

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kersen yang diperoleh di daerah Surakarta Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kersen segar yang diperoleh di daerah Surakarta Jawa Tengah. Daun *Muntingia calabura* L. merupakan daun tunggal, berseling, berbentuk jorong, panjang 6-10 cm, ujung daun runcing, pangkal berlekuk, tepi daun bergerigi, permukaan daun berbulu halus, pertulangan menyirip, hijau, mudah layu, dan daging daun seperti kertas (papyraceus).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah ekstrak daun kersen yang dibuat sediaan krim. Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah hewan uji kelinci. Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah aktivitas *anti-aging* krim ekstrak daun kersen pada hewan uji.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel prakondisi adalah variabel yang keberadaannya merupakan prasyarat bagi bekerjanya suatu variabel bebas terhadap variabel tergantung. Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah sinar UVA.

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat, entah secara positif atau negatif. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi kadar ekstrak etanol daun kersen.

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung/terikat selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkendali 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 berubah karena variabel bebas. Variabel tergantung/terikat dalam penelitian ini adalah uji iritasi primer dan iritasi okuler kelinci, serta persentase kolagen, elastisitas, dan kelembaban kulit kelinci.

3. Definisi operasional variabel utama

Tabel 2. Definisi operasional variabel utama

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

Skala Ordinal ini lebih tinggi daripada skala nominal, dan sering juga disebut dengan skala peringkat. Hal ini karena dalam skala ordinal, lambang-lambang bilangan hasil pengukuran selain menunjukkan pembedaan juga menunjukkan urutan atau tingkatan obyek yang diukur menurut karakteristik tertentu (Junaidi 2015).

Skala rasio adalah skala data dengan kualitas paling tinggi. Pada skala rasio, terdapat semua karakteristik skala nominal, ordinal dan skala interval ditambah dengan sifat adanya nilai nol yang bersifat mutlak. Nilai nol mutlak ini artinya

adalah nilai dasar yang tidak bisa diubah meskipun menggunakan skala yang lain. Oleh karenanya, pada skala ratio, pengukuran sudah mempunyai nilai perbandingan/rasio (Junaidi 2015).

Skala iritasi adalah keadaan area kulit hewan uji yang mengalami eritema maupun edema sebelum dan sesudah dioles krim yang diukur dengan melihatnya secara visual. Kadar kolagen adalah prosentase jumlah kolagen kulit hewan uji sebelum dan sesudah dioles krim yang diukur dengan *Skin Analyzer* EH900U. Elastisitas kulit adalah kekenyalan kulit hewan uji sebelum dan sesudah dioles krim yang diukur dengan *Skin Analyzer* EH900U. Kadar air (*moisture*) adalah persentase jumlah air pada kulit hewan uji sebelum dan sesudah dioles krim yang diukur dengan *Skin Analyzer* EH900U.

C. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

1. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun kersen segar bagian pangkal ranting. Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah etanol 96%. Bahan untuk pembuatan krim adalah ekstrak etanol daun kersen, parafin cair, asam stearat, etil alkohol, gliserin, adeps lanae, Tween 80, Span 80, metil paraben, profil paraben, dan air suling. Loreal Paris Revitalift anti-wrinkle + firming day cream digunakan sebagai kontrol positif.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah botol kaca kedap cahaya sebagai tempat maserasi, gelas-gelas kaca, kain flanel, evaporator (Heidolph WB 4000), oven, mesin giling, ayakan no 40, *Moisture Balanc*, kandang kelinci, tempat minum, alat cukur, penggaris, timbangan digital, *restainer*, lampu Exoterra® *Daylight Basking Spot*, *Skin Analyzer* EH900U, dan komputer.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci jantan (galur *New Zealand*) berusia 5-8 bulan, berat 2-4 kg, sehat, mau makan dan minum. Tidak terdapat udema atau eritema pada kulit bagian punggung kelinci dan tidak terdapat iritasi pada mata.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan sampel

Daun kersen pada penelitian ini diambil dari pohon kersen di wilayah Mojosongo dalam bentuk daun segar, letak daun berseling mendatar, bentuk lanset, ujung runcing, ukuran daun 1-4 x 4-14 cm, dan permukaan bawah berbulu. Determinasi dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pembuatan serbuk daun kersen

Daun kersen kemudian dicuci, lalu simplisia dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan disortasi kering agar menjamin simplisia benar-benar bebas dari bahan asing. Setelah kering, simplisia dihaluskan dengan cara diblender sampai halus, lalu diayak dengan ayakan no 40.

