

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian yang bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdiri dari kelompok perlakuan kontrol positif octedine gel, kelompok kontrol pembanding basis hidrogel, dan ekstrak etanol daun terubuk konsentrasi 5%, 10% dan 15% dengan melakukan pengujian antiluka pada tikus putih.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Teknologi Bahan Alam, serta Teknologi Sediaan, Universitas Buana Perjuangan Karawang, pada periode April hingga Juni 2024.

3.3 Populasi Sampel

Populasi sampel dari penelitian ini ialah hewan uji coba tikus putih jantan galur wistar yang dikelompokkan secara acak dan sampel yang digunakan di penelitian ini yaitu tumbuhan terubuk (*Saccharum spontaneum var. edulis* (Hassk) K. Schum.) yang dibuat simplisia lalu diekstraksi menggunakan etanol 70%. Tanaman terubuk ini diambil di Kecamatan Tegalwaru Loji Kabupaten Karawang, Provinsi Jawa Barat.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang dipergunakan ialah ekstrak etanol daun terubuk (*Saccharum spontaneum var. edulis* (Hassk) K. Schum.)

2. Variabel Terikat

Variabel terikat yang dipergunakan ialah skrining fitokimia, aktivitas antiluka pada tikus putih jantan galur wistar terhadap ekstrak etanol daun

terubuk (*Saccharum spontaneum var. edulis* (Hassk) K. Schum.)

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Berikut adalah definisi operasional dari variabel-variabel penelitian :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas	Ekstrak etanol daun terubuk adalah ekstrak kental yang terbuat dari tanaman terubuk yang sudah dikeringkan dan menjadi simplisia kemudian diekstraksi menggunakan etanol 70% untuk memperoleh rendemen ekstrak	Observasi	Nominal	%
Variabel Terikat				
Kandungan metabolit sekunder	Skrining fitokimia memerlukan pengujian pada tanaman untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder.	Uji kualitatif dengan memasukan bahan kimia ke setiap percobaan dan di amati adanya perubahan rona dan buih	Nominal	

Uji aktivitas antiluka	Kemampuan ekstrak ditunjukkan dengan pengurangan luka, eritema atau kemerahan, pembengkakan dan luka yang sudah menutup pada tikus putih	Jangka sorong Rasio
-------------------------------	--	--------------------------



3.5 Alat dan Bahan yang Digunakan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang dipergunakan dalam penelitian kali ini yaitu: sarung tangan, penimbang berat badan tikus, kandang tikus, tempat minum tikus, alat cukur, toples, *scapel*, neraca analitik (*adam scientific*), panggang listrik (*gemmyco digital yco-no 1*), botol coklat, loyang, *rotary evaporator* (eyla osb – 2100 – ce), *laminar air flow*, *waterbath* (memmert), *alumunium foil*, kaca arloji, tabung reaksi, corong, spatula, gelas ukur, sudip, cawan, batang pengaduk, *beaker glass*, mortar dan stamper, lampu busen, inkubator, jangka sorong, kaca objek, pH meter, *viscometer*, kalkulator dan wadah hidrogel.

3.5.2 Bahan

Penelitian kali ini menggunakan bahan sebagai berikut, yaitu: ekstrak etanol daun terubuk (*Saccharum spontaneum var. edulis* (Hassk) K. Schum.), tikus putih jantan galur wistar, etanol 70%, serbuk mg, HCl, H₂SO₄, NaOH, CHCl₃, FeCl₃, Vanillin, pereaksi lieberman-burchard, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, gelatin, kalium hidroksida, carbopol 940, HPMC, gliserin, metilparaben, propilparaben, aquadest, ketamine dan octedine gel.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tumbuhan terubuk dilaksanakan di laboratorium Universitas Padjadjaran Bandung-Indonesia untuk diidentifikasi kebenaran identitas tanamannya.

3.6.2 Penyiapan dan Standarisasi Simplisia

Proses penyiapan simplisia tumbuhan terubuk (*Saccharum spontaneum var. edulis* (Hassk) K. Schum) dilakukan menggunakan pengumpulan, sortasi basah, pembersihan, dilakukan perajangan untuk mendapatkan bahan yang bagus dan baik, lalu dilakukan penjemuran di bawah sinar matahari dengan menggunakan kain berwarna hitam, kemudian dilakukan pemilahan daun yang telah kering terhadap benda asing, kemudian dihaluskan, lalu tempatkan pada tempat yang kering.

