

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

Populasi adalah semua unit atau individu yang ada di wilayah yang menjadi objek penelitian. Populasi penelitian ini adalah sampel krim ekstrak daun kecombrang

Sampel penelitian ini adalah sediaan krim ekstrak daun kecombrang dengan variasi emulgator tween 80 dan span 80 2%, 3%, dan 4%. Daun kecombrang yang digunakan berasal dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Daun kecombrang dipilih secara acak karena harus segar, tidak terlalu muda atau terlalu tua, dan berwarna hijau dari pangkal ke ujung.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun kecombrang(*Etlingera elatior* (Jack)) didapat melalui maserasi memakai etanol 70% sebagai pelarut.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang sudah ditetapkan diidentifikasi pada beragam jenis variabel diantaranya variabel bebas, tergantung serta terkendali.

Variabel yang sengaja diubah untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung disebut variabel bebas. Variasi konsentrasi emulgator digunakan sebagai variabel bebas dalam penelitian ini untuk melihat dampak dari variabel tergantung.

Variabel tergantung adalah fokus dan standar penilaian. Dalam penelitian ini, variabel tergantung termasuk aktivitas penyembuhan luka sayat, yang diukur melalui penurunan volume luka setelah penggunaan ekstrak etanol daun kecombrang pada konsentrasi yang berbeda, serta stabilitas mutu fisik krim yang digunakan.

Variabel terkendali merupakan variabel yang memiliki pengaruh terhadap variabel tergantung. Penting untuk menetapkan kualifikasi yang tepat agar hasil penelitian tidak tersebar dan dapat diulang dengan akurasi oleh peneliti lain. Variabel terkendali dalam penelitian ini mencakup berbagai aspek seperti pembuatan ekstrak kental, peralatan yang digunakan, kondisi lingkungan, panjang luka, kedalaman potongan

bulu, dan kondisi fisik hewan uji, termasuk berat badan, umur, galur hewan, lingkungan tempat tinggal, dan kondisi laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kecombrang yang digunakan dari wilayah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Daun dicuci dengan air mengalir, dikeringkan di oven suhu 45°C selama 2-3 hari selanjutnya diserbuk serta diayak memakai ayakan mesh 40.

Kedua, ekstrak daun kecombrang merupakan hasil maserasi serbuk daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)) dan etanol 70%, kemudian dipekatkan dalam *rotary evaporator* disuhu 40 °C.

Ketiga, kelinci putih *New Zealand* yang diperoleh dari peternakan Abimanyu Surakarta, digunakan sebagai hewan percobaan.

Keempat, uji aktivitas luka sayat yaitu kemampuan krim ekstrak etanol daun kecombrang dalam menyembuhkan luka sayat berdasarkan pengukuran panjang luka sayat

Kelima, krim merupakan sediaan topikal yang mengandung bahan aktif yang dicampur dalam basis.

Keenam, pengujian mutu fisik formulasi krim dilakukan dengan mengamati hasil organoleptis, tipe emulsi, pH, viskositas, daya lekat, daya sebar, homogenitas, dan stabilitas.

Ketujuh, variasi konsentrasi basis efektif yakni variasi konsentrasi basis dengan persentase kesembuhan tidak berbeda nyata dengan kontrol positif serta mempunyai persentase kesembuhan tertinggi.

