

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang diambil dari took rempah di pasar tradisional gede, Surakarta, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah krim *Anti-Aging* ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan variasi konsentrasi ekstrak 3%, 6%, dan 9%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah krim *Anti-Aging* ekstrak kayu secang terhadap tikus putih galur wistar jantan.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah sediaan krim ekstrak kayu secang dengan variasi konsentrasi 3%, 6%, dan 9%.

Variable utama ketiga dalam penelitian ini adalah efektivitas *Anti-Aging* ekstrak kayu secang dengan pemaparan sinar UV-B pada kulit telapak kaki tikus dilihat dari kerutan dan pengamatan lanjutan menggunakan pengamatan histopatologi menghitung kerusakan sel epidermis pada kulit telapak kaki tikus,

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang terlebih dahulu telah diidentifikasi, selanjutnya dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yakni variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel utama yang sengaja diubah-ubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung dengan perubahan yang dilakukan. Variabel yang dimaksud adalah variasi konsentrasi ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dalam formulasi sediaan krim.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh

tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara cepat. Variabel terkontrol yang dimaksud adalah tikus putih galur wistar jantan. Kondisi fisik hewan uji yang meliputi; berat badan, usia, jenis kelamin, tempat pemaparan, temperatur, makan dan minum, proses pembuatan krim, penelitian dan laboratorium.

Variabel terikat adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian. Variabel terikat yang dimaksud yakni adanya efektivitas *Anti-Aging* pada kulit telapak kaki tikus yang dilihat dari skor kerutan dan kulit epidermis.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, kayu secang merupakan serutan dari batang kayu tanaman secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang utuh dan bersih dari penyakit, diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu-Karanganyar, Surakarta.

Kedua, ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) merupakan hasil maserasi serbuk kayu secang dengan pelarut etanol 70% selama 5 hari kemudian disaring dan dipekatkan.

Ketiga, tikus percobaan adalah tikus putih galur wistar jantan dengan berat 200 gram dan kondisi telapak kaki tikus telah bebas dari bulu.

Keempat, variasi konsentrasi ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) yang digunakan dalam masing-masing formula yakni 3%, 6%, dan 9%.

Kelima, uji sifat fisik sediaan krim adalah uji dengan melihat organoleptis, homogenitas, daya sebar, daya lekat, viskositas, pH, tipe krim dan efektivitas *Anti-Aging*.

Keenam, efektivitas *Anti-Aging* krim adalah efektivitas *Anti-Aging* ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan metode penyinaran sinar UV-B. Sebelumnya krim uji diaplikasikan pada telapak kaki tikus, dibiarkan berkontak pada telapak kaki tikus selama 5 menit. Penyinaran dilakukan menggunakan lampu UV-B di radiasi dengan intensitas 13 Watt/cm² ditempatkan sekitar 10 cm tepat diatas kulit telapak kaki, penyinaran dilakukan selama 5 hari seminggu selama 2 minggu (dengan lama penyinaran 13 menit setiap harinya), sedangkan

kaki kiri mendapatkan perlakuan dengan pemberian basis krim dan menjadi kontrol negatif.

Ketujuh, kerutan merupakan penilaian yang dapat dilihat dalam dua minggu, dan dapat dilanjutkan untuk mengetahui lebih jelas tentang kerusakan jaringan epidermis pada telapak kaki tikus dengan menghitung kerusakan sel .

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, mesin penggiling, ayakan mesh 60, peralatan krimas, *rotary vacuum evaporator*, tabung reaksi, cawan porselin, pipet ukur, waterbath, lampu spiritus, seperangkat alat uji daya lekat, seperangkat alat uji daya sebar, *Moisture balance*, botol kaca krimap, viskometer *Cup and Bob*, pH meter, neraca analitik, mortir, stamper, obyek glass, deck glass, labu distilasi *Sterling Bidwell*, wadah krim, lampu sinar UV-B, dan mikroskop cahaya.

