

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang diperoleh dari Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah. Sedangkan sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Clay mask* ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi kaolin.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang diformulasikan menjadi sediaan *Clay mask*.

Variabel utama kedua pada penelitian ini yaitu sediaan *Clay mask* ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan variasi konsentrasi kaolin sebagai basis.

Variabel utama ketiga pada penelitian ini yaitu mutu fisik dan stabilitas dari sediaan *Clay mask* dari ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.).

Variabel utama keempat pada penelitian ini yaitu aktivitas antioksidan dari sediaan *Clay mask* ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan metode DPPH.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, variabel terkendali.

Variabel bebas yaitu variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi atau perbedaan variasi konsentrasi kaolin yang berbeda.

Variabel tergantung yaitu titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah mutu fisik dan stabilitas *Clay mask* ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.). Keamanan sediaan dilakukan dengan uji iritasi, dan tanggapan kesukaan terhadap sediaan dengan uji *hedonic*. Aktivitas antioksidan dengan parameter nilai IC_{50} yang terkandung pada sediaan *Clay mask*.

Variabel kendali yaitu variabel yang dapat dikendalikan yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah hal-hal yang berpengaruh selama pembuatan *Clay mask* ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura* L.) diantaranya metode pengeringan simplisia, metode ekstraksi, formula *Clay mask* yang digunakan, prosedur *Clay mask*, metode DPPH, bahan atau instrumen analisis yang digunakan, dan kondisi laboratorium termasuk peralatan dan bahan-bahan yang digunakan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah daun yang berwarna hijau dari tanaman kersen yang diperoleh dengan kondisi sudah tua dan masih segar dari Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak daun kersen adalah ekstrak yang diperoleh dari proses maserasi dengan pelarut etanol 96%, kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*.

Ketiga, sediaan *Clay mask* ekstrak etanol daun kersen adalah sediaan *Clay mask* yang dibuat dari ekstrak etanol daun kersen dengan formulasi variasi konsentrasi kaolin yang berbeda.

Keempat, mutu fisik *Clay mask* adalah pemeriksaan terhadap sediaan *Clay mask* yang akan menentukan stabilitas fisik yang terbaik dari suatu formula *Clay mask* yang meliputi organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat, viskositas, dan stabilitas.

Kelima, evaluasi keamanan adalah parameter yang menyatakan keamanan pada sediaan *Clay mask* ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) melalui uji iritasi.

Keenam, uji kesukaan adalah pengujian dari sejumlah panelis terhadap sediaan *Clay mask* ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang disebut dengan uji hedonik.

Ketujuh, aktivitas antioksidan adalah efek yang ditimbulkan dari sediaan *Clay mask* ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang ditunjukkan dalam persentase peredaman radikal DPPH yang dinyatakan dalam IC₅₀.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian formulasi sediaan *Clay mask* antioksidan ekstrak etanol daun kersen yaitu daun kersen,

bentonit, kaolin, propilen glikol, nipagin, TEA, *xanthan gum*, *oleum rosae*, dan *aquadest*. Bahan yang digunakan untuk pengujian ekstrak antara lain *Dragendroff*, *reagen Wagner*, Etanol 96%, H₂SO₄, CH₃COOH, HCl pekat, logam Mg, air hangat, FeCl₃. Larutan DPPH, metanol, quersetin, dan *aquadest*.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mesin blender, neraca analitik, pisau, pipet tetes, toples kaca, botol coklat maserasi, saringan, alat gelas, vacuum evaporator, desikator, oven, kurs porselen, lampu spiritus, ayakan mesh no 60, mortir, stamper, batang pengaduk, kaca transparan, *viscometer Brookfield*, pH meter dengan tipe Starter 3100, spindle, aluminum foil, corong, rak tabung, kertas saring, tissue, kuvet, spektrofotometer uv-vis, labu tentukur,

D. Prosedur Penelitian

1. Determinasi tumbuhan kersen

Determinasi dalam penelitian ini untuk menetapkan kebenaran sampel daun kersen. Determinasi dilakukan dengan perbandingan morfologi karakteristik tanaman daun kersen dengan literatur yang dilakukan oleh Laboratorium Universitas Setia Budi.

