

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba seledri (*Apium graveolens* L.) yang diperoleh dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa tengah.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu herba seledri yang dibuat menjadi gel dengan variasi konsentrasi HPMC.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel pertama adalah serbuk herba seledri yang diekstraksi secara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dan dilanjutkan dengan pembuatan sediaan gel.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel bebas penelitian ini yaitu variasi konsentrasi HPMC dalam sediaan gel ekstrak etanol herba seledri.

Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu aktivitas penyembuhan luka sayat pada punggung kelinci menggunakan gel ekstrak etanol herba seledri dengan variasi konsentrasi HPMC dan uji mutu fisik.

Variabel terkendali yaitu variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu kondisi fisik hewan yang diuji, pembuatan ekstrak etanol herba seledri, peralatan yang digunakan, area dan kedalaman luka, serta bobot badan, umur serta galur dari hewan tersebut, area tempat tinggal serta laboratorium.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, herba seledri yang segar dan berwarna hijau diambil dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa tengah.

Kedua, herba seledri disortasi basah dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor, dikeringkan dengan oven, penggilingan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, herba seledri diperoleh dari hasil maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* suhu 40-50⁰C hingga didapatkan ekstrak kental.

Keempat, sediaan gel merupakan sistem semipadat yang dibentuk dari partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar dan terpenetrasi oleh suatu cairan.

Kelima, *Gelling agent* yang digunakan adalah HPMC dengan konsentrasi 1%, 2% dan 3%.

Keenam, hewan percobaan yang digunakan adalah kelinci putih *new zealand* yang berumur 8-12 minggu dan sehat secara fisik yang diperoleh dari laboratorium Universitas Setia Budi.

Ketujuh, luka sayat adalah luka yang dibuat dengan cara kelinci dianestesi menggunakan *ethylchloride spray* lalu diberi perlakuan luka sayat menggunakan pisau bedah steril dengan kedalaman luka 0,5 cm dan panjang luka 2 cm.

Kedelapan, uji mutu fisik sediaan gel merupakan pengujian yang meliputi uji organoleptik, uji pH, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat, dan uji stabilitas.

Kesembilan, uji aktivitas luka sayat merupakan proses sembuhnya punggung kelinci dari kerapatan kulit diukur dengan melihat panjang luka dan waktu penyembuhan luka.

C. Alat dan Bahan

1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu herba seledri, etanol 96%, HPMC, propilen glikol, metil paraben, serbuk Mg, HCL 2N, FeCl₃, dan aquadest.

2. Alat

Alat yang digunakan antara lain oven, kulkas, blender, *rotary evaporator*, pipet ukur, pipet tetes, ayakan no. 40, kertas saring, botol coklat, cawan porselen, batang pengaduk, set mortir, *water bath*, set gelas kaca, neraca analitik, corong, penangas air, alat *sterling-bidwell*, jangka sorong, pisau bedah steril, gunting, pH meter, alat uji daya lekat, daya sebar, timbangan gram, *object glass*, *viscometer brookfield cone and plate*, *stopwach*, wadah sediaan gel.

D. Rencana Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman yang diambil dengan melakukan pencocokan ciri morfologis yang ada pada tanaman yang diteliti. Determinasi tanaman seledri

dilakukan di Gedung Herbarium, Balai Pasar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat tradisional, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Ethical Clearance (EC)

Berdasarkan ketentuan dari Menteri Kesehatan Republik Indonesia dalam Peraturan Nomor 7 tahun 2016 mengenai Komisi Etik Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Nasional, disebutkan bahwa setiap penelitian dan pengembangan kesehatan yang melibatkan manusia dan hewan percobaan sebagai subjek harus mematuhi prinsip-prinsip etika yang relevan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendukung upaya pelayanan kesehatan demi meningkatkan kualitas kesehatan masyarakat seoptimal mungkin. Pada penelitian ini *Ethical Clearance* (EC) dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

3. Penyiapan sampel

Herba seledri yang diambil dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, dilakukan sortasi basah, pencucian dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor, perajangan, pengeringan di bawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam hingga kering agar kadar air berkurang sehingga mencegah proses pembusukan.

