

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode eksperimental di laboratorium dengan melakukan uji stabilitas dipercepat terhadap sediaan hidrogel fraksi etil asetat dari lidah mertua untuk pengobatan luka insisi. Pengamatan dilakukan selama 6 siklus guna menilai perubahan fisik yang terjadi pada sediaan tersebut. (Suryani *et al.*, 2019).

3.2 Populasi

Penelitian ini menggunakan sebanyak 25 ekor tikus putih galur *Sprague Dawley* berumur $\pm 2-3$ bulan dengan berat badan berkisar antara 150–200 gram (Anggraeni *et al.*, 2020). Tikus-tikus tersebut dibagi ke dalam lima kelompok perlakuan, masing-masing terdiri dari lima ekor ($n = 5$). Sebagai bahan uji, digunakan daun lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* Prain) yang didapatkan dari BALITRO.

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Berikut adalah bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya fraksi lidah mertua, dan bahan tambahan yang digunakan yaitu Fraksi Lidah Mertua, Karbopol 940, HPMC, TEA, Gliserin, Propilparaben, Metilparaben, Aquadestilata, Octadine gel dan Salep Lidocain.

3.3.2 Alat

Berikut ini adalah alat yang digunakan dalam penelitian diantaranya timbangan analitik (Shidmadzu), gelas ukur (Pyrex) 10 ml, 50 ml; 100 ml, beaker glass (Iwaki) 50 ml, 100 ml, Cawan porselen (mortir dan stamper (Onemed), pH meter (YY-013 series), viscometer *brokfield* (LRLamy Rheology Instrument), *climatic chamber* (nuve), alat uji daya lekat, alat uji daya sebar, *biopsy punch* dan jangka sorong.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

3.4.1 Tempat Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.4.2 Waktu Penelitian

Waktu Penelitian dimulai pada bulan Februari s/d Maret 2025.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini yaitu tiga formulasi dengan konsentrasi 6,25%, 12,5% b/b, dan 25%.

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu pengujian organoleptik, pH, daya sebar, homogenitas, daya lekat, uji viskositas, uji FTIR, uji *cycling test* dan uji efek penyembuhan luka.

3.6 Definisi Operational Variabel

Berikut adalah tabel definisi operational variabel yang terdapat pada penelitian ini, yaitu :

Tabel 3.1 Definisi Operational Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil
Variabel Bebas					
1.	Formulasi sediaan hidrogel fraksi etil asetat daun lidah mertua	Formulasi sediaan hidrogel fraksi etil asetat daun lidah mertua dengan variasi konsentrasi 0% b/b; 6,25%,	Uji organoleptik, uji pH, uji daya lekat, uji daya sebar, uji	Nominal	FO : 0 F1 : 6,25% b/b F2 : 12,5% b/b F3: 25% b/b K (+) : Octadine gel K (-) : Tanpa fraksi

		12,5% b/b, dan 25%.	homoge nitas, uji viskosi atas, uji FTIR dan uji <i>cycling test</i> .	
Variabel Terikat				
1.	Pengujian Organoleptik			
	Warna	Pengujian meliputi warna, bau dan bentuk	Panca indera	Rasio
	Bau			1. Warna hijau 2. Warna hijau pekat 3. Tidak berwarna
	Bentuk			1. Bau lemah 2. Bau khas 3. Tidak berbau
				1. Halus 2. Tidak halus
2.	Skrining Fitokimia	Pengujian meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, fenol,	Tabung reaksi	Rasio
				Warna yang dihasilkan

		triterpenoid dan steroid			
3.	Uji Homogenitas	Dilakukan dengan mengoleskan sampel pada objek glaas dikatupkan cover glass untuk diamati homogenitas	Kaca objek	Rasio	1. Homogen 2. Tidak homogen
4.	Uji pH	Nilai pada pH sampel ditunjukkan sesuai dengan pH kulit oleh pH meter	pH meter	Rasio	Angka dalam pH meter 4.5-6.5 (Taurina <i>et al.</i> , 2018).
5.	Uji Viskositas	Menggunakan alat viscometer	Alat viscometer <i>brokfiel d</i>	Rasio	2000-4000 cP (Ardana <i>et al.</i> , 2015).
6.	Uji daya lekat	Dilakukan menggunakan kaca objek dan dihitung waktunya	Kaca objek	Rasio	2,00-300 detik (Harliantika dan Noval, 2021).
7.	Uji daya sebar	Dilakukan dengan lempeng kaca	Lempe ng kaca	Rasio	5-7 cm (Edy <i>et al.</i> , 2016).

