

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah suatu keseluruhan obyek yang menjadi penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga rosella yang diperoleh Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di daerah Karanganyar Tawangmangu Jawa Tengah.

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) yang berumur 2-3 bulan, kelopak bunga berwarna merah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah sediaan ekstrak bunga rosella.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah sediaan krim yang mengandung bunga rosella yang dibuat formulasi dengan variasi konsentrasi ekstrak yang berbeda dengan basis.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah aktivitas anti-aging krim ekstrak bunga rosella melalui pengujian ke Kelinci.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel yang telah diidentifikasi akan diklasifikasikan ke dalam variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung/terikat.

Variabel bebas adalah variabel yang nilainya mempengaruhi variabel tergantung/terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dengan konsentrasi 1.5%

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung/variabel terikat selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol yang dipakai pada penelitian ini adalah galur kelinci, umur, jenis kelamin, genetik, pakan, aktivitas, kesehatan, dan berat badan kelinci.

Variabel tergantung/terikat adalah variabel yang nilainya tergantung dari variabel bebas. Variabel tergantung/terikat dalam penelitian ini adalah uji mutu fisik, uji iritasi primer pada kelinci, serta kadar air, kehalusan, sebum, dan kerutan yang diperoleh dari pengujian aktivitas antiaging pada punggung kelinci menggunakan alat skin analyzer.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, bunga rosella adalah simplisia yang memiliki kelopak bunga berwarna merah terang dan memiliki kandungan sebagai antioksidan.

Kedua, sediaan krim ekstrak bunga rosella adalah sediaan krim yang mengandung bunga rosella yang dibuat dengan cara mencampurkan 2 fase basah dan minyak menggunakan formulasi yang telah dibuat.

Ketiga, sediaan krim ekstrak bunga rosella merupakan krim yang diformulasikan dengan perbedaan konsentrasi ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L*) yaitu 0,5%, 1%; dan 1,5 %

Keempat, mutu fisik sediaan krim adalah parameter yang menunjukkan kestabilan fisik dan mempengaruhi kualitas sediaan krim. Mutu fisik sediaan krim meliputi organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan stabilitas.

Kelima, iritasi primer sediaan krim adalah parameter yang menunjukkan indeks iritasi dan memberikan gambaran keamanan sediaan krim melalui pengamatan parameter edema (pembengkakan) dan eritema (kemerahan).

Keenam, aktivitas anti-aging sediaan krim adalah parameter yang menunjukkan aktivitas sediaan krim sebagai anti-aging yang diaplikasikan pada kulit punggung kelinci yang telah disetujui melalui pengamatan parameter persen pigmen, persen kolagen, persen elastisitas, dan persen kelembaban (kadar air) menggunakan alat skin analyzer.

C. Alat, Bahan, dan Hewan uji

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah skin analyzer, Kandang kelinci, alat cukur bulu kelinci, beaker glass, erlenmeyer, gelas ukur, neraca analitik, pot salep, mortir dan stemper, seperangkat alat uji daya sebar, pH meter, seperangkat alat uji daya lekat, seperangkat alat

uji stabilitas, label, jangka sorong, timbangan analitik, pipet tetes, voltmeter, viscometer *Brookfield DV2T*, cawan porselin, sendok tanduk. .

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) diambil Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di daerah Karanganyar Tawangmangu. Bahan kimia untuk melakukan penelitian ini meliputi setil alkohol, stearil alkohol, metil paraben, propil paraben, Gliserin, span 80 tween 80, parafil liquid dan aquades. Bahan yang digunakan sebagai kontrol positif uji aktivitas anti aging adalah Viva anti aging day cream.

3. Hewan uji

Pengujian hewan pada penelitian ini adalah kelinci putih New Zealand berumur 2-3 bulan dengan berat 3-4 kg, kondisi kelinci tidak dalam keadaan udema ataupun punggung terjadi eritema, dikarenakan kelinci tersebut akan digunakan untuk uji iritasi krim.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) diambil Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di daerah Karanganyar Tawangmangu. Bunga rosella diambil yang berumur 5-6 bulan, dan berwarna merah.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bunga rosella pada penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel tanaman bunga rosella, yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mencocokkan morfologi yang ada pada tanaman yang akan diteliti di laboratorium universitas setia budi.

