya sebar, pH, dan daya lekat) dilakukan menggunakan uji *Levene*, sedangkan uji normalitas dianalisis dengan metode *Shapiro-Wilk* karena jumlah data kurang dari 50. Jika data menunjukkan distribusi normal dan homogen, analisis statistik dilanjutkan dengan *one-way* ANOVA. Sementara itu, data yang terdistribusi normal namun tidak homogen, tidak normal tetapi homogen, maupun tidak normal dan tidak homogen, dianalisis menggunakan metode non-parametrik yaitu *Kruskal-Wallis Test*. Baik ANOVA maupun *Kruskal-Wallis* digunakan untuk membandingkan nilai aktivitas tabir surya dan sifat fisik krim pada tiga variasi konsentrasi ekstrak. Selanjutnya, uji *Post Hoc* dilakukan dengan metode *Least Significance Difference* (LSD) untuk data yang normal dan homogen, sedangkan *Pairwise Comparisons* digunakan pada data yang tidak normal dan tidak homogen maupun salah satunya, dengan tujuan mengidentifikasi kelompok yang menunjukkan perbedaan signifikan.