

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi mencakup semua objek yang menjadi subjek penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan untuk melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah daun stroberi yang dibuat menjadi ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*). Variabel kedua dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*). Variabel ketiga dalam penelitian ini adalah efek *anti aging* ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) pada kelinci *New Zealand*.

2. Klasifikasi variabel utama

Klasifikasi utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel yang diteliti terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*).

Variabel tergantung adalah variabel yang berubah karena variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas *anti aging* ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) pada kulit punggung kelinci *New Zealand*

Variabel terkendali merujuk pada variabel yang dianggap mempengaruhi variabel yang bergantung selain dari variabel bebas. Dalam penelitian ini, variabel terkendali meliputi peneliti, kondisi laboratorium, spesifikasi kelinci *New Zealand*, termasuk umur, jenis kelamin, pakan, aktivitas, kesehatan, dan berat badan kelinci.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun stroberi adalah daun yang berasal dari tanaman stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang diperoleh di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah dengan kondisi daun masih muda, segar, tidak busuk, dan berwarna hijau.

Kedua, serbuk daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) adalah yang dibuat dengan mencuci daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang kemudian dihaluskan dan dikeringkan, lalu diayak menggunakan ayakan mesh 40 hingga diperoleh serbuk kering dan halus.

Ketiga, ekstrak daun stroberi adalah hasil maserasi dari daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) dengan etanol 96%, filtrat dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator hingga didapatkan ekstrak kental.

Keempat, variasi konsentrasi ekstrak kental daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak paling baik.

Kelima, pengujian aktivitas *anti aging* ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) terhadap kelinci *New Zealand* menggunakan *skin analyzer* dengan parameter persentase kolagen, persentase elastisitas, dan persentase kelembaban.

Keenam, derajat iritasi ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang ditandai dengan eritema dan udemata terhadap kelinci *New Zealand*.

Tabel 1 Definisi Operasional Variabel Utama

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Uji Iritasi	Status kulit dan mata kelinci setelah pemberian ekstrak	Pengamatan visual	Skala iritasi	Ordinal
Kolagen	Alat akan menunjukkan persentase kolagen	<i>Skin Analyzer</i>	Persentase kolagen	Rasio
Elastisitas	Alat akan menunjukkan persentase elastisitas	<i>Skin Analyzer</i>	Presentasi elastisitas	Rasio
Kelembaban kulit	Alat akan menunjukkan persentase kelembaban kulit	<i>Skin Analyzer</i>	Persentase kelembaban kulit	Rasio

Skala penilaian, yang dikenal sebagai skala ordinal, memiliki nilai yang lebih tinggi daripada skala nominal. Pada skala penilaian, lambang bilangan hasil pengukuran tidak hanya menunjukkan perbedaan, tetapi juga urutan atau tingkatan objek pengukuran berdasarkan ciri-ciri tertentu. Skala rasio memiliki kualitas data yang

paling tinggi. Skala rasio memiliki semua sifat dari skala nominal, ordinal, dan interval, serta memiliki sifat nilai nol mutlak atau konstan (Junaidi, 2015).

Skala iritasi adakah kondisi kulit hewan uji yang mengalami eritema dan edema yang timbul sebelum maupun sesudah dioles ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang dilihat melalui pengamatan secara visual. Kadar kolagen adalah jumlah kolagen kulit hewan uji yang dioleskan ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang diukur menggunakan *Skin Analyzer* EH900U. Elastisitas kulit adalah kekenyalan kulit hewan uji yang dioleskan ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang diukur menggunakan *Skin Analyzer* EH900U.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, bejana maserasi, mesin pembuat serbuk phillips, *moisture balance*, oven, ayakan mesh 40, *vacum rotary evaporator*, batang pengaduk, cawan porselin, cawan petri, gelas ukur, kain flanel, kertas saring, erlenmeyer, beaker glass, sudip, pot salep wadah ekstrak, dan alat *skin analyzer*.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun stroberi (*Fragaria x ananassa*).