3.6.3 Ekstraksi

Sampel tanaman dimaserasi dengan etanol 70% selama 24 jam pada suhu ruangan. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi selama 3x24 jam dengan tiga kali pengulangan dan menghasilkan berupa ekstrak cair. Ekstrak cair mengalami proses penguapan menggunakan rotary evaporator untuk menghilangkan pelarut etanol (Kurniasih, 2015).

3.6.4 Skirining Fitokimia

Skrining fitokimia dilaksanakan yaitu bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak daun terubuk. Berikut langkah-langkah skrining fitokimia.

1. Alkaloid

Tuangkan amonia encer pada ekstrak, kemudian digerus pada mortir, tuangkan beberapa ml CHCl₃ sambil terus digerus setelah itu disaring. Filtrat ditambahkan lima ml HCL 2N. Lapisan asam dipisahkan selanjutnya bagi menjadi 3 gram. Tabung pertama, diisi dengan asam encer sebagai Kontrol.

Tabung kedua ditambahkan dengan reagen dragendorff hingga 3 tetes dan yang terakhir tabung ketiga ditambahkan reagen mayer hingga 3 tetes. Jika di tabung kedua terdapat endapan berwarna jingga serta di tabung ketiga terdapat endapan berwarna putih, maka dapat disimpulkan hasil uji positif terhadap keberadaan alkaloid (Abriyani et al., 2021).

2. Flavonoid

Masukkan 1 mililiter ekstrak daun terubuk. Tambahkan sedikit bubuk magnesium dan teteskan 10 tetes asam klorida pekat secara perlahan sambil dikocok serta amati perubahan warna yang akan terjadi. Munculnya warna merah kehitaman, kuning, atau jingga dapat disimpulkan adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak (Abriyani et al., 2022).

3. Tanin

Isi tabung reaksi dengan ekstrak sebanyak 3 mililiter lalu tambahkan larutan gelatin 1% sebanyak 5 tetes. Terbentuknya endapan putih mengindikasikan adanya senyawa tanin dalam sampel (Abriyani et al., 2021).

4. Fenolik

Isi tabung reaksi dengan 1 mililiter ekstrak dan tambahkan 10 tetes larutan FeCl_3 1%. Jika terjadi warna merah, biru, ungu, hitam atau hijau menunjukkan hasil yang positif (Abriyani et al., 2022).

5. Kuinon

Timbang Ekstrak bubuk pelepas daun seberat 1 gram serta tambahkan 20 mililiter kemudian lakukan penyaringan, masukan ke dalam tabung reaksi, lalu digabungkan menggunakan larutan KOH 5%. Bila warna kuning sampai merah membagikan yang akan terjadi yang didapatkan positif (Endah, 2017)

6. Saponin

Larutkan ekstrak dengan air mendidih selama 15 menit, kemudian dikocok selama 15 atau 10 detik. Terbentuknya buih selama kurang lebih 10 menit yang tidak akan hilang setelah ditambahkan HCL 2N, maka sampel mengindikasikan adanya senyawa saponin. (Abriyani et al., 2022).

7. Monoterpenoid dan Sesquiterpenoid

Larutkan sampel dengan eter lalu digerus kemudian dilakukan penyaringan, selanjutnya dilakukan penguapan hingga kering, lalu teteskan vanilin 10% pada H₂SO₄ pekat. Perubahan warna yang terjadi diamati untuk mengindikasikan adanya senyawa tertentu (Endah, 2017).

8. Triterpenoid dan Steroid

Larutkan sampel dengan eter lalu digerus kemudian dilakukan penyaringan, kemudian dilakukan penguapan hingga kering, lalu diteteskan dengan reaksi lieberman-burchard. Apabila hasil uji mengalami perubahan warna menjadi ungu, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa dalam sampel terdapat senyawa triterpenoid. Sementara itu, jika hasil uji mengalami perubahan warna menjadi biru kehijauan, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa dalam sampel terdapat senyawa steroid (Abriyani *et al.*, 2021).