2. Pengambilan bahan

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) adalah daun dari tumbuhan kersen yang diperoleh dari Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah. Daun yang dipilih yaitu daun kersen yang tua yang masih segar.

3. Pengolahan simplisia

Bagian daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun kersen hijau yang segar dan tidak layu. Diperoleh sebanyak 12 kg, kemudian dilakukan sortasi basah dengan mencuci sampel menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Selanjutnya dikeringkan dengan cara di angin-anginkan (tanpa sinar matahari langsung).

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang telah kering, kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk, ditimbang kemudian diayak dengan menggunakan mesh 60 hingga diperoleh serbuk halus. Serbuk ditimbang dengan neraca analitik berdasarkan bahan-bahan yang diperlukan untuk membuat ekstrak.

4. Pemeriksaan susut pengeringan serbuk

Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan dengan cara yang telah ditetapkan. Kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, simplisia harus dalam bentuk serbuk dengan derajat halus nomor 8, suhu pengeringan 105° C dan susut pengeringan ditetapkan sebagai berikut : menimbang saksama 1 sampai 2 g simplisia dalam botol timbang dangkal tertutup atau kurs yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu penetapan dan ditara. Ratakan bahan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 sampai 10 mm, masukkan dalam ruang pengering, buka tutupnya, keringkan pada suhu penetapan hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu ruang (Kemenkes, 2017).

5. Pembuatan ekstrak daun kersen

Pembuatan ekstrak daun kersen dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Pada bejana maserasi dimasukkan serbuk daun kersen sebesar 800 g menggunakan perbandingan 1 : 10 bagian pelarut dengan menambahkan pelarut 8 liter etanol 96%. Biarkan serbuk simplisia terendam sepenuhnya. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan 18 jam. Hasil Maserasi disaring dengan kain flanel sampai mendapatkan hasil ekstrak cair yang bebas dari ampas daun kersen lalu dilanjutkan dengan penyaringan ulang menggunakan kertas saring. Ampas maserat direndam lagi dengan setengah pelarut awal pada *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental. Kemudian timbang dan catat rendemen yang diperoleh (Kemenkes, 2017).

6. Pemeriksaan organoleptis ekstrak daun kersen

Pemeriksaan organoleptis ekstrak daun kersen dilakukan dengan melihat sifat fisik ekstrak. Pemeriksaan organoleptis meliputi dengan mengamati warna, bentuk, dan bau ekstrak daun kersen yang diperoleh.

7. Penetapan kadar air ekstrak daun kersen

Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan metode destilasi toluen. Dengan cara membersihkan tabung penerima dan pendingin dengan *asam pencuci*, bilas dengan air, kemudian keringkan dalam lemari pengering. Menimbang 20g bahan yang

diperkirakan mengandung 1 sampai 4 mL air, memasukkan ke dalam labu kering. Jika zat berupa pasta, timbang dalam sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu. Untuk zat yang dapat menyebabkan gejolak mendadak saat mendidih, tambahkan batu didih secukupnya. Memasukkan lebih kurang 200 mL toluen jenuh air ke dalam labu, pasang rangkaian alat. Memasukkan toluen jenuh air ke dalam tabung penerima melalui pendingin sampai leher alat penampung. Panaskan labu selama 15 menit dengan hati-hati.

Setelah toluen mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes tiap detik, sehingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen jenuh air, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluen jenuh air. Melanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima sampai suhu ruang. Jika terdapat tetes air yang melekat, gosok tabung pendingin dan tabung penerima dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen jenuh air hingga tetesan air turun. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna (Kemenkes, 2017).

$$\text{Kadar air} = [(Vol \text{ akhir} - Vol \text{ awal}) / \text{bobot sampel}] \times 100\%$$

8. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak daun kersen

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat dalam ekstrak daun kersen.

8.1. Flavonoid. Sebanyak 0,5 g ekstrak diekstraksi dengan metanol dan dipekatkan. Kemudian, ekstrak metanol diekstraksi menggunakan pelarut *n*-heksana. Residu diekstraksi menggunakan 10 mL etanol 80% dan ditambahkan 0,5 g logam Mg serta HCl 0,5 M. Jika timbul warna merah muda/ungu menunjukkan positif adanya flavonoid (Syahara, 2019).