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini yaitu etanol 96% dan aquadest.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kelinci jantan (galur *New Zealand*) berusia 5-8 bulan, berat 2-4 kg, kondisi sehat.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman bertujuan untuk menetapkan keaslian dan kemurnian dari tanaman stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang digunakan dalam penelitian. Determinasi dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri dan morfologi dari tanaman stroberi dengan

kunci determinasi atau pustaka yang dilakukan di Universitas Setia Budi, Surakarta.

2. Pengumpulan bahan

Tanaman daun ekstrak stroberi (*Fragaria x ananassa*) diperoleh di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang digunakan adalah daun yang masih muda hingga cukup tua, berwarna hijau, masih segar, tidak busuk, dan dalam kondisi baik.

3. Pengeringan bahan

Daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) dibersihkan dan dicuci terlebih dahulu dengan air bersih sebelum dibuat ekstrak. Simplisia daun stroberi yang sudah dibersihkan, kemudian dikeringkan dengan langsung dijemur dibawah sinar matahari untuk mengurangi kadar air, mencegah pembusukan akibat jamur atau bakteri, dan mencegah terjadinya perubahan kimiawi sehingga memudahkan proses pembuatan serbuk (Luliana *et al.*, 2016).

4. Pembuatan serbuk daun stroberi

Simplisia daun stroberi (*Fragaria x ananassa var Duchesne*) dilakukan penggilingan menggunakan alat pembuat serbuk, setelah itu diayak menggunakan ayakan mesh nomer 40. Bobot persen kering terhadap bobot persen basah ditentukan dengan menimbang kembali serbuk yang sudah diayak. Serbuk daun stroberi disimpan pada wadah kering dan tertutup rapat (Supomo *et al.*, 2016).

5. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan dilakukan menggunakan *Moisture Balance* di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Alat ditara terlebih dahulu dengan akurasi dan temperatur sesuai dengan jumlah simplisia yang diujikan. Sebanyak 2 gram serbuk daun stroberi dimasukkan ke dalam plat. Pengukuran dilakukan pada suhu 105°C sampai diperoleh bobot sampel konstan, kemudian catat angka dalam persen pada alat. Untuk meminimalisir kesalahan penetapan susut pengeringan lakukan sebanyak 2 kali. Kadar susut pengeringan dinyatakan dalam satuan persen.

6. Penetapan kadar air serbuk daun stroberi

Uji kadar air bertujuan untuk mengetahui batasan maksimal kandungan air didalam ekstrak (Endarini, 2016). Metode destilasi cocok untuk simplisia yang memiliki kandungan air tinggi, selain itu juga dapat digunakan dengan bahan yang mengandung lemak dan

mudah menguap. Kadar air dari metode destilasi mempunyai prinsip menggunakan pelarut yang tidak menguap karena air, tabung dengan volume terbaca digunakan untuk menampung air tersebut. Pelarut yang digunakan mempunyai berat jenis yang lebih kecil dari air, namun titik didih lebih besar dibandingkan dengan air. Air dan pelarut akan berpisah, kemudian air akan turun ke bawah. Toluena, benzena, dan xilen adalah beberapa contoh senyawa yang dapat digunakan sebagai pelarut dalam uji kadar air suatu simplisia (Legowo et al., 2007).

7. Pembuatan ekstrak daun stroberi

Pembuatan ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa var Duchesne*) dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk daun stroberi yang digunakan dalam pembuatan ekstrak sebanyak 700 gram, kemudian masukkan dalam botol maserasi tambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Rendam campuran serbuk daun stroberi dan etanol, digojog minimal 6 jam sekali atau sesering mungkin. Botol maserasi dalam keadaan tertutup dan terlindung dari cahaya matahari langsung selama 18 jam. Sampel disaring dengan kain flanel sebagai maserat I, lalu saring kembali menggunakan kertas saring sehingga didapatkan filtrat I. Proses pembuatan ekstrak dilakukan remaserasi. Remaserasi dilakukan dengan melarutkan kembali maserat I menggunakan pelarut yang sama yaitu etanol 96% dengan jumlah pelarut yang digunakan $\frac{1}{2}$ kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Sampel remaserasi disaring dengan menggunakan kain flanel, lalu saring kembali menggunakan kertas saring hingga didapatkan filtrat II. Filtrat I dan II dijadikan dalam satu wadah, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental dari daun stroberi.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

(Sayuti, 2015).