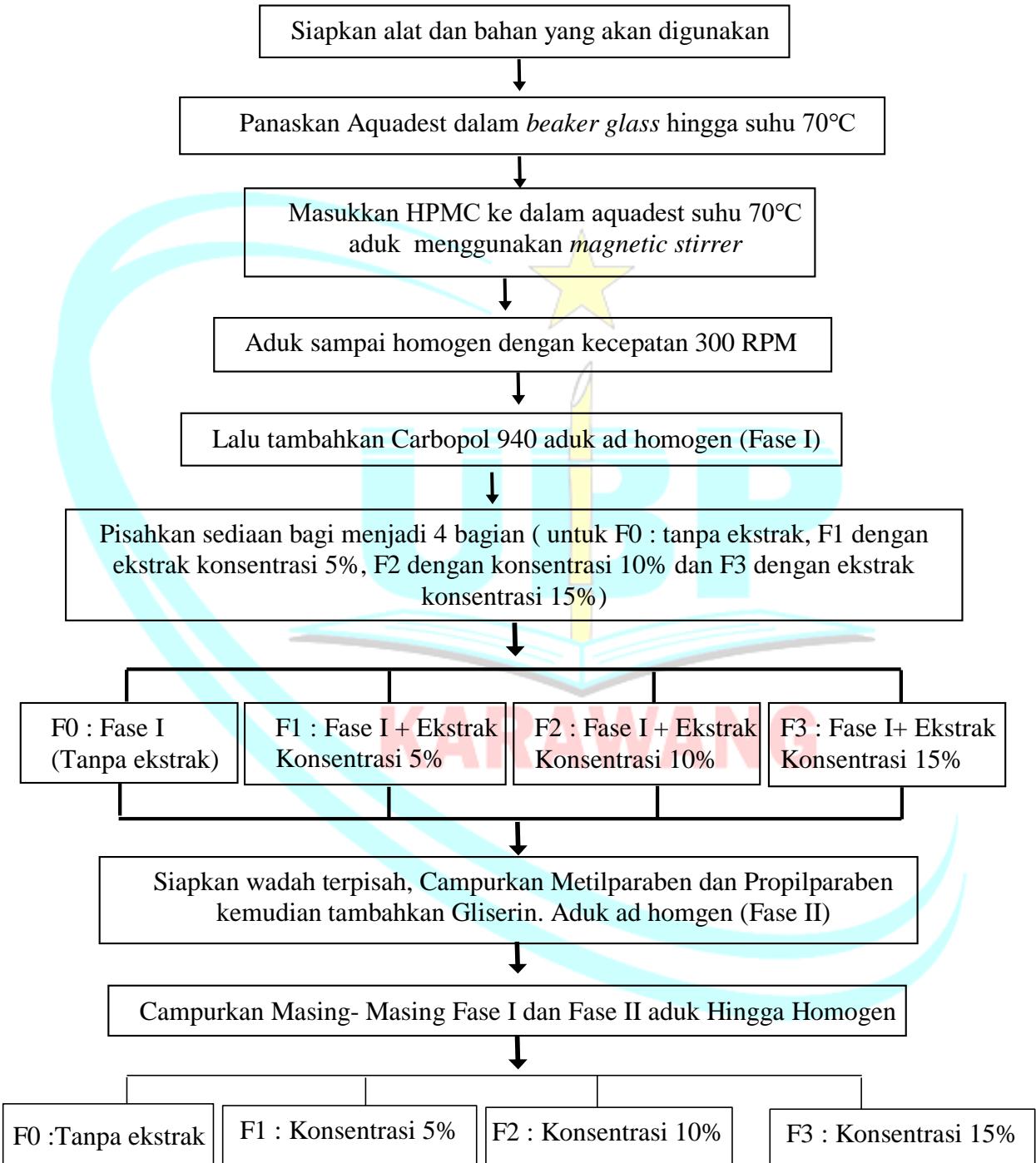
3.7 Formulasi Sediaan Hidrogel Ekstrak Tanaman Terubuk

Pada penelitian ini dibuat formulasi sediaan hidrogel dengan variasi perbandingan konsentrasi yang berbeda. Berikut komposisi formula hidrogel.

Tabel 3.2 Formulasi Sediaan Hidrogel (Yuniarsih *et al.*, 2023)

Nama bahan	Fungsi	Konsentrasi %				
		Kontrol (-)	Kontrol (+)	F1 (%)	F2(%)	F3 (%)
Ekstrak etanol daun terubuk	Zat Aktif	-		5	10	15
HPMC	Basis	0,25	<i>Octedine</i>	0,25	0,25	0,25
Carbopol 940	Basis	0,25	<i>Hydrochlo</i>	0,25	0,25	0,25
Gliserin	Humektan	5	<i>ride</i>	5	5	5
Propilparaben	Pengawet	0,02		0,02	0,02	0,02
Metilparaben	Pengawet	0,18		0,18	0,18	0,18
Aquadest	Pelarut	ad 100		ad 100	ad 100	ad 100

3.8 Prosedur Pembuatan Hidrogel



Gambar 3.1 Prosedur Pembuatan Hidrogel

3.9 Evaluasi Sediaan Hidrogel

3.9.1 Organoleptik

Uji organoleptik meliputi pengamatan warna, bentuk dan bau dari sediaan, hasil yang diperoleh kemudian dicatat (Harliatika, 2021).