C. Alat dan bahan

1. Alat

Alat pada penelitian ini diantaranya timbangan analitik, blender, ayakan serbuk mesh 40, alat maserasi, krimas ukur, Beaker glass, objek glass, cawan porselin, batang pengaduk, water bath, *rotary evaporator*, pot salep, mortir dan stamper, viscotester VT-04F RION, pH meter, objek glass, alat uji daya sebar dan daya lekat, timbangan gram, *stopwatch*, pisau bedah, alat pencukur bulu, gunting, penggaris, tabung reaksi, corong, kain flanel, alat pengukur luka, pisau, nampan, *moisture balance*, *sterling bidwell*, labu destilat, pembakar spiritus, *scaple*, sarung tangan, tempat makan dan minum hewan uji, dan cotton bad.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel pada penelitian ini yaitu daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)) didapat dari wilayah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia pada penelitian ini diantaranya etanol 70%, tween 80, span 80, propilen glikol, vaselin putih, cera alba, methyl paraben, asam asetat dan asam sulfat pekat, asam asetat glasial, asam klorida 2N, serbuk magnesium, amil alkohol, alkohol, toluen jenuh air, *ethyl khlorida* spray, nipagin, nipasol, *methylen blue*, aquadest dan betadine krim.

2.3 Hewan uji. Hewan uji pada penelitian ini yaitu kelinci putih jenis *New Zealand* dengan bobot badan 1,5 hingga 2,0 kg dengan rentang umur 5,0 hingga 6,0 tahun yang diperoleh dari peternakan Abimanyu Surakarta yang diaklimasikan selama seminggu selanjutnya dibuat luka sayat memakai pisau bedah sesuai panjang yang diharapkan.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilaksanakan dengan tujuan mengecek sampel benar daun kecombrang yang digunakan. Determinasi dilaksanakan untuk mengidentifikasi ciri morfologi tanaman terhadap kunci determinasi untuk menghindari penyalahgunaan sampel dalam penelitian (Diniatik, 2015). Determinasi tumbuhan kecombrang dilakukan di B2P2TOOT, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pembuatan serbuk daun kecombrang

Daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)) kering dilakukan penyerbukan dengan blender kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 40. Hasil serbuk kering kecombrang disimpan diplastik yang telah disediakan untuk wadah penyimpanan.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot simplisia kering}}{\text{berat serbuk}} \times 100\%$$

3. Identifikasi serbuk daun kecombrang

3.1 Uji organoleptis. Serbuk daun kecombrang diidentifikasi secara organoleptis. Identifikasi dilakukan dengan pengamatan organoleptis berupa bentuk, warna, serta aroma serbuk kecombrang yang diuji.

3.2 Penetapan susut pengeringan serbuk daun kecombrang. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan *moisture balance* disuhu

105°C, timbang 2 gram serbuk daun kecombrang masukkan dalam *moisture balance* hingga didapat bobot yang konsisten kemudian hasil ditunjukkan dalam monitor dan dicatat. Hasil susut pengeringan yang baik adalah kurang dari 10%.

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

4. Pembuatan ekstrak daun kecombrang

600 gram serbuk daun kecombrang diekstrak melalui proses maserasi. Sembilan liter etanol 70% dilarutkan dengan serbuk pada perbandingan 1:10 sesuai dengan FHI; ada enam liter pelarut dan tiga liter remaserasi. Dimaserasi selama tiga hari, diaduk setiap enam jam sekali, dan kemudian disaring menggunakan kain flanel. Dalam maserasi kedua, filtrat pertama digunakan kembali; setelah itu, hasil ekstraksi digabungkan. Setelah hasil ekstraksi dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C sampai didapatkan bobot konsisten dari ekstrak kental dan hasilnya ditimbang. (Kurnianto, 2017).

5. Identifikasi ekstrak kental daun kecombrang

5.1 Uji organoletis. Ekstrak daun kecombrang diidentifikasi secara organoleptis. Identifikasi dilakukan dengan pengamatan organoleptis berupa bentuk, warna serta aroma ekstrak kecombrang yang diuji.

