

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan segala objek yang ditetapkan oleh peneliti maupun sasaran penelitian dan memiliki karakteristik tertentu yang telah ditetapkan guna dipelajari untuk ditarik kesimpulan. Populasi pada penelitian ini adalah daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang diperoleh dari petani Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel didefinisikan sebagai bagian kecil dari populasi yang diambil sebagai objek pada penelitian karena dianggap mampu mewakili populasi. Sampel pada penelitian ini adalah daun muda stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang dibuat menjadi sediaan emulgel yang diperoleh dari petani Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah dengan variasi konsentrasi ekstrak daun stroberi 0,25%; 0,5%; dan 1%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama yakni ekstrak daun stroberi dalam sediaan emulgel sebagai *anti-aging*. Variabel utama kedua dalam penelitian ini yakni hewan uji kelinci *New Zealand*. Variabel utama ketiga yaitu aktivitas *anti-aging* variasi konsentrasi sediaan emulgel ekstrak daun stroberi pada kulit punggung kelinci *New Zealand*. Variabel utama keempat dari penelitian ini yaitu berbagai pengujian mutu fisik dan stabilitas sediaan emulgel ekstrak daun stroberi dengan variasi konsentrasi ekstrak daun stroberi.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung, kemudian diklasifikasikan menjadi beberapa bagian yakni variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung. Variabel bebas merupakan variabel yang memberikan pengaruh dan merupakan penyebab munculnya variabel lainnya. Pada penelitian ini yang merupakan variabel bebas yakni ekstrak daun stroberi dengan variasi konsentrasi ekstrak daun stroberi sebesar 0,25%; 0,5%; dan 1% dalam sediaan emulgel.

Variabel terkendali merupakan variabel yang dianggap dapat memengaruhi variabel tergantung/terikat selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya supaya hasil yang diperoleh bisa

diulang di penelitian lainnya dengan tepat. Variabel terkendali di penelitian ini yakni aktivitas, berat badan kelinci, galur kelinci, genetik, jenis kelamin, kesehatan, pakan, umur, serta kondisi laboratorium, kondisi peneliti, kondisi alat, dan metode.

Variabel tergantung/terikat merupakan variabel yang berubah karena variabel bebas. Variabel tergantung/terikat di penelitian ini yakni uji iritasi primer, persentasi elastisitas, persentasi kelembapan, dan persentase kolagen kulit punggung kelinci, serta uji mutu fisik sediaan emulgel.

3. Definisi operasional variabel utama

Definisi operasional merupakan definisi yang didasarkan atas sifat-sifat hal yang bisa diamati serta diperlukan bagi peneliti lainnya yang hendak menguji kembali penelitian yang sama.

Daun stroberi adalah bagian daun yang berasal dari tanaman stroberi diperoleh dari petani Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah disertai dengan surat keterangan determinasi tanaman.

Ekstrak daun stroberi adalah hasil maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan diuji organoleptis, susut pengeringan, serta kandungan kimia dalam ekstrak daun stroberi.

Sediaan emulgel ekstrak daun stroberi adalah sediaan yang dibuat melalui pencampuran fase gel dan fase emulsi, dengan karbopol sebagai *gelling agent* serta kombinasi tween 80 dan span 80 sebagai emulgator.

Uji mutu fisik sediaan emulgel adalah serangkaian pengujian sediaan yang dapat mempengaruhi kestabilan fisik emulgel. Beberapa uji mutu fisik pada sediaan emulgel yaitu daya lekat, daya sebar, homogenitas, *pH*, stabilitas emulgel, uji organoleptis, serta viskositas.

Uji keamanan sediaan emulgel adalah pengamatan terjadinya iritasi primer pada punggung kelinci dan dihitung dengan rumus IIPR (Indeks Iritasi Primer).

Kolagen adalah protein yang terdapat pada kulit untuk menjaga keelastisan kulit dan salah satu parameter yang diukur untuk melihat aktivitas *anti-aging* pada kulit. Pengukuran kolagen menggunakan alat *skin analyzer* yang terhubung dengan laptop yang kemudian langsung menunjukkan persentase kolagen pada kulit punggung kelinci.

Elastisitas adalah kemampuan kulit untuk meregang dan kembali ke bentuk semula sehingga kulit tidak mengkerut. Elastisitas juga merupakan salah satu parameter yang diukur menggunakan alat

skin analyzer yang terhubung dengan laptop yang kemudian langsung menunjukkan persentase elastisitas pada kulit punggung kelinci.

Kelembapan adalah kemampuan kulit untuk mengikat air agar kulit tidak kering. Kelembapan merupakan salah satu parameter yang diukur menggunakan alat *skin analyzer* yang terhubung dengan laptop yang kemudian langsung menunjukkan persentase kelembapan pada kulit punggung kelinci.