8.2. Tanin. Sebanyak 0,5 g ekstrak dimaserasi dengan 10 mL aquades selama 15 menit, dan disaring, filtrat diencerkan dengan aquades sampai hampir tidak berwarna. Sebanyak 2 mL filtrat tambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 10%, dan perhatikan warna yang terjadi, warna biru atau hijau menunjukkan adanya tanin. Warna biru menunjukkan adanya 3 buah gugusan hidroksil pada inti aromatis tanin. Warna hijau menunjukkan adanya 2 buah gugusan hidroksil pada inti aromatis tannin (Depkes, 1995).

8.3. Saponin. Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Sebanyak 1 mL campuran diencerkan dengan 10 mL air dan dikocok kuat-kuat selama 10 menit (terbentuk buih selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1-10 cm). Pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes, 1995).

8.4. Steroid/ Triterpenoid. Sebanyak 0,5 g ekstrak daun kersen ditambahkan 5 mL eter, didiamkan selama 2 jam dan disaring. Filtrat hasil penyaringan diuapkan. Pada sisanya ditambahkan 1 mL asam asetat anhidrida, dan 2-3 tetes asam sulfat pekat (Pereaksi Liebermann-Bouchardat). Timbulnya warna ungu dan merah kemudian berubah menjadi hijau biru menunjukkan adanya triterpen/steroid (Depkes, 1995).

8.5. Alkaloid. Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan 1 mL asam Florida 2 N dan 9 mL air, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipindahkan masing-masing 3 tetes ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 tetes larutan pereaksi (LP) Meyer, Bouchardat, dan Dragendorf ke dalam masing-masing tabung reaksi. Jika terdapat alkaloid maka dengan LP Meyer terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning, dengan LP Bouchardat terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, dengan LP Dragendorf terbentuk endapan kuning jingga. Ekstrak dikatakan mengandung alkaloid apabila 2 dari 3 reaksi diatas memberikan reaksi positif (Depkes, 1995).

9. Rancangan formulasi *Clay mask*

Tabel 4. Rancangan Formulasi *Clay mask* ekstrak daun kersen

Bahan	Fungsi	Konsentrasi %					
		F01	F02	F03	F1	F2	F3
Ekstrak Daun Kersen	Bahan Aktif	-	-	-	3	3	3
Bentonit	Basis	1	1	1	1	1	1
Kaolin	Basis	30	35	40	30	35	40
Propilen glikol	Humektan	8	8	8	8	8	8
Nipagin	Pengawet	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEA	Penstabil pH	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
<i>Xantam Gum</i>	Pengental	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Oleum rosae</i>	Pengaroma	Qs	qs	qs	qs	qs	qs
<i>Aquadest</i> ad	Pelarut	100	100	100	100	100	100

Keterangan :

F01 : Formula dengan konsentrasi Kaolin (30%)

F02 : Formula dengan konsentrasi Kaolin (35%)

F03 : Formula dengan konsentrasi Kaolin (40%)

- F1 : Formula dengan konsentrasi Kaolin (30%) ditambah ekstrak
 F2 : Formula dengan konsentrasi Kaolin (35%) ditambah ekstrak
 F3 : Formula dengan konsentrasi Kaolin (40%) ditambah ekstrak

10. Pembuatan *Clay mask*

Cara pembuatan sediaan *Clay mask* yaitu dengan dilakukan timbang masing-masing bahan pada setiap formula. Bentonit dilarutkan sesuai dengan menggunakan air panas suhu 40-50°C didalam mortir, kemudian menambahkan *xanthan gum* digerus sampai homogen. Kaolin ditambahkan sesuai dengan konsentrasi yang dibuat pada masing-masing formula, kemudian dimasukkan propilen glikol dan ekstrak daun kersen, kemudian digerus sampai homogen. Nipagin dilarutkan dengan air hangat dalam beaker glass dan dimasukkan ke dalam mortir. Kemudian ditambahkan TEA dan *oleum rosae*, terakhir dimasukkan sisa air kemudian digerus sampai diperoleh sediaan *Clay mask* yang homogen. Sediaan disimpan pada suhu ruang antara 20-25°C (Kumalasari *et al.*, 2023).