5.2 Penetapan kadar air ekstrak. Kadar air ekstrak penetapannya dikerjakan dengan metode gravimetri. Ekstrak etanol daun kecombrang ditimbang 2 g selanjutnya dimasukkan pada plat alumunium serta diatur disuhu 105°C, tunggu sampai penurunan berat sampel ditampilkan pada layar. Pengukuran berakhir sampai bobot konstan dan persentase ditampilkan. Lanjutkan proses pengeringan dengan menimbang kembali setiap 1 jam sampai didapatkan perbedaan 2 penimbangan berturut akan tetapi tidak lebih 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

5.3 Penetapan susut pengeringan ekstrak daun kecombrang. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan *moisture balance*, ekstrak etanol daun kecombrang ditimbang 2 g selanjutnya dimasukkan pada plat alumunium serta diatur disuhu 105°C, tunggu sampai penurunan berat sampel ditampilkan pada layar. Pengukuran berakhir sampai bobot konstan dan persentase ditampilkan. Penyusutan pengeringan yang baik yaitu kurang dari 10%.

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

5.4 Uji bebas etanol. Tujuan uji yaitu memastikan ekstrak tersebut tidak mengandung etanol atau senyawa ester. Reaksi dijalankan melalui penambahan asam asetat serta asam sulfat pekat terkonsentrasi ke tabung reaksi yang terkandung ekstrak dan tabung reaksi dipanaskan. Aroma ester alkohol apabila tercium dapat disimpulkan bahwasannya etanol masih terkandung dalam ekstrak.

6. Identifikasi kandungan senyawa

6.1. Flavonoid. Menurut Harbone (1987) larutkan 0,1 gram ekstrak dengan 10 ml aquades ke dalam tabung reaksi kemudian panaskan sampai mendidih, lalu disaring, dan diambil bagian filtratnya. Tambahkan serbuk Mg, dan HCl pekat sebanyak 20 tetes, lalu tambahkan amil alkohol 20 tetes kemudian di gojog kuat-kuat, dan tunggu sampai larutan tersebut memisah. Hasil positif flavonoid apabila terbentuk warna merah, jingga, ataupun kuning pada bagian lapisan amil alkohol. Apabila hasil reaksi menunjukkan warna jingga sampai merah menandakan positif flavon, sedangkan warna merah hingga merah tua adalah flavanol, dan merah tua hingga magenta (merah keunguan) menunjukkan positif flavanon.

6.2. Tanin. Mengambil 0,5 gram ekstrak lalu masukan dalam tabung reaksi tambahkan 3 ml aquades lalu panaskan , saring, dan ambil bagian filtratnya. Setelah itu masukan pereaksi FeCl_3 1% sebanyak 1 – 2 tetes, amati hingga terbentuk perubahan warna. Hasil berwarna biru atau hijau kehitaman menunjukkan bahwa larutan tersebut positif mengandung tanin (Harbone,1987).

6.3. Alkaloid. Ambil 0,5 gram ekstrak masukan kedalam tabung reaksi lalu tambahkan HCl 2 N sebanyak 1 ml, dan aquades 9 ml kemudian dipanaskan. Setelah itu disaring, dan ambil bagian filtratnya. Filtrat yang didapatkan dibagi secara rata kedalam 3 tabung reaksi yang mana masing – masing tabung ditambahkan pereaksi mayer, dragendroff serta wagner. Hasil positif alkaloid menurut Harbone (1987) yaitu ditandai dengan terbentuk endapan cokelat hingga hitam pada pereaksi wagner, endapan berwarna jingga cokelat pada pereaksi dragendroff, dan terbentuk endapan putih pada pereaksi mayer.

6.4. Saponin. Mengambil 0,5 gram ekstrak yang akan diuji masukan dalam tabung reaksi tambahkan 2 ml air panas lalu gojog kuat selama lebih kurang 10 detik. Jika dalam tabung reaksi terbentuk busa stabil tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 cm hingga 10 cm, dapat ditambahkan 1 tetes HCl 2N, hasilnya busa tersebut tidak hilang maka

disimpulkan bahwa larutan mengandung saponin.