3. Pembuatan Serbuk

Tanaman bunga rosella dilakukan penyortiran lalu dicuci dengan air mengalir yang bersih supaya menghindari debu atau kotoran yang menempel di bunga rosella. Setelah dicuci bersih, kemudian dioven pada suhu 40°C atau dikeringkan dibawah sinar matahari hingga kering. Setelah kering melakukan gilingan atau penyerbukan. Simplisia dilakukan penyerbukan hingga halus dan melakukan pengayakan menggunakan mesh no 40. Serbuk halus yang sudah

diayak kemudian melakukan maserasi menggunakan pelarut etanol 70% (Lady *et al.*, 2020).

4. Susut Pengeringan Serbuk

Penetapan susut pengeringan serbuk bunga rosella menggunakan alat *moisture balance*. bunga rosella ditimbang sebanyak 2 gram kemudian dimasukkan dalam *moisture balance* yang diatur pemanasan sampai suhu 105 oC dan ditunggu sampai pemanasan selesai. Nilai susut pengeringan dinyatakan dalam satuan persen tertera pada *moisture balance* (Setyawati, 2018).

5. Pembuatan ekstrak bunga rosella.

Pembuatan ekstrak ekstrak dari serbuk kering simplisia dengan cara maserasi menggunakan pelarut yang sesuai. Gunakan pelarut yang dapat menyaring sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia. Kecuali dinyatakan lain dalam monografi, gunakan etanol 70% LP. Masukkan satu bagian serbuk kering sebanyak 600mg dengan pelarut 6 liter etanol 70% simplisia ke dalam maserator. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Kumpulkan semua maserat, kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah dapat juga menggunakan “rotavapor” hingga diperoleh ekstrak kental (FHI EDISI III 2017).

6. Uji Kadar air ekstrak

Uji kadar air menggunakan metode Gravimetri, yaitu timbang saksama lebih kurang 10 g sampel, masukkan ke dalam wadah yang telah ditera. Keringkan pada suhu 105° selama 5 jam, dan timbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang pada selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%.

7. Identifikasi Kandungan Kimia

Identifikasi kandungan kimia dilakukan untuk mengetahui kebenaran kandungan kimia yang berada diserbuk ataupun ekstrak bunga rosella kandungan kimia yang berada dalam bunga rosella yaitu flavonoid, saponin, tanin dan antosianin dengan menggunakan suatu reaksi.

7.1 Identifikasi flavonoid. Uji flavonoid dilakukan dengan mengambil ekstrak sebanyak 0,1 gram dilarutkan dengan etanol 96% sampai terlarut, lalu ditambahkan pereaksi H₂SO₄ pekat. Jika terjadi warna merah, kuning atau jingga menunjukkan adanya flavonoid (Andy, 2019).

7.2 Identifikasi Saponin. Uji Saponin dilakukan dengan mengambil ekstrak sebanyak 0,1 gram lalu ditambahkan 10 ml air panas dan dididihkan selama 10 menit. Setelah itu, ke dalam tabung reaksi tertutup kemudian dikocok selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit, ditambah 1 ml HCL 2 M. Adanya tanin ditunjukkan dengan terbentuknya buih busa yang stabil.

7.3 Identifikasi Tanin. Uji Tanin dilakukan dengan mengambil 0,1 gram sampel diberi penambahan 10 ml air panas dan dididihkan selama 10 menit. Kemudian saring ekstrak, filtrat ditambahkan 10 ml FeCl₃ 1%. Hasil positif menunjukkan warna biru-hijau kehitaman.