10.1. Uji organoleptik. Uji organoleptis dilakukan dengan pengamatan langsung meliputi: bentuk, warna, tekstur sediaan, dan bau sediaan *Clay mask* ekstrak daun kersen (Yuniarsih *et al.*, 2020).

10.2. Uji homogenitas. Uji homogenitas dilakukan yaitu dengan menimbang sebanyak 0,1 gram sampel uji, lalu ditempatkan diantara dua kaca object. Amati apakah terdapat partikel tidak homogen atau kasar dibawah kaca. Uji ini untuk mengamati campuran bahan yang tidak tercampur dengan baik (DepKes RI, 1979).

10.3. Uji pH. *Clay mask* dengan ekstrak daun kersen dapat diukur menggunakan pH meter *ohaus tipe starter 31000*. pH meter dikalibrasi terlebih dahulu lalu dimasukkan ke dalam sediaan, dan hasil pengukuran pH akan muncul pada layar alat pH merupakan pH sediaan. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Safilla, 2022).

10.4. Uji viskositas. Uji viskositas ini dilakukan sebanyak 2 g sediaan *Clay mask* ditempatkan pada Viskometer *Brookfield*, kemudian diatur spindle dan kecepatan yang akan digunakan, Viskometer *Brookfield* dijalankan, kemudian viskositas dari *Clay mask* akan terbaca. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali (Septiani, Watoni dan Mita, 2012).

10.5. Uji waktu kering. Sebanyak 0,5 gram sediaan pada masing-masing konsentrasi dioleskan di kaca objek dan diamati berapa lama waktu yang dibutuhkan sediaan untuk mengering. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Safilla, 2022).

10.6. Uji daya sebar. Sebanyak 1 gram masker diletakkan di atas kaca transparan, dimana kaca transparan bagian atas dibebani dengan menggunakan anak timbangan 50 g dan 100 g. Masing-masing diberi rentang waktu 1-2 menit, selanjutnya diameter penyebaran diukur pada setiap penambahan beban. Daya sebar yang memenuhi standar *Clay mask* yaitu 5-7 cm. Uji daya sebar dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Safilla, 2022).

10.7. Uji daya lekat. Sejumlah 300 mg *Clay mask* diletakkan diatas kaca objek pertama, kemudian ditutup dengan kaca objek kedua, ditekan dengan beban 1 kg selama 1 menit, setelah itu beban diangkat dari kaca objek dan dilepaskan. Waktu yang dibutuhkan untuk kedua kaca objek tersebut terlepas dicatat. Uji daya lekat dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Ardhany, 2022).

10.8. Uji kesukaan (*Hedonic*). Uji kesukaan dilakukan pada 12 orang sukarelawan untuk mengetahui tingkat kesukaan probandus terhadap sediaan yang dibuat, semakin banyak jumlah probandus uji kesukaan maka semakin baik. Parameter pengamatan uji kesukaan adalah kemudahan dioleskannya *Clay mask*, homogenitas, efek setelah penggunaan, dan intensitas warna (Febriani, 2021).

10.9. Uji iritasi. Uji iritasi kelayakan penggunaan masker wajah dilakukan terhadap 12 probandus yang bersedia menjadi sukarelawan. Dengan cara 500 mg *Clay mask* mengandung ekstrak etanol daun kersen dioleskan pada kulit punggung tangan probandus dengan diameter kurang lebih 3 cm, kemudian ditutup dengan kasa steril untuk mengantipasi apabila probandus melakukan aktivitas lain, kemudian didiamkan selama 15-20 menit untuk mengamati perubahan yang terjadi seperti kemerahan, gatal, atau pembengkakan pada kulit (Febriani *et al.*, 2022).

10.10. Uji stabilitas. Uji stabilitas sediaan dilakukan menggunakan metode *cycling test*. Cara ini dilakukan menyimpan sediaan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ dengan waktu 24 jam. Sediaan uji dipindahkan ke suhu 40°C selama 24 jam (satu siklus). Pengujian sediaan ini dilakukan dari siklus 1 sampai siklus 6 (Febriani, 2021). Setelah siklus selesai, dilakukan uji organoleptis, uji homogenitas, uji

pH, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat, uji lama waktu mengering.