Kontrol positif adalah krim *anti-aging* “Natur-E Advanced Anti-Aging Day Cream” mengandung bahan alami seperti astaxanthin, vitamin E, dan lycopene yang dapat memelihara kesehatan kulit, menjaga kekenyamanan kulit, dan menyamarkan tanda penuaan.

Pengaplikasian sediaan emulgel ekstrak daun stroberi adalah pada punggung kelinci yang telah dipapar dengan sinar UV-A dan diukur parameter % kolagen, % kelembapan, dan % elastisitas menggunakan alat *skin analyzer* untuk melihat aktivitas *anti-aging* pada sediaan.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatannya: Alat cukur, alat maserasi, ayakan no 60, cawan porselin, *extensometer* (kaca bulat), lampu sinar UV-A, lampu spiritus, laptop, mesin penggiling, *moisture balance Ohaus* MB90, mortar dan stamper, neraca analitik, *object glass*, oven, *pH* meter, pipet ukur, *rotary vacuum evaporator* IKA®, tabung reaksi, *waterbath*, seperangkat alat uji daya lekat dan alat uji daya sebar, *Skin Analyzer EH900U*, *Brookfield viscometer*, *voltmeter*, serta wadah emulgel.

2. Bahan

2.1 Bahan Sampel. Sampel yang digunakan adalah daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) sebagai bahan aktif yang diperoleh dengan maserasi menggunakan etanol 96%.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah akuades, asam asetat, asam klorida 2%, asam sulfat, besi (III) klorida, etanol 96%, karbopol 940 (merck), logam magnesium, *methylene blue*, nipagin (merck), nipasol (merck), parafin cair (merck), pereaksi Bouchardat, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, propilen glikol (merck), span 80 (merck), sudan III, trietanolamin (TEA) (merck), serta tween 80 (merck).

2.3 Hewan Uji. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci jantan (galur *New Zealand*) berusia 5-8 bulan, berat 2-4 kg, sehat, tidak

terdapat edema maupun eritema pada kulit bagian punggung kelinci.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan, determinasi, dan pemilihan

Tanaman utuh stroberi yang diperoleh dari petani di desa Tawangmangu, Jawa Tengah dilakukan determinasi terlebih dahulu. Determinasi merupakan tahap awal dalam penelitian untuk menetapkan kebenaran tanaman yang akan digunakan untuk penelitian yang berkaitan dengan ciri-ciri dan morfologi daun stroberi (*Fragaria x ananassa*). Determinasi daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) dilaksanakan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Jawa Tengah.

Tanaman stroberi yang sudah dideterminasi diambil bagian daunnya. Daun stroberi yang dipilih adalah daun yang masih muda dilihat dari warna daunnya berwarna hijau segar. Pemilihan daun stroberi dilakukan dengan cara sortasi kering untuk memisahkan bagian-bagian yang tidak diinginkan.

2. Pembuatan serbuk daun stroberi (*Fragaria x ananassa*)

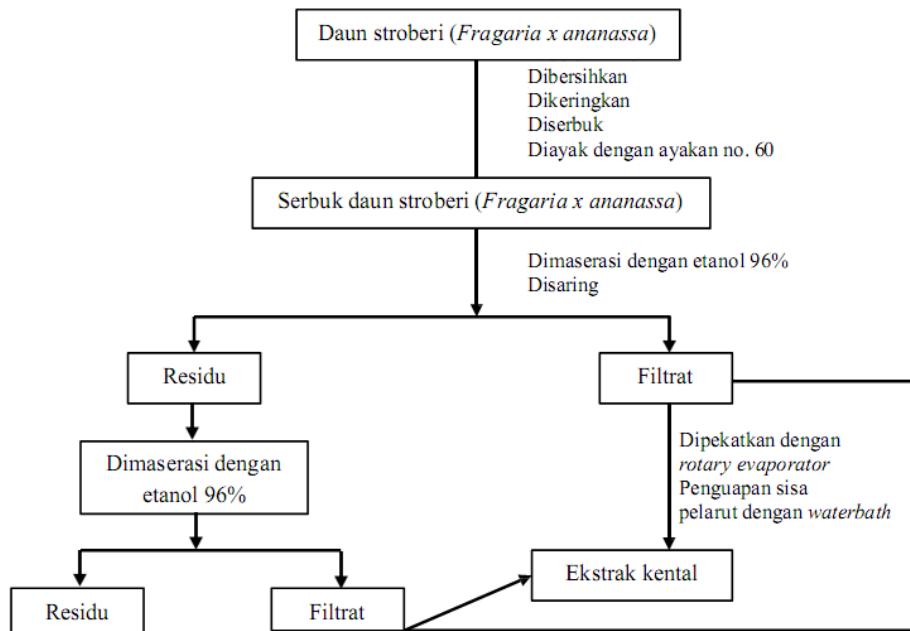
Daun stroberi (*Fragaria x ananassa*) dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran yang menempel dengan air bersih dan mengalir. Daun stroberi yang sudah bersih dilakukan sortasi basah untuk mengambil bagian yang layak digunakan. dikeringkan dengan sinar matahari yang bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga terhindar dari proses pembusukan akibat mikroorganisme. Simplisia daun stroberi kering tersebut kemudian dibuat serbuk dengan menggunakan blender atau penggiling. Untuk mendapatkan serbuk yang halus maka diayak menggunakan ayakan no 60. Kemudian dilaksanakan persentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah. Hasil dari serbuk yang sudah diayak kemudian disimpan dalam wadah kering dengan tutup rapat.

