

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang diperoleh dari Kecamatan Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel merupakan sebagian dari populasi yang ingin diteliti, sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang segar dan tidak rusak.

B. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas yang terdapat pada penelitian ini adalah konsentrasi krim ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas *anti-aging* dari sediaan krim ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah keadaan laboratorium, hewan uji yang digunakan, seleksi tanaman, metode ekstraksi serta parameter uji efektivitas *anti-aging* sediaan.

4. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) merupakan bagian dari tanaman binahong yang berwarna hijau segar dengan batang berwarna merah yang diperoleh dari Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk simplisia daun binahong merupakan serbuk hasil pencucian, perajangan dan pengeringan dengan menggunakan oven pada suhu 45-50°C, kemudian dihaluskan dengan cara diblender dan diayak dengan ayakan mesh nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun binahong adalah hasil ekstraksi daun binahong yang dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Keempat, hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).

Kelima, sediaan krim daun binahong merupakan sediaan yang diformulasikan menggunakan ekstrak etanol daun binahong pada konsentrasi 3%, 5% dan 10% dengan tipe krim yang dihasilkan adalah *vanishing cream*.

Keenam, parameter uji yang digunakan pada penelitian ini adalah uji organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, tipe krim, stabilitas sediaan, iritasi.

Ketujuh, uji efektivitas *anti-aging* merupakan pengujian yang dilakukan untuk mengetahui kadar *anti-aging* pada sediaan krim yang diaplikasikan pada kulit.

Kedelapan, parameter uji efektivitas *anti-aging* yang digunakan pada pengujian ini meliputi kelembaban, elastisitas dan persen (%) kolagen.

Kesembilan, metode pengukuran pada parameter uji efektivitas *anti-aging* yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan alat *skin analyzer EH-900U*.

C. Alat, Bahan dan Hewan uji

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah blender, batang pengaduk, *beaker glass*, gelas ukur, pipet tetes, jar kaca, kain flanel, kertas saring, mortir dan stamper, cawan penguap, pipet tetes, *rotary evaporator*, spatula, tabung reaksi, rak tabung, timbangan analitik, *waterbath*, ayakan ukuran mesh nomor 40, bejana maserasi, corong kaca, labu erlenmeyer, alat *sterling bidwell*, *skin analyzer EH-900U*, *object glass*, pH meter, viskometer, kaca bulat, alat uji daya lekat.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang dihasilkan dari kecamatan Karanganyar, Jawa Tengah, pelarut etanol 96%, asam stearat 8 gram, setil alkohol 2 gram, *paraffin liquid* 20 gram, propil paraben 0,02 gram, metil paraben 0,02 gram, *glicerine* 10 gram, Tween 80 2 gram, TEA 1 gram, dan *aquadest* ad 100 ml.

3. Hewan uji

Kelinci merupakan hewan uji yang banyak digunakan sebagai hewan percobaan dalam suatu penelitian, hal ini karena kemiripan struktur dan susunan sel yang berada pada kelinci hampir sama dengan manusia. Hewan uji tersebut dapat dijadikan media berbagai uji coba,

salah satunya adalah pengujian iritasi pada kulit. Uji iritasi yang dilakukan pada kelinci menggunakan metode *Draize*. Kriteria kelinci yang akan digunakan pada uji keamanan ini adalah menggunakan kelinci albino dewasa yang sehat dengan berat badan $\pm 1,5-2$ kg (Putry *et al.*, 2023).

D. Rencana Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi yang dilakukan pada tanaman bertujuan untuk pengamatan secara mikroskopis, makroskopis dan morfologi tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) untuk mendapatkan kesesuaian identitas. Tahapan ini dilakukan pada Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pembuatan serbuk daun binahong

Daun binahong yang telah disortir dan dikumpulkan diambil sebanyak 13 kg lalu dibersihkan dengan air mengalir untuk mengeluarkan pengotor yang menempel. Setelah dipastikan benar-benar bersih selanjutnya daun binahong dikeringkan pada oven dengan suhu $40-45^{\circ}\text{C}$ kemudian dikering anginkan dibawah sinar matahari. Daun binahong yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender lalu diayak dengan ayakan ukuran mesh 40. Pengecilan ukuran serbuk dilakukan agar proses penyarian lebih mudah karena kontak dengan luas permukaan simplisia yang kecil. Simplisia yang sudah menjadi serbuk halus, disimpan dalam sebuah wadah tertutup untuk selanjutnya dilakukan proses ekstraksi.

