

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi Pada penelitian ini, masker *gel peel off* ekstrak etanol umbi bit (*Beta vulgaris L*) digunakan dengan berbagai macam bahan *gelling agent*, termasuk karbopol 940 dan HPMC.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah masker *gel peel off* ekstrak etanol umbi bit (*Beta vulgaris L*) dengan variasi bahan *gelling agent* karbopol 0,75%; karbopol 0,25% dan HPMC 0,25%; HPMC 1% tanpa ditambah karbopol ; karbopol 1% tanpa ditambah HPMC.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Dalam penelitian ini, variabel utama pertama adalah konsentrasi bahan *gelling agent* dalam formulasi masker *gel peel off* ekstrak etanol umbi bit (*Beta vulgaris L*). Variabel utama kedua adalah kualitas fisik dan stabilitas masker *gel peel off* ekstrak etanol umbi bit (*Beta vulgaris L*). Variabel utama ketiga adalah kandungan antioksidan masker *gel peel off* ekstrak etanol umbi bit (*Beta vulgaris L*).

2. Klasifikasi variabel utama

Ada tiga kategori variabel utama yang telah diidentifikasi sebelumnya: variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol. Variabel bebas adalah variabel yang berfungsi secara independen tanpa terpengaruh oleh variabel lain. Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena adanya variabel bebas dan faktornya diamati serta diukur. Variabel terkontrol yang mempengaruhi variabel tergantung harus diakui dan dinetralisir agar peneliti lain tidak dapat mengulang hasilnya secara menyeluruh.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi bahan pembentuk gel yaitu HPMC dan karbopol 940 dalam formulasi masker *gel peel off* ekstrak etanol umbi bit (*Beta vulgaris L*).

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah mutu fisik sediaan masker *gel peel off* (homogenitas, organoleptis, viskositas, pH, daya sebar, daya lekat, waktu kering) dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol umbi bit terhadap DPPH.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah proses pembuatan masker gel *peel off* ekstrak etanol umbi bit, kondisi laboratorium, bahan dan alat yang digunakan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, umbi bit adalah tanaman rumput termasuk jenis akar tunggang yang akarnya akan tumbuh menjadi umbi, diambil secara acak dari daerah Batu.

Kedua, ekstrak etanol adalah ekstrak yang berasal dari simplisia umbi bit yang telah disari dan diuapkan etanolnya menjadi ekstrak pekat.

Ketiga, masker gel *peel off* adalah sediaan masker dari ekstrak etanol umbi bit dengan perbedaan konsentrasi bahan pembentuk gel dalam formulasi.

Keempat, uji antioksidan DPPH adalah reaksi yang terjadi ketika atom hidrogen dari substansi yang mengandung antioksidan menjadi donor membentuk senyawa tereduksi.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol coklat gelap besar, botol vial, labu ukur 100 mL, kertas saring, gelas ukur, batang pengaduk, pipet tetes, mortar, stamper, timbangan analitik, blender, evaporator, *beaker glass*, pisau, spektrofotometri UV-Vis.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bit yang diperoleh dari daerah Batu, bahan untuk formulasi seperti PVA, propylene glikol, metil paraben, karbopol 940, HPMC, akuades, etanol 70%, metanol *p.a*, serbuk DPPH, serbuk vitamin C, HCl, magnesium, besi (III) klorida, kloroform, asam sulfat pekat.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman umbi bit adalah proses menetapkan kebenaran sampel tanaman umbi bit; tujuan determinasi adalah untuk menentukan keaslian yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman. Metode ini digunakan untuk melakukan identifikasi tanaman. Hasil pengukuran tanaman dilakukan di Laboratorium Materia Medica Batu, seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 1.

