

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Menurut Margono (2017) populasi adalah kumpulan seluruh data yang menjadi fokus perhatian seorang peneliti dalam batasan ruang lingkup dan periode waktu yang telah ditentukan. Pada penelitian ini, populasi yang digunakan yaitu sediaan emulgel indometasin dengan kombinasi minyak kapulaga yang diperoleh dari PT. Sumatra Aroma Lestari.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian kecil dari keseluruhan populasi yang hendak diselidiki oleh peneliti. Sampel mencangkup sejumlah karakteristik yang dapat ditemui dalam populasi tersebut (Sugiyono, 2010). Pada penelitian ini, sampel yang digunakan yaitu sediaan emulgel yang memiliki zat aktif indometasin dengan konsentrasi 1% dengan variasi minyak kapulaga dengan variasi konsentrasi 1%, 2%, dan 3%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama yang dijelaskan pada penelitian ini adalah emulgel indometasin dengan konsentrasi 1%.

Variabel pertama kedua yang menjadi fokus penelitian ini adalah minyak kapulaga sebagai *enhancer* dalam berbagai konsentrasi.

Variabel pertama ketiga dalam penelitian ini adalah mutu fisik sediaan emulgel indometasin.

Variabel pertama keempat dalam penelitian ini adalah uji aktivitas antiinflamasi terhadap sediaan emulgel indometasin pada hewan uji tikus jantan galur wistar.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas merupakan variabel yang menjadi penyebab dan berpengaruh munculnya variabel lain. Variabel bebas yang dimaksud pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi minyak kapulaga sebagai *enhancer*.

Variabel terkendali merupakan variabel yang dianggap memiliki dampak selain variabel bebas, penting untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasikan variabel ini ketika merancang penelitian ulang. Variabel terkendali dalam penelitian ini mencangkup metode pembuatan emulgel, proses penelitian dan kondisi laboratorium.

Variabel tergantung merupakan titik pusat persoalan yang menjadi dasar penilaian dalam penelitian ini. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah uji mutu fisik sediaan emulgel yang melibatkan aspek organoleptis, homogenitas, viskositas, daya lekat, daya sebar, pH serta uji efek inflamasi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, indometasin merupakan salah satu obat antiinflamasi golongan NSAID (*Non Steroid Anti Inflammatory*). Bahan baku indometasin diperoleh dari PT. Digitech Laboratory Supply (*Sigma-Aldrich*) melalui platform toko *online*.

Kedua, sediaan emulgel indometasin adalah emulgel yang diformulasikan dengan indometasin dengan konsentrasi minyak kapulaga yang berbeda-beda yaitu formula 1 minyak kapulaga 1%, formula 2 minyak kapulaga 2%, formula 3 minyak kapulaga 3%.

Ketiga minyak kapulaga (*cardamom oil*) merupakan minyak atsiri yang diperoleh dari penyulingan biji kapulaga yang diperoleh dari CV. Sumatra Aroma Lestari dengan melampirkan CoA (*Certificate of Analysis*).

Keempat, uji mutu fisik sediaan emulgel indometasin yaitu meliputi uji organoleptik, uji homogenitas, uji pH, uji daya lekat, uji daya sebar, uji stabilitas, dan uji viskositas.

Kelima, uji antiinflamasi adalah daya penyembuhan terhadap inflamasi dengan cara membuat peradangan pada kaki belakang tikus jantan putih, kemudian dilakukan pengolesan emulgel indometasin.

Keenam, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar yang memiliki berat badan 200 – 250 gram.

Ketujuh, konsentrasi minyak kapulaga (*cardamom oil*) yang efektif membantu peningkat penetrasi sediaan emulgel adalah 1% dalam formula.

C. Bahan dan alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah zat aktif Indometasin, carbopol 940, minyak kapulaga (*Cardamom oil*), minyak jarak (*Castor oil*), *polysorbate 80* (*Tween 80*), *sorbitan stearate* (*span 80*), propylene glycol, methyl paraben, propylparaben, BHT, aqua destillata.

Subjek uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan berat badan 200-250 gram.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah 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.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan bahan penelitian

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah zat aktif indometasin yang diperoleh dari PT. Digitech Laboratory Supply (*Sigma-Aldrich*) melalui platform toko *online* dengan melampirkan CoA (*Certificate of Analysis*).

2. Pengajuan *Ethicel Clearance*

Sebelum dilakukan pengujian antiinflamasi menggunakan hewan uji maka rancangan penelitian ini dikaji terlebih dahulu oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi untuk mendapatkan persetujuan (*Ethicel Clearance*).