3. Karakterisasi serbuk daun binahong

3.1 Susut pengeringan serbuk. Simplisia daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) ditimbang sebanyak 2 gram menggunakan kurs yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara terlebih dahulu. Ratakan simplisia dalam cawan penguap dengan cara menggoyangkan cawan, serbuk simplisia pada cawan dipanaskan pada suhu 105°C selama 60 menit menggunakan oven selanjutnya didinginkan dalam desikator hingga suhu kamar dan ditimbang. Lakukan pemanasan kembali sebanyak 3 kali replikasi hingga diperoleh bobot konstan (FHI, 2017).

3.2 Uji kandungan kimia serbuk. Bertujuan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam serbuk simplisia daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).

Tabel 1. Uji kandungan kimia serbuk daun binahong

Uji fitokimia	Perlakuan	Pereaksi	Hasil	Pustaka
Alkaloid	0,5 gr serbuk + 1 ml HCl 2N + 9 ml aquadest. Panaskan hingga mendidih, dinginkan dan saring	3 tetes filtrat + 2 tetes pereaksi <i>bouchardat</i>	Endapan coklat sampai hitam	Depkes RI, 1980
Saponin	0,5 gr serbuk + 10 ml aquadest, kocok selama 10 detik + 1 tetes HCl 2N	-	Terbentuk buih tetap	Depkes RI, 1980
Tanin	0,25 gr serbuk + 5 ml aquadest, panaskan hingga mendidih, dinginkan dan saring	1 ml filtrat + 2 tetes FeCl ₃ 1%	Terbentuk warna biru kehitaman atau hijau kehitaman	Sastrawan <i>et al.</i> , 2013
Flavonoid	Panaskan 0,5 gr serbuk + 5 ml aquadest sampai mendidih, dinginkan dan saring	1 ml filtrat + 2 ml etanol 95% + 2 ml HCl 2N + 10 tetes HCl pekat	Terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu adanya flavonoid. Warna kuning jingga adanya flavon	Depkes RI, 1979

4. Pembuatan ekstrak etanol daun binahong

Serbuk simplisia daun binahong yang telah dihaluskan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan larutan penyari etanol 96%. Pengekstraksian dilakukan dengan cara hasil serbuk simplisia direndam dengan pelarut etanol selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, lalu diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat menggunakan kain flanel. Ulangi proses penyarian menggunakan ampas dari hasil ekstraksi pertama dengan tetap menggunakan setengah kali jumlah pelarut yang sama pada penyarian pertama. Gabungan hasil maserat pertama dan kedua selanjutnya diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Ekstrak kental dari proses evaporator kemudian dikentalkan lagi menggunakan waterbath pada suhu 40-65°C (FHI, 2017).

5. Karakterisasi ekstrak daun binahong

5.1 Penetapan kadar air ekstrak. Penetapan kadar air ekstrak dengan metode destilasi menggunakan *sterling-bidwell*. Sebanyak 10 gram ekstrak daun binahong, dimasukkan pada labu destilasi dan diberi pelarut toluen : air (100:10) sampai ekstrak dalam labu terendam kemudian merangkai alat *sterling-bidwell*. Penetapan kadar air

menggunakan *sterling-bidwell* berdasarkan volume yang tertera pada skala alat *sterling-bidwell*, volume yang tertera pada alat kemudian dihitung kadar airnya dalam satuan persen (%) dengan syarat pada FHI adalah kurang dari 8,9% (FHI, 2017).

6. Skrining fitokimia

6.1 Flavonoid. Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 5 ml etanol kemudian dipanaskan selama 5 menit. Ekstrak yang telah dipanaskan kemudian disaring, tambahkan 10 tetes HCl pekat dan 0,2 g serbuk Mg. Reaksi positif ditandai oleh timbulnya warna merah coklat (Surbakti *et al.*, 2018).