2. Pengambilan dan penyiapan simplisia

Umbi bit (*Beta vulgaris* L) dipilih yang siap panen berusia 3-4 bulan dari masa tanam. Semakin tua tanaman bit maka kandungan gula juga semakin tinggi sehingga rasanya bertambah manis. Sampel dilakukan sortasi basah, dicuci dan dibersihkan kulitnya dengan dikupas lalu umbi bit dikumpulkan dan ditimbang sebanyak 3 kg kemudian dipotong dan di blender agar halus untuk pembuatan ekstrak.

3. Ekstrak umbi bit

Setelah umbi bit dikupas, dicuci, dan ditiriskan untuk diblender, umbi bit dimaserasi dengan perbandingan 1:4 (ekstrak: etanol 70%) kali bobot umbi bit selama satu hari. Setelah hasil maserasi disaring menggunakan kain flanel, kertas filter digunakan untuk membuat filtrat bersih. Setelah itu, filtrat diuapkan menggunakan evaporator pada suhu 54°C sampai kental.

4. Penetapan parameter non spesifik ekstrak umbi bit

4.1. Penetapan susut pengeringan. Ekstrak umbi bit ditimbang secara seksama sebanyak 1 – 2 gram lalu dimasukkan kedalam cawan krusibel atau porselen tertutup yang telah ditara dan dipanaskan sebelumnya pada suhu 105°C selama 30 menit. Ekstrak diratakan dalam cawan dengan menggoyangkan hingga terbentuk lapisan tipis untuk kemudian dimasukkan kedalam ruang pengering atau oven dengan tutup yang terbuka hingga bobot ekstrak tetap. Sebelum dimasukkan kedalam pengering cawan dibiarkan mendingin dalam eksikator hingga suhu ruang untuk kemudian dikeringkan kembali hingga bobot konstan.

4.2. Penetapan bobot jenis. Penetapan dilakukan dengan menggunakan piknometer yang telah dibersihkan, kering, dan terkalibrasi. Masukkan ekstrak cair ke dalam piknometer dan atur suhunya hingga 25°C. Kemudian, ekstrak yang lebih besar dibuang dan ditimbang. Suhu piknometer yang telah diisi dikurangi dari bobot kosongnya pada suhu 25°C.

5. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak umbi bit

Tujuan identifikasi kandungan senyawa kimia adalah untuk menentukan zat kimia yang ada dalam ekstrak etanol umbi bit. Senyawa kimia ini diidentifikasi di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi, Surakarta, dan termasuk alkaloid, flavonoid, saponin, dan minyak atsiri.

5.1. Flavanoid. Uji dilakukan dengan menasukkan ekstrak umbi bit yang telah diencerkan menggunakan etanol sebanyak 1 mL ke

dalam tabung reaksi kemudian dibasahkan dengan seton, ditambahkan serbuk asam borat sedikit dan serbuk halus asam oksalat, panaskan hati-hati diatas penangas air hindari pemanasan berlebih. Residu sisa pemanasan ditambahkan eter 10 mL mengamati larutan dibawah sinar UV 366 nm jika larutan berfluoresensi kuning intensif menunjukkan adanya flavonoid (Depkes, 1989).

5.2. Glikosida. Pengujian dilakukan dengan reaksi Lieberman-Burchard. Ekstrak dilarutkan pada pelarut etanol lalu diuapkan diatas penngas air, residu dilarutkan dengan 5 mL asam asetat anhidrat ditambahkan 10 tetes asam sulfat. Hasil positif glikosida jika terbentuk endapan berwarna biru atau hijau (Depkes RI, 1989).

5.3. Triterpenoid dan steroid. Ekstrak kental sebanyak 2 mL diuapkan dalam cawan penguap. Residu dilarutkan dalam 0,5 mililiter kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mililiter asam asetat anhidrat. satu mililiter asam sulfat pekat ditambahkan melalui dinding tabung. Steroid dan triterpenoid akan membentuk cincin biru atau hijau, dan perbatasan larutan akan berwarna merah kecoklatan atau violet (Depkes, 1989).

