

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Keseluruhan unit atau individu dalam ruang lingkup yang ingin diteliti disebut populasi. Daun kecombrang yang diambil secara acak dari wilayah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, digunakan untuk penelitian ini.

Sampel yang digunakan adalah emulgel ekstrak daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)) dengan konsentrasi HPMC 2%, 3%, dan 4%. Daun kecombrang harus segar, berwarna hijau dari pangkal sampai ujung daun.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah mutu fisik dari emulgel (*Etlingera elatior* (Jack)) dengan variasi HPMC. Variasi HPMC dalam penelitian ini yaitu 2%, 3%, dan 4%.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah ditentukan dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang telah dimodifikasi untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variasi konsentrasi HPMC adalah variabel bebas penelitian ini.

Variabel tergantung adalah titik pusat masalah, yang berfungsi sebagai kriteria penilaian. Variabel penelitian adalah kualitas fisik emulgel, stabilitas emulgel, dan aktivitas penyembuhan luka. Selain itu, sediaan emulgel juga diuji untuk stabilitas dan kualitas fisik.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah pembuatan ekstrak kental, peralatan yang akan digunakan, lingkungan, kedalaman pencukuran bulu, panjang luka yang dibuat, meliputi berat badan hewan, kondisi fisik hewan yang akan uji, usia hewan, serta galur dari hewan tersebut, lingkungan tempat tinggal, dan laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kecombrang adalah dari daerah Tawangmangu, Karanganyar.

Kedua, serbuk daun kecombrang adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan, penggilingan, dan pengayakan daun kecombrang.

Ketiga, ekstrak etanol daun kecombrang adalah ekstrak hasil maserasi dengan pelarut etanol 70%.

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

Kelima, uji aktivitas luka sayat adalah kemampuan dari emulgel ekstrak etanol daun kecombrang dalam menyembuhkan luka sayat yang diukur dari panjang luka sayat

Keenam, emulgel adalah sediaan topikal yang dibuat dari campuran zat aktif dengan basis HPMC yang berfungsi sebagai *gelling agent* pada sediaan emulgel dengan variasi yaitu 2% ; 3% ; dan ; 4%

Ketujuh, pengujian mutu fisik formulasi emulgel dilakukan dengan mengamati hasil organoleptis, pH, viskositas, daya lekat, daya sebar, homogenitas serta stabilitas.

Kedelapan, variasi konsentrasi basis sudah efektif adalah variasi konsentrasi basis dengan persentase kesembuhan yang tidak berbeda bermakna terhadap kontrol positif dan memiliki persentase kesembuhan paling besar.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya, timbangan analitik, blender, ayakan serbuk mesh 40, alat maserasi, gelas ukur, Beaker glass, Objek glass double, cawan porselin, batang pengaduk, *rotary evaporator*, pot emulgel, mortir dan stamper, sudip, viscotester VT-04F RION, pH meter, alat uji daya sebar dan daya lekat, gelas objek dobel, timbangan gram, stopwatch, wadah sediaan, pisau bedah, alat pencukur bulu, gunting, penggaris, tabung reaksi, corong, kain flanel, kendang kelinci, tempat wadah minim, makan kelinci, alat pengukur luka, kain hitam, tabung reaksi, pisau, nampan, gelas ukur, *moisture balance*, *sterling bidwell*, labu destilat, pembakar spiritus, *cycling test*, lemari es, *methylen blue*, dan *scaple*.

2. Bahan

2.1. Bahan sampel. Daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)) yang diperoleh dari wilayah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan antara lain etanol 70%, tween 80, span 80, *hidroxypropy methylcellulose* (HPMC),

propilen glikol, paraffin cair, asam asetat, dan asam sulfat pekat, asam asetat glasial, asam klorida 2N, serbuk magnesium, amil alkohol, alkohol, toluen jenuh air, *ethyl klorida* spray, nipagin, nipasol, dan aquadest.