6.5. Steroid. Uji steroid dan triterpenoid menggunakan metode *Liebermann-Bouchard*, ekstrak dilarutkan dalam kloroform kemudian ditambah pereaksi *Liebermann-Bouchard* (asam asetat anhidrat H_2SO_4) menunjukkan hasil positif dengan adanya perubahan warna menjadi merah kecoklatan untuk steroid dan coklat-ungu untuk triterpenoid.

7. Rumusan formula krim

Tabel 1. Rumusan formula krim luka sayat ekstrak etanol daun kecombrang

Bahan	Formula (%)						Fungsi
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
Ekstrak daun kecombrang	-	9	-	9	-	9	Zat aktif
Setil alkohol	7	7	7	7	7	7	Zat pengental
Adeps lanae	5	5	5	5	5	5	Basis
Gliserin	5	5	5	5	5	5	Humektan
Tween 80	1,06	1,06	1,59	1,59	2,13	2,13	Emulgator
Span 80	0,94	0,94	1,41	1,41	1,87	1,87	Emulgator
Propilenglikol	3	3	3	3	3	3	Humektan
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	Pengawet
Metil paraben	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Pengawet
Aquadest	<i>ad</i>	<i>ad</i>	<i>ad</i>	<i>ad</i>	<i>ad</i>	<i>ad</i>	Pelarat
	100	100	100	100	100	100	

Keterangan :

Formula 1 : Krim tween 80 dan span 80 2%

Formula 2 : Krim tween 80 dan span 80 2% dengan Ekstrak

Formula 3 : Krim tween 80 dan span 80 3%

Formula 4 : Krim tween 80 dan span 80 3% dengan Ekstrak

Formula 5 : Krim tween 80 dan span 80 4%

Formula 6 : Krim tween 80 dan span 80 4% dengan Ekstrak

8. Pembuatan krim

Proses pembuatan sediaan krim dimulai dengan menyiapkan semua perlengkapan yang akan digunakan. Kemudian, bahan-bahan yang akan digunakan dalam formulasi krim ditimbang dahulu sesuai dengan perhitungan. Fase minyak, yang terdiri dari span 80, setil alkohol, dan adeps lanae, dicampur dalam air panas pada suhu 70°Celsius sampai mencair. Untuk melarutkan metil paraben dan propil paraben dalam propilenglikol, penangas air yang mengandung tween 80, gliserin, dan propilenglikol dipanaskan pada suhu 70°Celsius. Fase minyak dimasukkan perlahan ke dalam fase cair sambil terus diaduk di dalam mortir sampai campuran menghangat di suhu 40°Celsius dan terbentuk emulsi yang stabil. Ekstrak etanol daun kecombrang dimasukkan perlahan ke dalam mortir yang berisi basis aduk hingga tercampur secara merata. Krim dimasukkan ke dalam wadah pot yang bersih dan diberi label. (Mansauda *et al.*, 2021).

9. Pengujian sediaan krim

Evaluasi mutu fisik dari sediaan krim ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack)) meliputi :

9.1. Pemeriksaan organoleptik. Indera manusia merupakan cara yang dilakukan pada uji ini, pengamatan meliputi warna dan aroma sediaan, tekstur sediaan dan bentuk sediaan. Pengujian dikerjakan masing-masing tiga kali pada setiap formula (Ratnaputri *et al.*, 2020)

9.2. Pengujian homogenitas. Pengujian dilaksanakan dengan pengolesan krim telah ditimbang ke atas kaca objek, selanjutnya katupkan kaca objek yang telah diolesi krim dengan kaca objek yang satunya dan perhatikan krim yang telah dioleskan pada kaca objek homogen dan apakah permukaannya ratadan halus. Uji homogenitas tiap formula dikerjakan tiga kali (Saryanti *et al.*, 2019).

9.3. Pengujian tipe emulsi

9.3.1 Metode pengenceran. Krim yang sudah dibuat dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian diencerkan dengan air. Jika krim dapat diencerkan maka tipe emulsinya adalah tipe M/A sebaliknya jika tidak dapat diencerkan maka tipe emulsinya A/M (Sanjay, 2003).