3.9.2 Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas yaitu Sediaan Hidrogel diuji dengan secara visual serta pengulangan sebanyak tiga kali perlakuan. Pengujian homogenitas dilakukan menggunakan mengoleskan tiga bagian terhadap kaca transparan lalu ditutup kembali menggunakan kaca objek, kemudian diamati keberadaan agregat serta kejernihan pada sedian hidrogel (Harliatika, 2021).

3.9.3 Uji pH

Lakukan pengukuran pH kemudian masukan kedalam sediaan hidrogel. alat ukur pH yang telah pakai sebelumnya harus dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan standar. Tujuan dari Analisis pH yaitu untuk mengetahui pH sediaan yang akan diubah sesuai menggunakan pH fisiologi kulit, yaitu 4,5 sampai dengan 6,5. dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan serta hitung rata-ratanya (Harliatika, 2021).

$$pH = \frac{pH1 + pH2 + pH3}{3}$$

3.9.4 Uji Viskositas

Viskometer dengan spindle nomor 4 digunakan untuk pengukuran viskositas serta untuk menentukan nilai viskositas dari setiap formula sediaan. Lakukan peningkatan kecepatan dari 12 rpm (*revolutions per minute*), lalu 30 rpm sampai 60 rpm serta yang akan terjadi pengujian viskositasnya kemudian catat dalam satuan mPa.s (milipascal-secon). Pengujian ini dilaksanakan dengan tiga kali pengulangan serta dihitung rata-ratanya (Harliatika, 2021).

$$Viskositas (\eta) = \frac{\eta_1 + \eta_2 + \eta_3}{3}$$

3.9.5 Uji Daya Sebar

Pengujian Daya sebar dilakukan dengan dua lempeng kaca, satu lempeng kaca untuk alas untuk memudahkan pengamatan dan pengukuran serta satu lempeng lagi digunakan sebagai penutup. Pengukuran daya sebar hidrogel dilakukan dengan cara meletakkan 1 gram hidrogel di tengah-tengah kaca. Tutup hidrogel dengan kaca penutup dan pemberat dengan total keseluruhan bobot 125 gram selama 1 menit, dihitung diameter luas sebaran. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan (Harliatika, 2021).

$$Daya Sebar = \frac{\text{diameter } 1 + \text{diameter } 2 + \text{diameter } 3}{3}$$

3.9.6 Uji Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan cara timbang 0,5 gram sediaan hidrogel kemudian letakkan pada bagian atas kaca objek, lalu tutup kembali menggunakan kaca yang lain. Kemudian kaca objek diberikan beban seberat 1 kilogram selama 5 mnt. Lalu kaca objek yang berhimpitan dipasangkan kepada alat pengujian daya lekat serta secara bersamaan diberikan beban seberat 80 gram pada alat pengujian daya lekat, catat ketika waktu lekatan terlepas menggunakan menurunkan beban 80 gram, pengujian dilaksanakan dengan tiga kali pengulangan (Harliatika, 2021).

$$Daya lekat = \frac{\text{waktu } 1 + \text{waktu } 2 + \text{waktu } 3}{3}$$

3.10 Pengujian Efektivitas Antiluka Pada Tikus Putih

Dalam pengujian ini menggunakan hewan percobaan tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan glur wistar berumur 2 hingga 3 bulan dengan berat 200–300 gram. Tikus yang akan di uji dalam penelitian ini berjumlah 20 tikus yang dikelompokkan kedalam 5 kelompok, dengan tiap kelompok berjumlah 4 tikus. Pembagian kelompok perlakuan menjadi berikut :

1. K (+) : diberikan octedine gel
2. K (-) : diberikan basis sediaan hidrogel
3. P1 : diberikan sediaan hidrogel konsentrasi 5% ekstrak etanol daun terubuk
4. P2 : diberikan sediaan hidrogel konsentrasi 10% ekstrak etanol daun terubuk
5. P3 : diberikan sediaan hidrogel konsentrasi 15% ekstrak etanol daun terubuk

Pembuatan luka pada tikus dengan cara dianastesi menggunakan ketamine di bagian sebelah punggung, kemudian cukur seluas 3 cm x 2,5 cm hingga licin lalu bersihkan menggunakan etanol 96% serta diberi pertanda 2 cm dibagian yang akan dilukai. Bagian yang diberi pertanda disayat dengan scapel steril menggunakan panjang dua cm (Yunanda et al., 2016). Pengamatan secara visual dilakukan dengan fokus pada perubahan panjang luka di hari ke 1 hingga ke 14. Jangka sorong digunakan untuk mengukur panjang luka hewan uji.

