

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yaitu keseluruhan dari pokok bahasan penelitian. Populasi penelitian ini merupakan herba pegagan yang dipanen pada bulan ketiga setelah penanaman di wilayah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sampel penelitian ini merupakan gel *anti-aging* herba pegagan (*Centella asiatica L. Urban*) variasi konsentrasi propilenglikol.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini merupakan ekstrak sediaan gel *anti-aging* dari ekstrak herba pegagan terhadap kelinci putih *New Zealand*.

Variabel utama kedua penelitian ini merupakan sediaan gel ekstrak herba pegagan bervariasi konsentrasi propilenglikol.

Variabel utama ketiga penelitian berupa aktivitas ekstrak herba pegagan sebagai *anti-aging* pada punggung kelinci yang terpapar sinar UV-A.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang sudah ditentukan selanjutnya dibagi atas variabel bebas, terkendali, serta tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang divariasikan supaya diuji bagaimana pengaruh pada variabel tergantung. Variabel bebas penelitian ini yaitu variasi konsentrasi propilenglikol dalam sediaan gel.

Variabel tergantung merupakan masalah utama yang merupakan pilihan penelitian yaitu stabilitas sediaan gel, mutu fisik (organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya lekat, daya sebar) serta aktivitas gel pegagan anti-aging pada punggung kelinci putih *New Zealand* yang diukur menggunakan alat *skin analyzer* dengan parameter persentasi kolagen, elastisitas, dan kelembapan kulit.

Variabel terkendali merupakan variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung. Kualifikasi variabel terkendali harus ditetapkan agar hasil yang didapat kredibel dan bisa direplikasi oleh penelitian selanjutnya. Penelitian ini menggunakan variabel terkendali ekstrak herba pegagan (tempat tumbuh, usia panen tanaman),

kelinci putih *New Zealand* (kondisi fisik hewan uji seperti berat badan, usia, *gender*, tempat tinggal, suhu, makanan dan minuman), laboratorium penelitian dan pembuatan gel.

3. Definisi operasional variable utama

Pertama, pegagan (*Centella asiatica L. Urban*) adalah tanaman yang dipanen pada bulan ke tiga setelah penanaman. Didapatkan dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk herba pegagan diperoleh dari hasil pengeringan, penggilingan, dan pengayakan.

Ketiga, ekstrak etanol herba pegagan diperoleh dari penyarian hasil metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan dilanjutkan dengan pembuatan ekstrak kental pada alat *rotary evaporator* suhu 40°C.

Keempat, variasi konsentrasi propilenglikol yang berbeda digunakan dalam masing-masing formula gel ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica L. Urban*).

Kelima, uji sifat fisik sediaan gel dengan melihat organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya lekat, daya sebar dan efektivitas *anti-aging*.

Keenam, uji aktivitas *anti-aging* merupakan kemampuan gel ekstrak herba pegagan dalam penyembuhan penuaan kulit yang diukur dengan alat *Skin Analyzer* dengan parameter persentasi kolagen, elastisitas, dan kelembapan kulit.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain blender, ayakan 60 mesh, alat ekstraksi, *rotary vacuum evaporator*, tabung reaksi, cawan porselen, mortir, stamfer, *moisture balance* alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, pH meter, viskometer *Brookfield*, objek glass, timbangan analitik, lampu UV-A, alat *skin analyzer*.

2. Bahan

2.1. Bahan Sampel. Sampel yang dipakai pada penelitian ini adalah ekstrak kental yang telah melalui proses maserasi dan pemekatan dengan *rotary evaporator* suhu 40°C.

2.2. Bahan kimia. Karbopol 940, TEA, propilenglikol, metil paraben, aquadest, etanol 70%, toluena, air panas, preaksi *Liberman-Burchard* yaitu 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat,

serbuk Mg 0,1 mg dan 4 ml HCL pekat dan 0,4 ml amil alkohol, 1 tetes HCl 2 N.