3. Pembuatan ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*)

Pembuatan ekstrak daun stroberi menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96%, dengan cara 700 g serbuk kering simplisia dengan derajat halus yang cocok dimasukkan ke dalam bejana, kemudian ditambahkan 7 liter etanol 96%, direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Hasil maserasi dipisahkan dengan menggunakan cara

filtrasi dan ulangi proses penyarian minimal dua kali dengan jenis pelarut dan jumlah volume pelarut digunakan setengah kali jumlah volume pelarut sebelumnya. Semua maserat diuapkan dengan rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 2017). Hitung rendemen yang diperoleh yakni persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan.

Menurut Depkes RI (2013) setelah dilakukan perhitungan nilai rendemen, rendemen yang didapatkan harus sesuai dengan monografi ekstrak.



Gambar 16. Skema pembuatan ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*)

4. Organoleptis serbuk dan ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*)

Uji organoleptis pada serbuk dan ekstrak daun stroberi dilaksanakan untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan tekstur dari ekstrak menggunakan pancaindra sehingga diperoleh hasil yang objektif (Ditjen POM, 2000).

5. Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*)

Susut pengeringan bertujuan untuk mengetahui kandungan kadar air dan senyawa yang dapat menguap pada serbuk dan ekstrak yang dapat menyebabkan pertumbuhan mikroba dengan cara yang sudah ditentukan menggunakan alat *moisture balance*. Prosedur

penetapan susut pengeringan dilaksanakan melalui cara menimbang 2 gram serbuk daun stroberi, lalu memasukkan ke alat *moisture balance* di suhu 105°C selama 5 menit dilaksanakan sebanyak 3 kali yang ditandai oleh hasil bobot yang konstan. Prosedur penetapan susut pengeringan pada ekstrak sama dengan pada serbuk. Satuan dari nilai kadar susut pengeringan adalah persen (Depkes RI, 2000).

6. Identifikasi kandungan senyawa kimia pada ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*)

6.1 Pembuatan larutan uji kandungan kimia. Menimbang ekstrak daun stroberi sebanyak 1 g dilarutkan dengan 100 ml etanol 96%, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Larutan ini digunakan sebagai larutan stok untuk uji identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun stroberi.

6.2 Identifikasi alkaloid. Larutan stok ekstrak daun stroberi sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam cawan porselen kemudian diuapkan hingga terbentuk residu, dan ditambahkan 5 ml HCl 2N. Larutan hasil dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi yang berbeda. Tabung pertama ditambahkan pereaksi *Dragendorff*. Tabung kedua ditambahkan pereaksi *Mayer*. Hasil positif mengandung alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan jingga di tabung pertama dan endapan putih kekuningan di tabung kedua (Lisdiani *et al.*, 2022).

6.3 Identifikasi flavonoid. Larutan stok ekstrak daun stroberi sebanyak 2 ml dipanaskan selama \pm 5 menit, lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Hasil positif mengandung flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning atau warna jingga hingga kemerahan (Lisdiani *et al.*, 2022).

6.4 Identifikasi tanin. Larutan stok ekstrak daun stroberi sebanyak 2 ml ditambahkan dengan beberapa tetes larutan besi (III) klorida. Positif mengandung tanin ditandai dengan adanya warna biru tua atau hitam kehijauan.

7. Rancangan formula emulgel dan pembuatan sediaan emulgel

Pembuatan sediaan emulgel dilakukan dengan memvariasikan bahan aktif yaitu ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*). Tujuan dari divariasikannya konsentrasi ekstrak daun stroberi yakni melihat konsentrasi ekstrak daun stroberi yang diformulasikan menjadi sediaan emulgel yang menunjukkan aktivitas *anti-aging* paling baik.