5.4. Alkaloid. Larutan ekstrak yang telah diencerkan dengan etanol sebanyak 2 mL diuapkan diatas penngas air menggunakan cawan porselin untuk memperoleh residu. Residu dilarutkan dengan 5mL HCl 2N, larutan tersebut dibagi 3 bagian dalam tabung reaksi. Dalam tabung pertama, air ditambahkan sebagai blangko. Dalam tabung kedua, pereaksi Dragendroff ditambahkan tiga tetes hasil positif jika terbentuk endapan jingga. Dalam tabung ketiga, pereaksi Mayer ditambahkan tiga tetes hasil positif jika terbentuk endapan kuning. (Farnsworth,1966).

6. Formulasi masker gel peel off ekstrak etanol umbi bit

Tabel 1. Formula masker gel peel of ekstrak etanol umbi bit

Nama zat	Jumlah zat dalam formula (% b/v)				Basis
	Formula	Formula	Formula	Formula	
	1	2	3	4	
Ekstrak etanol umbi bit	1	1	1	1	-
PVA	10	10	10	10	10
Propylen glycol	20	20	20	20	20
Carbopol 940	1	0,75	0,25	-	0,75
HPMC	-	0,25	0,75	1	0,25
Trietanolamin	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Metil paraben	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Parfum	3 gtt	3 gtt	3 gtt	3 gtt	3 gtt
Air suling	Ad 100 mL	Ad 100 mL	Ad 100 mL	Ad 100 mL	Ad 100 mL

7. Pembuatan masker gel peel off ekstrak etanol umbi bit

Polivinil alkohol dilarutkan dalam aqua destilata sebanyak 4 kali berat PVA yang dipanaskan dalam penangas air $\pm 100^{\circ}\text{C}$ sampai PVA terlarut sempurna. Karbopol 940 dilarutkan dalam sebagian air panas sebanyak 10 kali berat karbopol sampai mengembang ditambahkan trietanolamin, ditambahkan polivinil alkohol yang telah melarut lalu campurkan hingga homogen. Metil paraben dilarutkan dalam sebagian propilen glikol sampai melarut campurkan dengan ekstrak etanol umbi bit yang dilarutkan dalam sebagian propilen glikol. Basis karbopol dan polivinil alkohol dicampurkan dengan bahan metil paraben serta propilen glikol yang telah bercampur dengan ekstrak. HPMC dilarutkan dalam air sebanyak 7 kali berat HPMC lalu ditambahkan dalam campuran basis dan ekstrak.

8. Uji mutu fisik masker gel peel off ekstrak etanol umbi bit

8.1. Pemeriksaan homogenitas. Pengukuran ini dilakukan dengan meletakkan kaca objek di atas kaca preparat yang telah dioleskan satu gram sediaan masker gel peel off. Setelah itu, diamati apakah masker memiliki butiran kasar, teksturnya rata, atau tidak menggumpal (Reveny *et al* 2016).

8.2. Pemeriksaan organoleptis. Uji organoleptis masker gel peel-off dilakukan untuk mengukur keadaan fisik gel dengan menguji bau, warna, bentuk, atau konsistensi dari sediaan yang telah dicampur dengan basis. Pengujian pertama dilakukan saat sediaan jadi pada hari pertama. Sediaan disimpan sampai 3 minggu untuk di uji organoleptik kembali setiap minggunya (Voight 1994). Pengujian ini bersifat subjektif karena setiap orang memiliki kepekaan panca indera yang berbeda-beda (Sukmawati *et al* 2013).

8.3. Pemeriksaan viskositas. Untuk menguji viskositas, sampel dimasukkan ke dalam wadah sampai spindel terendam dan dapat memutar. Spindel akan memutar melalui pegas yang telah terkalibrasi hasil defleksi pegas akan muncul pada pointer.