Rumus dari pengukuran panjang luka sayat setelah pemberian perlakuan dinyatakan dx (cm):

$$P\% = \frac{d_0 - dx}{d_0} \times 100\%$$

P : Persentase penyembuhan luka

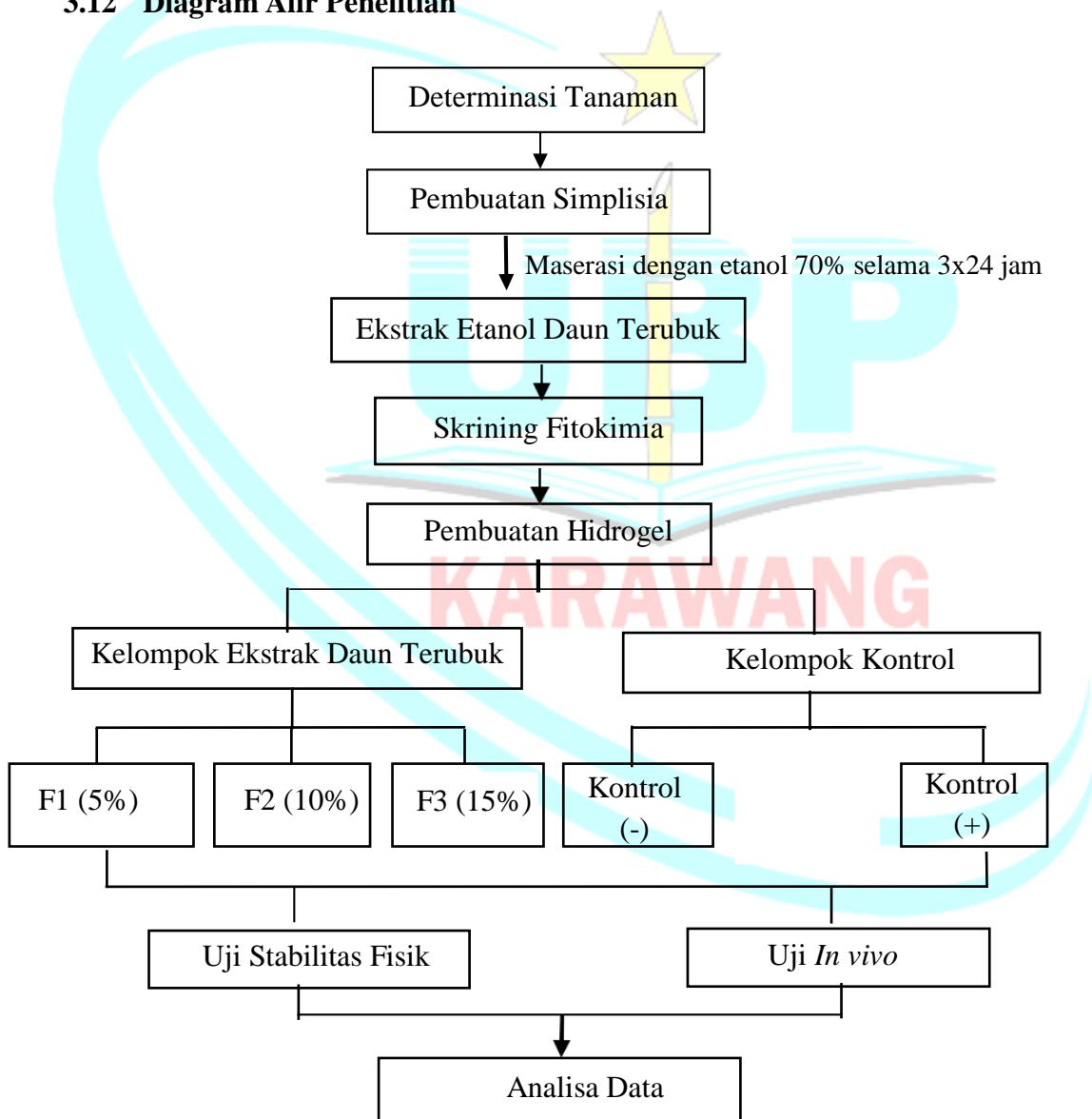
d₀ : Panjang awal luka sayat

d_x : Panjang luka sayat setelah perlakuan

3.11 Analisis Data

Hasil penelitian ini tersaji dalam bentuk rata-rata \pm SEM dengan $p<0,05$ dianggap berbeda signifikan. Untuk analisis statistika dilakukan dengan uji *Analysis Of Variance* (ANOVA) menggunakan Graphpad Prism Versi 10 dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD Post Hoc.

3.12 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.2 DiagramAlir Penelitian