11. Pengujian antioksidan dengan Metode DPPH

11.1. Pembuatan larutan DPPH. Pembuatan larutan DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM dalam pelarut metanol *p.a* dengan menimbang serbuk DPPH sebanyak 15,8 mg lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur ad 100 mL yang telah dilapisi *aluminum foil* agar terhindar dari cahaya matahari langsung. Senyawa DPPH diketahui tidak stabil pada waktu menjadi larutan sehingga larutan DPPH dibuat selalu baru dan secukupnya.

11.2. Penetapan panjang gelombang maksimum DPPH. Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum dilakukan dengan memipet 1,0 mL larutan induk DPPH 0,4 mM dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 mL dan ditambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas dan dihomogenkan. Larutan tersebut kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 450-550 nm. Panjang gelombang maksimum yaitu panjang gelombang yang mempunyai nilai absorbansi yang paling tinggi (Nurdianti *et al.*, 2024).

11.3. Pengukuran *operating time*. Pengukuran *operating time* dilakukan dengan memipet 1,0 mL larutan induk DPPH 0,4 mM dan 1,0 mL larutan pembanding kuersetin, dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 mL, kemudian menambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas (Hasriyani *et al.*, 2022). Kemudian diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan dengan interval waktu 2 menit dan dilakukan hingga diperoleh absorbansi yang stabil dan tidak terlihat adanya penurunan absorbansi (Satria *et al.*, 2022).

11.4. Pengukuran serapan blanko. Pengukuran dapat dilakukan dengan memipet 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dimasukkan pada labu tentukur 5 mL lalu menambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas. Campuran larutan tersebut digojok sampai homogen lalu dibiarkan selama 30 menit, kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-vis. Pengukuran serapan blanko dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dengan cara yang sama untuk serapan blanko kuersetin, serapan blanko ekstrak daun kersen dan serapan blanko sediaan *Clay mask* (Sami, 2016).

11.5. Pembuatan larutan stok dan uji aktivitas antioksidan kuersetin . Pembuatan larutan stok kuersetin dengan menimbang 10 mg serbuk kuersetin dilarutkan metanol *p.a* pada labu tentukur 100 mL sehingga dihasilkan konsentrasi 100 ppm. Larutan tersebut dibuat 5 seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm dengan cara memipet larutan stok kuersetin dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan dilarutkan metanol *p.a* sampai tanda batas. Dari masing-masing seri konsentrasi tersebut dipipet 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM ke dalam labu tentukur 5 mL dan dilarutkan dengan metanol *p.a* sampai tanda batas dan kemudian didiamkan sesuai dengan *operating time* yang telah ditentukan dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Putu *et al.*, 2021).

11.6. Pembuatan larutan stok dan uji aktivitas antioksidan ekstrak daun kersen. Menimbang 10 mg ekstrak daun kersen kemudian melarutkan dengan metanol *p.a* sampai larut dan memasukkan ke dalam labu tentukur 50 mL. Kemudian menambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas dan sampai memperoleh konsentrasi 200 ppm. Larutan stok ekstrak dibuat pengenceran 5 seri konsentrasi yaitu 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm dengan cara dipipet kemudian dimasukkan labu tentukur 10 ml lalu ditambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas dan dihomogenkan. Masing- masing seri konsentrasi dipipet 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan metanol *p.a* ke dalam labu tentukur 5 mL dan dihomogenkan. Larutan didiamkan selama 30 menit kemudian dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-vis (Islamiyati dan Saputri, 2018).