		dan diberikan beban			
8.	Uji stabilitas penyimpanan	Menngamati kemampuan sediaan hidrogel dalam ketahanan penyimpanan menggunakan metode <i>cycling test</i>	<i>climatic chamber</i>	Nominal	1. Stabil 2. Tidak stabil
9.	Uji FTIR	Mendeteksi gugus fungsi, mengidentifikasi senyawa dan sampel yang dianalisis	Spektrofotometer IR	Nominal	Gugus fungsi senyawa

3.7 Formulasi Hidrogel

Formulasi hidrogel dalam penelitian ini didasarkan pada studi sebelumnya (Yuniarsih *et al.*, 2023; Nadhifah, 2022) yang menunjukkan efektivitas fraksi lidah mertua dalam penyembuhan luka insisi. Kebaruan dalam penelitian ini terletak pada penggunaan fraksi etil asetat lidah mertua untuk memperoleh senyawa bioaktif yang lebih spesifik dan berpotensi tinggi dalam proses penyembuhan luka. Adapun formulasi yang digunakan adalah sebagai berikut:

Tabel 3.2 Formulasi Hidrogel Fraksi Etil Asetat Lidah Mertua

Nama Bahan	Fungsi	Konsentrasi gram (b/b)			Kontrol (-)	Kontrol (+)
		F1	F2	F3		
Fraksi lidah mertua	Zat aktif	6,25	12,5	25	-	Octadine gel
Karbopol 940	Agen pengental	0,25	0,25	0,25	0,25	

HPMC	Agen pembentuk gel	0,25	0,25	0,25	0,25
TEA	Penstabil gel	0,5	0,5	0,5	0,5
Gliserin	Emolient	5	5	5	5
Propilparaben	Pengawet	0,02	0,02	0,02	0,02
Metilparaben	Pengawet	0,18	0,18	0,18	0,18
Aquadestilata	Pelarut	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Determinasi Tanaman

Identifikasi tanaman dilakukan melalui proses determinasi di Departemen Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Sumedang. Tujuan dari proses ini adalah untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian telah teridentifikasi dengan benar, sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengambilan dan penggunaan bahan tanaman (Sawiji *et al.*, 2020).

3.8.2 Pembuatan Simplisia

Sampel yang digunakan adalah daun lidah mertua segar berwarna hijau tua. Daun dicuci menggunakan air mengalir kemudian keringkan di tempat teduh, jauh dari paparan sinar matahari langsung. Setelah proses pengeringan, daun digiling hingga menjadi serbuk simplisia dan disimpan dalam wadah tertutup yang terlindung dari cahaya (Barrus, 2021).

3.8.3 Ekstraksi

Ekstraksi daun lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* Prain) dilakukan menggunakan metode maserasi, yakni teknik ekstraksi senyawa aktif dengan cara merendam bahan tumbuhan dalam pelarut organik pada suhu tertentu. Metode ini dipilih karena prosedurnya yang mudah, efisien, serta biaya operasional yang relatif rendah (Karina *et al.*, 2016). Daun yang telah dikeringkan dimasukkan ke dalam wadah maserasi, lalu direndam dalam etanol 96% selama 3 hari (3×24 jam), dengan pengadukan secara berkala. Setelah proses perendaman, larutan disaring menggunakan kertas saring yang dipasang

pada corong, dan hasil saringannya dikumpulkan dalam gelas kimia. Selanjutnya, cairan ekstrak diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu tidak lebih dari 60°C untuk memperoleh ekstrak kental daun lidah mertua (Ervianingsih *et al.*, 2020). Setelah itu, ekstrak dikeringkan, ditimbang, dan rendemennya dihitung menggunakan rumus berikut : Data rendeman diperoleh dengan perhitungan berikut:

$$\% \text{ Rendeman} = \frac{\text{Jumlah berat ekstrak kental (g)}}{\text{Jumlah berat simplisia (g)}} \times 100\%$$