4. Pembuatan serbuk

Simplisia herba seledri yang telah kering kemudian dilakukan penggilingan menggunakan blender didapat serbuk kasar lalu diayak menggunakan ayakan nomor 40 agar diperoleh serbuk dengan ukuran yang lebih kecil. Semakin kecil ukuran serbuk maka luas permukaan menjadi lebih besar sehingga kontak dengan pelarut lebih banyak dan senyawa aktif dapat ditarik dengan maksimal.

5. Analisis serbuk

Serbuk herba seledri dilakukan analisis dengan organoleptis yang meliputi bentuk warna bau dan rasa.

6. Penetapan susut pengeringan serbuk

Susut pengeringan dengan cara ditimbang dan ditaburkan diatas *moisture balance* sebanyak 2 g dilakukan selama kurang lebih 4 menit, tunggu sampai angka konstan. Catat hasil susut pengeringan dalam % b/b. Memenuhi syarat apabila kadar air serbuk <10% (Depkes, 2013).

$$\% \text{ Susut pengeringan} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

7. Penetapan kadar air serbuk

Penetapan kadar air dilakukan menggunakan cara destilasi toluen. Toluene dijenuhkan dengan air terlebih dahulu, kemudian serbuk ditimbang sebanyak 20 g dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Tambahkan 200 ml toluen yang telah dijenuhkan menggunakan air 20 ml, kemudian labu dipanaskan selama 15 menit, Setelah semua tersuling dilanjutkan pemanasan selama 5 menit. Setelah itu, tabung didinginkan hingga mencapai suhu kamar. Volume air dibaca saat toluen dan air memisah dengan sempurna.

$$\% \text{ kadar air serbuk} = \frac{\text{volume air}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$$

8. Pembuatan ekstrak etanol

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi (metode dingin). Sebanyak 900 g serbuk simplisia herba seledri diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 4.500 ml dengan perbandingan 1:5 selama 3 hari dengan penggantian pelarut setiap 24 jam sekali dengan sesekali pengadukan kemudian disaring menggunakan kain flanel hingga didapat filtrat dan residu. Residu di remaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1.800 ml dengan perbandingan 1:3. Filtrat 1 dan filtrat 2 yang diperoleh disatukan lalu dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* untuk memisahkan pelarut dan didapat ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh diuapkan pada *waterbath* untuk menghilangkan pelarut yang masih tertinggal pada ekstrak. Pelarut etanol 96% dipilih karena merupakan senyawa yang mudah menguap sehingga baik digunakan untuk ekstraksi dan dapat menarik senyawa polar dan semi polar.

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak (gram)}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$$

9. Analisis ekstrak kental herba seledri

Ekstrak kental herba seledri dilakukan analisis dengan organoleptis yang meliputi bentuk, warna, dan bau.

10. Penetapan kadar air ekstrak

Menentukan kandungan kadar air dilakukan menggunakan cara destilasi toluen. Toluene dijenuhkan dengan air terlebih dahulu, kemudian 10 g ekstrak ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Tambahkan 200 ml toluen yang telah dijenuhkan menggunakan air sebanyak 20 ml, kemudian labu dipanaskan selama 15 menit, Setelah semua tersuling dilanjutkan pemanasan selama 5 menit.

$$\% \text{ kadar air serbuk} = \frac{\text{volume air}}{\text{bobot ekstrak}} \times 100\%$$

11. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak

11.1 Uji flavonoid. Ekstrak kental 0,5 g dilarutkan dengan 5 ml etanol 96%, diambil 2 ml larutan dan ditambah 0,1 g serbuk Mg, ditetesi dengan 10 tetes HCL 2N, dikocok perlahan. Hasil positif flavonoid ditandai warna merah jingga hingga merah ungu (Depkes RI, 1995).