Tabel 2. Rancangan formulasi emulgel anti-aging ekstrak daun stroberi

Bahan	Satuan	F1	F2	F3	F4	Kegunaan
Ekstrak daun stroberi	%	0,25	0,5	1	-	Bahan aktif
Karbopol	Gram	1	1	1	1	<i>Gelling agent</i>
TEA	ml	0,75	0,75	0,75	0,75	Pembasa
Parafin cair	ml	10	10	10	10	Emolien
Tween 80	gram	1,4	1,4	1,4	1,4	Pengemulsi
Span 80	gram	3,6	3,6	3,6	3,6	Pengemulsi
Propilen glikol	ml	10	10	10	10	Humektan
Nipagin	gram	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengawet
Nipasol	gram	0,5	0,5	0,5	0,5	Pengawet
Akuades	add	100	100	100	100	Pelarut

Keterangan:

F1: Emulgel mengandung ekstrak daun stroberi sebesar 0,25%

F2: Emulgel mengandung ekstrak daun stroberi sebesar 0,5%

F3: Emulgel mengandung ekstrak daun stroberi sebesar 1%

F4: Basis emulgel

Pembuatan sediaan emulgel yaitu alat dan bahan yang hendak dipakai sebaiknya disiapkan terlebih dahulu kemudian timbang bahan berdasarkan formula yang sudah ditentukan. *Gelling agent* yang digunakan adalah karbopol, cara membuat massa gel yaitu karbopol dikembangkan pada mortar yang berisi akuades, diaduk hingga homogen dan ditetes TEA secukupnya sampai terbentuk massa gel.

Fase air yakni nipagin dan tween 80 dilarutkan dengan propilen glikol dan akuades dicampur dalam cawan porselen kemudian dipanaskan di atas *waterbath* dalam suhu 60⁰-70⁰C sambil diaduk hingga homogen. Fase minyak yang terdiri dari nipasol, parafin cair, dan span 80 dicampur di cawan porselen lalu dipanaskan di atas *waterbath* dalam suhu 60⁰-70⁰C sambil diaduk hingga homogen. Setelah kedua fase melebur dan homogen, dicampurkan dalam mortar panas sambil terus diaduk secara kontinyu sampai terbentuk emulsi dan suhu mencapai suhu ruangan. Emulsi yang terbentuk dimasukkan ke dalam mortar yang berisi massa gel kemudian aduk hingga homogen dan terbentuk emulgel. Ekstrak yang sudah dilarutkan etanol secukupnya ditambahkan ke massa emulgel pada mortar, diaduk sampai homogen.

8. Pengujian mutu fisik sediaan emulgel ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*)

8.1. Pengujian organoleptis. Pengamatan secara visual pada bau, bentuk, konsistensi, serta warna dari sediaan emulgel.

8.2. Pengujian homogenitas. Menurut Wiyono *et al.* (2020), yang dikatakan sediaan itu homogen apabila tidak terlihat butir partikel yang kasar pada sediaan. Sebanyak 1 gram sediaan emulgel dioleskan pada kaca transparan contohnya pada *object glass*.

8.3. Pengujian tipe emulsi. Dilaksanakan melalui 3 metode, yaitu pemberian warna dengan ditambahkan *methylene blue* dan sudan III, pengenceran, dan pengukuran daya hantar listrik.

8.3.1 Metode pemberian warna. Sampel dioleskan pada dua *object glass*. *Object glass* pertama ditetesi dengan larutan *methylene blue*, jika sampel homogen dengan *methylene blue* maka tipe emulsinya minyak dalam air (o/w) sedangkan jika tidak homogen maka tipe emulsinya air dalam minyak (w/o). *Object glass* kedua ditetesi dengan larutan sudan III, jika sampel homogen dengan sudan III maka tipe emulsinya air dalam minyak (w/o) sedangkan jika tidak homogen maka tipe emulsinya minyak dalam air (o/w).

8.3.2 Metode pengenceran. Sebanyak 1 gram sediaan dimasukkan ke tabung reaksi, lalu diencerkan dengan akuadestilata, apabila homogen atau sediaan bercampur dengan akuadestilata maka tipe emulsinya minyak dalam air (o/w) (Usman dan Muin, 2021).

8.3.3 Metode penghantaran listrik. Mencelupkan alat voltameter ke dalam sediaan, apabila ada pergerakan jarum menunjukkan tipe emulsi minyak dalam air dan sebaliknya (Mirawati, 2012).

8.4. Pengujian pH. Dilaksanakan menggunakan *pH* meter yang telah dikalibrasi menggunakan dapar sampai menunjukkan *pH* 7. Kemudian elektroda dicuci menggunakan air suling dan keringkan dengan tisu, lalu celupkan elektroda pada sediaan dan tunggu sampai angka yang ditunjukkan pada alat menunjukkan harga *pH* konstan. Pengukuran dilakukan pada suhu ruang (Hurria, 2014).