7.4 Identifikasi Antosianin. Identifikasi Antosianin. Ekstrak sebanyak ± 0,1 g ditambah dengan HCl 2 M dipanaskan selama 5 menit pada 100 °C, positif antosianin warna tidak akan pudar (Harborne, 1996)

8. Formulasi sediaan krim

Formulasi sediaan krim bunga rosella mengacu pada salah satu penelitian Awwalin (2016). dengan mengganti beberapa formulas basis menggunakan Ceto stearyl dan Setil alkohol sebagai pengemulsi dan parffain liquid dan span 80 sebagai fase minyak, dan gliserin tween 80 dan sebagai fase air .formula krim ekstrak bunga rosella dengan konsentrasi 0,5% 1%, 1,5% Rancangan formula krim ekstrak bunga rosella pada penelitian ini di disajikan dalam tabel 4 berikut.

Tabel 4. Rancangan formula krim ekstrak bunga rosella

Komposisi	Formulasi			
	F1%	F2%	F3%	F4%
Ekstrak bunga rosella	-	0,5	1	1,5
Ceto stearyl	15	15	15	50
Setil alkohol	10	10	10	10
Tween 80	5	5	5	5
Span 80	1	1	1	1
metil paraben	0.1	0.1	0.1	0.1
propilen paraben	0,05	0,05	0,05	0,05
Gliserin	30	30	30	30
Paraffin liq	10	10	10	10
aquades ad	100	100	100	100

Keterangan :

Kontrol positif :viva krim

F1 :krim kontrol negatif (basis krim)

F2: krim ekstrak bunga rosella konsentrasi 0,5%

F3:krim ekstrak bunga rosella konsentrasi 1%

F4:krim ekstrak bunga rosella konsentrasi 1,5%

9. Pembuatan Krim

Menyiapkan mortir yang sudah di panaskan. Krim dibuat dengan cara: bahan yang tergolong fase minyak, Setil alkohol stearil alkohol, propil paraben, paraffil liquid,dan span 80 dipanaskan pada suhu 70°C. Bahan yang tergolong fase air, yaitu kalium Gliserin, aquades, tween 80 dan metil paraben dipanaskan pada suhu 70°C, diaduk sampai larut sempurna. Fase air dicampurkan sedikit demi sedikit ke dalam fase minyak di dalam mortir kemudian diaduk dengan kuat selama 10 menit sampai terbentuk basis krim. Setelah basis terbentuk, ekstrak dicampurkan ke dalam basis krim (ekstrak di larutkan dengan aquades), sedikit demi sedikit lalu diaduk perlahan, kemudian didinginkan dan di maskkan ke dalam wadah tertutup rapat.

10. Pengujian mutu fisik dan stabilitas krim

Pengujian mutu fisik sediaan krim bunga rosella yang dilakukan meliputi pengujian organoleptis, pengujian homogenitas, pengujian pH, pengujian viskositas, pengujian daya sebar, dan pengujian daya lekat. Pengujian stabilitas sediaan krim bunga rosella dilakukan menggunakan metode pengujian stabilitas *cycling test*.

10.1 Pengujian organoleptis. Pengujian organoleptis sediaan krim meliputi warna, aroma, konsistensi, dan sensasi di kulit dengan cara mengamati penampilan visual dan sensasi di kulit (Hasrawati 2020).

10.2 Uji pH. Pengujian pH bertujuan untuk mengetahui keamanan dari ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) sehingga tidak mengiritasi kulit,apabila ph terlalu basa maka kulit akan bersisik sebaliknya jika pH terlalu asam maka dapat memicu terjadinya iritasi kulit. Standar pH normal bagi kulit yaitu 4,5 - 6,5.

10.3 Uji Homogenitas. Uji homogenitas adalah salah satu uji fisik sediaan yang penting dalam sediaan farmasetika ,dari hal hal dari tersebut agar kita tahu dari bahan bahan yang dicampur merata atau tidak didalam ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L).