9.3.2 Metode dispersi larutan zat warna. Krim yang sudah dibuat dimasukkan pada Beaker glass lalu beberapa tetes larutan *metylen blue* ditambahkan jika warna biru segera terdistribusi keseluruhan emulsi maka berjenis M/A. Warna biru tidak terdispersi dengan keseluruhan maka berjenis A/M (Sanjay, 2003).

9.4. Pengujian viskositas. Alat *Viskometer Rion* adalah alat yang dipakai untuk melakukan uji viskositas. Pengujian dilakukan dengan cara memasang rotor pada viskometer lalu dikunci secara berlawanan arah dengan jarum jam. Isi cup dengan sediaan krim kemudian letakan rotor ditengah-tengah cup yang sudah diisikrim, lalu hidupkan alat. Sediaan sudah stabil maka nilai viskositas akan muncul dilayar, satuan nilai pada *viskositas Rion* adalah *desipascal-seconds* (Dpas). Masing-masing pengujian dilakukan sebanyak tiga kali (Ismiyati *et al.*, 2019).

9.5. Pengujian pH. Pengujian pH pada sediaan krim dilakukan apakah krim yang sudah dibuat memenuhi standar keamanan supaya tidak membuat kulit iritasi. Uji pH memakai alat yang dinamakan pH meter, kemudian krim tersebut diukur menggunakan pH meter. Nilai 4,5-8 masuk ke jenis sediaan yang aman bagi kulit, rentang tersebut merupakan pH yang sesuai dengan kulit. Pengujian dikerjakan masing-masing tiga kali pada setiap formula (Saryanti *et al.*, 2019).

9.6. Pengujian daya sebar. Pengujian daya sebar dilakukan dengan cara meletakkan krim sekitar 0,5 gram pada kaca transparan yang diletak di atas kertas grafik, kemudian tutup kembali dengan kaca transparan serta didiamkan selama kurang lebih 5 detik, hal tersebut bertujuan untuk berapa diameter daerah yang terbentuk. Penambahan beban dilakukan diatas kaca transparan seberat 50, 100, 200, dan 500glalu amati diameter yang terbentuk. Umumnya daya sebar krim berkisar antara 5-7cm. Pengujian dikerjakan masing-masing tiga kali pada setiap formula.

9.7. Pengujian daya lekat. Pengujian daya lekat dilakukan dengan krim ditimbang seberat 0,5 gram untuk dioleskan di plat kaca yang nantinya selama 5 menit akan diberi beban 250 g, kemudian beban diangkat dan lekatan plat kaca dilepaskan setelah 5 menit lalu hitung waktu saat kedua plat saling lepas. Daya lekatkrim yang baik memiliki waktu ≥ 1 detik. Pengujian daya lekat pada tiap formula dikerjakan sebanyak tiga kali.

9.8. Pengujian stabilitas. Metode *cycling test* adalah metode yang dipakai untuk menguji kestabilan sediaan. Uji ini dilakukan dengan cara menyimpansampel selama 24 jam disuhu sekitar 4°C, selanjutnya memasukan sampel pada oven dengan 1 siklus memakan waktu 24 jam dengan suhu 40 °C. Uji stabilitas sediaan dilangsungkan sejumlah 6 siklus lalu hasil dibandingkan pada setiap sikluslalu amati kondisi sediaan sebelum dan sesudah di uji meliputi homogenitas, organoleptik, tipe emulsi, pH, dan viskositas. Pengujian dikerjakan masing-masing tiga kali padasetiap formula (Rahman, 2020).