8.5. Pengujian viskositas. Pengujian dilakukan menggunakan alat *Brookfield viscometer* dengan ukuran spindle yang disesuaikan dengan konsistensi sediaan. Sediaan dituang ke dalam wadah yang tersedia kemudian spindle yang telah terpasang pada alat dicelupkan pada wadah, lalu tekan tombol ON pada alat. Pembacaan hasil viskositas didasarkan pada jarum yang stabil menunjukkan suatu angka dengan satuan cPa's (Wiyono *et al.*, 2020)

8.6. Pengujian daya sebar. Pengujian dilakukan menggunakan alat *extensometer* (kaca bulat). Menimbang terlebih dulu bagian penutup kaca dan sediaan sebanyak 0,5 g. Meletakkan sediaan pada kaca bulat bagian tengah lalu ditutup dengan kaca yang lainnya. Mendiamkan selama 1 menit dan ukurlah berapa diameter sediaan yang menyebar dengan mengambil panjang rata-rata diameter di beberapa sisi menggunakan penggaris. Menambahkan 50 g beban, diamkan lagi selama 1 menit dan

catat diameter sediaan yang menyebar seperti sebelumnya. Teruskan dengan menambah tiap kali dengan beban tambahan 50 g hingga mencapai bobot 150 g (Widyaningrum *et al.*, 2012).

8.7. Pengujian daya lekat. Sebanyak 0,5 g sampel diletakkan di atas *object glass* serta ditutup dengan *object glass* lainnya dengan memberikan bebas sebesar 1 kg selama 5 menit. Dipasang kaca objek pada alat ukur, melepaskan beban seberat 50 g, serta catat waktu hingga dua kaca terlepas (Nur Aisyah *et al.*, 2017).

9. Pengujian stabilitas sediaan emulgel ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa*)

Pengujian stabilitas menggunakan metode *Cycling test (Freeze-Thaw Cycle)* dengan jumlah siklus sebanyak 6 kali. Satu siklus pengujian merupakan sediaan disimpan di suhu 4⁰C selama 24 jam, kemudian dikeluarkan serta di tempat bersuhu 40⁰C dalam oven selama 24 jam. Diulangi sampai siklus ke-6. Menurut Sinata dan Mistawati (2020), pengamatan stabilitas dilihat ada tidaknya pemisahan fase pada emulgel, serta parameter pergeseran sifat fisik yakni pergeseran homogenitas, organoleptis, *pH* dan viskositas emulgel.

9.1. Organoleptis. Pengamatan secara visual pada bau, bentuk, konsistensi, serta warna dari sediaan emulgel.

9.2. Homogenitas. Menurut Wiyono *et al.* (2020), yang dikatakan sediaan itu homogen apabila tidak terlihat butir partikel yang kasar pada sediaan. Sebanyak 1 gram sediaan emulgel dioleskan pada kaca transparan contohnya pada *object glass*.

9.3. Tipe emulsi. Dilaksanakan melalui 3 metode, yaitu pemberian warna dengan ditambahkan *methylene blue* dan sudan III, pengenceran, dan pengukuran daya hantar listrik.

9.1.1 Metode pemberian warna. Sampel dioleskan pada dua *object glass*. *Object glass* pertama ditetesi dengan larutan *methylene blue*, jika sampel homogen dengan *methylene blue* maka tipe emulsinya minyak dalam air (o/w) sedangkan jika tidak homogen maka tipe emulsinya air dalam minyak (w/o). *Object glass* kedua ditetesi dengan larutan sudan III, jika sampel homogen dengan sudan III maka tipe emulsinya air dalam minyak (w/o) sedangkan jika tidak homogen maka tipe emulsinya minyak dalam air (o/w).

9.1.2 Metode pengenceran. Sebanyak 1 gram sediaan dimasukkan ke tabung reaksi, lalu diencerkan dengan akuadestilata, apabila homogen atau sediaan bercampur dengan akuadestilata maka tipe emulsinya minyak dalam air (o/w) (Usman dan Muin, 2021).

9.1.3 Metode penghantaran listrik. Mencelupkan alat voltameter ke dalam sediaan, apabila ada pergerakan jarum menunjukkan tipe emulsi minyak dalam air dan sebaliknya (Mirawati, 2012).

9.4. pH. Dilaksanakan menggunakan *pH* meter yang telah dikalibrasi menggunakan dapar sampai menunjukkan *pH* 7. Kemudian elektroda dicuci menggunakan air suling dan keringkan dengan tisu, lalu celupkan elektroda pada sediaan dan tunggu sampai angka yang ditunjukkan pada alat menunjukkan harga *pH* konstan. Pengukuran dilakukan pada suhu ruang (Hurria, 2014).