10.4 Uji Viskositas. Uji viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer. Uji viskositas dilakukan dengan cara 50

gram sediaan krim diukur dengan viskositasnya dengan viskometer Brookfield. Beberapa sampel dimasukkan ke dalam wadah, celupkan spindle ke dalam wadah hingga tanda batas. Menentukan nomor spindle dan Nilai cPs untuk viskositas akan muncul pada monitor alat (Sukmawati dkk., 2013)

10.5 Uji Daya Sebar. Uji daya sebar ini dilakukan dengan cara 0,5 gram sediaan krim diletakkan di atas kaca bulat dan kaca lainnya di atasnya dan dibiarkan selama 5 menit. Diameter sebar krim diukur, kemudian ditambahkan beban 50 gram dan di tunggu selama 1 menit, kemudian diukur diameternya. Dan tambahkan lagi beban 100 gram dan ukur diameternya dan yang terakhir 150 dan diukur diameternya. (Naibaho *et al.*, 2013)

10.6 Uji daya lekat. Pengujian daya lekat dilakukan dengan cara meletakkan sediaan krim secukupnya di atas objek glass, kemudian letakkan objek glass yang lain di atas sediaan krim, ditekan dengan beban 0,5 kg selama 5 menit. Ambil beban dan tetap posisikan objek glass masih menempel, lepaskan beban seberat 1000 gram dan catat waktu kedua objek glass terlepas (Permatasari, 2019).

11. Uji iritasi primer krim bunga rosella

Uji iritasi primer dilakukan dengan mencukur bulu pada punggung kelinci sampai bersih, kemudian punggung kelinci dibagi menjadi 4 bagian berbentuk bujur sangkar dengan ukuran masing-masing 1x1 inci (Lu, 1995). Kulit punggung kelinci dibersihkan menggunakan kapas yang dibasahi aquades sebelum dioleskan sediaan krim. Kasa dioleskan sediaan krim bunga rosella, kemudian ditempelkan pada punggung kelinci, setelah itu hewan uji dikembalikan ke kandangnya. Hari selanjutnya pada jam yang sama, plester dibuka dan kulit punggung kelinci dibersihkan dengan aquades dari sisa sediaan krim yang menempel. Gejala yang timbul yang diamati yaitu iritasi primer yang berupa eritema dan edema selama 1 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam (OECD, 2002). Rumus perhitungan indeks iritasi primer adalah sebagai berikut (Lu, 1995):

$$\text{Indeks iritasi primer} = \frac{\sum \text{skor eritema} + \sum \text{skor edema}}{2}$$

12. Uji Aktivitas antiaging

Uji aktivitas sediaan krim ekstrak bunga rosella menggunakan kelinci sebagai hewan uji, menyiapkan kelinci sebanyak 5 ekor dan melakukan pencukuran punggung kelinci dan melakukan

cek kulit awal punggung kelinci dengan cara melakukan penyinaran UV A dan melihat hasil uji yang telah ditandai dengan berbagai parameter uji, seperti *moussiture*, *elastic*, *collagen*, dan sebum dengan menggunakan alat skin analyzer. Pemakaian krim dioleskan dua kali sehari setiap hari selama 30 hari pada daerah punggung Kelinci. Perubahan kondisi kulit diukur setelah hari ke-30 dengan menggunakan skin analyzer.

12.1 Persiapan hewan uji. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci putih jantan berusia 4-8 bulan, berat 2-3 kg, sehat, tidak terdapat *edema* dan *eritema* pada kulit bagian punggung kelinci, serta mau makan dan minum. Kelinci yang dibutuhkan adalah 3 ekor dan diadaptasi terlebih dahulu selama satu minggu dan melakukan penyinaran UV ke punggung kelinci.

12.2 Pembagian kelompok uji. Setiap satu kelinci diberikan satu kelompok perlakuan, dimana perlakuan tersebut dibagi berdasarkan:

Formula I : Sebagai kontrol negatif (diberikan basis krim)

Formula II : Krim ekstrak bunga rosella konsentrasi 0,5%

Formula III : Krim ekstrak bunga rosella konsentrasi 1 %

Formula IV : Krim ekstrak bunga rosella konsentrasi 1,5%

12.3 Pengamatan aktivitas anti-aging. Parameter kerutan diamati sebelum dan sesudah pemberian, pada hari ke-0 (sebelum diberikan sediaan krim) dan pada hari ke 4 minggu (sesudah diberikan sediaan krim). Parameter kerutan yang diamati antara lain persen kolagen, persen kelembaban, dan persen elastisitas menggunakan alat skin analyzer. Parameter uji, seperti kadar air (*moisture*), kehalusan (*evenness*), sebum pada kulit, dan keriput (*wrinkle*) dapat langsung dilihat pada komputer yang sudah diinstal aplikasi skin analyzer untuk menunjukkan persentase tersebut.