3.8.4 Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair (ECC) secara bertahap menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan air. Sebanyak 5 gram ekstrak kental daun lidah mertua dilarutkan dalam sedikit aquades, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah bersama 100 mL aquades dan 100 mL pelarut n-heksana. Campuran dikocok dan proses pemisahan dilakukan sebanyak tiga kali hingga lapisan fraksi n-heksana menjadi jernih. Setelah terbentuk dua lapisan, yaitu fraksi n-heksana dan fraksi air, fraksi air diambil kembali dan ditambahkan pelarut etil asetat sebanyak 100 mL. Proses pemisahan ini juga dilakukan sebanyak tiga kali. Fraksi etil asetat yang diperoleh kemudian dipisahkan dan diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh fraksi etil asetat yang kental dari daun lidah mertua. (Nikola *et al.*, 2021).

3.8.5 Skrining Fitokimia

1. Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram fraksi dicampurkan dengan 5 mL HCl 2N dan 9 mL aquades, lalu campuran tersebut dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit. Setelah itu, larutan didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil sebanyak 3 tetes dan dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi yang berbeda (Aprilia *et al.*, 2017).

- a. Pada tabung reaksi pertama, ditambahkan larutan pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan putih atau kuning, hal tersebut mengindikasikan keberadaan senyawa alkaloid.

- b. Pada tabung reaksi kedua ditambahkan larutan pereaksi Dragendorff sebanyak 2 tetes. Munculnya endapan berwarna kuning jingga menandakan adanya kandungan alkaloid.

2. Flavonoid

Sebanyak 0,5 g fraksi lidah mertua dilarutkan dalam 5 ml aquadest, kemudian dipanaskan dan disaring. Filtrat yang dihasilkan kemudian dicampurkan dengan 0,1 g serbuk Mg, 1 ml HCl pekat, dan 2 ml amil alkohol. Campuran tersebut dikocok dan dibiarkan terpisah. Keberadaan flavonoid dapat ditandai dengan munculnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Barrus, 2021).

3. Tanin

Sebanyak 0,5 g fraksi lidah mertua ditambahkan 3-4 tetes larutan FeCl_3 1%. Jika terbentuk warna coklat kehijauan atau ungu kehitaman, maka hasilnya positif mengandung tanin (Barrus, 2021).