6.2 Alkaloid. Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 2 ml kloroform secukupnya dan 10 ml amonia kemudian tambahkan 10 tetes H₂SO₄. Campuran dalam tabung reaksi dikocok dan biarkan hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan H₂SO₄ diambil dan dibagi menjadi 3 bagian dalam 3 tabung reaksi. Masing-masing larutan H₂SO₄ tabung reaksi diberikan pereaksi *Mayer*, *Dragendorf* dan *Wagner*. Hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi *Mayer*, endapan merah jingga pada pereaksi *Dragendorf* dan terbentuk endapan coklat pada pereaksi *Wagner* (Surbakti *et al.*, 2018).

6.3 Saponin. Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 10 ml aquadest kemudian dikocok selama 1 menit. Tabung reaksi kemudian didiamkan selama 10 menit untuk mengamati busa yang terbentuk. Kandungan saponin dalam ekstrak ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil dengan tinggi 1-3 cm selama 10 menit waktu pengamatan (Surbakti *et al.*, 2018).

6.4 Tanin. Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 10 ml air panas dan tambahkan beberapa tetes besi (III) klorida. Kandungan tanin dalam ekstrak ditunjukkan dengan timbulnya warna biru kehitaman (Surbakti *et al.*, 2018).

6.5 Steroid/Terpenoid. Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 tetes CH₃COOH glasial dan 2 tetes H₂SO₄ pekat. Kocok tabung secara perlahan lalu didiamkan beberapa menit. Reaksi positif steroid jika larutan berubah menjadi warna biru atau hijau, sedangkan reaksi positif terpenoid jika larutan berubah menjadi warna merah atau ungu (Surbakti *et al.*, 2018).

7. Pembuatan sediaan krim

Merujuk pada penelitian Amin *et al.*, (2018).

Tabel 2. Formulasi krim ekstrak etanol daun binahong

Bahan	Kegunaan	K-	F1	F2	F3
Ekstrak daun binahong	Zat aktif	-	3%	5%	10%
Asam stearat	Emulsi	8 g	8 g	8 g	8 g
Setil alkohol	Emulsi	2 g	2 g	2 g	2 g
<i>Paraffin liquid</i>	Emulgator	20 g	20 g	20 g	20 g
Propil paraben	Pengawet	0,02 g	0,02 g	0,02 g	0,02 g
Metil paraben	Pengawet	0,02 g	0,02 g	0,02 g	0,02 g
<i>Glycerin</i>	Humektan	10 g	10 g	10 g	10 g
Tween 80	Surfaktan	2 g	2 g	2 g	2 g
TEA	Emulsi	1 g	1 g	1 g	1 g
<i>Aquadest</i> ad	Pelarut	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Semua bahan ditimbang terlebih dahulu sesuai formula. Ekstrak kental daun binahong dilarutkan menggunakan Tween 80. Pembuatan basis sediaan krim dilakukan dengan cara membagi bahan ke dalam dua fase, yaitu fase minyak dan fase air.

Fase minyak yang terdiri dari asam stearat, setil alkohol, *paraffin liquid* dan propil paraben dilebur diatas penangas air suhu 70°C. Dan fase air yang terdiri dari *glicerin*, metil paraben, Tween 80, TEA dan *aquadest* dilebur diatas penangas air suhu 70°C. Kemudian fase air ditambahkan pada dalam fase minyak secara perlahan-lahan sambil diaduk manual secara konstan dengan cara berlawanan arah jarum jam sampai homogen. Lalu basis krim yang telah homogen dicampurkan sedikit demi sedikit dengan ekstrak daun binahong yang telah dilarutkan dengan Tween 80, digerus sampai homogen (Amin *et al.*, 2018).

8. Parameter uji mutu fisik

8.1 Pengujian organoleptis. Pengujian dengan mengamati perubahan sifat yang dapat terjadi pada sediaan secara visual meliputi bentuk, warna, bau dan konsistensi pada sediaan krim (Rumanti *et al.*, 2022).

8.2 Pengujian homogenitas. Pengujian dilakukan dengan cara sebanyak 1 g sediaan krim dioleskan *object glass*. Sediaan yang homogen ditunjukkan dengan tidak adanya partikel kasar yang terlihat (Rumanti *et al.*, 2022).