2. Bahan

2.1 Bahan Sampel. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) sebagai bahan aktif yang diperoleh dengan maserasi menggunakan etanol 70%.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan etanol 70%, propilen glikol, Dinatrium edetat, TEA, vaselin, setil alcohol, asam stearat, gliseril monostearat, nipagin, asam asetat, asam sulfat, kloroform, asam klorida 2%, logam magnesium, besi (III) klorida, pereaksi dragendorff, dan pereaksi mayer.

2.3 Hewan Uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus* L.) yang berumur 2 bulan dengan berat rata-rata berkisar antara 180-200 gram yang diperoleh dari laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi dan Determinasi tanaman secang

Identifikasi tanaman dilakukan untuk menghindari kesalahan pemilihan bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian. Identifikasi yang dilakukan

meliputi pengujian organoleptik (bau, warna, dan rasa), pengujian makroskopik dan mikroskopik. Identifikasi tanaman ini dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

Determinasi tanaman pada tahapan ini adalah untuk menetapkan kebenaran sampel tanaman secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan cara mencocokkan ciri-ciri makroskopik dan morfologi simplisia tanaman yang akan diteliti untuk menghindari kesalahan dari simplisia tanaman yang akan digunakan untuk tahap penelitian. Determinasi tanaman ini dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengambilan dan Pemilihan bahan

Simplisia batang kayu secang diperoleh dari Toko rempah di pasar tradisional gede Surakarta, Jawa Tengah. Simplisia batang kayu secang dibersihkan dari kotoran-kotoran yang melekat. Dilanjutkan dengan proses pengeringan menggunakan oven pada suhu kurang lebih 50°C selama dua hari. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air pada simplisia batang kayu secang sehingga mengurangi bahkan mencegah pembusukan yang disebabkan oleh mikroorganisme.

3. Pembuatan serbuk kayu secang

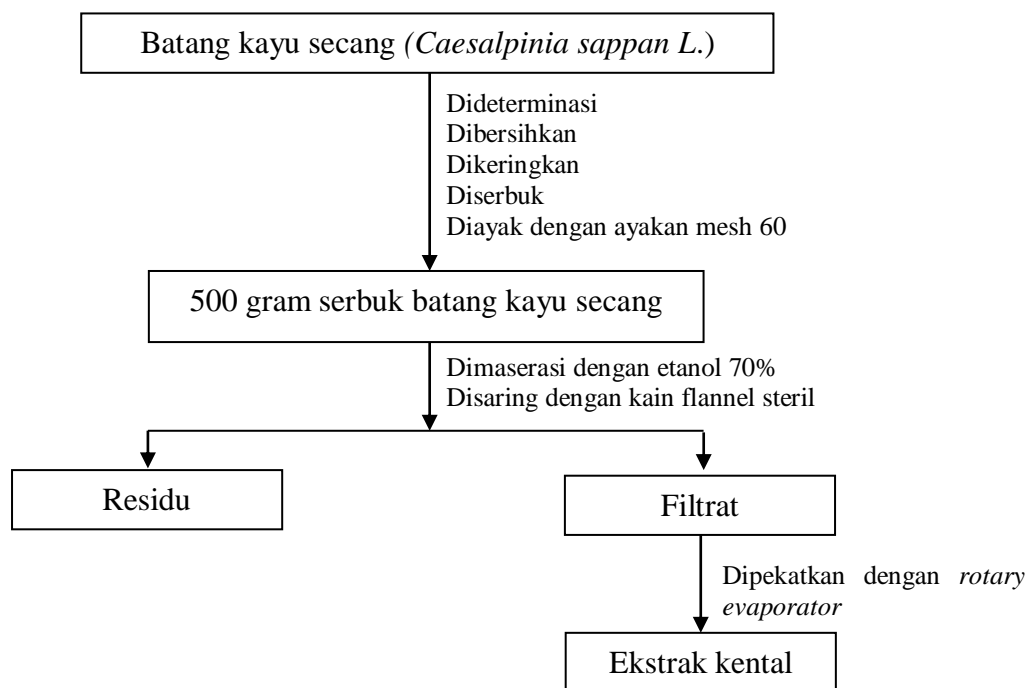
Simplisia batang kayu secang kering tersebut kemudian diserbuk dengan alat penggiling atau blender. Lalu diayak menggunakan ayakan mesh 60 sampai serbuk terayak habis. Hasil serbuk disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat. Kemudian dilakukan presentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk kayu secang