3. Penetapan kadar kelembaban serbuk daun kersen

Penentuan moisture content menggunakan moisture content balance. Bahan diletakkan dalam wadah moisture content balance yang sebelumnya telah ditara, dan dilihat bobot awal bahan. Lalu bahan dikeringkan pada suhu 105°C pada *moisture content balance* sampai diperoleh bobot sampel yang konstan. Catat hasil yang muncul pada layar, kadar air dalam satuan persen.

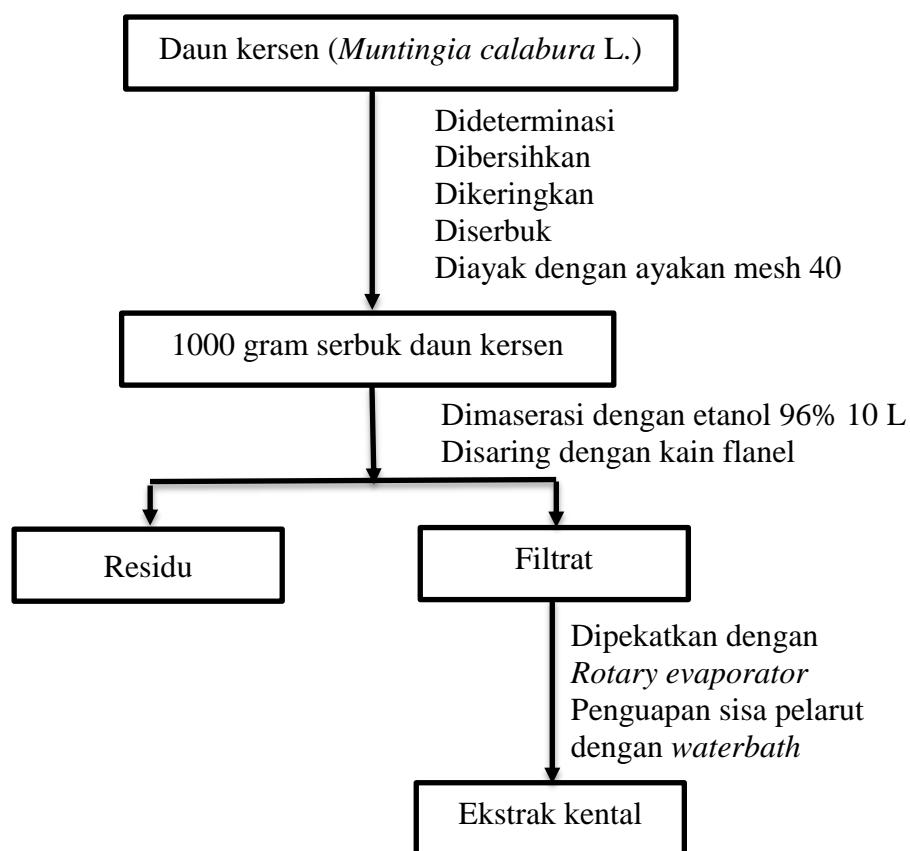
4. Pembuatan ekstrak daun kersen

Buat ekstrak dari serbuk kering simplisia dengan cara maserasi menggunakan pelarut yang sesuai. Gunakan pelarut yang dapat menyari sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia. Kecuali dinyatakan lain dalam monografi, gunakan *etanol 70% LP* (DepKes RI 2013).

Masukkan satu bagian serbuk kering simplisia ke dalam maserator, tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali 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 uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (DepKes RI 2013).

Hitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak (DepKes RI 2013).