8.4. Pemeriksaan pH. Pengukuran pH dilakukan dengan kalibrasi pH meter; kalibrasi dilakukan pada larutan buffer dengan pH 7 dan 4, dan kemudian, untuk mengukur kadar pH sediaan, elektroda dicelupkan ke dalam sediaan masker. Angka pH meter dibiarkan berjalan sampai menunjukkan nilai tetap, dan nilai pH yang ditunjukkan pada layar dicatat (Froelich *et al* 2017).

8.5. Pemeriksaan daya sebar. Uji dilakukan dengan meletakkan satu gram sediaan pada kaca bulat dengan skala dan kemudian menutup

kaca dengan berat sebelumnya selama satu menit. Kemudian, beban 50 gram ditambahkan dengan kelipatan 50 gram sampai 250 gram. Selanjutnya, panjang sediaan yang menyebar dihitung dengan menghitung panjang rata-rata berbagai sisi. Hasil untuk setiap penambahan beban dicatat (Voigt 1994).

8.6. Pemeriksaan daya lekat. Uji dilakukan dengan meletakkan sediaan pada objek glass yang tersedia pada alat seberat 1 g yang kemudian ditutup dengan objek glass lainnya dan ditekan beban 250 g selama 5 menit. Pelepasan objek glass dengan menarik tuas yang terdapat beban 80 g. Waktu yang dibutuhkan objek glass dapat terlepas dicatat (Septiani *et al*, 2011).

8.7. Pemeriksaan waktu kering. Uji dilakukan menggunakan metode *in vitro* dengan tujuan untuk mengetahui waktu estimasi yang dibutuhkan formulasi untuk mengering seluruhnya. Sediaan masker ditimbang 0,7 g setiap formula kemudian dioleskan pada piring kaca dengan area seluas 5,0x2,5 cm dengan ketebalan tertentu. Piring kaca tersebut dipanaska pada oven dengan suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sesuai dengan suhu pada kulit. Monitoring dilakukan setiap 5 menit sampai kering sempurna yang ditandai permukaan sediaan halus dan tidak menempel ketika disentuh. Hasil uji dirata-rata dengan replikasi 3 kali (Beringhs *et al* 2013).

8.8. Pemeriksaan uji iritasi. Metode *Draize Test* digunakan untuk menguji potensi iritasi dan kepekaan kulit. Ini dilakukan dengan mengoleskan sediaan pada kulit kelinci albino dan kulit yang utuh untuk menguji potensi iritasi atau tidak. Pengujian dilakukan dengan tertutup terhadap 3 kelinci albino sehat, dengan berat 1-2 kg, usia 8-9 bulan. Uji ini dilakukan dengan mencukur bulu kelinci sampai terlihat bagian kulit lalu ditandai menjadi 6 bagian untuk mengoleskan sediaan pada kulit kelinci. Badan kelinci yang telah dioles sediaan sebanyak 0,5 gram dengan diameter 1 cm lalu ditutup dan dibungkus dengan perban atau kasa selama waktu pengujian. Pembungkusan untuk menjaga agar bahan yang akan ditest tetap diposisi semula dan mencegah bahan yang menguap. Sebelum bahan uji ditempelkan, kulit tempat aplikasi sampel diamati, serta pada 0, 24, 48, dan 72 jam setelah bahan uji dilepas.

Untuk mengetahui seberapa parah iritasi, skor diberikan dari 0 hingga 4 berdasarkan intensitas reaksi eritema dan edema pada kulit. Tanpa eritema: 0, sangat sedikit eritema (hampir tidak terlihat): 1, eritema jelas terlihat (diameter 25,1–30 mm): 2, eritema sedang

(diameter 30,1-35 mm): 3, eritema berat (diameter lebih dari 35 mm): 4, tanpa edema: 0, sangat sedikit eritema (hampir tidak terlihat): 1, edema tapi berbatas jelas (ketebalan <1 mm): 2, eritema sedang (tepi naik \pm 1 mm): 3, eritema berat (tepi naik lebih dari 1 mm). Masing-masing bahan uji di hitung indeks iritasi dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Indeks iritasi} = \frac{(\text{skor eritema } 24+48+72) + (\text{skor edema } 24+48+72)}{\text{jumlah kelinci}}$$

Tidak mengiritasi adalah 0,0, sangat sedikit iritasi adalah 0,1–0,4, sedikit iritasi adalah 0,41–1,9, iritasi sedang adalah 2,0–4,9, dan iritasi parah adalah 5,0–8,0. Indeks iritasi dibandingkan dengan nilai derajat iritasi untuk menentukan tingkat reaksi iritasi (Sukandar 2006; Pansang *et al.* 2010; Laras AAIS *et al.* 2014).