2.3. Hewan uji. Kelinci putih jenis New Zealand, yang dibeli dari Peternakan Abimanyu di Surakarta, dengan bobot 1,5 hingga 2,0 kilogram dan umur 5,0 hingga 6,0 tahun, digunakan sebagai hewan uji. Setelah diaklimatisasi selama satu minggu, hewan tersebut dengan sengaja dibuat luka sayat dengan pisau bedah dengan panjang yang diinginkan.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan dengan tujuan untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan benar daun kecombrang. Determinasi dilakukan dengan mengidentifikasi serta mencocokkan ciri-ciri morfologi tanaman dengan kunci determinasi untuk menghindari kesalahan penggunaan sampel dalam penelitian (Diniatik, 2015). Determinasi tumbuhan kecombrang dilakukan di B2P2TOOT, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Penyiapan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)) yang diperoleh dari wilayah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Bilas daun kecombrang yang terkumpul dalam air bersih yang mengalir (Kemenkes RI, 2014).

3. Pengeringan daun kecombrang

Daun kecombrang yang telah diambil, dicuci, dikeringkan di bawah sinar matahari, dan ditutup menggunakan kain berwarna hitam. Pengeringan dilakukan di Tawangmangu, Karanganyar (Kemenkes RI, 2014).

4. Pembuatan serbuk daun kecombrang

Daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)) setelah dikeringkan diblender dan diayak menggunakan ayakan mesh 40 di Universitas Setia Budi Surakarta. Selanjutnya, serbuk kering kecombrang disimpan dalam wadah plastik yang sudah disediakan.

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

5. Analisis serbuk daun kecombrang

5.1 Uji organoleptis. Analisis serbuk daun kecombrang dilakukan Bentuk, warna, dan bau serbuk daun kecombrang diuji secara organoleptis. (Kemenkes RI, 2014).

5.2 Penetapan susut pengeringan serbuk daun kecombrang. *Moisture balance* digunakan untuk mengukur susut pengeringan. 2 gram serbuk daun kecombrang ditimbang dan dimasukkan ke dalam alat pengimbangan air basah pada suhu 105 °C sampai diperoleh berat yang konstan. Hasil ditunjukkan pada monitor dan dicatat bahwa susut pengeringan yang baik tidak lebih dari 10%. (Kemenkes RI, 2014).

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

6. Pembuatan ekstrak daun kecombrang

Serbuk daun kecombrang 600 gram diekstraksi melalui proses maserasi. Larutan penyari etanol 70% dilarutkan dengan serbuk simplisia sebanyak 9 liter dengan perbandingan 1:10. Maserasi selama tiga hari dan diaduk setiap enam jam sekali, kemudian disaring menggunakan kain flanel. Untuk maserasi kedua, filtrat 1 digunakan kembali. Setelah itu, hasil ekstraksi digabungkan. Setelah itu, hasil ekstraksi dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental dengan bobot yang tetap. Kemudian, ekstrak tersebut ditimbang (Kemenkes RI, 2014).

7. Identifikasi ekstrak kental daun kecombrang

7.1 Uji organoleptis. Ekstrak daun kecombrang diidentifikasi secara organoleptis dengan melihat bentuk, warna, dan bau dari ekstrak yang diuji.

7.2 Penetapan kadar air daun kecombrang. Kandungan air pada serbuk daun kecombrang ditentukan memakai 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% (Depkes RI, 2014).

7.3. Uji bebas etanol. Tujuan uji bebas etanol pada ekstrak adalah untuk memastikan bahwa ekstrak tersebut terkonsentrasi tidak mengandung etanol atau senyawa ester. Reaksi dilakukan dengan menambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat terkonsentrasi ke

tabung reaksi yang mengandung ekstrak dan kemudian memanaskan tabung reaksi. Ekstrak apabila tercium bau ester alkohol yang khas dapat disimpulkan bahwasannya ekstrak masih mengandung etanol.

8. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak daun kecombrang

8.1. Flavonoid. Metode pengecekan flavonoid menurut Harbone (1987) adalah dengan melarutkan 0,1 gram ekstrak dalam 10 ml aquades dalam sebuah tabung reaksi. Setelah itu, campuran dipanaskan hingga mendidih, disaring, dan diambil bagian filtratnya. Serbuk Mg dan HCl pekat sebanyak 20 tetes ditambahkan, kemudian amil alkohol sebanyak 20 tetes ditambahkan dan dicampur dengan goyangan kuat. Selanjutnya, tunggu sampai larutan memisah. Adanya flavonoid akan ditandai oleh terbentuknya warna merah, jingga, atau kuning pada lapisan amil alkohol. Warna jingga hingga merah menunjukkan keberadaan flavon, warna merah hingga merah tua menunjukkan flavanol, dan warna merah tua hingga magenta menunjukkan flavanon yang positif (Harbone,1987).

8.2. Tanin. Proses pengecekan tanin dimulai dengan mengambil 0,5 gram ekstrak dan menaruhnya dalam tabung reaksi. Lalu, tambahkan 3 ml aquades, panaskan, saring, dan ambil filtratnya. Pereaksi FeCl_3 1% sebanyak 1-2 tetes ditambahkan ke dalam filtrat, dan perubahan warna diamati. Warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin dalam larutan (Harbone,1987).

8.3. Alkaloid. 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan HCl 2 N sebanyak 1 mililiter, dan aquades 9 mililiter sebelum dipanaskan. Setelah disaring, filtrat dibagi rata ke dalam tiga tabung reaksi, masing-masing ditambahkan pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Wagner. Endapan putih pada pereaksi Mayer menunjukkan hasil positif. Terbentuknya endapan cokelat hingga hitam pada pereaksi wagner, endapan berwarna jingga cokelat pada pereaksi *Dragendorff* (Harbone,1987).

8.4. Saponin. Uji saponin dimulai dengan mengambil 0,5 gram ekstrak yang akan diuji dan menaruhnya dalam tabung reaksi. Lalu, tambahkan 2 ml air panas dan goyangkan kuat selama 10 detik. Jika busa stabil terbentuk dan tidak hilang selama 10 menit pada tinggi antara 1 cm hingga 10 cm, tambahkan 1 tetes HCl 2N. Jika busa tetap ada, maka larutan dianggap mengandung saponin (Harbone,1987)..

8.5. Steroid. Metode Liebermann-Bouchard digunakan untuk menguji steroid dan triterpenoid. Ekstrak dilarutkan dalam kloroform dan kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Bouchard, yaitu asam

asetat anhidrat-H₂SO₄. Perubahan warna steroid menjadi merah kecoklatan dan triterpenoid menjadi coklat-ungu menunjukkan hasil positif (Harbone,1987).

9. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun kecombrang

Pemeriksaan susut pengeringan menggunakan alat *moisture balance*, menimbang dua gram ekstrak etanol daun kecombrang kemudian diletakkan pada plat alumunium dan alat diatur pada suhu 105°C. Tunggu sampai layar menunjukkan penurunan berat sampel. Pengukuran dimulai dengan bobot konstan dan menghasilkan angka dalam persen. (Kemenkes RI, 2014).

10. Formula emulgel

Penetapan formulasi dan ekstrak merujuk pada penelitian dari Handayany *et al*, (2015) dengan menggunakan ekstrak yang optimum yaitu 9%. Formula emulgel terhadap pengobatan luka sayat ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)) ditunjukkan pada tabel di bawah ini :

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

Bahan	Formula %						Fungsi
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
Ekstrak daun kecombrang	9	-	9	-	9	-	Zat aktif
HPMC	2	2	3	3	4	4	Basis Gel
Paraffin cair	5	5	5	5	5	5	Emolien
Span 80	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	Pengemulsi
Tween 80	1,08	1,08	1,08	1,08	1,08	1,08	Pengemulsi
Propilen glikol	10	10	10	10	10	10	Humektan
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	Pengawet
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	Pengawet
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Pelarut

(Erinda, 2022)

Keterangan :