Gambar 9. Skema pembuatan ekstrak daun kersen

Masukkan 1000 gram serbuk daun kersen ke dalam maserator, tambahkan etanol 96% sebanyak 10 liter. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali 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 dengan volume pelarut etanol 96% sebanyak 5 liter. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (DepKes RI 2013).

$$rendemen = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

5. Penetapan kadar kelembaban ekstrak daun kersen

Pengujian kelembaban ekstrak kersen menggunakan alat *moisture balance*, yang dilakukan dengan cara 2 gram ekstrak dimasukkan ke dalam pan, kemudian dikeringkan pada temperatur 105°C hingga bebas air \pm 60 menit. Catat hasil yang muncul pada layar, kadar air dalam satuan persen (Arisca 2018).

6. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak daun kersen

1.1. Identifikasi flavonoid. Ekstrak ditotolkan pada lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silikagel. Dari hasil KLT terlihat secara visual tidak terdapat bercak warna apapun. Setelah di uapi uap amonia, terjadi perubahan yaitu spot yang asalnya berwarna hijau jadi berwarna hijau kekuningan. Kemudian pada penyemprotan dengan AlCl_3 spot yang asalnya berwarna hijau menjadi kuning, dibawah sinar UV_{366} nm yaitu dari hijau menjadi hijau terang. Dari hasil perubahan pereaksi semprot AlCl_3 dan uap amonia ini menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan golongan flavonoid (Nurhasanah 2012).

7. Formula krim ekstrak daun kersen

Krim ekstrak etanol daun kersen dibuat dengan cara fase minyak (paraffin cair, asam stearat, setil alkohol, adeps lanae, span 80, dan propil paraben) dicampur dan dilebur di atas penangas air. Fase air dibuat dengan melarutkan gliserin, metil paraben, dan tween 80. Krim dibuat dengan menambahkan fase air kedalam fase minyak yang telah dilebur sambil diaduk cepat sampai terbentuk basis krim. Ekstrak etanol daun kersen ditambahkan dalam basis sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai homogen.

Tabel 3. Rancangan formula krim

Bahan	F1	F2	F3	F4
Ekstrak etanol daun kersen	0	3	6	9
Paraffin cair	5	5	5	5
Asam stearat	5	5	5	5
Setil alkohol	5	5	5	5
Gliserin	15	15	15	15
Adeps lanae	5	5	5	5
Tween 80	5	5	5	5
Span 80	5	5	5	5
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02
Air suling ad	100	100	100	100

Keterangan :

F1 : Krim kontrol negatif

F2 : Krim ekstrak daun kersen 3%

F3 : Krim ekstrak daun kersen 6%

F4 : Krim ekstrak daun kersen 9%

8. Cara kerja pembuatan krim ekstrak daun kersen

Alat dan bahan yang digunakan disiapkan. Masing-masing bahan ditimbang sesuai dengan perhitungan. Fase minyak dibuat dengan melebur berturut-turut adeps lanae, asam stearat, setil alkohol, span 80, parafin cair di atas penangas air, kemudian ditambahkan propil paraben. Kemudian fase air dibuat dengan cara melarutkan metil paraben dalam air yang telah dipanaskan hingga 70°C, kemudian ditambahkan gliserin dan tween 80. Emulsi dibuat dengan cara menambahkan fase minyak kedalam fase air sambil diaduk dalam lumpang hingga terbentuk corpus emulsi yang stabil. Kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit ekstrak etanol 96% daun kersen (*Muntingia calibura* L.) gerus dalam lumpang hingga terbentuk emulsi yang homogen. Krim dimasukkan dalam wadah tertutup rapat dan diberi etiket.

9. Pengujian sediaan krim

9.1. Organoleptis. Uji organoleptis dengan cara memperhatikan bentuk, warna dan bau sediaan krim yang dibuat (Anief 1997).

9.2. Pengujian pH. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Pengujian ini dilakukan dengan cara membenamkan alat/elektroda pada

sediaan krim yang diuji, kemudian tunggu beberapa detik sampai angka pada layar stabil dan dicatat nilai pH yang muncul pada layar. Rentang pH yang dapat diterima kulit berkisar 4,0-7,5 (Aswal 2013).