E. Analisis Hasil

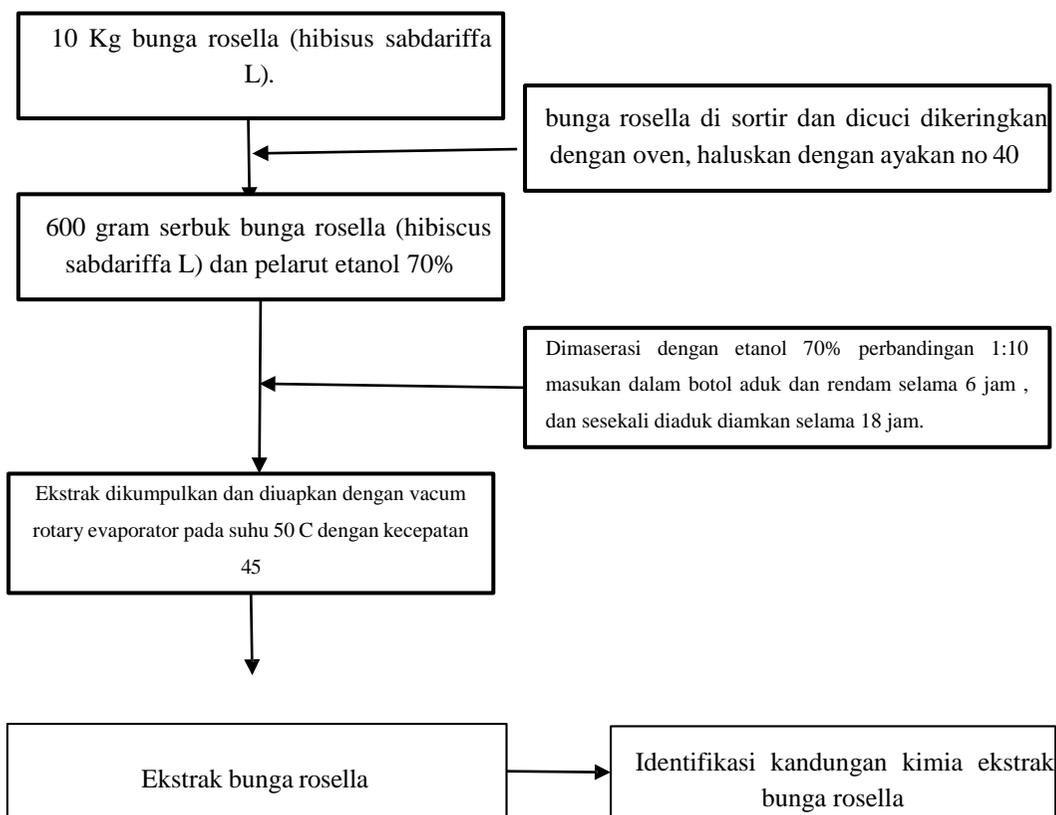
Data yang telah terkumpul kemudian dianalisis menggunakan program Statistical Product and Service Solution (SPSS). Data dianalisis dengan langkah- langkah berikut:

1. Data stabilitas sediaan krim yang diperoleh dianalisis statistik dengan menggunakan Test of Normality untuk melihat distribusi normal data. Kemudian dilakukan uji statistik ANOVA untuk melihat perbedaan keseluruhan apakah terjadi perbedaan