Penetapan susut pengeringan serbuk kayu secang menggunakan alat *Moisture balance*. Prosedur dilakukan dengan menimbang 2 gram serbuk kayu secang, kemudian dimasukkan ke alat *moisture balance* pada suhu 105°C selama 5 menit dilakukan sebanyak 3 kali ditandai dengan hasil bobot yang konstan. Nilai kadar susut pengeringan dinyatakan dalam satuan persen.

5. Pembuatan ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*)

Pembuatan ekstrak kayu secang menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, dengan cara 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok dimasukkan ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan 75 bagian cairan penyari. Sebanyak 500 gram serbuk dimaserasi dengan penyari etanol 70% sebanyak 3750 ml di dalam botol kaca gelap. Kemudian didiamkan selama 5 hari terlindung dari cahaya. Gojog setiap 8 jam sekali. Setelah 5 hari hasil maserasi disaring dengan kain flannel steril, ampas diperas. Ampas ditambah dengan etanol 70% sebanyak 1250 ml sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian atau dengan penambahan sisa pelarut hingga diperoleh filtrat 5000 ml. Hasil ekstraksi digabungkan, kemudian dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental (Depkes RI 1986).



Gambar 12. Skema pembuatan ekstrak etanol batang kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*)

6. Penetapan organoleptis ekstrak kayu secang

Penetapan organoleptis ekstrak kayu secang dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan bau dari ekstrak kayu secang.

7. Penetapan susut pengeringan ekstrak

Penetapan susut pengeringan ekstrak kayu secang menggunakan alat *Moisture balance*. Prosedur dilakukan dengan menimbang 2 gram ekstrak kayu

secang, kemudian dimasukkan ke alat *moisture balance* pada suhu 105°C selama 15 menit dilakukan sebanyak 3 kali ditandai dengan hasil bobot yang konstan. Nilai kadar susut pengeringan dinyatakan dalam satuan persen.

8. Identifikasi kandungan kimia ekstrak kayu secang

Identifikasi kandungan kimia dilakukan untuk menetapkan kandungan kimia dalam ekstrak kayu secang dengan pereaksi.

8.1 Identifikasi kimia dengan pereaksi.

8.1.1 Identifikasi alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan Sampel dilarutkan dalam 10 mL HCl, kemudian dipanaskan sambil terus diaduk. Kemudian dilakukan pendinginan dan dimasukkan serbuk NaCl sebanyak 1 sendok spatula, kemudian dihomogenkan dan disaring. Kemudian diuji dengan 2 pereaksi alkaloid yaitu pereaksi *Dragendorff* dan pereaksi *Mayer*. Hasil uji positif diperoleh bila terbentuk endapan merah hingga jingga dengan pereaksi *Dragendorff* dan endapan putih kekuningan dengan pereaksi *Mayer* (Agustina *et al.* 2018).

8.1.2 Identifikasi flavonoid. Uji flavonoid dilakukan dengan sampel dilarutkan dalam aquadest. Setelah itu dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrate ditambahkan 0,5 mg bubuk Mg dan ditambahkan 1 ml HCl pekat dan amil alkohol. Dicampur dan dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau jingga atau kuning pada lapisan amil alkohol (Alamsyah *et al.* 2014).