11.2 Uji tanin. Ekstrak kental diencerkan dengan metanol dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan 3 tetes larutan FeCl₃ 5%. Jika terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru tua, hal ini mengindikasikan keberadaan tanin dalam sampel (Depkes RI, 1979).

12. Rancangan formulasi gel herba seledri (*Apium graveolens* L.)

Tabel 1. Rancangan formula sediaan gel ekstrak etanol herba seledri

| Bahan | Formula (%) | | | | Fungsi |
|-----------------------|-------------|---------|---------|---------|-----------|
| | FI | FII | FIII | FIV | |
| Ekstrak herba seledri | 4 | 4 | 4 | - | Zat aktif |
| HPMC | 1 | 2 | 3 | 2 | Basis gel |
| Metil paraben | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,18 | Pengawet |
| Propilenglikol | 15 | 15 | 15 | 15 | Humektan |
| Aquadest | Add 100 | Add 100 | Add 100 | Add 100 | Pelarut |

Sumber: Kori Yati *et al.*, 2018 dengan modifikasi

Keterangan:

FI: Gel ekstrak etanol herba seledri dengan konsentrasi HPMC 1%

FII: Gel ekstrak etanol herba seledri dengan konsentrasi HPMC 2%

FIII: Gel ekstrak etanol herba seledri dengan konsentrasi HPMC 3%

FIV: Gel tanpa ekstrak etanol herba seledri (kontrol negatif)

13. Prosedur pembuatan gel

Pembuatan basis gel dilakukan dengan mendispersikan HPMC dalam Aquadest dengan suhu 80-90°C, kemudian digerus hingga terbentuk dispersi yang homogen. Metilparaben dilarutkan dalam propilenglikol, kemudian ekstrak etanol herba seledri ditambahkan ke dalam larutan metilparaben. Kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam basis gel HPMC dan campurkan hingga homogen, lalu ditambahkan sisa aquadest. Kemudian sediaan gel ekstrak etanol herba seledri yang sudah siap disimpan dalam wadah tertutup dan dilakukan uji mutu fisik.

14. Uji mutu fisik sediaan gel

14.1 Uji Organoleptis. Sediaan gel yang telah jadi dilihat bentuk fisiknya yang meliputi bentuk, warna dan bau guna mengidentifikasi karakteristik visual dari gel tersebut.

14.2 Uji Homogenitas. Untuk menguji homogenitas, sediaan gel ditempatkan pada selembar kaca atau material transparan yang sesuai. Hasil dari pengujian ini adalah untuk memastikan bahwa gel menampilkan struktur yang homogen dan tidak menunjukkan adanya partikel kasar (Amin, 2014).

14.3 Uji pH. Penentuan pH sediaan gel diukur dengan menggunakan pH meter (Novitasari, 2014). Dalam setiap formula, batasan pH yang ditetapkan berada di antara kisaran pH kulit, yaitu 4,0 hingga 7,0. Hal ini menunjukkan bahwa gel yang dihasilkan dirancang untuk tidak menyebabkan iritasi pada kulit dan memenuhi kriteria untuk sifat fisik serta stabilitas yang optimal dari gel tersebut (Andriani, 2017).

14.4 Uji Viskositas. Pengukuran viskositas atau kekentalan sediaan gel dilakukan dengan menggunakan *viskometer Brookfield* (Voight, 1995 dalam Amin 2014). Tuangkan 50 mL gel ke dalam tabung viskometer. Atur alat pengaduk viskometer dengan menggunakan spindle berukuran 6. Pastikan level air pada posisi tengah dan aktifkan mode siaga, serta pastikan display menunjukkan angka nol. Sesuaikan kecepatan putaran spindle dan turunkan spindle hingga menyentuh sediaan gel. Aktifkan switch ke posisi on, hidupkan alat, dan catat hasil kekekalan gel. Pengujian dilakukan pada hari pertama dan ke-21 dengan periode penyimpanan selama tiga minggu. Untuk formula gel yang baik mempunyai rentang nilai viskositas antara 2.000-50.000 cps (SNI No.16 th. 1996).