8.9. Pemeriksaan uji kesukaan. Uji kesukaan, juga dikenal sebagai uji hedonik, adalah uji penerimaan yang dilakukan untuk mengetahui seberapa baik panelis menerima produk yang dibuat. Terdapat beberapa parameter yaitu bau masker, rasa kencang saat digunakan dan kehalusan masker saat di aplikasikan pada permukaan kulit. Skala hedonik yang dihasilkan berkisar 1 - 5, dimana: (1) tidak suka; (2) sedikit suka; (3) normal; (4) suka (5) sangat suka. Uji hedonik yang dilakukan menggunakan panelis sebanyak 10 orang usia 25-35 tahun (Carpenter *et al* 2000). Uji dilakukan pada bagian punggung tangan dengan berat 0,5 gram masker untuk setiap formula yang akan digunakan untuk pengujian.

9. Pemeriksaan aktivitas antioksidan

9.1. Pembuatan larutan DPPH 80 ppm. Dalam vial yang dibungkus alumunium foil, serbuk DPPH 8 mg ditimbang dan dilarutkan dengan metanol *p.a* dengan pipet. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL yang dibungkus alumunium foil, bilas sampai bersih hingga tanda batas labu ukur. Larutan kemudian dikocok hingga konsentrasinya mencapai 80 ppm.

9.2. Pembuatan larutan pembanding vitamin C. Setelah menimbang 10 mg serbuk vitamin C, tambahkan metanol pada labu ukur 100 mL sampai tanda batas, sehingga diperoleh kadar 100 ppm. Dari kadar ini, dibuat seri konsentrasi sebesar 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm.

9.3. Penentuan panjang gelombang maksimal larutan DPPH 80 ppm. Untuk mengukur panjang gelombang, gunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400-600 nm untuk

mengukur 2 mL larutan DPPH 80 ppm yang ditambahkan dengan 2 mL metanol *p.a*. Hasilnya adalah absorbansi $\pm 0,2$ hingga 0,8.

9.4. Penentuan operating time larutan DPPH. Reaksi dua mililiter baku pembanding vitamin C 10 ppm dengan dua mililiter larutan DPPH 80 ppm digunakan untuk menghitung waktu operasional. Pada panjang gelombang maksimal yang telah diperoleh, absorbansi diukur sampai menit 60.

9.5. Pembuatan larutan uji ekstrak umbi bit. Kadar antioksidan ekstrak, yang berjumlah 282 mg dilarutkan dengan metanol *p.a* ditambahkan ke labu ukur 100mL sampai konsentrasi 2820 ppm dicapai. Dari konsentrasi 2820 ppm, larutan stok dibuat dalam seri konsentrasi 56, 112, 141, 197, dan 253 ppm.

9.6. Pembuatan larutan uji sediaan masker *gel peel off*. Sediaan masker diambil sebanyak 2,5 g untuk mendapatkan kadar 2500 ppm lalu dicukupkan sampai 100 mL menggunakan pelarut metanol dalam labu takar 100 mL. Larutan 2500 ppm dipipet sebanyak 1, 2, 3, 4, 5 mL kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dicukupkan sampai tanda batas dengan metanol *p.a* untuk mendapatkan konsentrasi 2500, 5000, 7500, 10000, 12500 ppm.