F1 : Emulgel basis HPMC 2 % dengan ekstrak

F2 : Emulgel basis HPMC 2% tanpa ekstrak

F3 : Emulgel basis HPMC 3 % dengan ekstrak

F4 : Emulgel basis HPMC 3% tanpa ekstrak

F5 : Emulgel basis HPMC 4 % dengan ekstrak

F6 : Emulgel basis HPMC 4% tanpa ekstrak

11. Prosedur pembuatan emulgel

Emulgel dibuat sesuai dengan komposisi formula yang tercantum dalam tabel. Semua komponen harus ditimbang dengan hati-hati sebelum dimasukkan ke dalam cawan porselin. Kemudian, fase minyak dipanaskan di dalam *waterbath* dengan mencampurkan parafin cair, span 80, dan nipasol pada suhu 70° Celcius. Selanjutnya, fase air dimasukkan

ke dalam mortir. Dengan batang pengaduk, campurkan tween 80, propylene glycol, nipagin, dan sedikit air. Setelah fase minyak ditambahkan ke fase air pada suhu 70°C, batang pengaduk digunakan untuk mengaduk terus-menerus hingga terbentuk emulsi. Selanjutnya, gel dibuat dengan mendispersikan HPMC sedikit demi sedikit ke dalam air panas pada suhu 80 °C, dan kemudian digerus hingga membentuk basis gel. Emulsi dan gel yang telah terbentuk kemudian dicampurkan dan dihomogenkan dalam kaca beaker hingga terbentuk emulgel.

12. Evaluasi sediaan emulgel

12.1. Uji organoleptik. Uji organoleptik dilakukan dilakukan untuk mengevaluasi aspek fisik sediaan dengan mengamati bentuk, warna, dan bau yang dimiliki oleh sediaan (Sarlina *et al.*, 2017).

12.2. Uji homogenitas. Uji homogenitas dengan mengoleskan 50 mg sediaan pada gelas yang bersih digunakan untuk menguji homogenitas. Selanjutnya, campuran emulgel diusap untuk menguji homogenitasnya. Untuk memastikan bahwa hasilnya konsisten, tes ini diulang tiga kali. (Putra, 2014).

12.3. Uji pH. Uji pH dengan menggunakan pH meter. Elektroda pertama kali dikalibrasi dengan larutan standar yang memiliki pH antara 4 dan 7. Kemudian, elektroda dicelupkan ke dalam sediaan, dan nilai pH ditampilkan di layar pH meter (Sharon *et al.*, 2013).

12.4. Uji viskositas. Viskometer Rion VT-04F digunakan untuk pengujian viskositas dengan spindel yang sesuai dengan konsistensi sediaan. Spindel dicelupkan ke dalam sediaan emulgel, dan setelah jarum skala dimasukkan ke dalam viskometer stabil, viskositas diukur. Untuk setiap formula, tes ini diulang tiga kali (Hurria, 2014).

12.5. Uji daya lekat. Uji daya lekat dilakukan dengan menempatkan 0,5 gram sediaan di atas gelas obyek yang telah diketahui luasnya dan menekannya dengan beban 1 kg selama lima menit. Kemudian, gelas obyek tersebut dipasang pada alat uji dan diberi beban 80 gram. Waktu hingga kedua gelas obyek terpisah dicatat. (Azkia *et al.*, 2017).

12.6. Uji daya sebar. Uji daya sebar dilakukan dengan menggunakan sampel sebanyak 0,5 gram dan ditempatkan di tengah lempeng gelas. Lempeng atas diberi beban bertahap (50 g, 100 g, 150 g, 200 g) dalam interval waktu tertentu. Karakteristik daya sebar dievaluasi melalui luas penyebaran yang dihasilkan dengan peningkatan beban (Hurria, 2014).

12.7. Uji uji tipe emulsi.

12.7.1 Metode pewarnaan. Jenis emulgel O/W diwarnai dengan zat yang larut dalam air, dan jenis emulgel W/O diwarnai dengan pewarna *methylene blue* yang larut dalam minyak. Emulgel dicampur dengan sedikit air dan diaduk, bila terbentuk emulgel yang homogen maka dari jenis emulsi minyak dalam air (O/W).