14.5 Uji Daya Sebar. Sejumlah 0,5 gram gel ditempatkan di atas sebuah kaca. Kemudian, kaca lain diletakkan di atasnya dan dibiarkan selama satu menit. Diameter penyebaran gel diukur setelahnya. Selanjutnya, diberikan tambahan beban seberat 250 gram dan dibiarkan selama satu menit sebelum mengukur kembali diameter dan stabilitasnya. Sebaran dengan diameter antara 5 hingga 7 cm menandakan bahwa konsistensi semisolid gel tersebut sangat nyaman untuk penggunaan (Nutrisia, 2015).

14.6 Uji daya lekat. Sampel ditempatkan di antara dua kaca dengan sisi bawah yang dilengkapi dengan tali untuk menggantungkan beban. Seberat 50 gram beban ditambahkan, dan kemudian diamati berapa lama yang diperlukan untuk beban tersebut agar bisa memisahkan kedua kaca tersebut. (Safitri *et al.*, 2014). Tidak ada ketentuan khusus terkait daya lekat sediaan semipadat, tetapi idealnya,

sediaan semipadat tersebut sebaiknya memiliki daya lekat selama lebih dari satu detik. (Zats & Gregory, 1996)

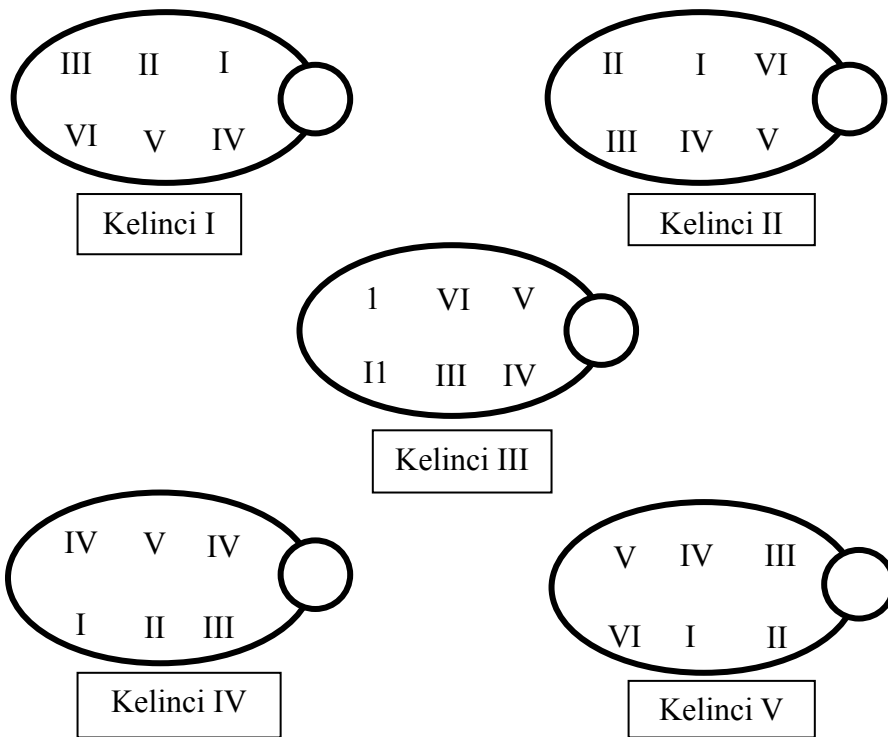
14.7 Uji stabilitas. Dilakukan dengan metode *cycling test*, yaitu menyimpan gel kedalam temperatur 4°C dalam kurun waktu 24 jam, kemudian dipindahkan kedalam suhu yang sama yaitu 48°C dalam kurun waktu 24 jam (1 siklus). Pengujian stabilitas berlangsung hingga enam siklus, pada siklus yang terakhir dilihat ada tidaknya pemisahan dari fase gel. Selanjutnya setelah pengujian 6 siklus, kondisi sediaan diamati dengan memeriksa organoleptis, homogenitas, pH daya sebar, daya lekat, dan viskositas apakah stabil atau tidak setelah dilakukan pengujian dengan menggunakan metode *cycling test*.