Sediaan yang dibandingkan dengan sediaan adalah merk masker Hanasui *peel off black*. Masker hanasui diambil sebanyak 2,5 g dilarutkan dengan metanol *p.a* di dalam labu takar 100 mL sampai tanda batas didapatkan konsentrasi 50.000 ppm. Larutan 50.000 ppm dipipet sebanyak 1, 2, 3, 4, 5 mL kemudian dimasukkan labu takar 10 mL dicukupkan sampai tanda batas dengan metanol *p.a* didapatkan konsentrasi 5000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000 ppm.

9.7. Pengujian aktivitas antioksidan. Pengujian dilakukan terhadap ekstrak dan sediaan masker yang memiliki hasil pemeriksaan mutu fisik baik serta tidak menimbulkan iritasi. Pengujian sediaan masker dilakukan dengan menyetarakan berat ekstrak yang terkandung dalam masker terhadap kadar ekstrak yang diuji antioksidannya. Untuk mengukur aktivitas antioksidan, 2 mL konsentrasi masing-masing dipipet ke dalam vial dengan pipet mikro dan larutan DPPH 80 ppm ditambahkan. Setelah campuran digabungkan, tunggu selama waktu operasi di tempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum DPPH. Dengan menghitung presentase inhibisi serapan DPPH, aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh tingkat hambatan serapan radikal DPPH.

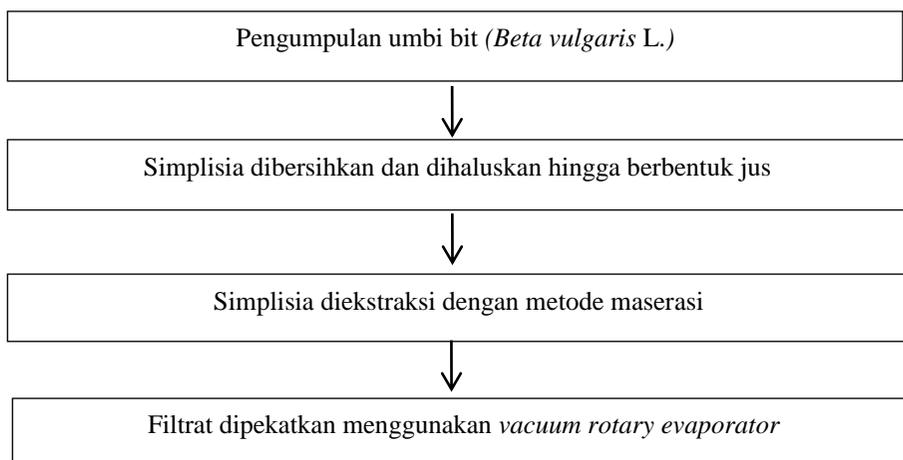
E. Analisis Hasil

Berbagai hasil pemeriksaan, seperti homogenitas, organoleptis, viskositas, pH, daya lekat, daya sebar, waktu kering, iritasi, kesukaan, dan perbandingan dengan literatur, dapat digunakan untuk mengevaluasi hasil penelitian ini. Metode Kolmogorv-Smimov digunakan untuk menganalisis data yang dikumpulkan dengan hasil distribusi normal ($\text{sig} > 0,05$). Selanjutnya, uji One Way ANOVA digunakan, tetapi uji Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, dan Wilconxon dapat digunakan untuk menganalisis data yang tidak terdistribusi secara normal.

Hasil uji kesukaan (hedonik) dapat dianalisa menggunakan metode frekuensi untuk mengetahui persentase masing-masing tingkat kesukaan dan dilanjutkan dengan metode *Chi-Square* untuk adanya perbedaan bau masker, rasa kencang saat digunakan dan kehalusan masker saat di aplikasikan pada permukaan kulit dari semua formula.