12.7.2 Metode pengenceran. Emulgel tipe minyak dalam air (M/A) akan terdistribusi secara merata dalam medium air, sedangkan emulgel tipe air dalam minyak (A/M) akan tertinggal pada permukaan air. Pengujian tipe emulsi dilakukan dengan metode pengenceran, di mana satu gram sediaan emulgel ditambahkan ke dalam air suling sebanyak 10 mililiter.

12.7.3 Daya hantar listrik. Emulgel dimasukkan ke dalam *Beaker glass* kemudian dihubungkan dengan elektroda, yang merupakan rangkaian arus listrik. Ketika lampu menyala maka emulgel tipe M/A.

12.8. Uji stabilitas. Pengujian dilakukan dengan metode *cycling test*, yaitu menyimpan gel ke dalam temperatur 4°C dalam kurun waktu 24 jam, kemudian dipindahkan ke dalam 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 (Ramadhani, 2017). Setelah pengujian 6 siklus, kondisi sediaan diamati dengan memeriksa pH dan viskositas apakah stabil atau tidak setelah dilakukan pengujian dengan menggunakan metode *cycling test*.

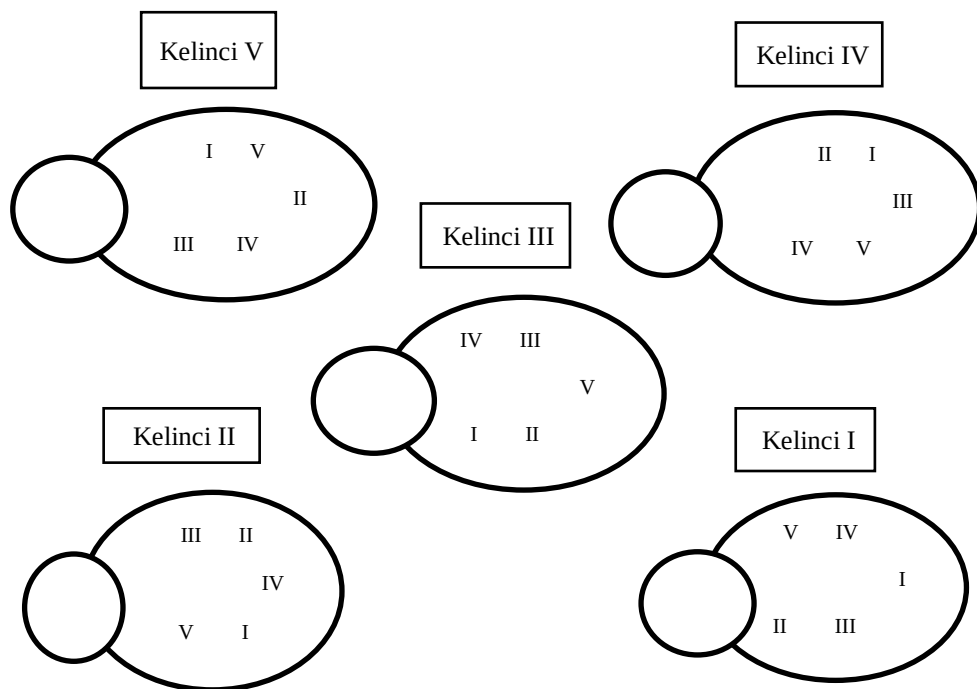
13. Persiapan hewan uji

Kelinci putih *New Zealand* yang diperoleh dari peternakan Abimanyu, Surakarta, 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.

14. Pengelompokan hewan uji

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

- a. Kelompok I : kontrol positif (binasol[®] gel)
- b. Kelompok II : dioleskan emulgel konsentrasi basis HPMC 2% (F1)
- c. Kelompok III : dioleskan emulgel konsentrasi basis HPMC 3% (F2)
- d. Kelompok IV : dioleskan emulgel konsentrasi basis HPMC 4% (F3)
- e. Kelompok V : Kontrol Negatif, dioleskan emulgel tanpa ekstrak



Gambar 6. Model lokasi pelukaan kelinci.