8. Identifikasi ekstrak daun stroberi

8.1. Pengamatan organoleptik. Identifikasi ekstrak daun tespong dilakukan secara organoleptik. Uji dilakukan untuk mengetahui ekstrak dengan pengamatan makroskopik, meliputi bentuk, warna, rasa, dan bau (Saryanti, 2016).

8.2. Identifikasi flavonoid. Serbuk simplisia sebanyak 1 gram dan 100 ml air dididihkan selama 15 menit kemudian saring.

8.3. Identifikasi tanin. Filtrat + larutan FeCl_3 1% 1 : 5 masukkan dalam tabung. Hasil positif ditunjukkan dengan warna biru tua atau kehijauan pada penambahan FeCl_3 1%.

8.4. Identifikasi fenol dengan FeCl_3 . Cara mendeteksi senyawa fenol sederhana adalah dengan menambahkan 1 mL larutan FeCl_3 1% dengan 5 mL ekstrak. Hasil positif apabila menunjukkan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat (Harbone, 2006).

8.5. Identifikasi saponin. 1 gram serbuk simplisia + 100 ml air panas + HCl 2N. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 100 ml kemudian dikocok secara vertikal selama 10 detik dan didiamkan selama 10 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil.

9. Konsentrasi ekstrak daun stroberi

Ekstrak dibuat dalam beberapa variasi konsentrasi diantaranya yaitu 0,25%; 0,5%; 1%; dan 1,5%. Penentuan variasi dilakukan dengan cara dilakukan orientasi terlebih dahulu.

10. Kontrol uji aktivitas

10.1 Kontrol positif. Kontrol positif dalam penelitian ini adalah sediaan gel yang berkhasiat sebagai *anti aging* yaitu Avoskin Your Skin Bae Glow Concentrate Treatment dengan kandungan polypeptide, multi probiome, acetyl glucosamine, dan red Algae. Produk ini merupakan moisturizer water based dengan tekstur gel ringan dan mudah menyerap. Selain menjaga kelembapan kulit wajah, moisturizer ini mengandung Polypeptide yang efektif untuk membantu menyamarkan garis halus dan kerutan, serta membuat permukaan kulit tampak lebih halus. Dipadukan dengan Acetyl Glucosamine, salah satu asam amino yang juga terdapat secara alami pada kulit yang berperan untuk membantu menjaga kesehatan dan tekstur kulit. Dilengkapi dengan kandungan ekstrak Red Algae yang memiliki sifat film-forming pada permukaan kulit sehingga dapat membantu menjaga kelembapan kulit sekaligus membuat kulit tampak lebih halus dan sehat.

10.2 Kontrol negatif. Kontrol negatif dalam penelitian ini adalah pelarut aquadest.

11. Pengujian aktivitas anti aging ekstrak daun stroberi

11.1 Penyiapan hewan uji. Menggunakan 6 ekor kelinci yang diadaptasi selama satu minggu dalam kandang. Satu kelinci diberikan satu kelompok perlakuan.

I : dioleskan ekstrak daun stroberi konsentrasi 0,25%

- II : dioleskan ekstrak daun stroberi konsentrasi 0,5%
 III : dioleskan ekstrak daun stroberi konsentrasi 1%
 IV : dioleskan ekstrak daun stroberi konsentrasi 1,5%
 + : kontrol positif
 - : kontrol negatif

11.2 Induksi kerutan dengan penyinaran sinar UV-A.

Semua kelinci yg dipergunakan dalam penelitian dicukur bulunya pada bagian punggung. Punggung kelinci dibagi menjadi lima bagian, masing-masing bagian berbentuk lingkaran diameter 2 cm. Cukur bagian punggung kelinci, lakukan pengukuran persentase kolagen, persentase kelembaban, dan persentase elastisitas memakai alat *skin analyzer*. Penyinaran UV A menggunakan *Exoterra Daylight Basking Spot* pada jarak 30 cm dengan dosis $63,69 \text{ J.cm}^{-2}/\text{jam}$ selama 6 jam (Putri *et al.*, 2023).