2.3. Hewan Uji. Hewan uji yang digunakan yaitu kelinci putih Jantan New Zealand dengan kisaran umur \pm 3-5 bulan, bobot 2 kg, yang didapat dari laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tujuan dilakukan determinasi untuk mengetahui kebenaran untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan data. Dalam penelitian ini menggunakan sampel sampel herba pegagan (*Centella asiatica* L. Urban). Determinasi akan dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu, Jawa Tengah

2. Pengambilan herba pegagan

Sampel herba pegagan (*Centella asiatica* Urban) diperoleh dari kebun daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Pemanenan herba pegagan dilakukan pada bulan ke tiga setelah penanaman, dengan mengambil bagian ideal atau tidak terlalu tua dan muda, dari pangkal hingga ujung daun terlihat hijau, masih segar, dan sehat.

3. Pengeringan herba pegagan

Herba pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) kemudian dicuci dan dikeringkan secara penjemuran di bawah sinar matahari dan ditutup dengan kain berwarna gelap.

4. Pembuatan serbuk herba pegagan

Simplisia herba pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk. Serbuk kemudian diayak sampai habis menggunakan ayakan dengan ukuran 60 mesh. Serbuk jadi disimpan dalam wadah kering yang tertutup rapat. Kemudian dihitung persentase rendemen hasil bobot kering terhadap bobot basah.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot simplisia kering}}{\text{berat serbuk}} \times 100\%$$

5. Penetapan susut pengeringan serbuk herba pegagan

Timbang 2 gram serbuk, letakkan di alat *moisture balance* yang diatur pada suhu 105°C, tunggu 15 menit untuk hasil setiap pengukuran, lalu hitung susut pengeringan serbuk. Hasil susut

pengeringan dinyatakan dalam persentase, dan hasil yang baik adalah <10% (Depkes RI, 2017).

6. Pembuatan ekstrak herba pegagan

Teknik maserasi digunakan untuk mengekstrak herba pegagan. Serbuk herba pegagan dilarutkan dengan perbandingan 1:10 dalam pelarut etanol 70%, dimaserasi selama 3 hari, diaduk setiap 6 jam sekali, kemudian disaring. Setelah hasil ekstraksi digabungkan, filtrat pertama digunakan kembali untuk remaserasi. Hasil ekstraksi kemudian dipisahkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C. Timbang ekstrak kental pegagan (Nurlatifah *et al.*, 2022).

7. Identifikasi organoleptis serbuk herba pegagan

Identifikasi serbuk herba pegagan dilakukan secara organoleptis, yaitu meliputi bentuk, warna, bau dan rasa dari serbuk pegagan yang diuji.

8. Identifikasi organoleptis ekstrak kental herba pegagan

Identifikasi serbuk herba dilaksanakan secara organoleptis meliputi warna, bentuk, dan bau dari serbuk.

9. Penetapan susut pengeringan ekstrak herba pegagan

Timbang 2 gram, letakkan di alat *moisture balance* yang diatur pada suhu 105°C, tunggu 15 menit untuk hasil setiap pengukuran, lalu hitung susut pengeringan. Hasil susut pengeringan dinyatakan dalam persentase, dan hasil yang baik adalah <10% (Depkes RI, 2017).

10. Penetapan kadar air ekstrak herba pegagan

Penetapan kadar air ekstrak menggunakan metode gravimetri. Menimbang ekstrak herba pegagan sebanyak 10 gram dan dimasukkan pada cawan yang sudah ditara, keringkan dengan oven di suhu 105°C selama 5 jam. Dilanjutkan pemanasan kembali hingga 1 jam. Kemudian dinginkan pada desikator dengan waktu 1 jam. Lalu timbang hingga diperoleh perbedaan antara dua penimbangan berturut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2000).

11. Uji bebas etanol ekstrak herba pegagan

Pemeriksaan ekstrak bebas alkohol dimaksudkan untuk memastikan bahwa ekstrak bebas dari etanol melalui reaksi esterifikasi. Percobaan dilakukan pada tabung reaksi yang sudah ada ekstrak kemudian ditambahkan asam asetat (CH₃COOH) dan asam sulfat (H₂SO₄) dan dipanaskan. Aroma khas ester yang berasal dari alkohol, menandakan bahwa sampel tersebut masih terkandung etanol.

12. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak herba pegagan

12.1. Triterpenoid. Sejumlah 2 g serbuk direndam dengan 20 ml eter selama 2 jam lalu disaring. 5 ml filtrat dikeringkan dengan cara diuapkan kemudian menambahkan preaksi *Lieberman-Burchard* (3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat). Hasil positif ditandai adanya perubahan warna menjadi jingga (Lukman, 2016).

12.2. Flavonoid. Uji ini dilakukan dengan menambahkan serbuk Mg 0,1 mg dan 4 mL HCL pekat, serta 0,4 mL amil alkohol kemudian campuran dikocok beberapa saat. Hasil positif ditunjukkan dengan warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alcohol (Nova, 2016).

13. Formula Gel

Formulasi gel yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada penelitian Nurhaini *et al.*, (2018) sebagai berikut :

Tabel 3. Formula acuan pembuatan gel (Nurhaini *et al.*, 2018)

Bahan	Jumlah (gr)
Ekstrak buah mahkota dewa	2,5
Carbopol 490	1,25
Propilenglikol	12,5
TEA	3
Metal paraben	0,3
Oleum rosae	q.s
Air suling	ad 100

Penelitian ini dilakukan modifikasi terhadap propilenglikol sebagai humektan. Propilenglikol dengan konsentrasi maksimal 15% dapat berfungsi sebagai humektan (Rowe *et al.*, 2009). Berdasarkan formula acuan ini, kemudian dilakukan modifikasi pada propilenglikol sebagai berikut :

Tabel 4. Rancangan formulasi gel

Bahan	Komposisi (gr)			
	F1	F2	F3	F4
Ekstrak herba pegagan	5	5	5	0
Karbopol 940	2	2	2	2
Propilenglikol	9	12	15	0
TEA	2	2	2	2
Metil paraben	0,3	0,3	0,3	0,3
Aquadest	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Keterangan :

F1 : gel ekstrak herba pegagan dengan propilenglikol 9%

F2 : gel ekstrak herba pegagan dengan propilenglikol 12%

F3 : gel ekstrak herba pegagan dengan propilenglikol 15%

F4 : basis gel tanpa propilenglikol (-)

14. Pembuatan Gel

Larutkan karbopol dalam aquadest lalu aduk hingga terlarut sempurna dan biarkan hingga mengembang, kemudian tambahkan TEA sedikit demi sedikit sebagai penetral basis lalu aduk hingga membentuk basis yang homogen (campuran 1). Dalam wadah yang berbeda metil paraben dicampur dengan propilenglikol (campuran 2). Gabungkan campuran 1 dan campuran 2 lalu aduk hingga homogen. Masukkan ekstrak herba pegagan ke dalam basis gel lalu aduk kembali hingga homogen. Sediaan yang sudah jadi dimasukkan kedalam wadah tertutup.

15. Pengujian Mutu Fisik Sediaan Gel Ekstrak Herba Pegagan

15.1. Uji Organoleptis. Pengujian organoleptik dilakukan dengan pengamatan warna secara langsung, bau, tekstur sediaan.

15.2. Uji Homogenitas. Uji homogenitas dilakukan dengan gel dioleskan pada kaca transparan, lalu diamati ada atau tidaknya butiran kasar yang terlihat.

15.3. Uji pH. pH meter sebelumnya dikalibrasi terlebih dahulu dengan larutan *buffer* pH 7, kemudian dicelupkan elektroda pH meter ke dalam sediaan gel lalu catat nilai pH yang muncul setelah stabilisasi. pH yang sesuai dengan kulit yaitu antara 4,5-6,5 (Tutik *et al.*, 2021).

15.4. Uji Viskositas. Uji viskositas menggunakan viskometer *Brookfield* RVT. Sesuaikan spindle berdasar konsentrasi sediaan. Sediaan gel dimasukkan didalam wadah, *spindel* dicelupkan dalam sediaan gel kemudian alat viskometer dinyalakan, lalu amati nilai viskositas (Chandra & Rahmah, 2022)

15.5. Uji Daya Sebar. Pengujian daya sebar dilakukan dengan menimbang 0,5 gram gel lalu diletakkan diatas kaca bulat transparan dengan skala milimeter dan ditutup dengan kaca transparan lainnya, diamkan selama 1 menit. Tambah beban 50 gram, 100 gram, 150 gram secara berturut-turut dan diukur diameter yang konstan. Daya sebar sediaan semi padat yaitu 5-7 cm (Nurhaini *et al.*, 2018).