8.1.3 Identifikasi glikosida. Serbuk simplisa uji dilarutkan dalam pelarut etanol, diuapkan diatas tangas air. Kemudian sisa dilarutkan dalam 5 mL asam asetat anhidrat, ditambahkan 10 tetes asam sulfat. Terjadinya warna biru atau hijau menunjukkan adanya glikosida (reaksi *Liebermann Burchard*) (Depkes RI 1989).

8.1.4 Identifikasi polifenol dan tanin. Sebanyak 3 mL larutan ekstrak uji dibagi menjadi 3 bagian yaitu tabung A, B, dan C. Tabung A digunakan sebagai blanko, tabung B direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%. Terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin dan

polifenol, sedangkan pada tabung C hanya ditambahkan garam krimatin. Apabila terbentuk endapan pada tabung C maka larutan ekstrak positif mengandung tanin (Robinson 1991).

9. Rancangan formulasi krim

Formula basis krim sebagai berikut : (Satria *et al.* 2017)

R/	Propilen glikol	7,0 ml
	Dinatrium edetat	0,005 gram
	TEA	1,0 ml
	Vaselin	5,0 gram
	Setil alcohol	3,0 gram
	Asam stearat	3,0 gram
	Gliserin monostearat	0,1 ml
	Nipagin	0,1 gram
	Nipasol	0,2 gram
	Aquadest ad	100 gram

Formulasi krim ini kemudian dirancang dalam berbagai variasi konsentrasi ekstrak kayu secang. Rancangan formula krim *Anti-Aging* ekstrak kayu secang dapat dilihat pada tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Rancangan formula krim Anti-Aging ekstrak kayu secang

Bahan	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)
Ekstrak *	3	6	9	-
Propilen glikol	7,0	7,0	7,0	7,0
Dinatrium Edetat	0,05	0,05	0,05	0,05
TEA	1,0	1,0	1,0	1,0
Vaselin	5,0	5,0	5,0	5,0
Setil alkohol	3,0	3,0	3,0	3,0
Asam stearate	3,0	3,0	3,0	3,0
Gliseril monostearat	0,1	0,1	0,1	0,1
Nipagin	0,1	0,1	0,1	0,1
Nipasol	0,2	0,2	0,2	0,2
Aquadest ad	100 g	100 g	100 g	100g

Keterangan:

F1: krim dengan konsentrasi ekstrak 3%

F2: krim dengan konsentrasi ekstrak 6%

F3: krim dengan konsentrasi ekstrak 9%

F4: krim tanpa ekstrak kayu secang (kontrol negatif)

10. Pembuatan sediaan krim

Komposisi formula krim ekstrak etanol kayu secang ditunjukkan melalui tabel 1. Pembuatan sediaan krim diawali dengan menimbang semua bahan yang terdapat dalam formula dipisahkan menjadi dua kelompok yaitu fase minyak yang terdiri dari vaselin, setil alkohol, asam stearat, dan gliseril monostearat, dilebur diatas penangas air dengan suhu kurang lebih 70°C, setelah melebur ditambahkan nipasol. Fase air yang terdiri dari aquadest, propilen glikol, dinatrium edetat, trietanol amin (TEA) dilarutkan bersamaan. Nipagin yang telah dilarutkan dalam aquadest panas dimasukkan dalam fase air. Diaduk fase air dalam beaker glass, kemudian ditambahkan secara perlahan-lahan fase minyak kedalam dalam pengadukan yang konstan pada suhu lebih kurang 70°C sampai terbentuk basis krim. Ditambahkan ekstrak etanol kayu secang sedikit demi sedikit, kemudian diaduk hingga krim homogen (Satria *et al.* 2017).

11. Pengujian sifat fisik sediaan krim ekstrak kayu secang

11.1 Uji organoleptis. Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna dan bau yang diamati secara visual. Dimana spesifikasi krim yang harus dipenuhi adalah memenuhi konsistensi lembut, warna sediaan homogen, dan baunya harum (Safitri *et al.* 2014).