9.3. Uji homogenitas krim. Ditimbang krim 0,1 gram diletakkan pada kaca objek kemudian dioleskan secara merata dan tipis pada kaca. Krim harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran halus (Depkes RI 1979).

9.4. Uji viskositas krim. Uji viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer Rion, dengan cara memasang rotor pada viskosimeter kemudian dikunci berlawanan arah dengan jarum jam. Lalu mengisi *cup* dengan sampel krim yang akan diuji, setelah itu rotor ditempatkan tepat berada ditengah-tengah *cup* yang telah berisi krim, kemudian alat dihidupkan. Rotor nomor 2 akan mulai berputar, kemudian setelah stabil viskositas dapat dibaca pada skala yang terdapat pada layar. Satuan yang digunakan adalah *desipascal-seconds* (Dpas). Pengujian dilakukan dengan replikasi sebanyak tiga kali untuk masing-masing formula (Dirjen POM 1979).

9.5. Uji daya lekat krim. Uji ini dilakukan dengan alat tes daya melekat krim. Dua objek glass, stopwatch, anak timbangan gram dan dilakukan dengan cara meletakkan krim secukupnya di atas objek glass. Kemudian dipasangkan objek glass yang lain di atas krim, ditekan dengan beban 0,5 kg selama 5 menit. Ambil beban dan tetap posisikan objek glass masih menempel, lepaskan beban seberat 20 gram dan catat waktu kedua objek glass terlepas.

9.6. Uji daya sebar krim. Ditimbang 0,5 g krim diletakkan ditengah cawan petri yang berada dalam posisi terbalik. Letakanlah cawan petri lain di atas krim, kemudian selama 1 menit. Ukurlah diameter Krim yang menyebar. Ditambahkan 50 gram beban tambahan, lalu didiamkan selama 1 menit dan ukurlah diameternya. Ditambahkan lagi 100 gram beban tambahan, lalu didiamkan selama 1 menit dan diukur diameternya (Voigt 1995).

9.7. Uji stabilitas krim. Metode *Cycling Test* digunakan untuk melihat kestabilan sediaan dengan pengaruh variasi suhu selama waktu penyimpanan tertentu. Sediaan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam, lalu keluarkan dan ditempatkan pada suhu 40°C selama 24 jam. Waktu selama penyimpanan 2 suhu

tersebut dianggap 1 siklus. Percobaan ini diulang sebanyak 6 siklus dan dievaluasi sediaan krim pada awal dan akhir tes siklus.

10. Pengujian aktivitas antikerut pada hewan uji

10.1. Pembagian kelompok hewan uji. Sebanyak 5 ekor kelinci diadaptasi selama satu minggu dalam kandang. Satu kelinci diberikan satu kelompok perlakuan.

Kelinci I : sebagai kontrol negatif (dioleskan basis krim)

Kelinci II : sebagai kontrol positif (dioleskan krim Revitalift®)

Kelinci III : dioleskan krim ekstrak daun kersen 3%

Kelinci IV : dioleskan krim ekstrak daun kersen 6%

Kelinci V : dioleskan krim ekstrak daun kersen 9%

10.2. Induksi kerutan dengan penyinaran sinar UV-A. Semua kelinci yang akan digunakan dalam penelitian dicukur bulunya pada bagian punggung. Punggung kelinci dibagi menjadi 5 bagian, masing-masing bagian berbentuk lingkaran dengan diameter 2 cm. Bulu bagian punggung kelinci kemudian dicukur menggunakan pencukur bulu secara hati-hati. Setelah bulu kelinci dicukur, lakukan pengukuran persen kolagen, persen kelembaban, dan persen elastisitas menggunakan alat *Skin Analyzer*. Kelinci I, II, III, IV, dan V diberi perlakuan penyinaran sinar UV-A. Penyinaran dilakukan menggunakan Exoterra® Daylight Basking Spot yang mengandung sinar UV-A pada jarak 30 cm dengan dosis 63,69 J.cm⁻²/jam selama 6 jam (Budiawan 2018).