11.7. Pembuatan larutan Stok dan uji aktivitas antioksidan sediaan Clay mask. Pembuatan larutan stok sediaan *Clay mask* dilakukan dengan menimbang sediaan *Clay mask* setara ekstrak daun kersen dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL dan melarutkan dengan metanol *p.a* sampai tanda batas lalu divortex hingga homogen sampai memperoleh konsentrasi 300 ppm. Larutan tersebut dibuat pengenceran 5 seri konsentrasi yaitu 30 ppm, 60 ppm, 90 ppm, 120 ppm, dan 150 ppm. Masing- masing seri konsentrasi dipipet kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 mL dan ditambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas kemudian dihomogenkan. Larutan sampel masing-masing seri konsentrasi

dipipet 1 mL kemudian dimasukkan tabung reaksi yang berisi larutan DPPH sebanyak 1 mL dan ditutup dengan *aluminium foil*, kemudian disonifikasi sampai tercampur dan biarkan selama 30 menit. Kemudian dibaca serapannya menggunakan spektrofotometer UV-vis dengan gelombang maksimum yang sudah didapatkan kemudian menghitung presentase inhibisinya (Nurdianti *et al.*, 2024).

11.8. Pembuatan larutan Stok dan uji aktivitas antioksidan sediaan Pemanding. Pembuatan larutan stok sediaan pasaran dilakukan dengan menimbang sediaan 50mg dalam labu tentukur 100 mL dan melarutkan dengan metanol *p.a* sampai tanda batas lalu divortex hingga homogen sampai memperoleh konsentrasi 500 ppm. Larutan tersebut dibuat pengenceran 5 seri konsentrasi yaitu 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, dan 300 ppm. Masing-masing seri konsentrasi dipipet kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan ditambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas kemudian dihomogenkan. Larutan sampel masing-masing seri konsentrasi dipipet 1 mL kemudian dimasukkan tabung reaksi yang berisi larutan DPPH sebanyak 1 mL dan ditutup dengan *aluminium foil*, kemudian disonifikasi sampai tercampur dan biarkan selama 30 menit. Kemudian dibaca serapannya menggunakan spektrofotometer UV-vis dengan gelombang maksimum yang sudah didapatkan kemudian menghitung presentase inhibisinya (Nurdianti *et al.*, 2024).

11.9. Penetapan IC₅₀. Hasil kurva regresi linier antara presentase penghambatan dan berbagai konsentrasi sampel *Clay mask* dan kuersetin digunakan untuk menghitung IC₅₀ (Ambarwati *et al.*, 2021). Untuk menentukan nilai IC₅₀, data antioksidan dianalisis menggunakan persamaan linier $y = bx + a$. Ekstrak daun kersen (*Muntingia Calabura* L.) Data antioksidan DPPH diperiksa, dan nilai IC₅₀ ditentukan. Microsoft Excel digunakan untuk memproses data absorbansi, dan persamaan linier yang dapat diterapkan pada analisis data dibuat. Dengan menghitung persentase penghambatan penyerapan DPPH menggunakan rumus berikut, kuantitas penghambatan DPPH oleh radikal bebas digunakan untuk memperkirakan aktivitas antioksidan sampel: (Rahmawati *et al.*, 2015).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs DPPH}} \times 100\%$$

Keterangan :

Absorbansi DPPH = larutan DPPH tidak mengandung sampel

Absorbansi sampel = larutan DPPH mengandung sampel

Rumus persamaan regresi linier digunakan untuk mendapatkan nilai IC_{50} setiap konsentrasi. Sumbu x mewakili konsentrasi sampel, sedangkan sumbu y mewakili persentase penghambatan (Rahmawati *et al.*, 2016). Rumus berikut dapat digunakan untuk mencari nilai IC_{50} :

$$Y = bx + a$$

Keterangan :

Y : 50 % Inhibisi

a : Intercept (Pemotongan garis di sumbu Y)