11.2 Uji homogenitas. Uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan objek glass dengan cara sejumlah tertentu sediaan dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan lain yang cocok, sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Satria *et al.* 2017).

11.3 Uji pH krim. Pengujian pH dilakukan dengan mencelupkan pH meter kedalam sediaan krim ekstrak kayu secang. Krim dilarutkan dalam aquadest dengan perbandingan 1:9.

11.4 Uji viskositas. Uji viskositas krim dilakukan dengan alat viskometer Cup and Bob. Bagian Cup diisi dengan masa krim yang akan diuji. Viskositas diketahui setelah jarum penunjuk skala dalam keadaan stabil (Sharon *et al.* 2013). Pengujian dilakukan pada hari pertama setelah dibuat krim selanjutnya dilakukan pengamatan pada hari ke-7, ke-14, dan hari ke-21.

11.5 Uji daya sebar krim. Krim dengan berat 0,5 g diletakkan di tengah-tengah kaca bulat, ditutup dengan kaca lain yang telah ditimbang beratnya dan dibiarkan selama 1 menit kemudian diukur diameter sebar krim. Setelah itu ditambahkan beban 50 g dan dibiarkan 1 menit kemudian diukur diameter sebar krim. Penambahan beban berat setelah 1 menit dilakukan secara terus-menerus hingga diperoleh diameter yang cukup untuk melihat pengaruh beban terhadap perubahan diameter sebar krim (Widyaningrum *et al.* 2012). Pengujian dilakukan pada hari pertama setelah dibuat krim selanjutnya dilakukan pengamatan pada hari ke-7, ke-14, dan hari ke-21.

11.6 Uji daya lekat krim. Krim seberat 0,25 g diletakkan pada krimas obyek dan ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Setelah itu krimas obyek dipasang pada alat tes. Alat tes diberi beban 80 g dan kemudian dicatat waktu pelepasan krim dari krimas obyek. Pengujian daya lekat dilakukan sebanyak tiga kali untuk setiap formula (Widyaningrum *et al.* 2012). Pengujian dilakukan pada hari pertama setelah dibuat krim selanjutnya dilakukan pengamatan pada hari ke-7, ke-14, dan hari ke-21.

11.7 Uji tipe krim. Sejumlah sediaan diletakkan diatas objek glass, ditambahkan 1 tetes metil biru, diaduk dengan batang pengaduk. Bila metil biru tersebar merata berarti sediaan tipe m/a, tetapi bila hanya bintik bintik sediaan tipe a/m (Satria *et al.* 2017).

11.8 Uji stabilitas krim. Pengujian dilakukan dengan metode *Cycling Test* dimana satu siklus sediaan krim disimpan pada suhu 4 °C selama 24 jam lalu dikeluarkan dan ditemptan pada suhu kurang lebih 40 °C selama 24 jam. Percobaan diulang sebanyak 6 siklus. Kondisi fisik krim dibandingkan selama percobaan dengan sediaan sebeumnya (*ASEAN Guideline on Stability Studi of Drug Product* 2005) Adapun parameter pengujian lainnya di dalam uji stabilitas krim yaitu pengujian Organoleptis, pH, dan Viskositas dengan pengamatan hari ke-0 dan hari ke-12.

12. Penyiapan hewan uji

Hewan uji tikus galur wistar betina putih sebanyak 20 ekor dengan berat kurang lebih 200 gram. Diaklimatisasi dengan lingkungan tempat penelitian

selama 7 hari sebelum diperlakukan agar hewan uji tersebut terbiasa dengan lingkungan dan perlakuan yang baru. Hewan uji ditempatkan dalam kandang dan diberi makan yang cukup untuk setiap harinya.