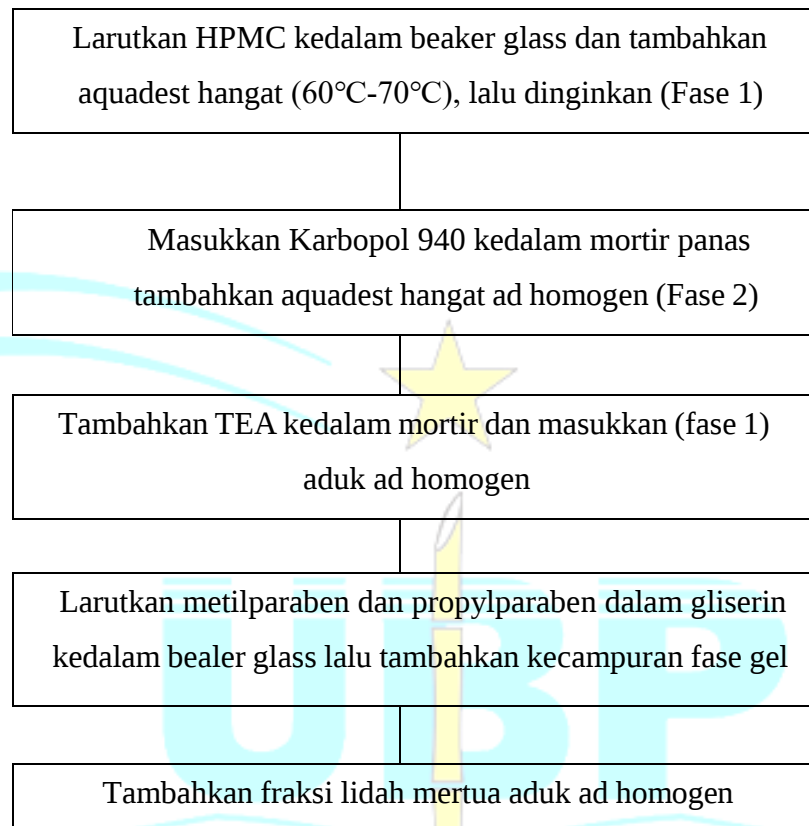
4. Saponin

Sebanyak 0,5 g fraksi lidah mertua dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml air panas. Setelah campuran tersebut didinginkan, dikocok dengan kuat selama minimal 10 menit hingga terbentuk buih setinggi 1-10 cm (Barrus, 2021).

5. Triterpenoid dan steroid

Uji untuk senyawa triterpenoid dan steroid dilakukan dengan menambahkan pereaksi Liebermann-Burchard ke dalam fraksi etil asetat lidah mertua. Jika terbentuk warna ungu yang kemudian berubah menjadi biru, ini menunjukkan adanya senyawa golongan triterpenoid. Sementara itu, jika terbentuk warna merah yang akhirnya berubah menjadi hijau, maka itu menandakan keberadaan senyawa golongan steroid (Firdaus, 2022).

3.8.6 Prosedur Pembuatan Hidrogel Untuk Luka Insisi



Gambar 3.1 Prosedur Pembuatan Hidrogel Fraksi Etil Asetat Lidah Mertua

3.8.7 Uji Evaluasi Fisik

1. Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik bertujuan untuk mendeskripsikan karakteristik suatu sediaan, termasuk warna, aroma, serta bentuk atau konsistensinya (Nikola *et al.*, 2021). Proses pengujian dilakukan dengan cara mengamati warna, bentuk, dan aroma dari sediaan, lalu mencatat hasil pengamatan tersebut (Harliantika dan Noval, 2021).

2. Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas bertujuan untuk memastikan bahwa hidrogel fraksi etil asetat dari lidah mertua memiliki tingkat kehomogenan yang baik. Sediaan hidrogel yang ideal harus memiliki tekstur yang homogen dan bebas dari gumpalan atau partikel yang tidak larut (Nikola *et al.*, 2021). Pengujian dilakukan dengan cara mengoleskan hidrogel dari sampel

berbeda, kemudian ditempatkan di atas kaca transparan untuk mengevaluasi kejernihan serta mendeteksi adanya agregat dalam sediaan (Harliantika dan Noval, 2021).

3. Uji pH

Pengujian pH dilakukan bertujuan untuk memastikan bahwa hidrogel yang dihasilkan aman digunakan dan tidak menyebabkan iritasi pada kulit (Nikola *et al.*, 2021). Pengukuran pH dilakukan dengan mencelupkan pH meter ke dalam sampel uji. Sebelum digunakan, pH meter telah dikalibrasi menggunakan larutan standar dan pengukuran PH dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Harliantika dan Noval, 2021; Taurina *et al.*, 2018). Syarat pH yang baik 4.5-6.5 (Taurina *et al.*, 2018).

4. Uji Viskositas

Pengujian viskositas hidrogel bertujuan untuk mengukur tingkat kekentalan hidrogel yang dihasilkan (Nikola *et al.*, 2021). Viskositas setiap formula diukur menggunakan viskometer Stormer dengan spindle nomor 4 pada kecepatan 60 rpm. Uji viskositas dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan, kemudian dihitung nilai rata-ratanya (Harliantika dan Noval, 2021). Syarat viskositas yang baik untuk sediaan hidrogel umumnya berada dalam rentang 2000-4000 cPois (Ardana *et al.*, 2015).