3. Formula sediaan emulgel

Formula yang digunakan pada pembuatan emulgel indometasin terdiri dari minyak jarak sebagai fase minyak, tween 80 dan span 80 sebagai surfaktan, minyak kapulaga sebagai *enhancer*, propilen glikol sebagai humektan, methyl paraben dan propil paraben sebagai bahan pengawet, BHT sebagai antioksidan, carbopol 940 sebagai *gelling agent*, dan aquadest sebagai fase air.

Tabel 1. Rancangan Formula Emulgel Indometasin

Bahan	Formula % (b/b)			
	F1	F2	F3	F4
Indometasin	1	1	1	1
Minyak jarak	1,5	1,5	1,5	1,5
Span 80	0,5943	0,5943	0,5943	0,5943
Tween 80	6,405	6,405	6,405	6,405
Minyak kapulaga	1	2	3	-
Carbopol 940	1	1	1	1
Propilenglikol	5	5	5	5
Metil paraben	0,03	0,03	0,03	0,03
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02
BHT	0,1	0,1	0,1	0,1
TEA	qs	qs	qs	qs
Aquades	ad 50	ad 50	ad 50	ad 50

4. Pembuatan emulgel

4.1. Pembuatan emulsi. Timbang indometasin secara akurat sesuai formula yang telah ditentukan. Leburkan fase minyak (minyak jarak, minyak kapulaga, span 80, propil paraben dan BHT) secara berturut-turut di dalam cawan porselin diatas hot plate. Masukkan indometasin ke dalam fase minyak yang telah dilebur. Fase air dibuat dengan mencampurkan tween 80 dan metil paraben dalam larutan propilen glikol dan aquades. Fase air dan fase minyak dipanaskan hingga suhu 70-80°C. Kemudian fase minyak ditambahkan ke dalam fase air dengan pengadukan terus-menerus sampai homogen dan dingin hingga suhu kamar.

4.2. Pembuatan gel. Pembuatan gel dilakukan terpisah dengan cara mendispersikan carbopol 940 dengan aquades dengan pengadukan konstan hingga homogen dan terbentuk massa gel. Setelah didispersikan ditambahkan TEA hingga pH yang dikehendaki untuk menyesuaikan pH sambil diaduk hingga membentuk massa gel.

4.3. Pembuatan emulgel. Emulsi yang telah diperoleh dicampurkan dengan fase gel yang sebelumnya dibuat dengan perbandingan 1:1 sambil diaduk dan dinginkan hingga suhu kamar sampai membentuk sediaan emulgel yang homogen.

5. Pembuatan kontrol

5.1. Kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah Voltaren Emulgel yang ada dipasaran.

5.2. Kontrol negatif. Kontrol negatif yang digunakan adalah basis emulgel tanpa penambahan minyak kapulaga (*cardamom oil*).

6. Pengujian sifat fisik emulgel indometasin

6.1. Uji organoleptik. Uji organoleptik merupakan pengujian yang dilakukan dengan melakukan pengamatan secara visual meliputi warna, bau, dan konsistensi dari sediaan emulgel (Kusumawati, 2015).

6.2. Uji homogenitas. Uji homogenitas ini dilakukan dengan cara meletakkan sediaan emulgel di antara dua kaca objek dan dilakukan pengamatan ada tidaknya partikel kasar yang terdapat di dalam sediaan. Sediaan dikatakan homogen apabila dilihat tidak adanya gumpalan pada sediaan dan kemerataan warna sediaan.

6.3. Uji tipe emulsi. Penentuan tipe emulsi sediaan dapat dilakukan dengan 2 metode yaitu:

6.3.1. Metode Pewarnaan. Uji ini dilakukan dengan menyiapkan dua objek glass, mengoleskan sebagian kecil sediaan di atas masing-masing objek glass. Pada objek glass pertama ditetesi sudan III dan objek glass kedua ditetesi *methylene blue*. Selanjutnya amati objek glass tersebut menggunakan mikroskop. Pada emulgel dengan tipe emulsi air dalam minyak droplet minyak akan menunjukkan warna merah pada pemberian sudan III sedangkan latar belakang emulgel akan menunjukkan warna biru pada bagian *methylene blue*.

6.3.2. Metode hantaran listrik. Uji hantaran listrik ini dilakukan dengan cara sediaan emulgel dimasukkan ke dalam wadah 25 ml kemudian dilakukan uji daya hantarnya dengan alat multimeter, apabila terdapat pergerakan jarum konduktometer maka dapat dikatakan bahwa sediaan memiliki tipe M/A dan sebaliknya (Taha *et al.*, 2020).