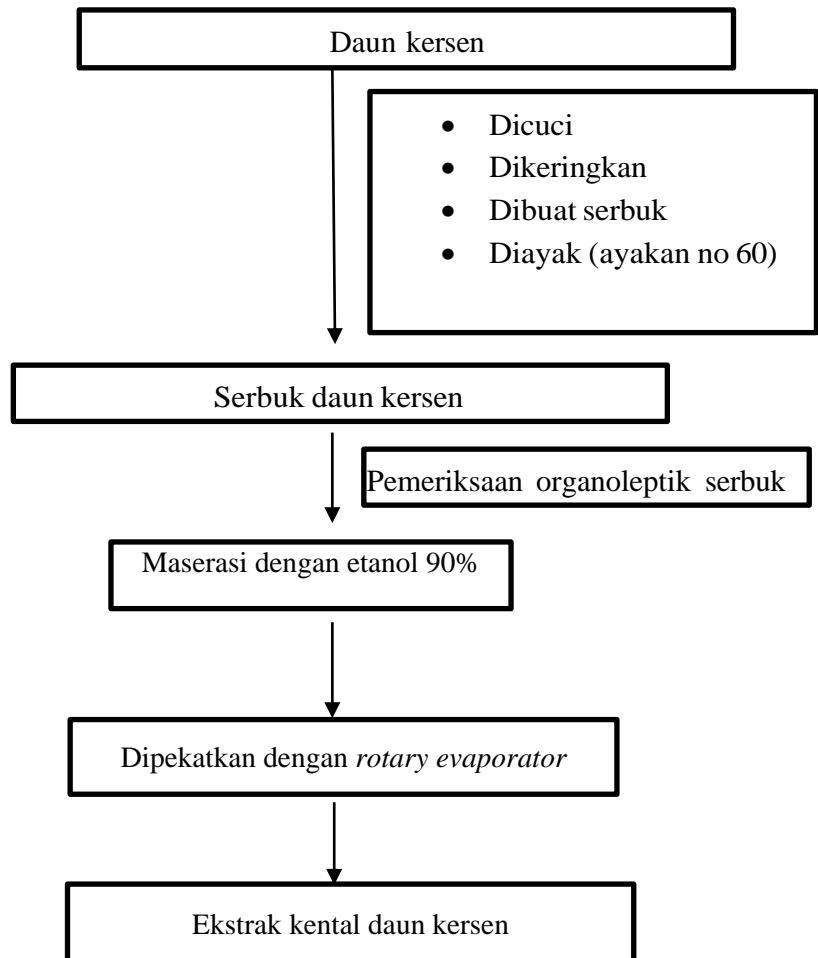
b : Slope

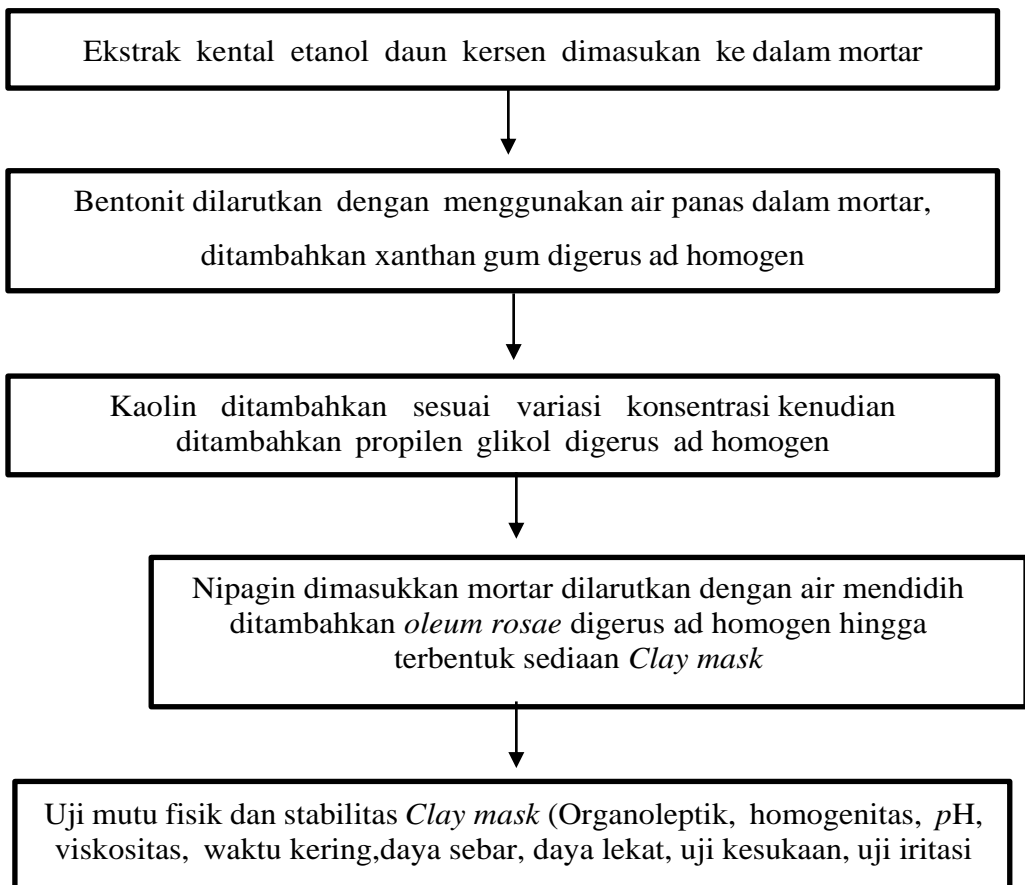
(Kemiringan)