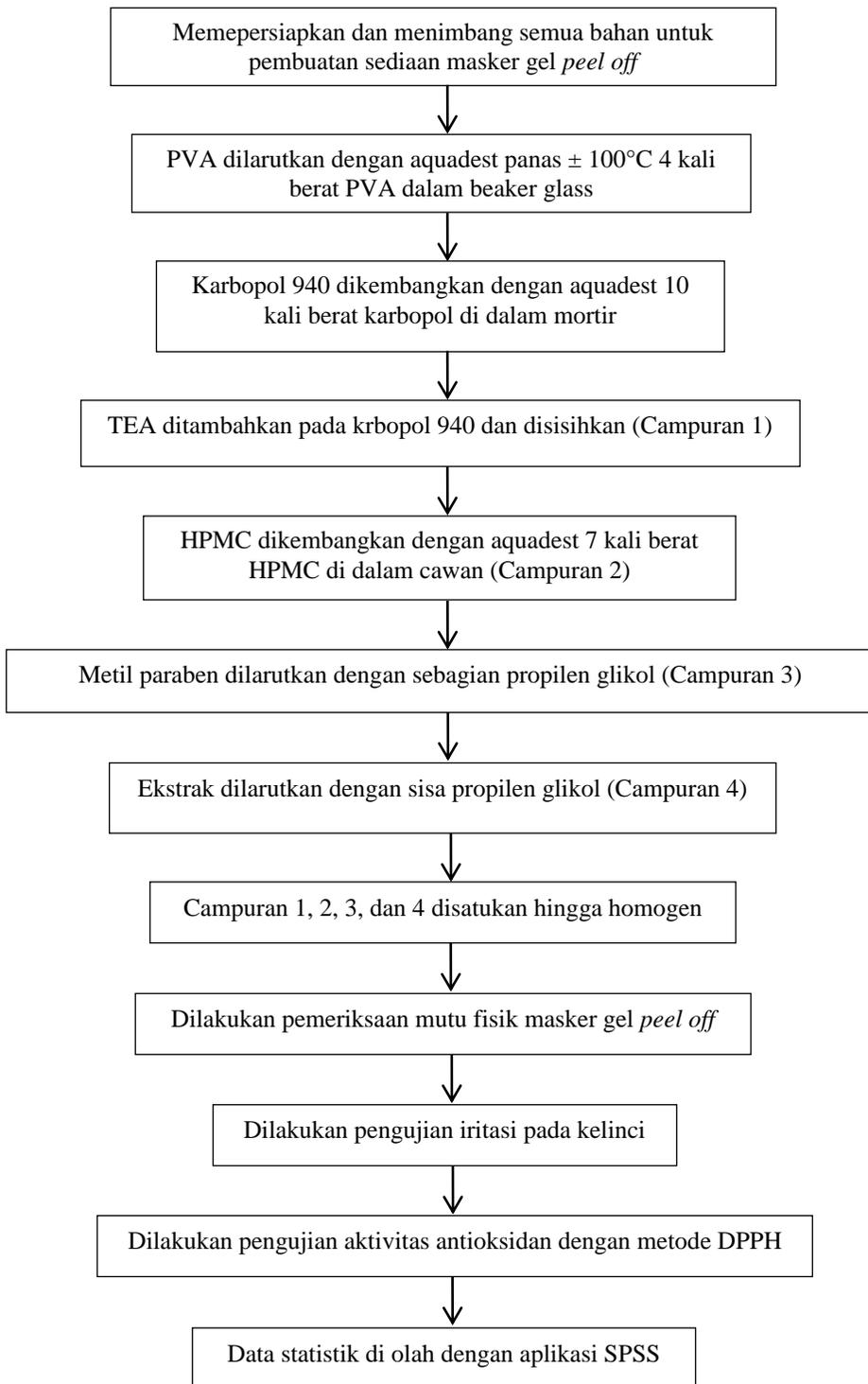
F. Skema Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak umbi bit



Gambar 2. Proses pembuatan ekstrak umbi bit

2. Pembuatan masker gel peel off ekstrak umbi bit



Gambar 3. Proses pembuatan masker gel peel off ekstrak umbi bit