9.5. Viskositas. Pengujian dilakukan menggunakan alat *Brookfield viscometer* dengan ukuran spindle yang disesuaikan dengan konsistensi sediaan. Sediaan dituang ke dalam wadah yang tersedia kemudian spindle yang telah terpasang pada alat dicelupkan pada wadah, lalu tekan tombol ON pada alat. Pembacaan hasil viskositas didasarkan pada jarum yang stabil menunjukkan suatu angka dengan satuan cPa's (Wiyono *et al.*, 2020)

10. Uji keamanan

Pengujian iritasi pada hewan uji setelah diolesi emulgel yang dibuat. Uji iritasi dilaksanakan supaya mencegah dan mengetahui efek samping sediaan terhadap kulit (Wasitaatmadja, 1997). Pengujian dilakukan menggunakan metode Draize. Hewan uji yang digunakan yaitu kelinci dewasa albino, berjenis kelamin jantan, sehat, dengan bobot badan 1,5-2 kg. Bulu punggung tiga ekor kelinci dicukur, kemudian dibagi menjadi 5 bagian. Sebanyak 0,5 g emulgel dioleskan ke area punggung yang sudah ditentukan, kemudian tutup dengan kasa steril dan perban dan dibiarkan selama 24 jam. Kasa dan perban dibuka setelah 24 jam, dibiarkan selama 1 jam dan amati terbentuknya eritema dan edema lalu tutup kembali dengan plester yang sama. Pada 48 dan 72 jam berikutnya dilaksanakan hal yang sama seperti sebelumnya. Perubahan yang terjadi diberikan skor berdasarkan tingkat keparahan atau reaksi kulit yang kemudian diklasifikasikan pada tabel iritasi kulit:

Tabel 3. Skor derajat edema

Reaksi kulit	Score
Tidak terbentuk edema	0
Edema sangat ringan	1
Edema ringan (bagian tepi area edema sangat jelas meninggi)	2
Edema sedang (tinggi bagian tepi area edema naik - 1 mm)	3
Edema parah (tinggi bagian tepi area edema naik > 1 mm dan meluas ke bagian yang lebih luar dari daerah pemaparan)	4

(OECD, 2015)

Tabel 4. Skor derajat eritema

Reaksi kulit	Score
Tidak terbentuk eritema	0
Eritema sangat ringan	1
Eritema ringan dan tampak jelas	2
Eritema sedang sampai parah	3
Eritema parah (warna merah keunguan) sampai pembentukan eskar ringan (luka dalam)	4

(OECD, 2015)

Setiap sediaan uji emulgel dihitung jumlah dari indeks eritema dan indeks edema kemudian dihitung indeks iritasi melalui rumus:

$$\text{Indeks iritasi primer} = \frac{\text{Jumlah eritema (24,48,72 jam)} + \text{Jumlah edema (24,48,72 jam)}}{\text{Jumlah kelinci}}$$

Tabel 5. Skor derajat iritasi

Klasifikasi	Skor iritasi primer
Non-iritasi	0
Iritasi ringan	< 2
Iritasi sedang	2-5
Iritasi parah atau iritasi primer	>5 atau dengan pembentukan eskar

(OECD, 2015)

11. Pengujian aktivitas *anti-aging* pada hewan uji

11.1 Pembagian kelompok hewan uji. Selama seminggu 3 ekor kelinci diadaptasi dalam kandang. Satu kelinci diberi 5 kelompok perlakuan. Semua punggung kelinci telah dicukur bulunya dibagi menjadi 5 area, masing-masing perlakuan sebagai berikut.

Kelinci I : diolesi emulgel ekstrak daun stroberi 0,25%; emulgel ekstrak daun stroberi 0,5%; emulgel ekstrak daun stroberi 1%; kontrol positif; dan kontrol negatif.

Kelinci II : diolesi emulgel ekstrak daun stroberi 0,25%; emulgel ekstrak daun stroberi 0,5%; emulgel ekstrak daun stroberi 1%; kontrol positif; dan kontrol negatif.

Kelinci III : diolesi emulgel ekstrak daun stroberi 0,25%; emulgel ekstrak daun stroberi 0,5%; emulgel ekstrak daun stroberi 1%; kontrol positif; dan kontrol negatif.

11.2 Uji aktivitas *anti-aging*. Kelinci yang bulu punggungnya telah dicukur dilakukan uji keamanan menggunakan 3 ekor kelinci terlebih dahulu selama 72 jam. 3 ekor kelinci lainnya dilakukan pengamatan awal dengan parameter persen kolagen, persen kelembapan, dan persen elastisitas menggunakan *skin analyzer*. Setelah pengamatan punggung kelinci diolesi dengan sediaan emulgel ekstrak daun stroberi setiap hari sesuai pembagian yang telah ditentukan. Punggung kelinci yang telah diolesi sediaan dipapar menggunakan