15.6. Uji Daya Lekat. Pengujian daya lekat dilakukan dengan menimbang 0,5 gram gel lalu diletakkan pada kaca kemudian ditutup dengan kaca lainnya. Kaca diberi beban 50 gram selama 1 menit, angkat beban hingga kaca terpisah kemudian catat waktu pelepasan antara 2 kaca tersebut. Daya lekat yang baik yaitu lebih dari 1 detik (Nurhaini *et al.*, 2018).

15.7. Uji Stabilitas. Pengujian ini dilakukan dengan metode *cycling test* yaitu gel disimpan pada suhu 4°C dalam kurun waktu 24 jam, selanjutnya ditingkatkan pada suhu 48°C dalam kurun waktu 24 jam (1 siklus). Pengujian stabilitas berlangsung hingga 6 siklus, pada siklus yang terakhir dilihat ada tidaknya pemisahan dari fase gel, kondisi sediaan diamati dengan memeriksa organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar dan daya lekat apakah stabil atau tidak setelah dilakukan pengujian dengan menggunakan metode *cycling test* (Rizikiyan *et al.*, 2022).

16. Pengelompokan hewan uji

Terdapat 5 hewan uji yang masing-masing dilakukan 5 perlakuan pada setiap punggung kelinci sebagai berikut:

Punggung kelinci bagian I : dioleskan gel ekstrak herba pegagan F I

Punggung kelinci bagian II : dioleskan gel ekstrak herba pegagan F II

Punggung kelinci bagian III : dioleskan gel ekstrak herba pegagan F III

Punggung kelinci bagian IV : dioleskan kontrol negatif (basis gel) F IV

Punggung kelinci bagian V : dioleskan kontrol positif (dioleskan wardah *renew you*)

17. Uji Keamanan Sediaan

Uji iritasi sediaan memakai metode Draize dilaksanakan pada 3 ekor kelinci. Kriteria pemeriksaan keamanan kelinci yaitu kelinci albino dewasa sehat dengan berat \pm 1,5 sampai 2 kg. Bulu punggung kelinci dicukur, selanjutnya dibagi 5 bagian dengan panjang 6,5 cm. 0,5 g sediaan dioleskan dipunggung kelinci yang ditentukan, dibiarkan 24 jam ditutup dengan kasa steril serta perban. Setelah pengamatan, bagian ditutup kembali dengan kasa serta dilakukan pengamatan kembali sesudah sesudah 48 jam serta 72 jam. Penilaian kondisi kulit menggunakan skala penilaian *Draize* :

Tabel 5. Skor derajat edema

Reaksi kulit	Skor
Tanpa edema	0
Sangat sedikit edema (hamper tidak terlihat)	1
Edema jelas terlihat (ketebalan < 1 mm)	2
Edema sedang (tepi naik \pm 1 mm)	3
Edema berat (tepi naik lebih dari 1 mm dan meluas keluar daerah penjanan)	4

Tabel 6. Skor derajat eritema

Reaksi kulit	Skor
Tanpa eritema	0
Sangat sedikit eritema (hamper tidak terlihat)	1
Eritema jelas terlihat (diameter 25,1-30 mm)	2
Eritema sedang sampai berat (diameter 30,1-35 mm)	3
Eritema berat (merah bit) membentuk eskar (diameter > 35 mm)	4

Tiap sediaan uji dihitung jumlah indeks eritema dan edema yang selanjutnya dihitung indeks iritasi dengan rumus sebagai berikut :

$$\frac{\text{jumlah eritema 24/48/72 jam} + \text{Jumlah edema 24/48/72 jam}}{\text{jumlah hewan}}$$

Hasil indeks tersebut semua kelinci dirata-rata dan ditentukan nilai skor derajat iritasi untuk menentukan tingkat keparahan iritasi sebagai berikut :

Tabel 7. Skor derajat iritasi (Priani & Lukmayani, 2010)