15. Perlakuan hewan uji

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

16. Pengukuran panjang luka sayat

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

17. Parameter penyembuhan luka sayat

Panjang luka diukur dengan mistar. Pengukuran ini dilakukan setiap hari sampai luka dinyatakan sembuh. Luka dianggap sembuh jika diameternya mencapai 0 cm atau jaringan baru telah membungkusnya. Proses penyembuhan luka sayat dilacak melalui fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase remodeling, dan pengukuran panjang luka setiap hari.

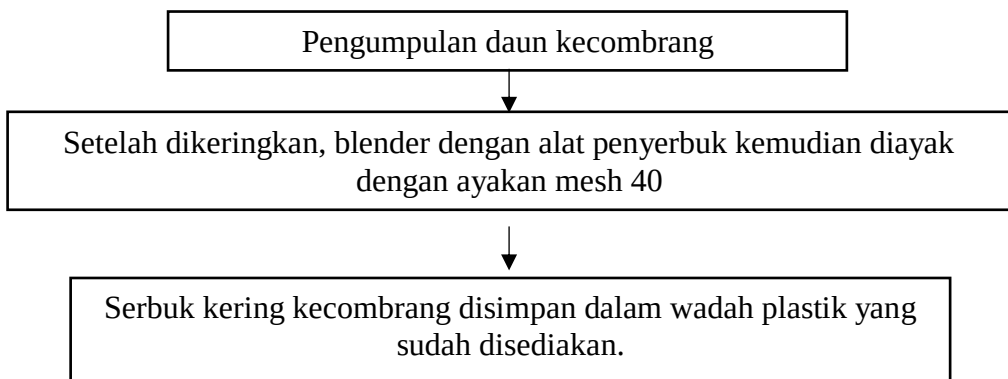
E. Analisis Data

Sediaan emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)) memiliki sifat fisik seperti organoleptik, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan jenis emulgel diuji menggunakan metode uji ulang. Hasil pengujian menunjukkan konsentrasi 2%, 3%, dan 4%. Hasil dari rumusan tersebut digunakan untuk menerapkan pendekatan statistik dengan menggunakan SPSS. *Test T-Paired Sample* untuk mengetahui stabilitas formula dalam penyimpanan.

Hasil uji efek pengobatan luka sayat emulgel ekstrak daun kecombrang (*Etlingera elatior*, Jack) dianalisis secara statistik menggunakan metode *Shapiro Wilk* untuk memastikan normalitas data. Data yang diperoleh memiliki distribusi normal ($\text{sig} > 0,05$), dan analisis dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan *ANOVA (Analysis of Variant)*, yang membandingkan waktu penyembuhan masing-masing kelompok dan luka sayat. Selanjutnya, uji *Post Hoc* dengan uji Tukey digunakan untuk mengetahui konsentrasi yang memiliki Data diuji dengan *Kruskal Wallis* dan *Mann-Whitney* jika tidak normal ($\text{sig} < 0,05$).