10.3. Aplikasi krim anti-aging. Setelah kelinci diinduksi kerutan, diamati parameter kerutannya menggunakan alat *Skin Analyzer* pada hari ke-0 sebelum dioles krim. Pada hari ke-0 sampai hari ke-30 dioles krim sesuai kelompok percobaan 1 kali sehari selama 30 hari (Duraivel *et al.* 2014).

10.4. Pengamatan aktivitas anti-aging. Parameter kerutan diamati sebelum diinduksi sinar, pada hari ke-0 (sebelum dioles krim), dan pada hari ke-30 (sesudah dioles krim). Parameter kerutan yang diamati antara lain persen kolagen, persen kelembaban, dan persen elastisitas menggunakan alat *Skin Analyzer*. Persen kolagen, persen kelembaban, dan persen elastisitas dapat langsung dilihat pada komputer yang sudah diinstal aplikasi *Skin Analyzer* untuk menunjukkan persentase tersebut.

11. Uji keamanan

Uji iritasi krim dilakukan pada 3 ekor kelinci sesuai metode Draize. Kelinci yang digunakan adalah kelinci dewasa albino, sehat, bobot badan 1,5-2 kg. Tiga ekor kelinci disiapkan dan dicukur bulu punggungnya, lalu ditentukan bagian 1 inci persegi. Sediaan sebanyak 0,5 g dioleskan pada bagian punggung kelinci yang telah ditentukan, lalu ditutup dengan kassa steril dan perban kemudian direkatkan dengan plester lalu dibungkus dengan perban, dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, plester dan perban dibuka dan dibiarkan selama 1 jam, lalu diamati. Setelah diamati, bagian tersebut ditutup kembali dengan plester yang sama, lalu dilakukan pengamatan kembali setelah 48 jam dan 72 jam. Untuk setiap keadaan kulit diberi nilai sesuai metode skoring dari Draize sebagai berikut:

Tabel 4. Skor derajat edema

Reaksi kulit	<i>Score</i>
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 lebih dari 1 mm dan meletus keluar daerah penjanan)	4

Tabel 5. Skor derajat eritema

Reaksi kulit	<i>Score</i>
Tanpa eritema	0
Sangat sedikit eritema (hampir tidak terlihat)	1
Eritema tapi berbatas jelas	2
Eritema sedang sampai berat	3
Edema berat (merah bit) sampai sedikit membentuk kerak	4

Masing-masing sediaan uji di hitung jumlah dari indeks eritema dan indeks edema kemudian dihitung indeks iritasi dengan cara seperti berikut :

$$\text{Indeks iritasi} = \frac{\text{Jumlah eritema} \times 24/48/72\text{jam} + \text{Jumlah edema} \times 24/48/72\text{jam}}{\text{Jumlah kelinci}} \dots \dots \dots (2)$$