X : Konsentrasi

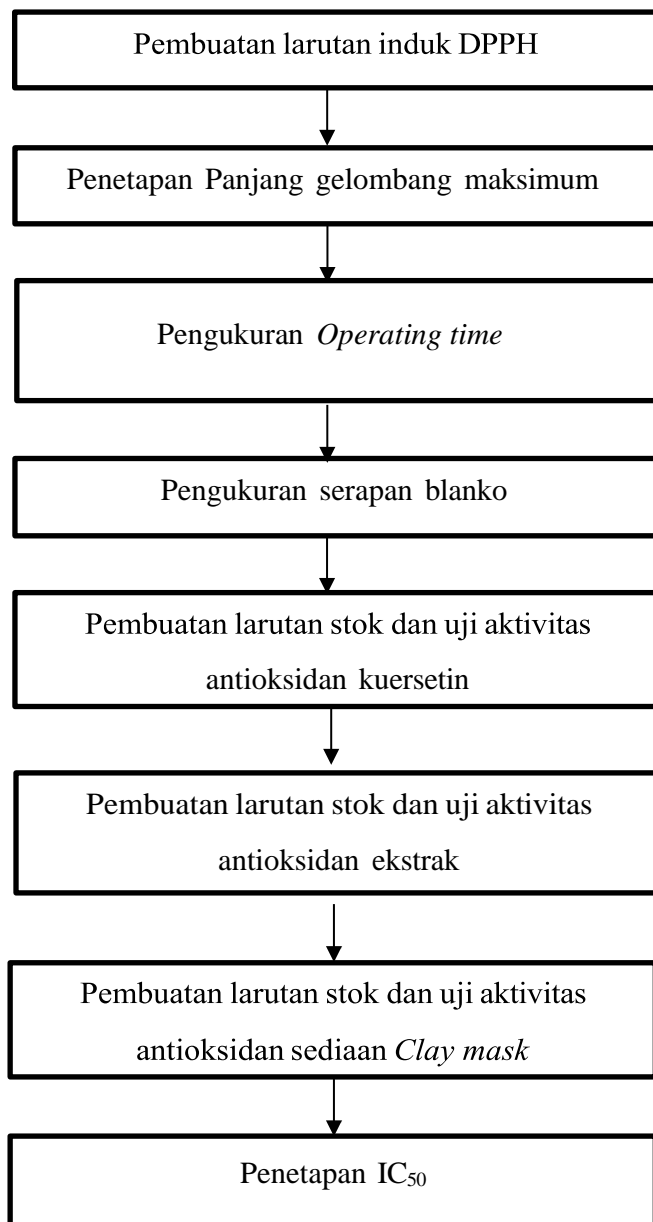
E. Analisis Data

Perangkat lunak SPSS akan digunakan untuk menilai hasil uji beberapa kriteria, meliputi jenis *Clay mask*, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat, viskositas, homogenitas, dan uji antioksidan. Analisis *Shapiro-Wilk* digunakan untuk memeriksa hasil uji; jika ditemukan berdistribusi normal, maka dilakukan analisis *One-Way Anova*, diikuti dengan uji *Post Hoc*. Persamaan regresi linier dan estimasi IC_{50} digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan secara *in vitro* menggunakan metode DPPH dengan larutan pembanding quersetin.

F. Skema Penelitian**Gambar 5. Skema Ekstraksi Daun Kersen**



Gambar 6. Skema Pembuatan *Clay mask*



Gambar 7. Pengujian Aktivitas Antioksidan *Clay mask* Ekstrak Etanol Daun Kersen