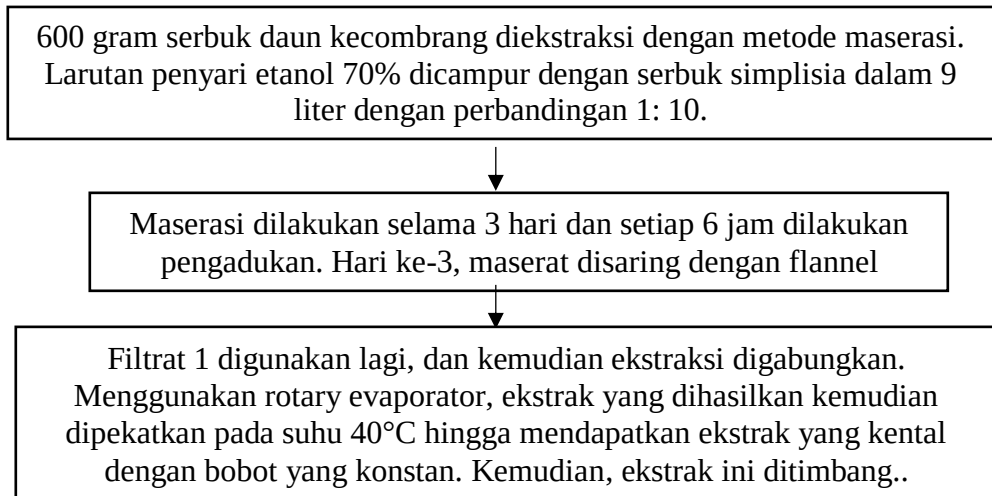
F. Skema Penelitian

1. Skema pembuatan serbuk daun kecombrang



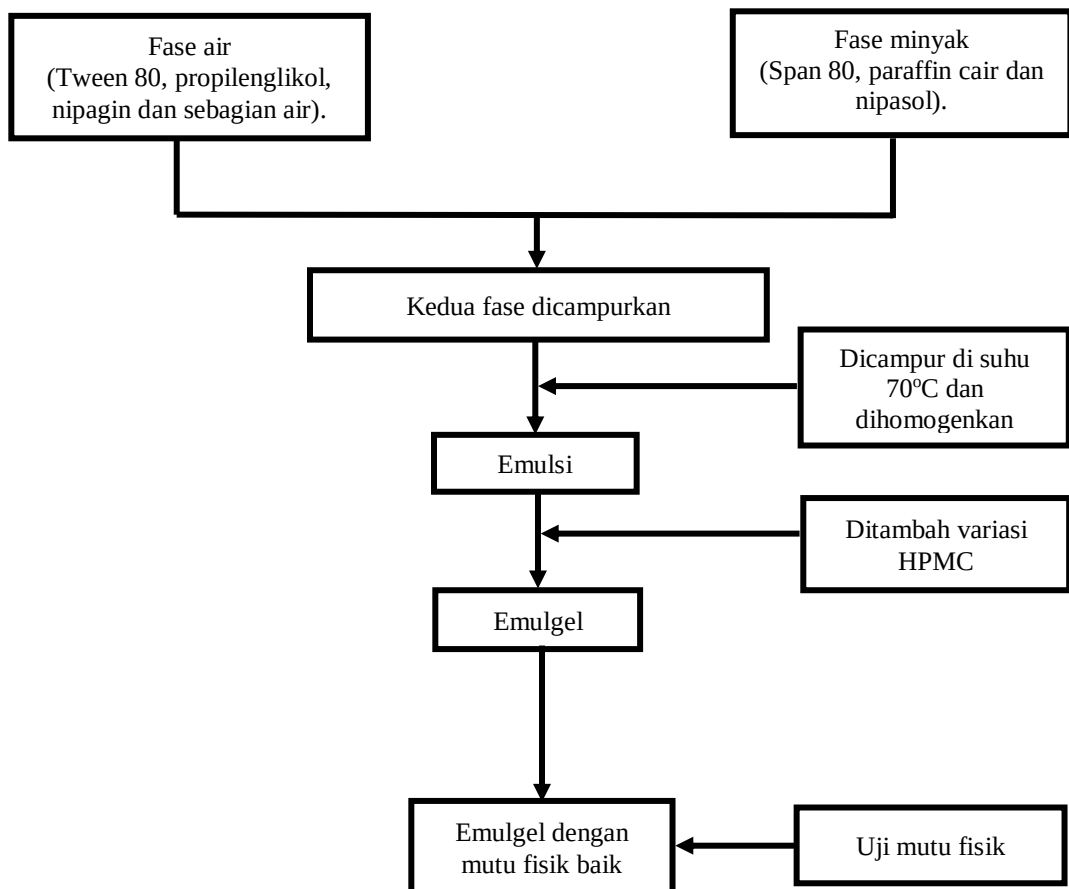
Gambar 7. Skema pembuatan serbuk daun kecombrang