5. Uji Daya Sebar

Pengujian daya sebar bertujuan untuk mengetahui seberapa mudah basis hidrogel dapat tersebar saat dioleskan pada kulit, sehingga memastikan kenyamanan penggunaan sediaan (Nikola *et al.*, 2021). Daya sebar diukur dengan menempatkan 1 g hidrogel di tengah lempeng kaca, ditutup dengan kaca penutup, lalu diberi beban 125 g selama 1 menit. Diameter sebaran dihitung menggunakan milimeter blok, dengan pengukuran dilakukan tiga kali (Harliantika dan Noval, 2021). Rentang daya sebar standar formulasi hidrogel yang baik antara 5-7 cm (Edy *et al.*, 2016).

6. Uji Daya Lekat

Pengujian daya lekat bertujuan untuk mengukur lamanya waktu sediaan hidrogel menempel pada kulit, yang menunjukkan seberapa baik sediaan tersebut melekat (Sandala *et al.*, 2024). Uji daya lekat dilakukan dengan menempatkan 0,5 g hidrogel di antara dua kaca objek, ditindih beban 1 kg selama 5 menit. Dengan beban 80 g, waktu lepas dicatat, dan pengujian diulang tiga kali. Persyaratan daya lekat yang baik, yaitu berada dalam rentang 2,00-300,00 detik (Harliantika dan Noval, 2021).

7. Uji FTIR

Uji FTIR (*Fourier Transform Infrared*) bertujuan untuk menganalisis interaksi kimia dalam suatu sediaan melalui spektrum inframerah yang dihasilkan. Teknik ini menggunakan kristal ZnSe sebagai media penghantar sampel, dengan jangkauan spektrum antara 400–3900 cm^{-1} , yang mencakup wilayah getaran khas berbagai gugus fungsi. Spektrum FTIR dapat mengidentifikasi gugus fungsi tertentu, seperti gugus —OH (3600–2500 cm^{-1}), C=O (sekitar 1700 cm^{-1}), dan ikatan C—C aromatik (1617, 1540, dan 1450 cm^{-1}), seperti terlihat pada asam galat. Metode ini efektif untuk mendeteksi adanya interaksi antar komponen dalam matriks kompleks, seperti hidrogel (Nurfitriyana *et al.*, 2022; Sanjiwani *et al.*, 2020; Sulistiyani, 2018; Khaskheli *et al.*, 2016).

8. Uji Stabilitas Penyimpan

Pengujian *Cycling test* atau uji stabilitas yang dipercepat bertujuan untuk mempercepat perubahan yang biasanya terjadi pada kondisi normal, sehingga memungkinkan evaluasi cepat terhadap kestabilan sediaan dalam berbagai kondisi penyimpanan (Aqsyal dan Mardiyanti, 2023). Metode *cycling test* digunakan untuk mengevaluasi stabilitas sediaan dengan cara menyimpan setiap formula pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian pada suhu 40°C selama 24 jam menggunakan *climatic chamber*. Proses ini dihitung sebagai satu siklus, dan pengujian dilakukan sebanyak enam siklus untuk mengamati adanya perubahan pada sediaan (Suryani, 2019). Parameter yang diamati selama pengujian meliputi organoleptik, pH,

viskositas, daya sebar, dan daya lekat. Hasil uji *cycling test* yang baik menunjukkan bahwa sediaan stabil dan tidak mengalami perubahan signifikan selama proses penyimpanan dengan suhu yang berbeda. (Harliantika dan Noval, 2021).

3.8.8 Uji Efek Penyembuhan Luka Hidrogel Fraksi Lidah Mertua

1. Pengajuan Etik

Pengajuan protokol kode etik hewan uji tikus putih jantan yang digunakan akan dilakukan di Komisi Etik Penelitian Kesehatan Institut Kesehatan Imanuel (IKI) Bandung.

2. Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur *sprague dawley* berusia 2-3 bulan dengan berat badan berkisar antara 150-250 gram. Populasi hewan dipastikan dalam keadaan sehat dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuhnya, sebelum digunakan tikus dikarantina selama 7 hari untuk proses adaptasi (Kresnamurti *et al.*, 2021).

3. Pengujian Terhadap Hewan Uji

Tikus dipilih berdasarkan kriteria tertentu seperti usia, jenis kelamin, dan kondisi kesehatan untuk memastikan akurasi hasil penelitian. Bulu pada bagian punggung dicukur dan area luka ditandai. Pembuatan model luka sayatan dimulai dengan anestesi lokal menggunakan krim lidocaine. Kemudian, luka sayatan sepanjang 1 cm dibuat pada punggung tikus dengan kedalaman mencapai otot sejajar tulang belakang, berjarak 5 cm dari telinga, menggunakan *biopsy punch* (Yuniarsih *et al.*, 2023). Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus, jumlah ini dihitung berdasarkan rumus Federer untuk menentukan ukuran sampel yang tepat (Gias, 2024). Rumus Federer = $(n-1)(t-1) \geq 15$

Keterangan : n = Besar sampel setiap kelompok

t = Jumlah kelompok

Menurut rumus Federer, banyaknya sampel yang diperlukan

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1) \cdot 4 \geq 15$$

$$n-1 = \frac{15}{4}$$

$$n-1 \geq 3,75$$

$$n = 3,75 + 1$$

$$n = 4,75 \text{ (dibulatkan)}$$

$$n \geq 5$$

Perhitungan menggunakan rumus Federer menghasilkan jumlah 5 ekor hewan uji per kelompok. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan digunakan 5 ekor hewan uji untuk masing-masing kelompok. Hal ini dilakukan untuk memudahkan analisis data, dengan total jumlah sampel yang diperlukan sebanyak 25 ekor tikus galur *Sprague Dawley*. Sebanyak 25 ekor tikus tersebut akan dibagi ke dalam beberapa kelompok perlakuan dengan pembagian sebagai berikut:

Kelompok 1 : Luka diolesi hidrogel dengan fraksi daun lidah mertua 6,25%.

Kelompok 2 : Luka diolesi hidrogel dengan fraksi daun lidah mertua 12,5%.

Kelompok 3 : Luka diolesi hidrogel dengan fraksi daun lidah mertua 25%.

Kelompok 4 : Luka diolesi dengan kontrol positif berupa *Octadine* gel sebagai kontrol positif.