13. Pengujian efektivitas *Anti-Aging* krim ekstrak kayu secang

Disediakan dua puluh ekor hewan uji tikus, yang dibagi menjadi 4 kelompok dan masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus sebelumnya sudah diaklimatisasi dicukur bulu telapak kaki sebelah kanan dan kiri hingga tidak meninggalkan rambut. Lalu diberikan tanda lokasi yang akan diperlakukan dimana diposisi sebelah kanan merupakan daerah yang diuji pemberian krim ekstrak kayu secang dengan masing-masing konsentrasi 3%, 6%, dan 9%. Sedangkan telapak kaki sebelah kiri diberi perlakuan dengan pemberian basis krim sebagai (kontrol negatif). Pemberian sediaan krim dilakukan sebelum penyinaran, krim uji dibiarkan berkontak pada telapak kaki selama 5 menit. Pada kelompok 1 dioleskan krim formula dengan konsentrasi ekstrak 3%, kelompok 2 dioleskan krim formula dengan konsentrasi ekstrak 6%, kelompok 3 dioleskan krim formula dengan konsentrasi ekstrak 9%, dan kelompok 4 dioleskan krim produk pasaran yaitu Wardah *renew you day cream* (kontrol positif). pengolesan krim dilakukan 1 kali sehari sebelum dilakukan penyinaran.

14. Pengamatan kerutan setelah pemaparan sinar UV-B

Pengamatan kerutan setelah pemaparan sinar UV-B dilihat pada akhir minggu kedua secara visual dengan parameter skor menurut criteria pengamatan: 0 = tidak ada kerutan kasar, 1 = sedikit kerutan kasar dangkal. 2 = beberapa kerutan kasar, dan 3 = beberapa kerutan kasar dalam. Skor kerutan dibandingkan diantara kaki yang hanya terpapar sinar UV-B dengan kaki yang diberi krim uji sebelum pemaparan sinar UV-B. Rata-rata dari selisih skor kedua kaki kemudian dihitung. Rata-rata dari skor pada kaki yang diberikan krim uji dibandingkan diantara kelompok perlakuan.

15. Pengamatan kerusakan jaringan epidermis

Pada bagian akhir tikus dikorbankan dan kulit telapak kaki diambil, dilakukan pengamatan lanjutan untuk mengetahui secara jelas tentang kerusakan