2. Skema pembuatan ekstrak daun kecombrang



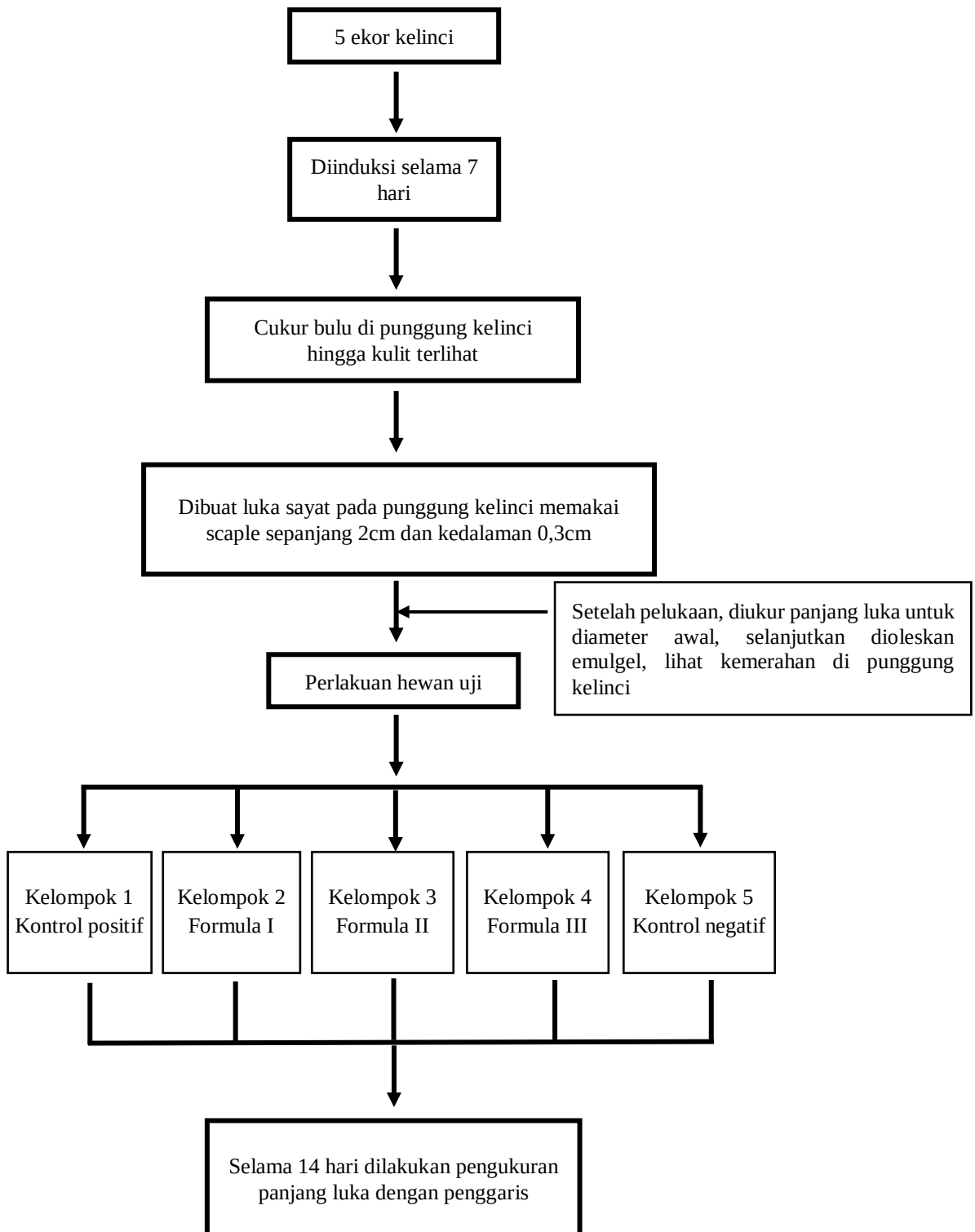
Gambar 8. Skema pembuatan ekstrak daun kecombrang.

3. Skema pembuatan emulgel



Gambar 9. Skema pembuatan ekstrak daun kecombrang

4. Pembuatan uji luka sayat



Gambar 10. Pembuatan uji luka sayat.