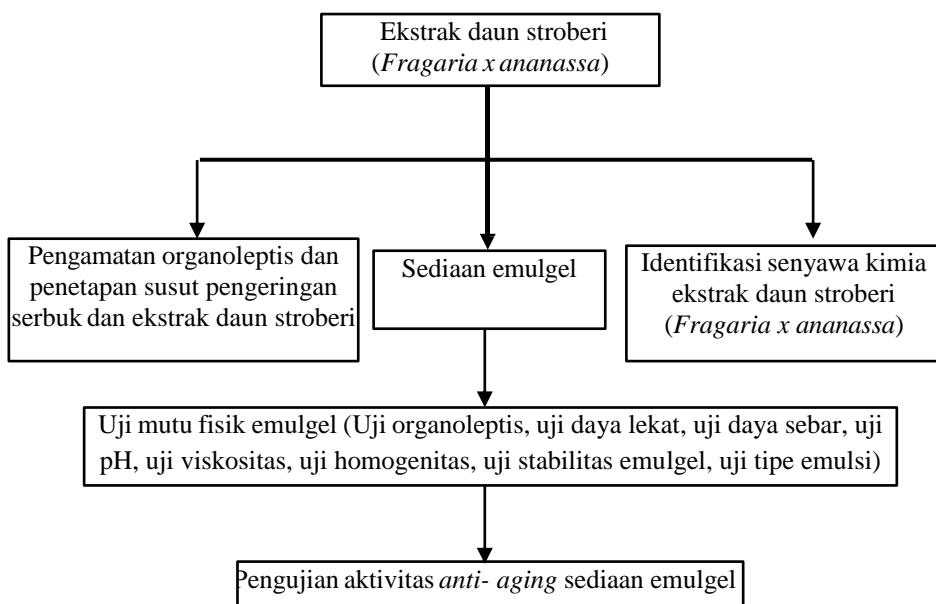
sinar UV-A selama 6 jam. Perlakuan pada kelinci dilakukan selama 30 hari. Pengamatan kembali setelah 30 hari perlakuan dengan parameter persen kolagen, persen kelembapan, dan persen elastisitas menggunakan *skin analyzer*.

E. Analisis Data

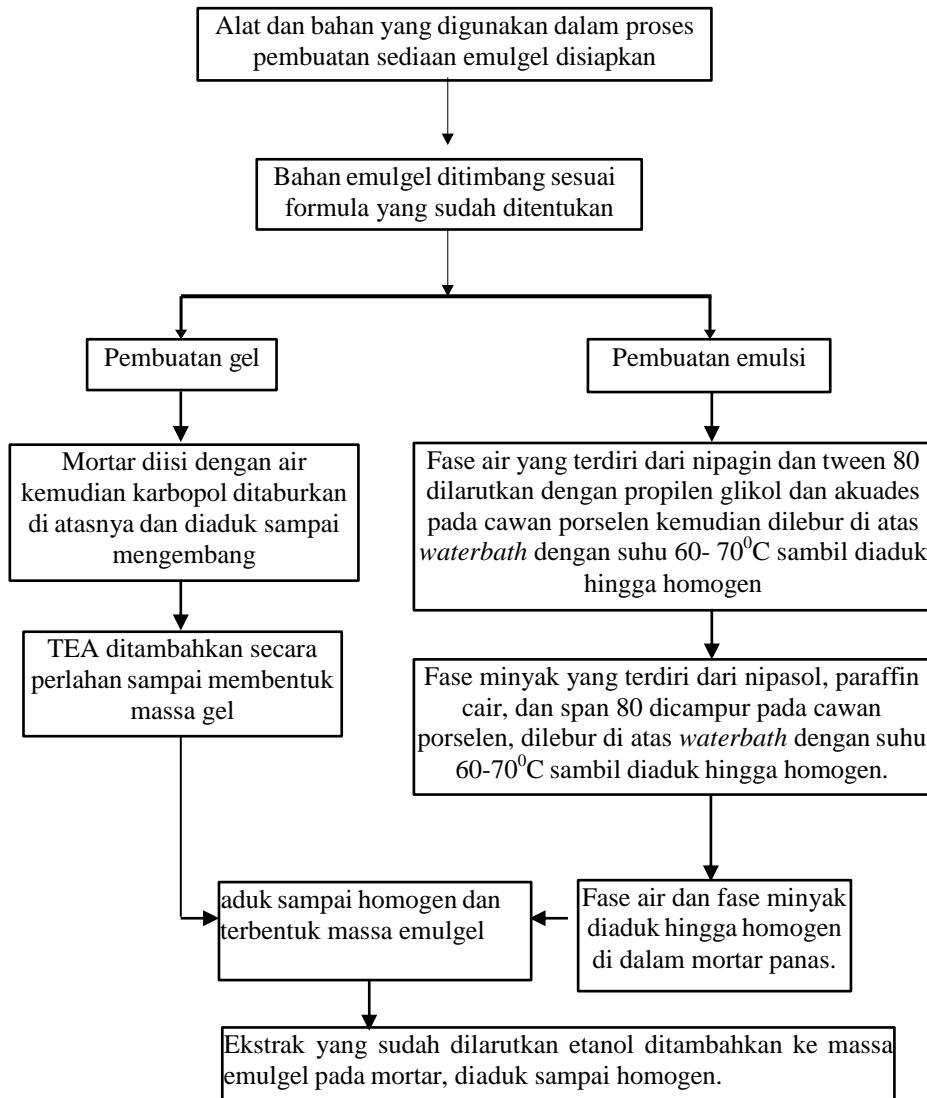
Analisis data mutu fisik sediaan yang sudah terkumpul kemudian diproses serta diolah secara statistika menggunakan software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Pengujian mutu fisik diuji normalitas ($p>0,05$) terlebih dahulu menggunakan *Shapiro-Wilk*. Bila data yang diperoleh terdistribusi normal dilanjutkan dengan analisis *One Way ANOVA* dengan *post hoc Tukey* yang berguna untuk mendapat perbedaan efek dari masing-masing konsentrasi ekstrak daun stroberi pada sediaan. Untuk melihat perbedaan sebelum dan sesudah uji stabilitas dilaksanakan analisis dengan *paired t test/Wilcoxon*.