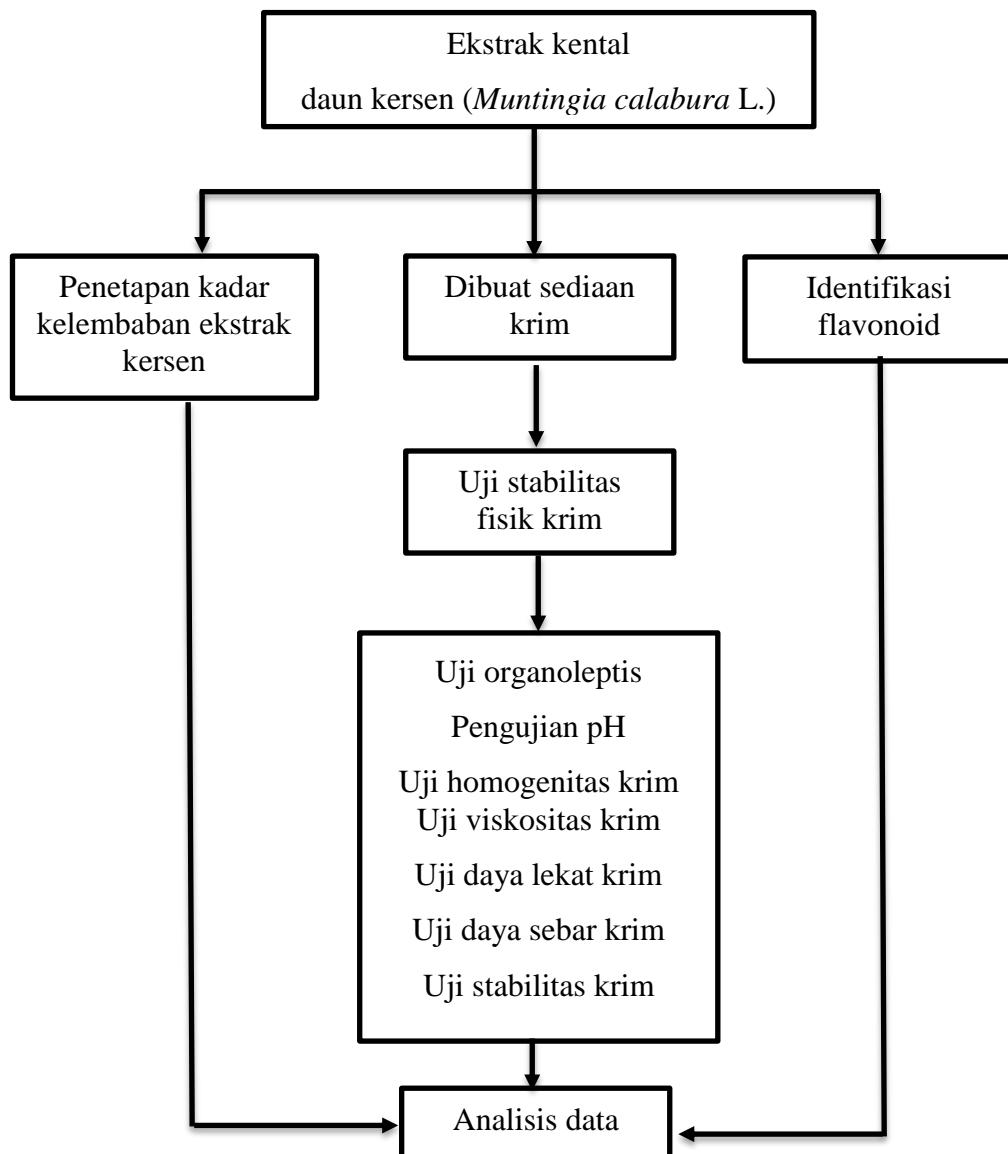
Tabel 6. Skor derajat iritasi

Reaksi kulit	<i>Score</i>
Tidak mengiritasi	0,0
Sangat sedikit mengiritasi	0,1 – 0,4
Sedikit iritasi	0,4 – 1,9
Iritasi sedang	2,0 – 4,9
Iritasi parah	5,0 – 8,0