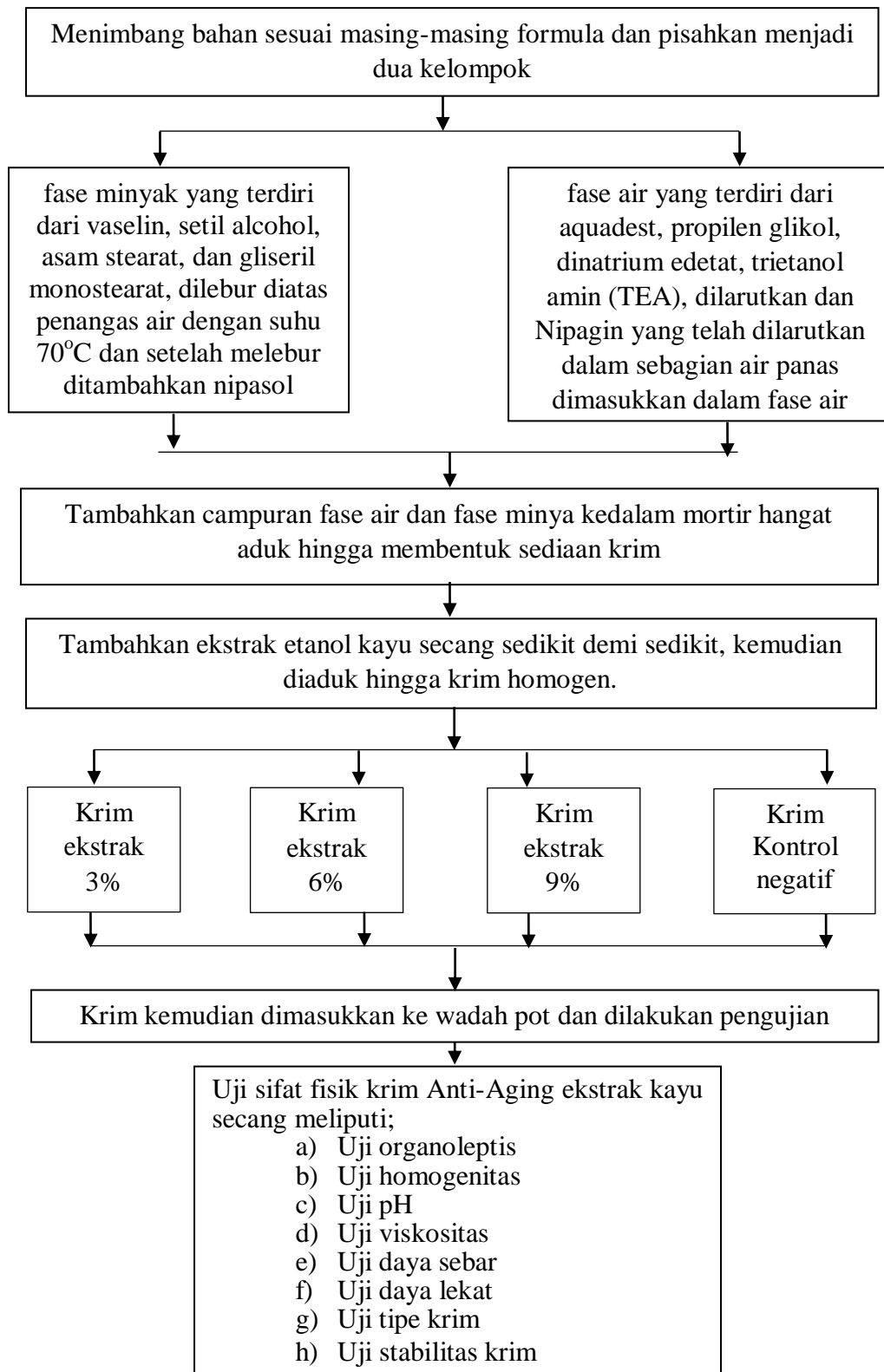
jaringan epidermis pada telapak kaki tikus dengan menghitung kerusakan sel di Laboratorium Histopatologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.