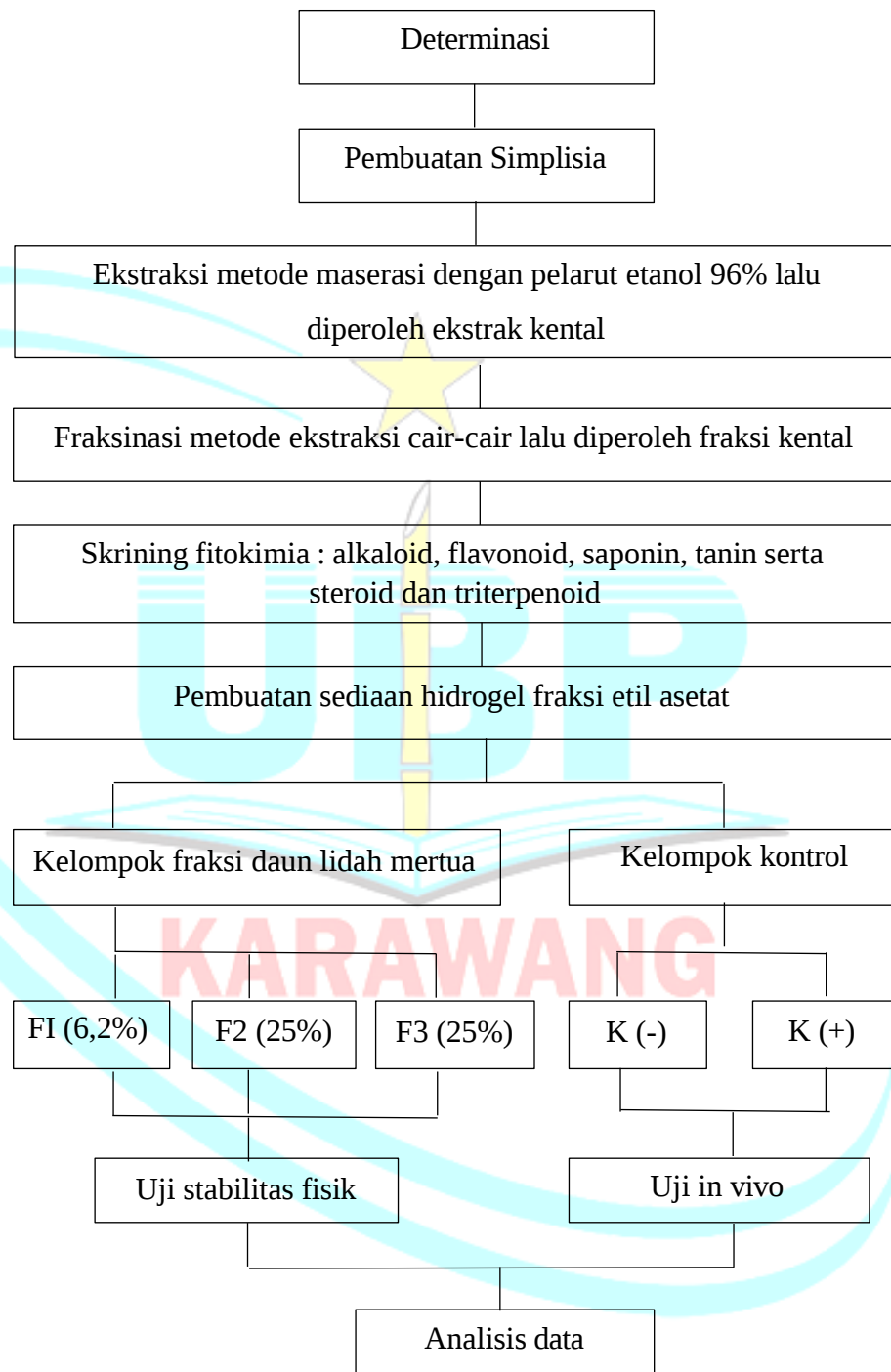
Kelompok 5 : Luka diolesi hidrogel tanpa kandungan fraksi lidah mertua sebagai kontrol negatif.

4. Pengukuran Efek Penyembuhan Luka

Pengamatan dan pengukuran diameter luka dilakukan pada setiap kelompok perlakuan pada hari ke-0, 2, 4, 8, dan 16. Persentase luas penutupan luka ditentukan dengan mengukur diameter rata-rata pada arah vertikal, horizontal, dan diagonal menggunakan jangka sorong. Adapun perhitungannya yaitu (Yuniarsih *et al.*, 2023) :

$$\% \text{Area penutupan luka} = \frac{\text{Luas luka pada hari ke 0} - \text{Luas luka pada hari ke 1}}{\text{Area luka pada hari ke 0}} \times 100$$

3.8.8 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.2 Diagram Alir Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data pada penelitian Hidrogel Fraksi Etil Asetat Lidah Mertua untuk Luka Insisi Secara In Vivo dilakukan tiap variasi kelompok diperiksa terhadap hasil hidrogel menggunakan uji pengujian evaluasi sifat fisik hidrogel yang meliputi uji organoleptik, uji pH, uji homogenitas, uji daya lekat, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat dan uji *cycling test*. Dilanjutkan dengan uji In Vivo dilakukan menggunakan uji one-way ANOVA (satu arah) melalui program graphad untuk menguji aktivitas penyembuhan luka. Apabila ditemukan perbedaan signifikan, uji lanjutan yang digunakan adalah Dunet. Data yang sudah diolah kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