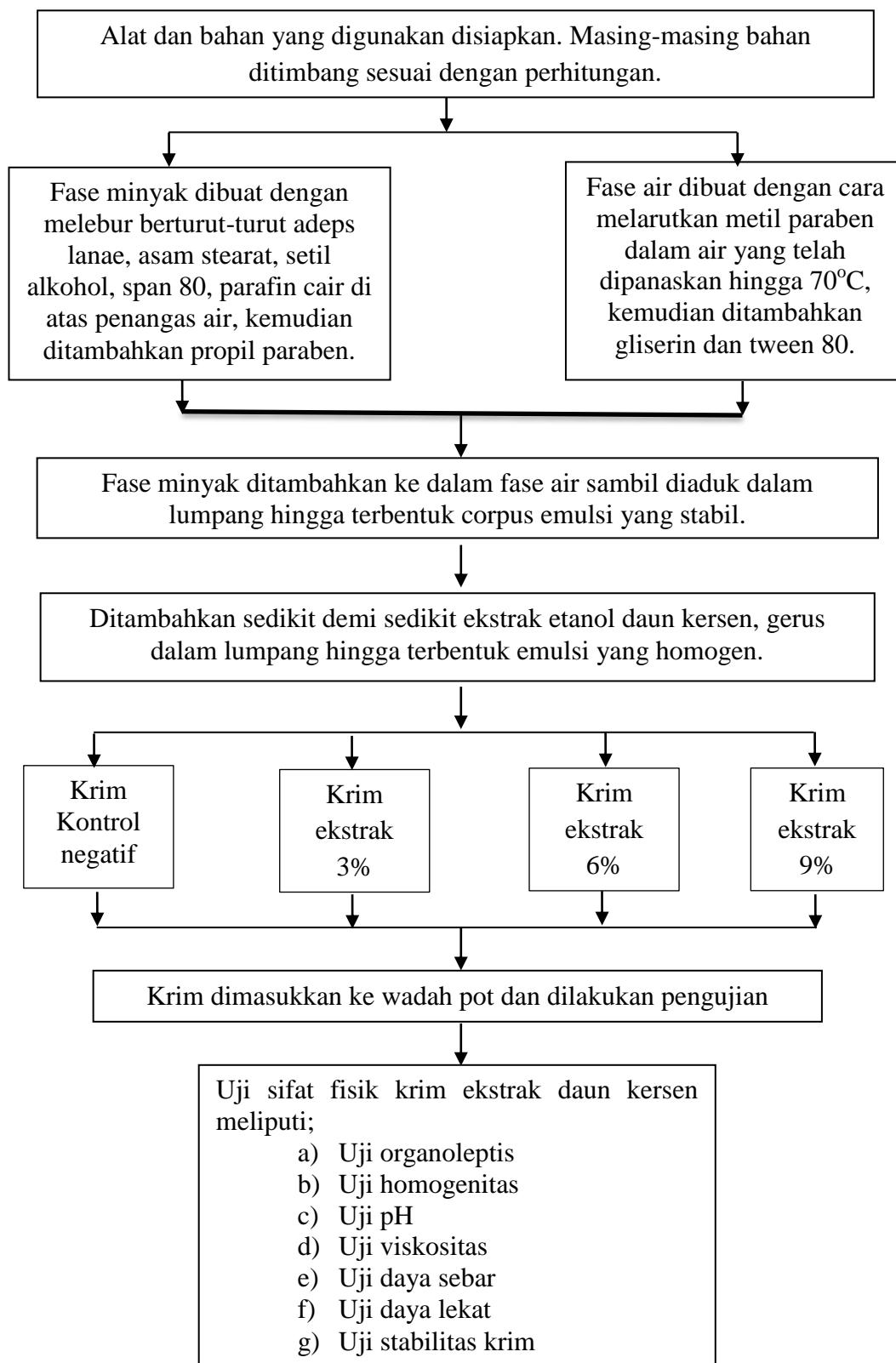
(Sani dan Lukmayani 2010).