11.3 Pengaplikasian sediaan ekstrak daun stroberi. Kelinci yang sebelumnya sudah diinduksi kerutan menggunakan penyinaran UV A, diamati parameter % kolagen, % kelembaban, % elastisitas menggunakan alat *skin analyzer* pada hari ke-0 sebelum dioleskan ekstrak daun stroberi. Kemudian oleskan ekstrak daun stroberi sebanyak 0,5 mg pada setiap kelompok uji 1 kali sehari (Duraivel *et al.*, 2014).

11.4 Pengamatan aktivitas anti aging. Parameter kerutan diamati sebelum diinduks sinar, pada hari ke-0 yaitu sebelum dioles ekstrak daun stroberi dan pada minggu 3 yaitu setelah dioles. Parameter yang diamati antara lain % kolagen, % kelembaban, dan % elastisitas menggunakan *skin analyzer*.

Tabel 1. Parameter hasil pengukuran dengan *Skin Analyzer*

Pengukuran	Parameter			
Kadar kolagen	Serious lack	Reduce	Normal	
	(25-50%)	(50-65%)	(65-80%)	
Elastisitas	Loose skin	Weak	Normal	Better
	(15-35%)	(35-50%)	(50-65%)	(67-70%)
Moisture (kelembaban)	Dry	Ageing	Normal	Higher
	(3-4%)	(4-10%)	(10-15%)	(15-30%)

(Yupitawati, 2017)

11.5 Uji Keamanan. Uji keamanan dilakukan untuk mencegah terjadinya efek samping terhadap kulit. Uji keamanan dilakukan secara *in vivo* pada kelinci percobaan. Pengamatan untuk uji keamanan dilakukan pada 24, 48, dan 72 jam setelah diberikan gel ekstrak daun stroberi dengan dua parameter pengamatan, yaitu tingkat eritema

(reaksi kemerahan) dan tingkat edema (bengkak). Untuk setiap keadaan kulit diberi nilai sesuai metode skoring dari Draize sebagai berikut.

Tabel 2. Skor derajat edema

Reaksi kulit	Score
Tanpa edema	0
Sangat sedikit edema (hampir tidak terlihat)	1
Edema tapi berbatas jelas	2
Edema sedang (tepi naik 1 mm)	3
Edema berat (tepi naik >1 mm dan meletus keluar daerah penjanan)	4

Tabel 3. Skor derajat eritema

Reaksi kulit	Score
Tanpa eritema	0
Sangat sedikit eritema(hampir tidak terlihat)	1
Eritema tapi berbatas jelas	2
Eritema sedang (tepi naik 1 mm)	3
Eritema berat (tepi naik >1 mm dan meletus keluar daerah penjanan)	4