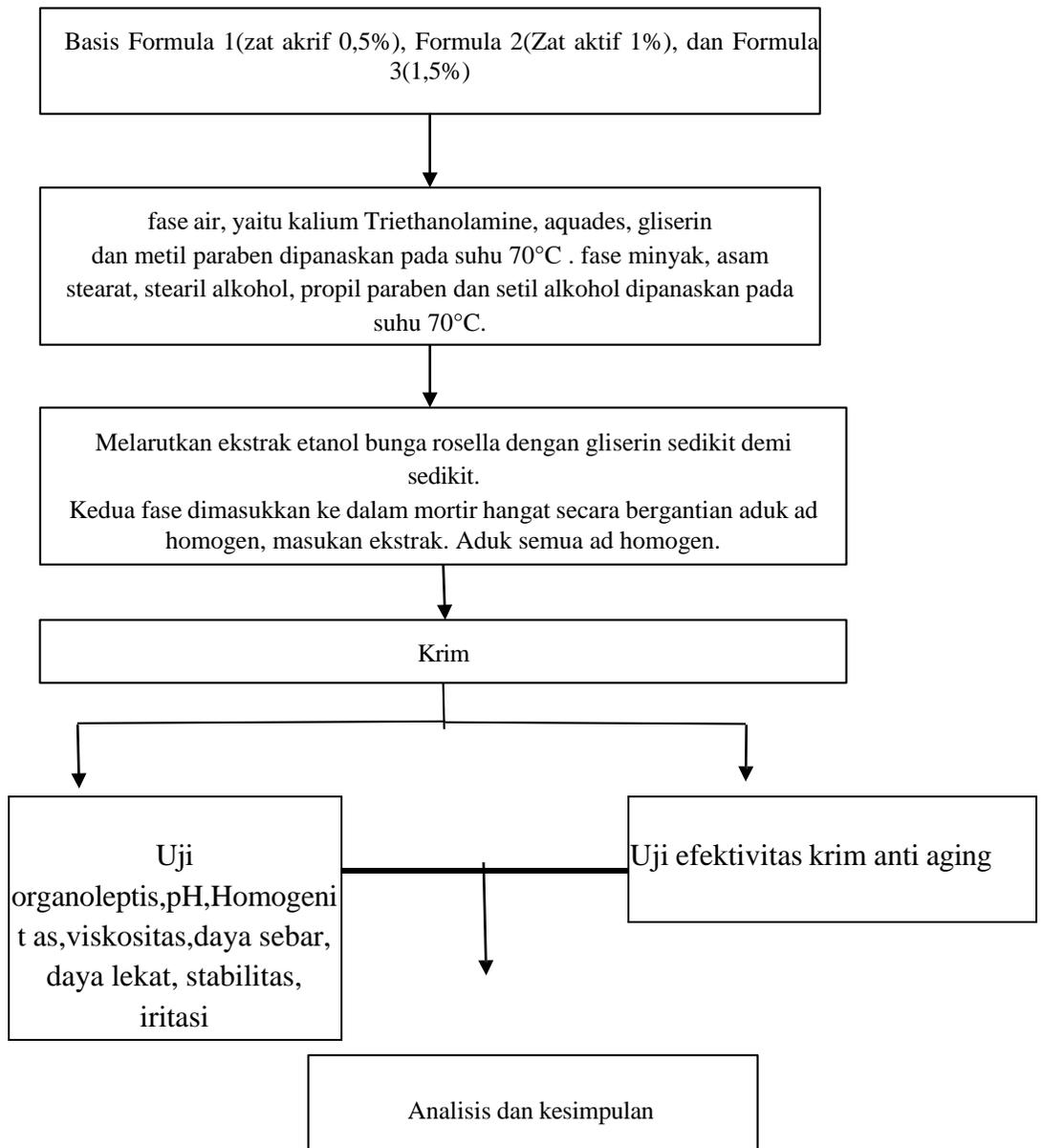
signifikan.

2. Hasil uji aktivitas anti-aging menggunakan skin analyzer dengan parameter persen kolagen, persen elastic, persen sebum, persen moisturize sebelum dan sesudah diberikan sediaan krim dianalisis menggunakan paired T-test dan ANOVA yang dilanjutkan uji *post hoc* (uji Tukey).

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 10. Skema pembuatan ekstrak bunga rosella



Gambar 11. Skema pembuatan krim ekstrak bunga rosella