Reaksi kulit	Skor
Tidak mengiritasi	0,0
Hampir tidak mengiritasi	0,04 – 0,99
Sedikit mengiritasi	1,0 – 1,99
Iritasi ringan	2,0 - 2,9
Iritasi sedang	3,0 - 5,9
Iritasi parah	6,0 - 8,0

18. Pengujian Aktivitas *Anti-Aging* Gel Ekstrak Pegagan

Penelitian ini menggunakan 5 ekor kelinci berumur 3 bulan dengan berat berkisar 2 kg. Kelinci diaklimatisasi selama tujuh hari, kemudian dicukur bulu area punggung hingga kulit terlihat jelas. Pengujian diawali dengan punggung kelinci telah dicukur diamati parameter sebelum perlakuan. Selanjutnya, punggung kelinci dilakukan penyinaran UV-A menggunakan *Exoterra® Daylight Basking Spot* selama 6 jam jarak 30 cm dengan dosis 63,69 J.cm-2/jam selama 2 minggu (Nurfitriyawatie *et al.*, 2023). Setelah penyinaran, pengamatan parameter *anti-aging* pada kelinci dilakukan setelah diolesi krim 1 kali sehari selama 30 hari sesuai kelompok perlakuan. Parameter anti penuaan menggunakan alat Skin Analysis meliputi rasio kolagen, kelembapan dan elastisitas yang diamati sebelum induksi sinar UV A, hari ke 0 (setelah induksi dan sebelum pengaplikasian krim) dan hari ke 30 (setelah pengaplikasian gel) (Putri *et al.*, 2023).

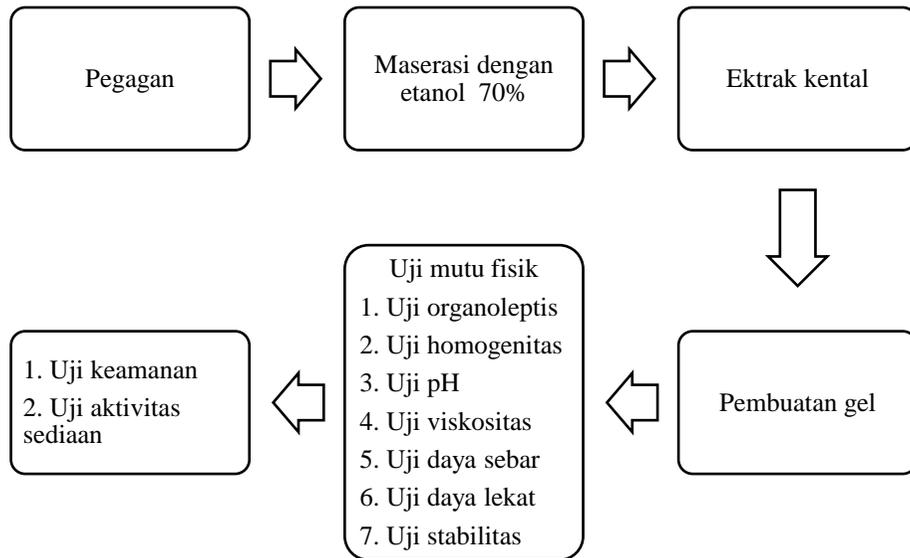
E. Analisis Data

Dari hasil pengujian sifat fisik gel ekstrak herba pegagan pada setiap formula dilakukan pengujian sebelum dan sesudah *Cycling Test*