E. Analisis Data

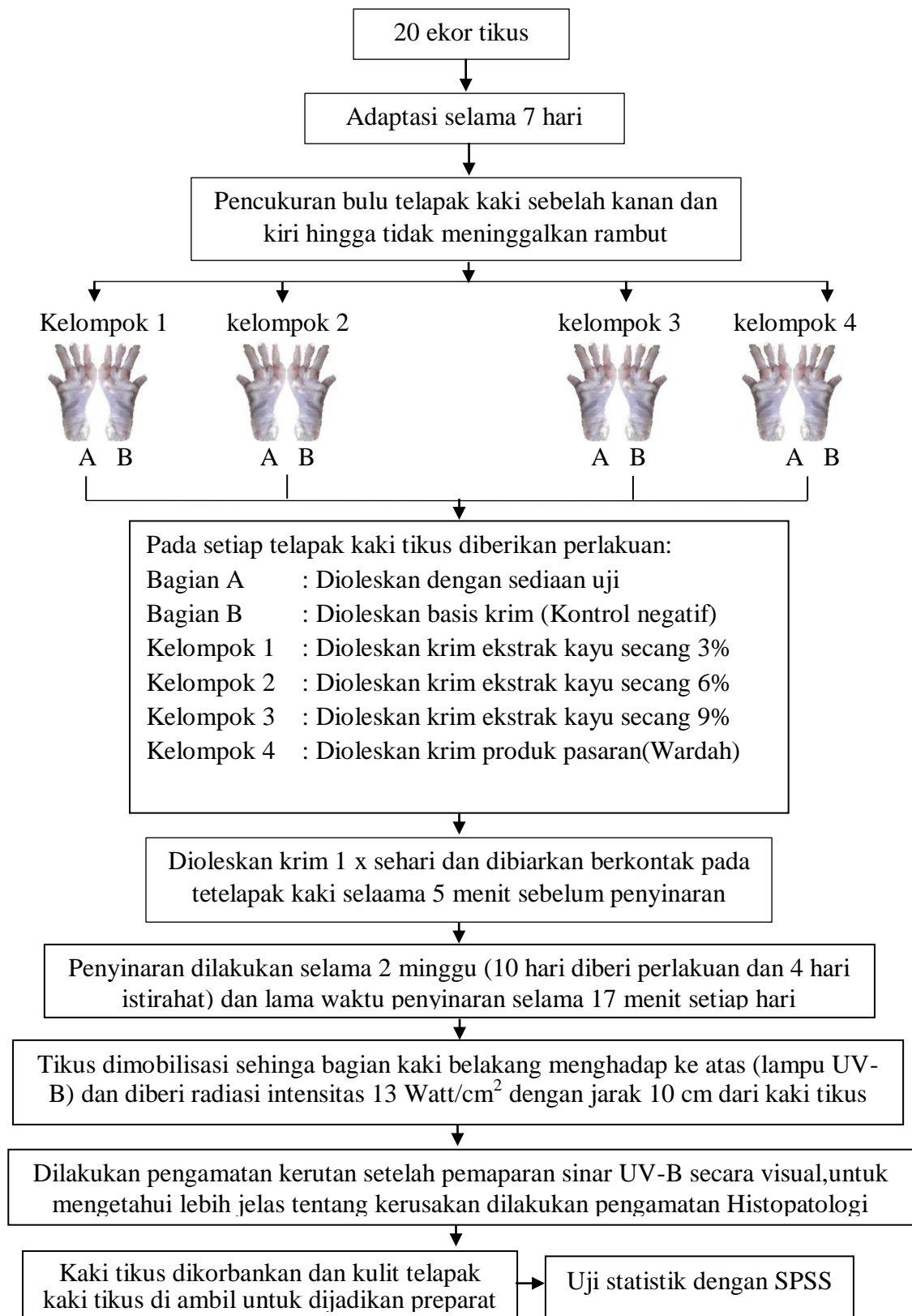
Dari data hasil pengujian sifat fisik sediaan krim ekstrak etanol 70% kayu secang dengan konsentrasi 3%, 6%, dan 9% Masing-masing formula diuji sifat fisiknya yang meliputi organoleptis, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, tipe krim, dan stabilitas krim dengan metode *Cycling Test*. Hasil formulasi dilakukan pendekatan statistik dengan menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Hasil data yang diperoleh dianalisis dengan *Kolmogorov-Smirnov*, apabila data yang diperoleh menunjukkan distribusi normal maka selanjutnya dilakukan analisis dengan *One Way Anova* taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan ke analisis SNK (*Student Newman Keuls*). Apabila data tidak terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan analisis *Kruskal-Wallis*. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Pada setiap uji dicari perbedaan signifikan pada hari ke-0, hari ke-14, dan hari ke-21 setelah pembuatan krim dapat dianalisis dengan uji *Repeated Measure Anova*.

Data hasil kerutan selama 10 hari pada krim *Anti-Aging* ekstrak kayu secang dapat dianalisis secara statistik menggunakan metode *Kolmogorov-Smirnov*. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan metode ANOVA dua jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Lanjutkan dengan uji Tukey untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka dilanjutkan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya.

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 13. Skema pembuatan dan pengujian krim *Anti-Aging* ekstrak kayu secang



Gambar 14. Skema pengujian efektivitas *Anti-Aging* krim ekstrak kayu secang