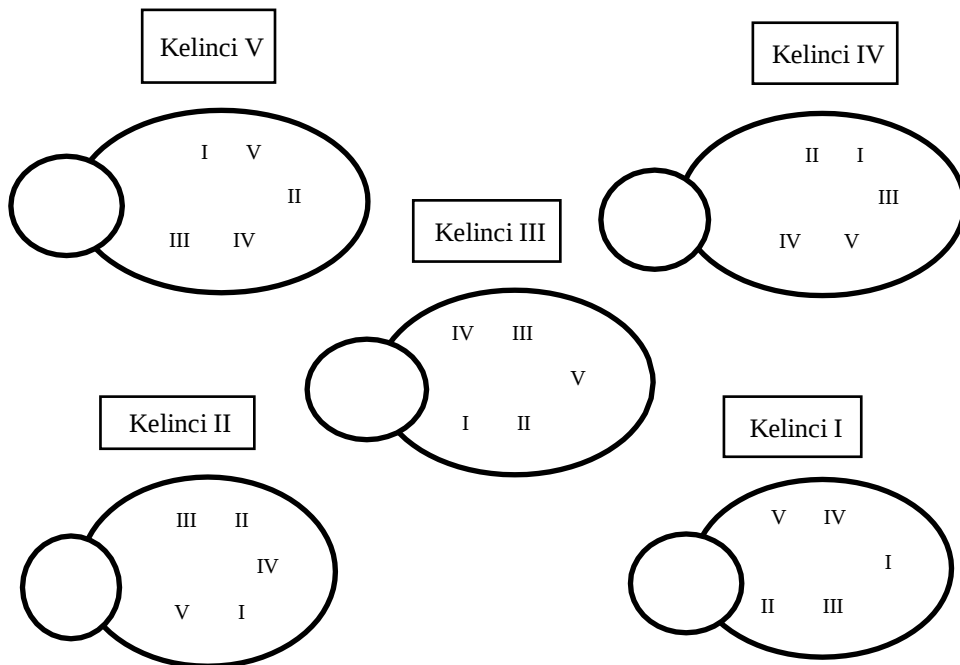
10. Persiapan hewan uji

Kelinci putih *New Zealand* yang diperoleh dari peternakan AbimanyuSurakarta, digunakan sebagai hewan percobaan. Umur kelinci yang di gunakan dengan rentang umur 5,0 hingga 6,0 tahun dan bobot badan sekitar 1,5 hingga 2,0 kg. kelinci putih yang telah diadaptasi selama 1 minggu kemudian diamati dan ditimbang dalam kondisi umum.

11. Pengelompokan hewan uji

Ada 5 kelompok perlakuan, satu kelinci per kelompok perlakuan:
Keterangan :

- a. Kelompok I : kontrol positif (betadine salep)
- b. Kelompok II : dioleskan krim konsentrasi emulgator 2% (F1)
- c. Kelompok III : dioleskan krim konsentrasi emulgator 3% (F2)
- d. Kelompok IV : dioleskan krim konsentrasi emulgator 4% (F3)
- e. Kelompok V : kontrol negatif (dioleskan krim tanpa ekstrak)



Gambar 6. Pola perlakuan pada kelinci.

12. Perlakuan hewan percobaan

Setelah mencukur bulu kelinci, langkah berikutnya adalah dianestesi dengan ethyl khlorida spray. Selanjutnya, dibuat luka sayat sepanjang 2 cm dengan menyayat, menggores, atau melukai punggung kelinci dengan kedalaman 0,3 cm, yang diukur dengan jangka sorong.