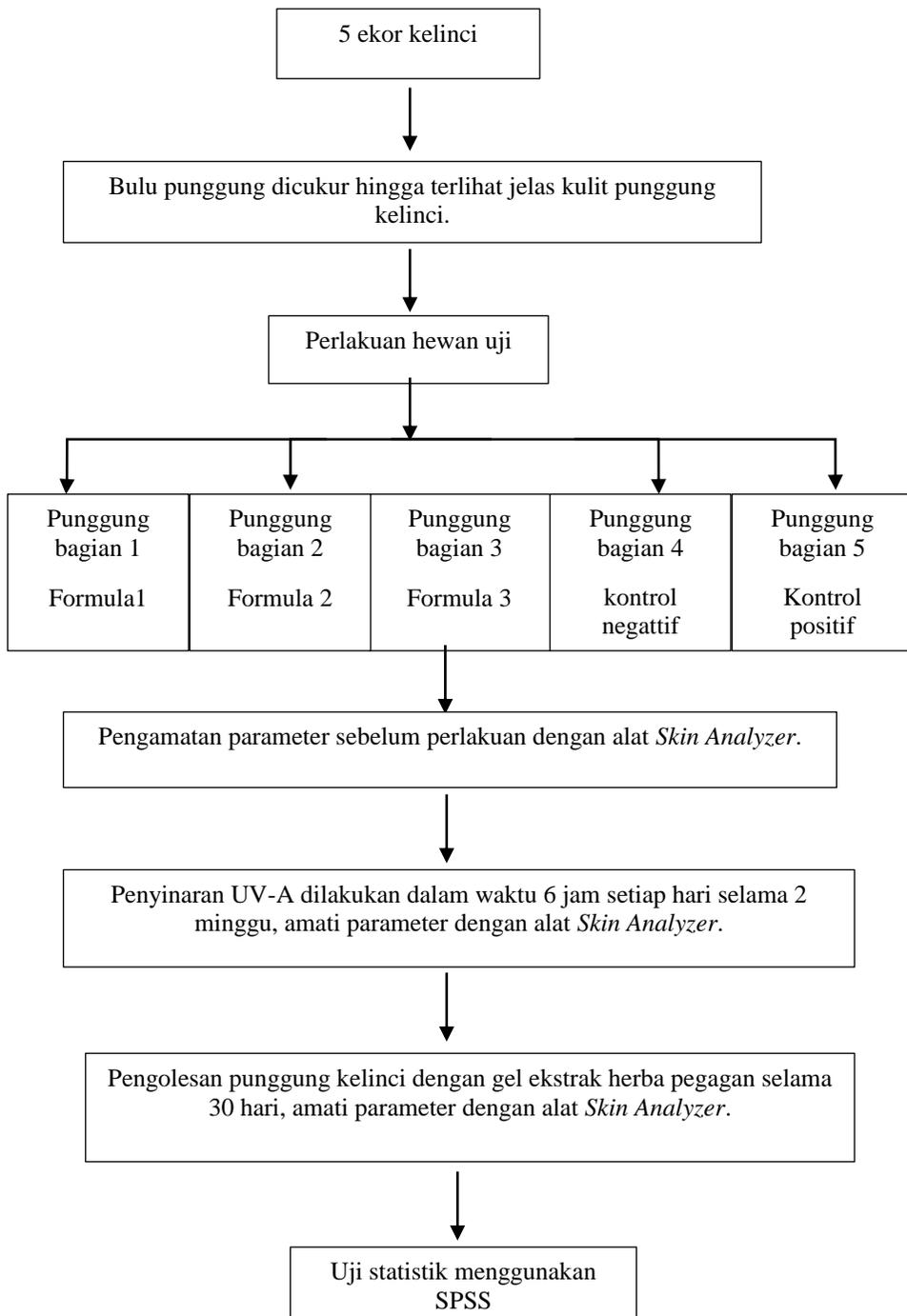
yang meliputi pH, viskositas, daya sebar, daya lekat. Hasil tersebut dilakukan uji statistic dengan SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Data sebelum stabilitas dianalisis terlebih dahulu normalitas dan homogenitasnya, apabila didapatkan hasil terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan menggunakan uji *One Way ANOVA* apabila tidak terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji *Kruskall Wallis* dan dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan tiap formula. Data setelah uji stabilitas dan analisis menggunakan *Two Way ANOVA*, apabila tidak terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji *Paired-Samples T-Test*, dan dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan tiap formula.

Hasil persentase kolagen, elastisitas dan kelembaban masing-masing hewan percobaan yang diperoleh sebelum dan sesudah induksi dengan *Skin Analyzer* dianalisis menggunakan uji *Paired-Samples T-Test*. Perbandingan parameter setelah induksi dan setelah pengolesan gel dilakukan dengan uji *Paired-Samples T-Test*, *One Way ANOVA* dan *Post Hoc Tukey*.

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 9. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 10. Skema pengujian aktivitas Anti-Aging gel ekstrak herba pegagan