15. Pengujian efek gel ekstrak etanol herba seledri pada kelinci

15.1 Penyiapan hewan uji. Sebanyak 5 kelinci putih terlebih dahulu dilakukan randomisasi kemudian ditempatkan ke dalam kandang yang sudah disediakan menurut kelompok perlakuan. Kelinci diadaptasi selama 7 hari dan pada hari ke-8 kelinci dilakukan perlakuan luka sayat. Sehari sebelum diberi perlakuan luka sayat punggung kelinci dicukur bulunya pada bagian punggung, keesokan harinya punggung kelinci yang sudah dicukur bulunya dianestesi menggunakan *ethylchloride spray* lalu diberi perlakuan luka sayat menggunakan pisau bedah steril dengan kedalaman luka 0,5 cm dan panjang luka 2 cm.

15.2 Pengujian terhadap hewan. Efek penyembuhan luka sayat dilakukan padahari ke-8 terhadap 5 ekor kelinci sehat. Kelinci yang telah dicukur bulunya pada bagian punggung dianestesi menggunakan *ethylchloride spray* lalu diberi perlakuan luka sayat menggunakan pisau bedah steril dengan kedalaman luka 0,5 cm dan panjang luka 2 cm. Pembagian perlakuan sebagai berikut:

- Kelompok I : Basis gel tanpa ekstrak (kontrol negatif)
- Kelompok II : Sediaan gel ekstrak herba seledri dengan HPMC 1%
- Kelompok III : Sediaan gel ekstrak herba seledri dengan HPMC 2%
- Kelompok IV : Sediaan gel ekstrak herba seledri dengan HPMC 3%
- Kelompok V : Sediaan gel bioplacenton (kontrol positif)
- Kelompok VI : Kontrol normal



Setelah dilakukan perlakuan dilakukan pengolesan terhadap luka sayat sesuai dengan kelompok perlakuannya. luka pada punggung kelinci kelompok I dioleskan basis gel tanpa ekstrak sebagai kontrol negatif, kelompok II, III, dan IV dioleskan gel ekstrak etanol herba seledri, kelompok V dioleskan gel bioplacenton dan kelompok VI dibiarkan tanpa perlakuan, lalu ditutup dengan kasa steril hingga luka tertutup sempurna. Dioleskan tipis $\pm 0,5$ gram pada masing-masing perlakuan dilakukan 2 kali yaitu pagi dan sore hari. Hal tersebut dilakukan secara berulang setiap hari selama 14 hari. Luka diukur mulai dari hari kedua hingga luka sembuh.

15.3 Pengukuran luka sayat. Panjang luka sayat diukur dari sisi kiri hingga sisi kanan luka. Pengukuran luka dimulai dari hari pertama dilakukan perlakuan luka sayat pada punggung kelinci sampai luka sayat sembuh. Pengukuran panjang luka sayat dilakukan satu kali sehari selama 14 hari menggunakan jangka sorong.