6.4. Uji pH. Sediaan emulgel merupakan sediaan yang akan diaplikasikan pada kulit sehingga memiliki persyaratan bahwa sediaan harus berada pada rentang pH normal kulit yaitu 4,5 - 7 (Budiman *et al.*, 2020). Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi.

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

6.6. Uji daya lekat. Uji daya lekat dilakukan dengan cara 0,5 gram sediaan emulgel diletakkan diatas objek gelas yang sebelumnya telah ditentukan luasnya. Objek gelas yang lainnya diletakkan di atasnya.

Kemudian objek gelas dipasang alat uji dan diberikan beban 1 kg selama 5 menit. Kemudian beban 1 kg dilepas beserta beban penyangga 80 gram dan dicatat waktunya hingga kedua objek gelas tersebut terlepas (Nibaho *et al.*, 2013).

6.7. Uji viskositas. Uji viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer. Uji viskositas dilakukan dengan cara 50 gram sediaan emulgel diukur dengan viskositasnya dengan viskometer Brookfield. Beberapa sampel dimasukkan ke dalam wadah, celupkan spindel ke dalam wadah hingga tanda batas. Nilai cPs untuk viskositas akan muncul pada monitor alat (Sukmawati dkk., 2013)

6.8. Uji stabilitas. Uji stabilitas dilakukan dengan metode *cycling test*. Uji ini dilakukan dengan melakukan penyimpanan selama beberapa waktu pada suhu yang lebih tinggi (Ika dkk., 2014). Sediaan siklus pertama disimpan pada suhu 4°C lalu dikeluarkan dan diletakkan pada suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$ pada masing-masing sediaan selama 24 jam dan dilakukan pengulangan sebanyak 6 siklus (Pambudi, 2013). Setelah pengujian *cycling test* ini dilakukan evaluasi pengujian yaitu pengamatan organoleptis, lalu pengamatan pH dan terakhir viskositas sebelum dan setelah pengujian stabilitas (Malik *et al*, 2020)

7. Pengujian anti inflamasi

7.1. Penanganan hewan uji. Hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih jantan galur wistar dengan berat badan 200-250 gram yang diaklimatisasi selama 1 minggu dan sebelum percobaan dilakukan tikus dipuasakan selama 18 jam tetapi tetap diberikan minum.

7.2. Pengelompokan hewan uji. Hewan uji dipilih sebanyak 25 ekor tikus percobaan dibagi menjadi 5 kelompok percobaan masing-masing 5 ekor. diberikan perlakuan berdasarkan pembagian formula yang akan diuji. Pembagian perlakuan uji antiinflamasi pada tikus sebagai berikut :

Kelompok I : kontrol negatif (basis emulgel tanpa minyak kapulaga)