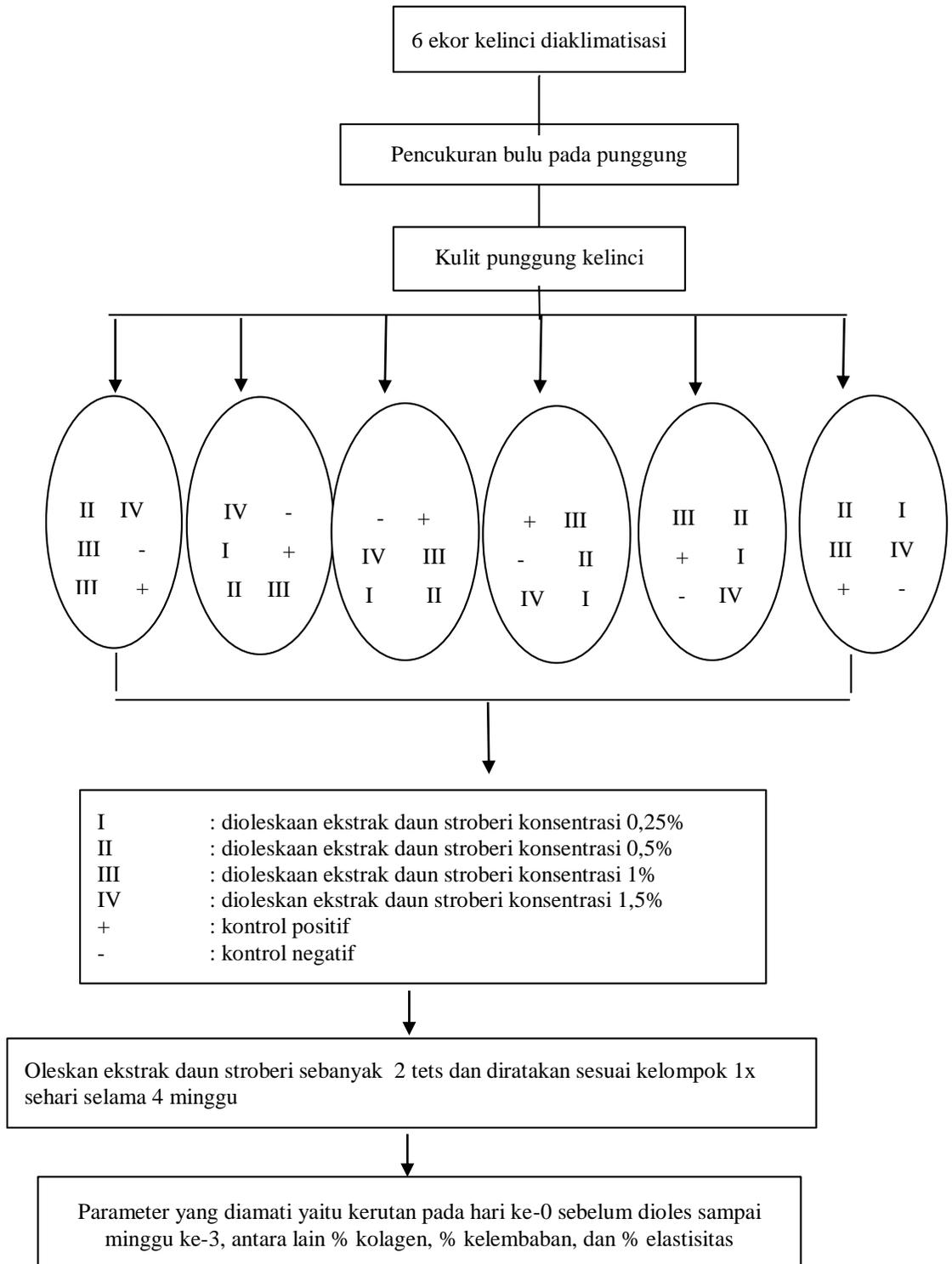
Masing-masing sediaan uji dihitung jumlah dari indeks eritema dan indeks edema kemudian dihitung indeks iritasi dengan cara berikut.

$$\text{Indeks iritasi primer} = \frac{\text{Jumlah eritema 24/28/72 jam} + \text{Jumlah edema 24/48/72 jam}}{\text{Jumlah kelinci}}$$