16. Pengamatan penyembuhan luka sayat

Efek dari penyembuhan luka diamati panjang luka yang memendek, munculnya dan keringnya kropeng terkelupas. Pemulihan dan panjang luka sayat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

Area sembuh = area luka awal – area luka yang tersisa

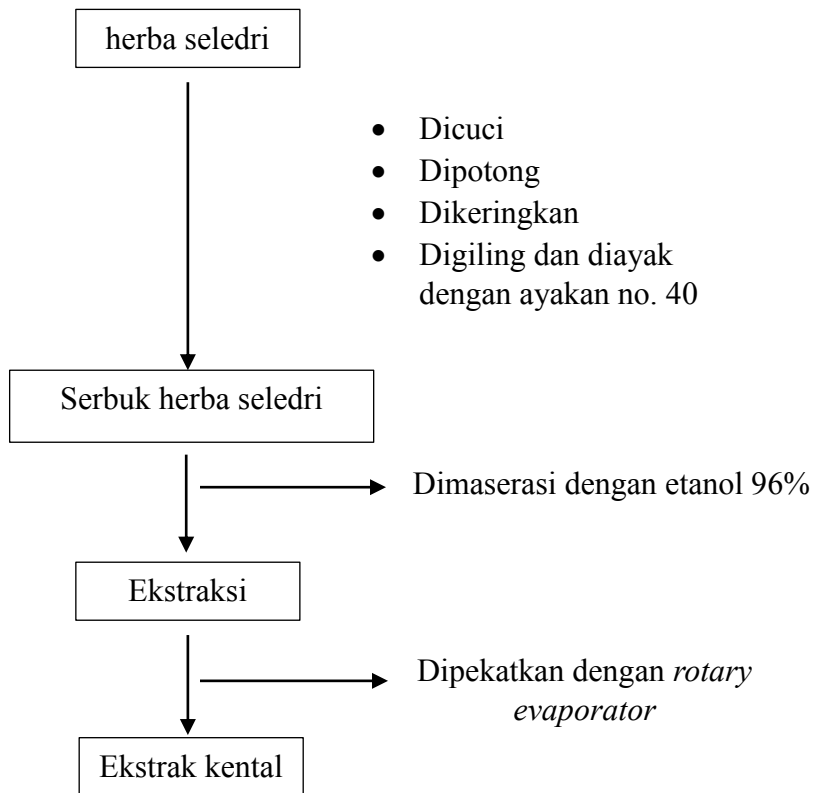
$$\% \text{Penyembuhan luka} = \frac{\text{Area sembuh}}{\text{Area luka awal}} \times 100$$