E. Jalannya Penelitian

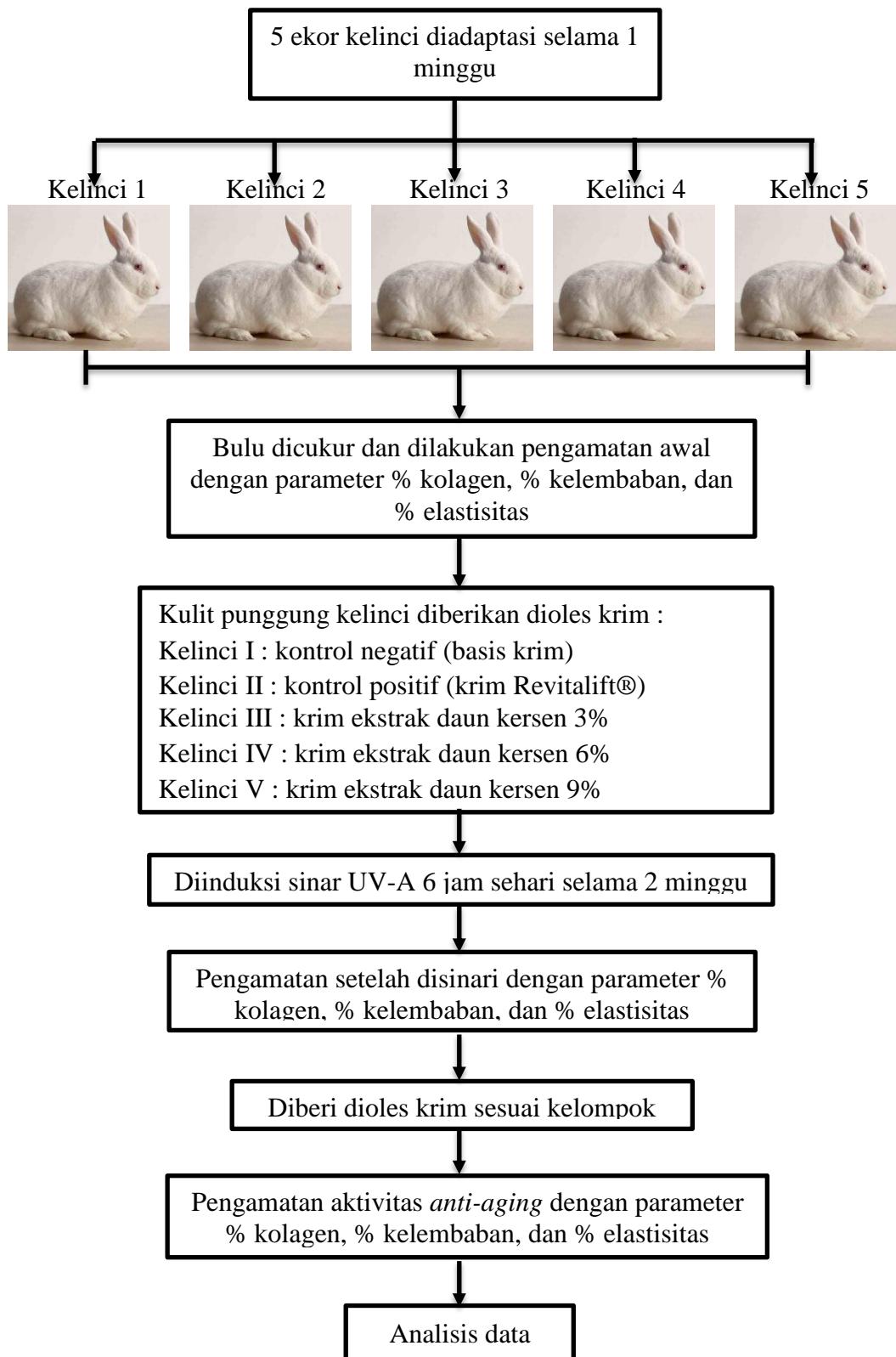
Jalannya penelitian diawali dengan pembuatan krim ekstrak daun kersen, kemudian dilanjutkan dengan pengujian fisik dan stabilitas sediaan krim. Uji keamanan dilakukan sebelum pengujian aktivitas *anti-aging* krim ekstrak daun kersen. Pengukuran aktivitas *anti-aging* krim ekstrak daun kersen menggunakan tiga parameter, yaitu parameter % kolagen, % kelembaban, dan % elastisitas.



Gambar 10. Skema pembuatan krim ekstrak daun kersen dan pengujian sediaan krim



Gambar 11. Skema pembuatan dan pengujian krim ekstrak daun kersen



Gambar 12. Skema pengujian aktivitas *anti-aging* krim ekstrak daun kersen

F. Analisis Hasil

Data yang telah terkumpul diproses dengan IBM SPSS 21.0 for Macintosh, dan dianalisis dengan langkah-langkah :

1. Data stabilitas krim yang diperoleh dianalisis statistik dengan menggunakan *Test of Normality* untuk melihat distribusi normal data. Kemudian dilakukan uji statistik ANOVA untuk melihat perbedaan keseluruhan, kemudian dilanjutkan dengan *Repeated Measures* untuk melihat perbedaan antar formula.
2. Hasil uji aktivitas *anti-aging* hewan uji menggunakan *Skin Analyzer* dengan parameter persen kolagen, persen kelembaban, dan persen elastisitas sebelum dan sesudah dioles krim dianalisa menggunakan *paired T-Test* dan ANOVA yang dilanjutkan uji *Tukey*.