8.3 Pengujian pH. Pengujian dilakukan dengan celupkan pH meter yang telah ditara menggunakan larutan dapar ke dalam sediaan. Standar uji pH kulit menurut SNI yaitu berkisar rentang pH 4,5-6,5 (Putry *et al.*, 2023).

8.4 Pengujian viskositas. Pengujian viskositas dilakukan dengan cara sediaan krim dimasukan kedalam wadah, pasang spindel no 7 kemudian alat visko di atur menggunakan kecepatan 20 rpm selama 15 detik. Catat hasil viskositas yang di tampilkan pada alat, hasil viskositas krim yang baik berkisar antara 2000-50000 cP (Rumanti *et al.*, 2022).

8.5 Pengujian daya sebar. Pengujian dilakukan dengan cara $\pm 0,5$ gr sediaan krim diletakkan di bagian tengah kaca bulat, selanjutnya di bagian atas sediaan krim diletakkan kaca buat lainnya selama 1 menit, ukur diameter krim yang menyebar pada kaca bulat. Pengujian dilanjutkan dengan meletakkan beban 50 gram diatas kaca bulat selama 1 menit lalu ukur dan catat lagi diameter penyebaran sediaan krim dari berbagai sisi pada kaca bulat. Pengujian diulangi dengan meletakkan beban 150 gram diatas kaca bulat selama 1 menit dan diukur diameter penyebaran krim (Rumanti *et al.*, 2022). Persyaratan daya sebar untuk sediaan krim yaitu sekitar 5-7 cm.

8.6 Pengujian daya lekat. Pengujian dilakukan dengan cara sebanyak $\pm 0,25$ g diletakkan pada krimas objek selama 1 menit dengan pemberat 1 kg. Kemudian krimas objek diletakkan pada alat tes dan beri pemberat 80 g. Hitung waktu krim terlepas dari krimas objek dengan *stopwatch*. Untuk tiap formula lakukan replikasi sebanyak 3 kali. Menurut SNI daya lekat krim yang baik adalah lebih dari 1 detik (Putry *et al.*, 2023).

8.7 Pengujian tipe krim. Dilakukan dengan cara meletakkan secukupnya sediaan krim pada *object glass* kemudian campurkan 1 tetes pereaksi *metilen blue* dan sudan III, aduk hingga homogen. Krim tipe minyak dalam air (*vanishing cream*) ditandai dengan warna biru yang terdistribusi secara merata pada sediaan krim (Rumanti *et al.*, 2022).

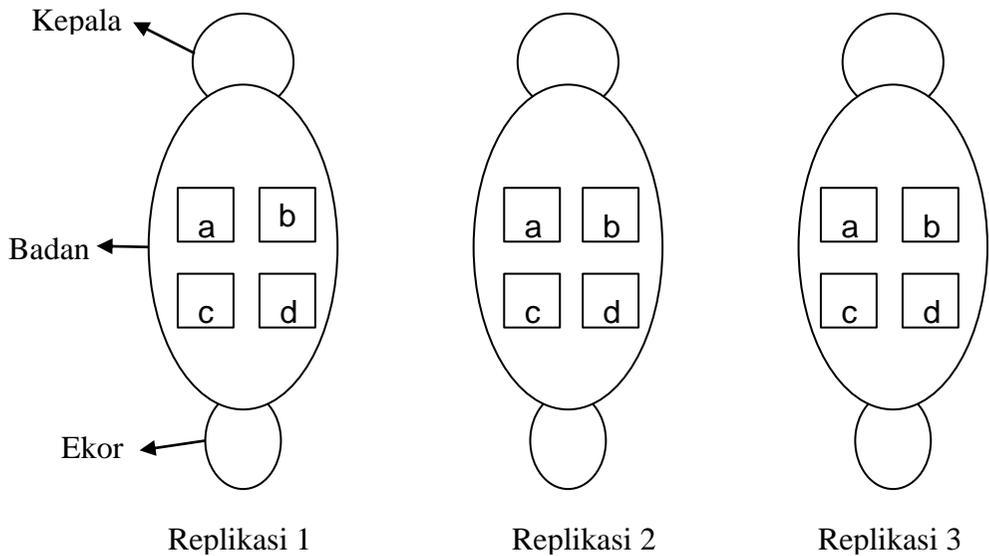
8.8 Pengujian stabilitas sediaan. Pengujian dilakukan dengan cara masing-masing formula sediaan krim disimpan pada suhu ruang, suhu dingin, suhu panas selama 30 hari untuk mengamati perubahan yang terjadi. Pada penyimpanan pada suhu dingin dan suhu panas pengujian sediaan krim meliputi organoleptis seperti bentuk, warna, bau dan pemisahan fase, dan pada penyimpanan suhu ruang dilakukan serangkaian pengujian mutu fisik sediaan krim (Rumanti *et al.*, 2022).