13. Pengukuran panjang luka sayat

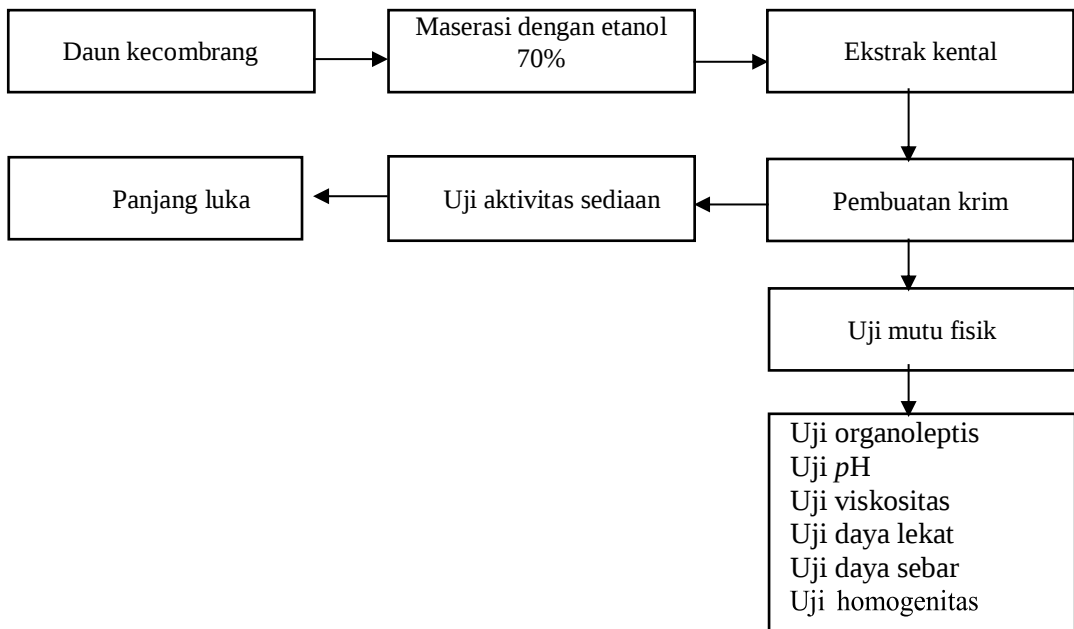
Melihat efektifitas dari setiap kelompok perlakuan dilakukan pengukuran panjang luka sayat satu kali sehari selama 14 hari. Pengukuran dilakukan di waktu tertentu hingga hari ke-14 dengan menggunakan penggaris.

14. Parameter penyembuhan luka sayat

Penyembuhan luka diamati dengan mengukur panjang luka dengan penggaris sejak hari kedua. Hari kedua pengukuran dilakukan setiap hari sampai luka dinyatakan sembuh. Luka dianggap sembuh bila diameter luka mencapai 0 cm atau terbentuk jaringan baru yang menutupi luka. Mekanisme penyembuhan luka sayat dilangsungkan sambil mengamati fase inflamasi, proliferasi, remodeling, serta diukur setiap hari panjang luka.

E. Diagram Alir

1. Skema pembuatan krim



Gambar 7. Skema pembuatan sediaan krim.

F. Analisis Data

Berdasarkan dari data hasil pengujian dari sifat fisik sediaan krim ekstrak etanol daun kecombrang dengan konsentrasi 2%, 3%, dan 4%, setiap formula diujimenggunakan metode *Cycling Test*. Sifat fisik seperti organoleptik, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat. Hasil rumusan tersebut diimplementasikan dengan pendekatan statistik menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the SocialSciences*). Uji *Paired-Samples T-Test* untuk mengetahui stabilitas formula dalam penyimpanan.

Hasil uji efek luka sayat krim ekstrak daun kecombrang dianalisis secara statistik memakai metode *Shapiro Wilk* untuk mengetahui normalitas data. Data yang diperoleh berdistribusi normal ($\text{sig} > 0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan ANOVA (*Analysis of Variant*) untuk membandingkan panjang luka tiap kelompok dan waktu penyembuhan luka sayat, dilanjutkan *Post Hoc Test* dengan uji *Tukey* untuk menentukan konsentrasi yang memiliki efek yang sama atau berbeda satu sama lain. Hasil dinyatakan tidak normal ($\text{sig} < 0,05$) makadata diuji dengan *Kruskal Wallis* dilanjutkan uji *Mann-Whitney*.