E. Analisis Hasil

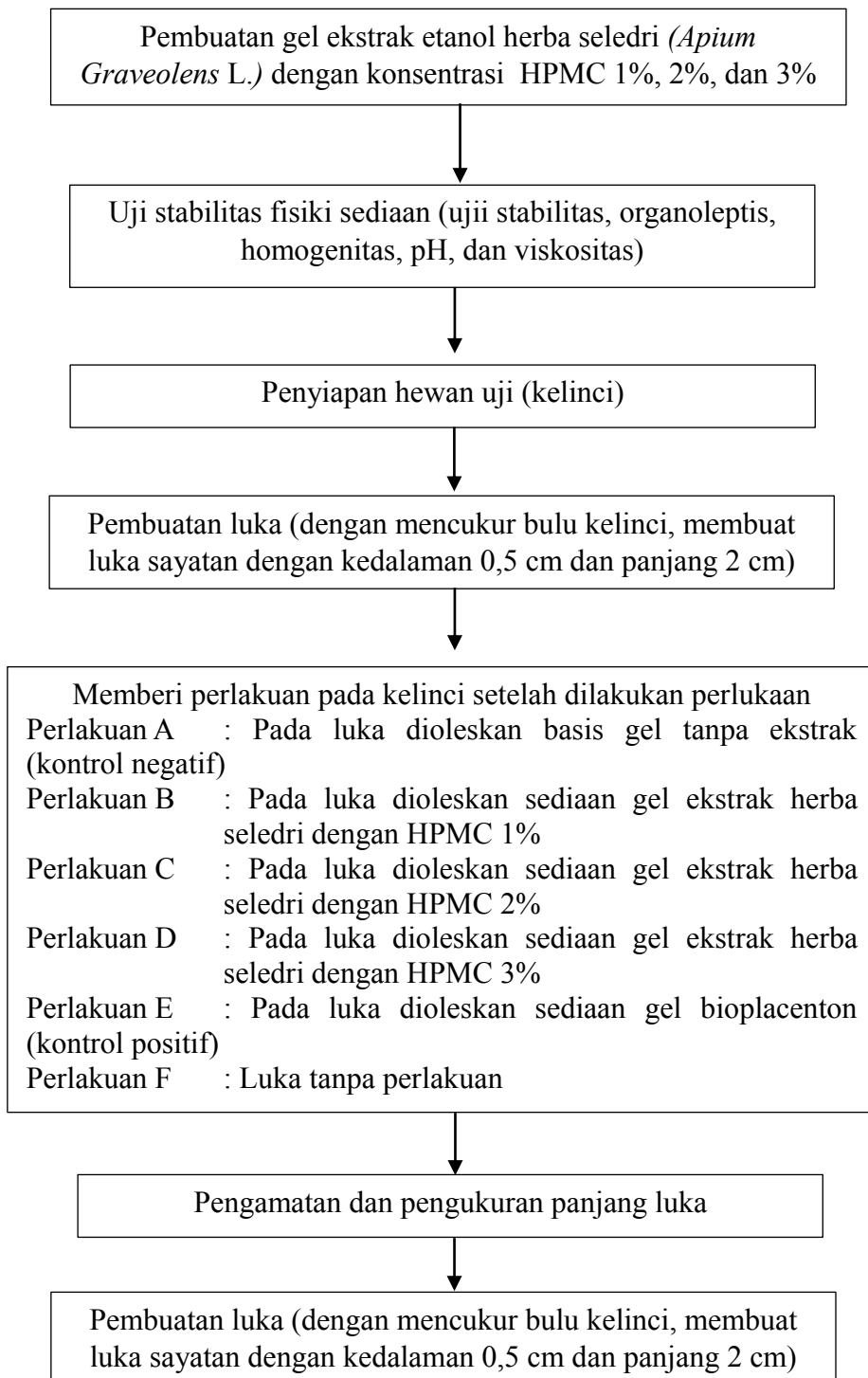
Berdasarkan hasil yang diperoleh dari data untuk membandingkan efek berdasarkan pengukuran penurunan panjang luka sayat serta waktu yang diperlukan untuk penyembuhan luka sayat pada hewan uji menggunakan formulasi sediaan gel ekstrak etanol herba seledri dengan variasi konsentrasi HPMC. Data diuji statistik menggunakan SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), dilakukan analisis data dengan uji normalitas dan uji homogenitas, jika data homogen dan terdistribusi normal $p > 0,05$ maka analisis data dilakukan dengan uji parametrik dilanjutkan menggunakan metode *One Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan *post hoc test* untuk mengetahui suatu kelompok memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok lain. Jika data tidak terdistribusi normal maka data dilanjutkan dengan analisis *Post-Hoc Dunnet's*.

Pada setiap pengujian, dicari perbedaan nyata dari mutu fisik sediaan gel ekstrak etanol herba seledri pada hari ke-1 hingga hari ke-21 setelah pembuatan gel. Hasil pengamatan aktivitas sediaan gel ekstrak etanol herba seledri terhadap penyembuhan luka sayat sepanjang 14 hari dianalisis secara statistik memakai metode *Shapiro Wilk*. Jika data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen maka $\text{sig} > 0,05$ analisis dilakukan dengan uji parametrik menggunakan *One Way Anova* dengan membandingkan diameter kelompok dan waktu penyembuhan luka sayat, dilanjutkan *Post Hoc Test Tukey* untuk menentukan konsentrasi yang memiliki efek yang sama atau berbeda satu sama lain. Jika data dinyatakan tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka $\text{sig} < 0,05$, analisis dilakukan dengan uji non-parametrik dengan uji *Kruskal-Wallis*.

F. Jalannya Penelitian



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak



Gambar 6. Skema jalannya penelitian