9. Pengujian iritasi

Kelinci yang digunakan untuk pengujian iritasi dikarantina dan diadaptasi selama 1 minggu sebelum dilakukan uji iritasi. Pengujian

dilakukan dengan cara mencukur rambut pada punggung kelinci yang akan digunakan, dan dibagi menjadi beberapa bagian sesuai formula yang digunakan.

Masing-masing formula sebanyak 0,5 g dioleskan pada bagian punggung kelinci dan dibungkus menggunakan kasa steril dan perban selama 24 jam, replikasi dilakukan dalam rentang waktu 48 jam dan 72 jam, pada masing-masing formula. Pengamatan uji iritasi pada kulit punggung kelinci (Putry *et al.*, 2023). Penilaian uji iritasi yang dilakukan pada kelinci menggunakan skoring dari metode *Draize*. Pengujian iritasi dilanjutkan pada kulit 20 orang sukarelawan dengan cara mengoleskan krim pada bagian belakang telinga selama 10 menit, kemudian diamati reaksi yang ditimbulkan meliputi kemerahan atau timbulnya rasa gatal pada bagian yang dioleskan krim (Dao dan Syamsul, 2016).



Gambar 10. Lokasi bagian kulit kelinci diberi perlakuan uji iritasi

10. Uji efektivitas krim *anti-aging*

Pengujian *anti-aging* dilakukan kepada 20 orang sukarelawan yang berumur 18 hingga 25 tahun, yang telah mengisi kuesioner dan bersedia dijadikan sebagai sukarelawan pada penelitian ini. Sebelumnya kulit relawan diukur terlebih dahulu parameter *anti-aging* meliputi kelembaban, elastisitas dan persen (%) kolagen. Setelah dilakukan pengukuran terhadap kelembaban, elastisitas dan persen (%) kolagen pada kulit sukarelawan. Kulit sukarelawan diinduksi sinar UV-

A menggunakan sinar dari *Exoterra® daylight basking spot* pada jarak 15 cm selama 30 menit.

Kulit sukarelawan yang telah diinduksi UV-A (*photoaging*) dan diamati parameter *anti-aging* yaitu kelembaban, elastisitas dan persen (%) kolagen dari kulit sukarelawan menggunakan alat *skin analyzer EH-900U*. Cara menggunakan *skin analyzer EH-900U* adalah alat dihubungkan ke perangkat PC, kulit yang akan diamati di foto dengan mikroskopi elektronik untuk kulit, lalu foto dan data kulit dimasukkan ke perangkat PC untuk dianalisis. Hasil analisis kulit akan ditampilkan pada layar PC (Yupitawati, 2017).

Setelah diamati kemudian kulit sukarelawan diolesi krim sebanyak 0,5 g sebanyak 1 kali sehari pada waktu malam hari selama 14 hari. Pengamatan pada kulit sukarelawan dilakukan terhadap parameter *anti-aging* yaitu sebelum diinduksi sinar UV-A, sesudah induksi dan sebelum dioles krim dan pada hari ke-14 setelah dioleskan krim (Putry *et al.*, 2023).

E. Analisis Data

Hasil uji parameter krim *anti-aging* ekstrak etanol daun binahong dianalisis secara statistik menggunakan metode uji *paired t-Test*, *one way ANOVA* dan *Tukey* untuk mengkaji keefektifan terhadap perlakuan formula konsentrasi 3%, 5%, 10% berdasarkan output perbedaan rata-rata sebelum dan sesudah diberi perlakuan.