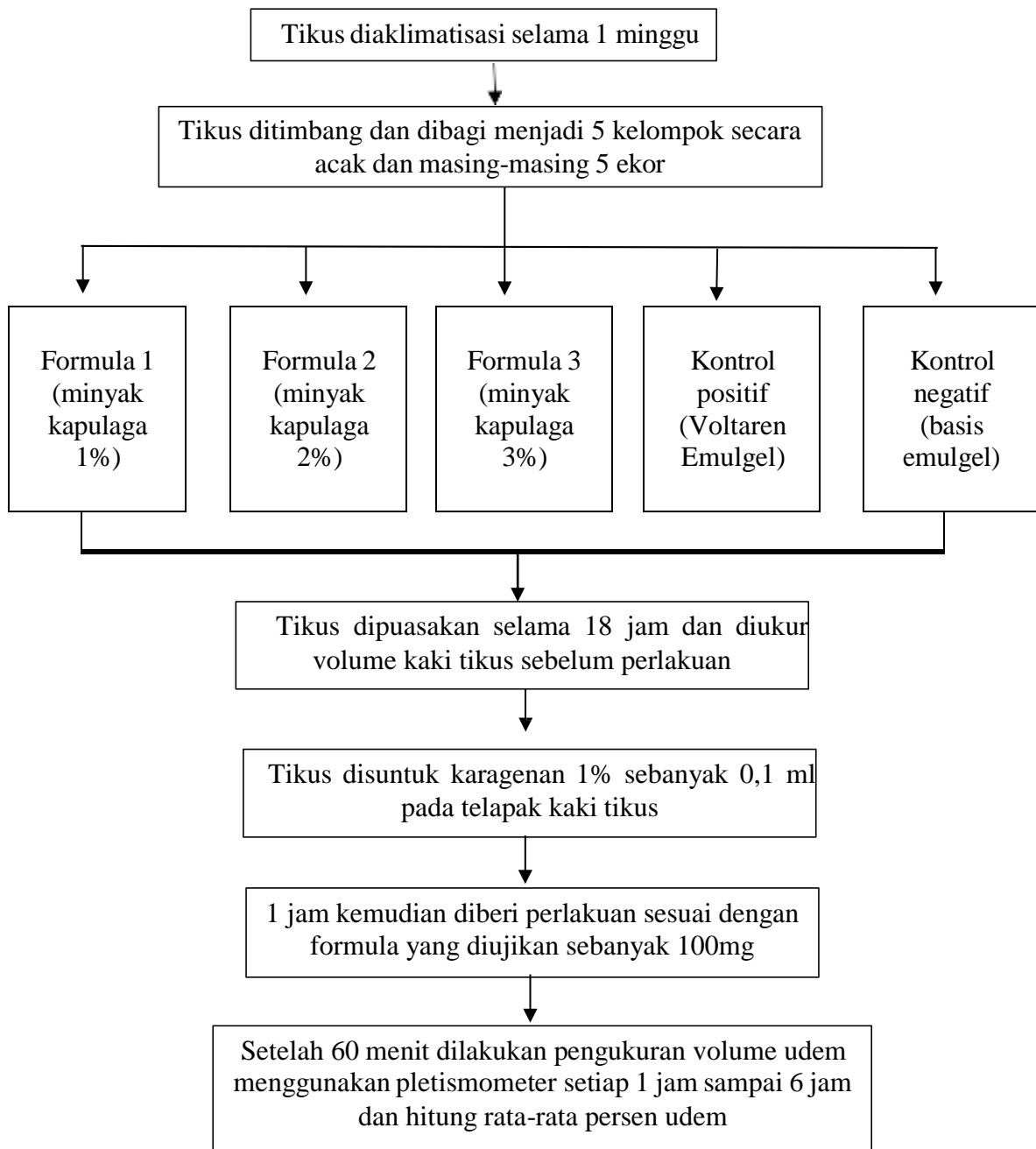
Kelompok II : kontrol positif (Voltaren Emulgel)

Kelompok III : emulgel indometasin formula I

Kelompok IV : emulgel indometasin formula II

Kelompok V : emulgel indometasin formula III

7.3. Tahapan uji antiinflamasi pada tikus jantan galur wistar



Gambar 13. Uji antiinflamasi pada tikus jantan galur wistar

Dihitung rumus perhitungan volume edema sebelum dan sesudah penginduksi karagen seperti berikut :

$$Vu = Vt - Vo$$

Keterangan :

Vu : volume edema kaki tikus tiap waktu

Vo : volume kaki tikus setelah diinduksi karagenan 1% tiap t

Data kuantitatif penelitian berupa AUC (*Area Under Curve*) dari kurva edema rata-rata terhadap waktu dan persen efek antiinflamasi. Nilai AUC merupakan luas rata-rata dibawah kurva yang merupakan hubungan volume edema rata-rata tiap satuan waktu. Rumus perhitungan AUC sebagai berikut :

$$AUC = \frac{Vtn + Vtn-1}{2} \times (tn - tn-1)$$

Keterangan :

Vtn : volume udeme rata rata

tn : waktu (jam)

Persen daya antiinflamasi (penghambatan volume udeme) dapat dihitung berdasarkan persen penurunan udeme dengan rumus :

$$\%DAI = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100\%$$

Keterangan :

AUC_k : AUC kurva volume udem rata-rata terhadap waktu untuk kontrol negatif.

AUC_p : AUC kurva volume udem terhadap waktu untuk kelompok perlakuan pada tiap individu.

E. Analisis data

Data yang telah terkumpul diproses dan dianalisis menggunakan SPSS (*Statistical Product And Service Solution*) dengan menganalisis data sediaan emulgel indometasin yang diuji sifat fisiknya, meliputi uji pH, homogenitas, viskositas, stabilitas, daya sebar, daya lekat dan uji stabilitas menggunakan *Cycling test* serta uji aktivitas antiinflamasi. Uji normalitas dilakukan menggunakan uji *Shapiro-wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *levene test*. Data yang terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji ANOVA (*Analysis Of Variant*) yang yang bertujuan untuk mengetahui bahwa kelompok penelitian memiliki

perbedaan yang bermakna, maka untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok. Analisis data menggunakan *Kruskall-Wallis* untuk data yang memiliki sebaran tidak normal dan data yang tidak homogen. Dikatakan berbeda signifikan apabila nilai $p < 0.05$ dan tidak signifikan bila $p > 0.05$, bila terdapat signifikansi maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Untuk melihat perbedaan sebelum dan sesudah uji stabilitas dilakukan analisis dengan *paired t test*.