Pengujian aktivitas *anti-aging* pada hewan uji menggunakan *Skin Analyzer* dengan parameter persen elastisitas, persen kelembapan, serta persen kolagen, dan sebelum dan sesudah dioles sediaan emulgel dianalisis melalui *paired T-Test* dan *ANOVA* yang dilanjutkan uji *Tukey*.

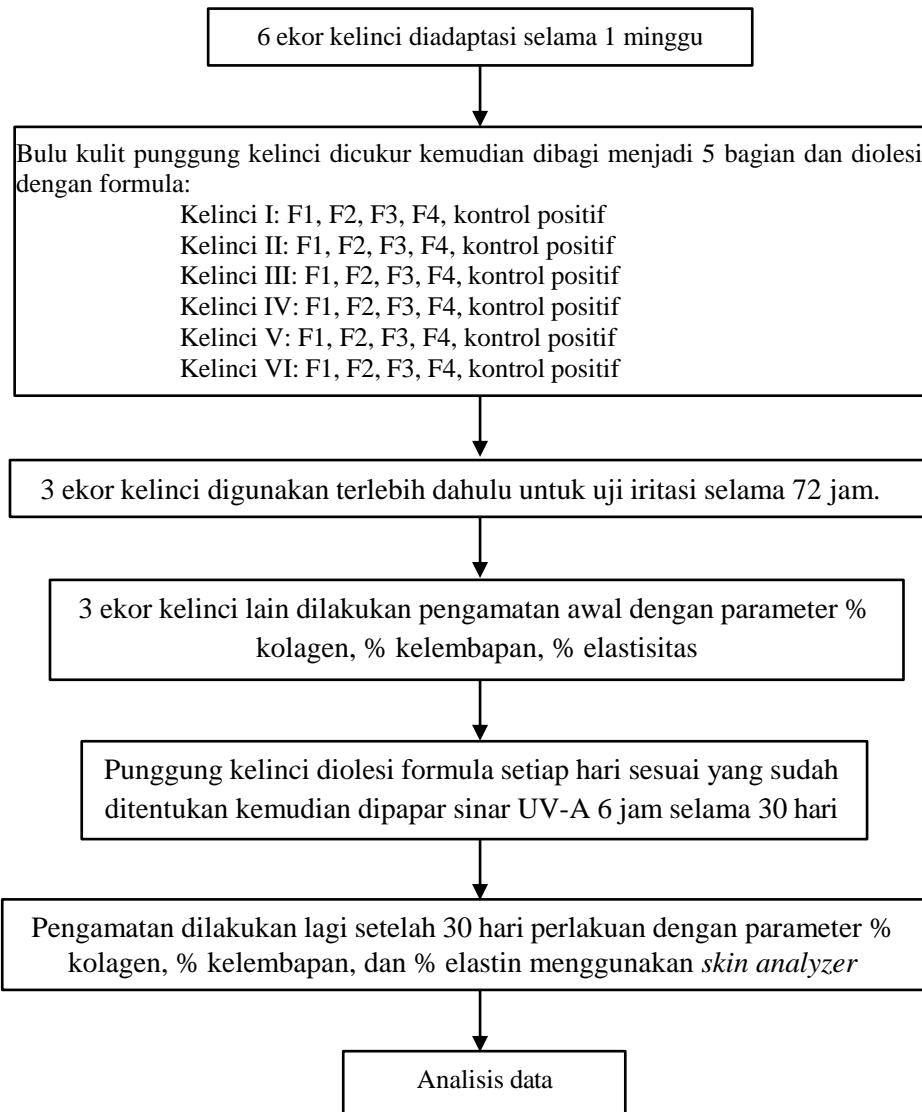
F. Skema Penelitian



Gambar 17. Skema penelitian



Gambar 18. Skema pembuatan sediaan emulgel



Gambar 19. Skema pengujian aktivitas *anti-aging* sediaan emulgel ekstrak daun stroberi