Tabel 4. Skor derajat iritasi

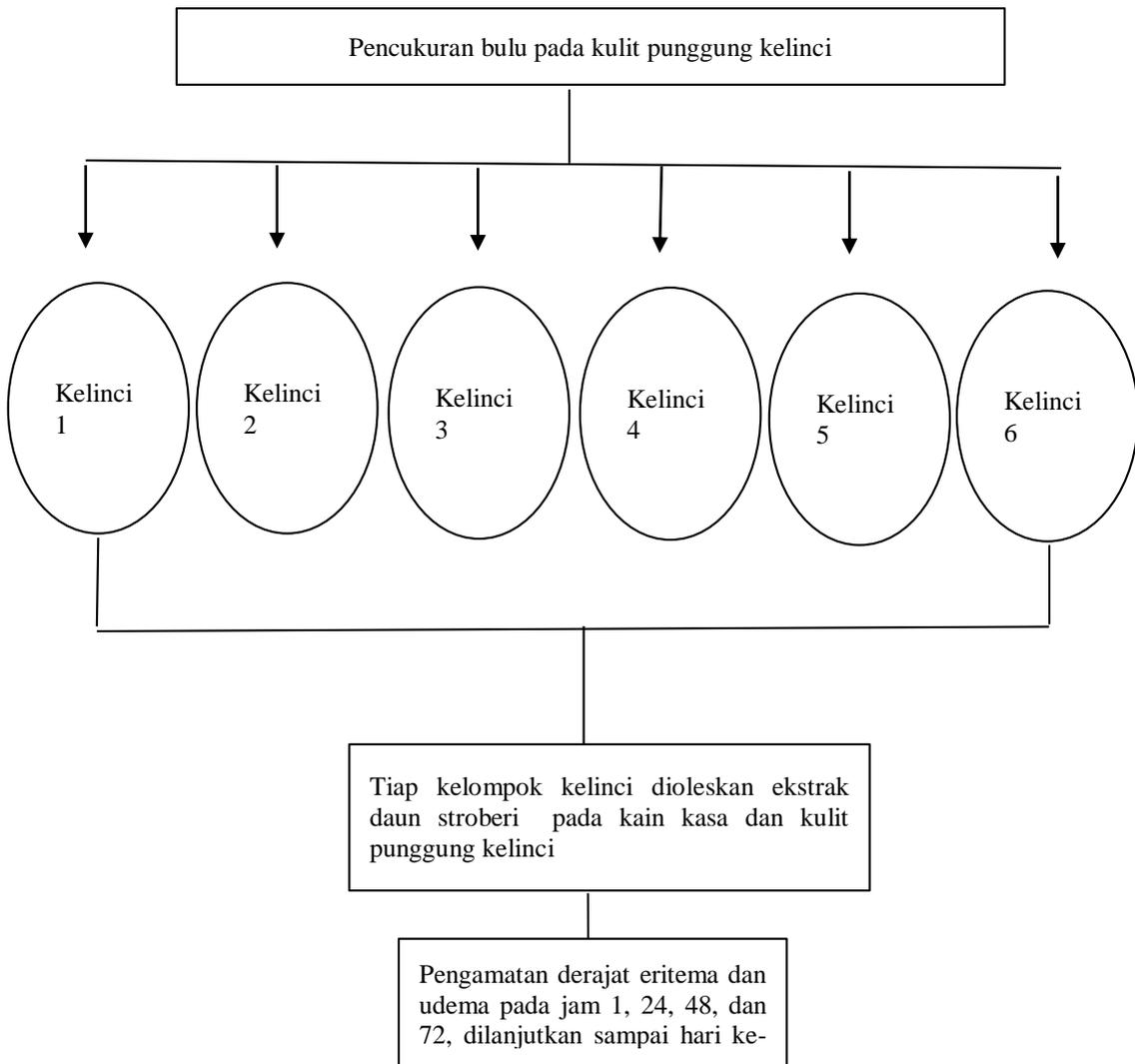
Reaksi kulit	Score
Tidak mengiritasi	0,0
Sangat sedikit mengiritasi	0,0-0,5
Sedikit iritasi	0,5-1,9
Iritasi sedang	2,0-4,9
Iritasi parah	5,0-8,0

(Sani dan Lukmayani, 2010)



Gambar 5. Skema pengujian aktivitas anti aging ekstrak daun stroberi

E. Skema Uji Keamanan



Gambar 6. Skema uji keamanan

E. Analisis Data

Data pengamatan yang diperoleh meliputi persentase kolagen, persentase elastisitas, persentase kelembaban kulit punggung kelinci dianalisis secara statistik menggunakan program *Statistical and Product Service Solution* (SPSS) versi 25 dengan uji normalitas dan homogenitas ($P > 0,05$). Data yang diperoleh diuji dengan metode *One-Way ANOVA* dan dilanjutkan uji *post hoc*.