

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan dari bulan Februari-April 2024 di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Program Studi Farmasi S-1 Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik (*Ohaus*), alat-alat gelas meliputi tabung reaksi (*Pyrex*), gelas beaker (*Pyrex*), gelas ukur (*Pyrex*), *Erlenmeyer* (*Pyrex*), labu ukur (*Pyrex*), batang pengaduk (*Iwaki*), pipet tetes, pipet ukur (*Pyrex*), kaca arloji, corong (*Pyrex*), cawan porselen, mortir dan stamper (*OneMed*), sudip, rak tabung reaksi, ayakan mesh 60, blender (*Airlux*), kompor listrik (*Maspion*), *waterbath* (*DFS*), *oven* (*Getra*), krus silikat, desikator, tanur atau *furnace* (*YKY-yudian*), kulkas (*Polytron*), pH stick, *viscometer brookfield* (*Welhome*) dan *stopwatch*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daun sawo (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen), buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.), etanol 96%, CMC-Na, propilenglikol, metil paraben, aquadest, HCl 2N, Mg sulfat, dan FeCl₃.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh variasi

konsentrasi ekstrak etanol daun sawo dan buah tomat sebagai sediaan gel terhadap penyembuhan luka sayat dengan variabel sebagai berikut:

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi kombinasi ekstrak etanol daun sawo dan buah tomat pada sediaan gel sebagai pengobatan luka sayat.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kecepatan penyembuhan luka pada kelinci.

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah tempat pengambilan sampel, jenis luka dan jenis kelamin kelinci.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengumpulan sampel

Dalam penelitian ini sampel daun sawo sebanyak 5 kg diperoleh dari Desa Kebogadung Kabupaten Brebes. Sedangkan buah tomat sebanyak 10 kg diperoleh dari Desa Larangan Kabupaten Brebes.

3.4.2 Determinasi tanaman

Determinasi tanaman daun sawo dan buah tomat dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi S-1 Universitas Bhamada Slawi.

3.4.3 Persiapan Sampel

Sampel daun sawo dan buah tomat yang telah dikumpulkan, kemudian disortasi dengan tujuan untuk memisahkan daun, tangkai serta kotoran dari sampel. Selanjutnya yaitu bersihkan daun sawo dan buah

tomat dengan air mengalir, lalu ditiriskan. Untuk buah tomat, setelah dibersihkan lalu dipotong menjadi empat bagian untuk mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya keringkan daun sawo dan buah tomat dengan cara dioven pada suhu 55°C. Setelah kering, daun sawo dan buah tomat diblender untuk mempermudah dalam mengekstrak sampel (Setiani dan Endriyatno, 2023).

3.4.4 Pembuatan Ekstrak

3.4.4.1. Daun Sawo

Sampel ditimbang sebanyak 500 g, lalu dimaserasi dengan 2500 mL etanol 96%. Pelarut dimasukkan sampai permukaan sampel terendam seluruhnya, lalu disimpan ditempat gelap dengan suhu ruangan selama 3x24 jam dan dilakukan pengadukan setiap 1x sehari. Setelah 3x24 jam, pisahkan ekstrak dengan cara penyarian menggunakan kertas saring. Selanjutnya filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak kental (Nopiyansyah et al., 2024).

3.4.4.2. Tomat

Sampel ditimbang sebanyak 400 g, lalu dimaserasi dengan 2000 mL etanol 96%. Pelarut dimasukkan sampai permukaan sampel terendam seluruhnya, lalu disimpan ditempat gelap dengan suhu ruangan selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah 3x24 jam, pisahkan ekstrak dengan cara penyarian menggunakan kertas saring. Kemudian maserat yang diperoleh

dikumpulkan lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak kental (Supit et al., 2021).

3.4.5 Rendemen

Rendemen merupakan perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal. Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan bahwa nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Cara menetapkan rendemen ekstrak yaitu dengan menimbang sejumlah ekstrak kental dalam cawan porselen lalu diuapkan diatas penangas air dengan temperatur 40-50°C. Kemudian dilakukan penentuan berat ekstrak setelah penguapan dengan mengurangkan bobot cawan kosong, lalu hitung rendemen ekstrak (%b/b) sesuai dengan rumus. Rendemen menggunakan satuan persen (%) (Tamrin, 2022).

$$\%Rendemen = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat (gram)}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstraksi (gram)}} \times 100\%$$

3.4.6 Standardisasi Ekstrak Etanol Daun Sawo dan Ekstrak Buah Tomat

3.4.6.1. Uji Organoleptik

Ekstrak etanol daun sawo dan buah tomat dideskripsikan mengenai bentuk, warna, dan bau dengan menggunakan panca indera manusia (Amin et al., 2024).

3.4.6.2. Uji Kadar Air

Sebanyak 1 g ekstrak dimasukkan ke dalam lempeng logam pada alat *moisture analyzer* dan diratakan. Kemudian nyalakan *moisture analyzer* pada suhu 105°C, tunggu sampai alat berbunyi yang menandakan analisis sudah selesai. Syarat

dari kadar air yaitu tidak lebih dari 10% (Aini et al., 2023).

3.4.6.3. Uji Susut Pengeringan

Sebanyak 1 g ekstrak dimasukan kedalam botol timbang yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang, ekstrak diratakan dalam botol timbang dengan cara digoyangkan hingga membentuk lapisan setebal 5-10 mm. Kemudian dimasukan kedalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit hingga bobot tetap. Sebelum tahap pengeringan, biarkan botol timbang mendingin dalam deksikator hingga suhu kamar. Kemudian ditimbang dan hitung persen susut pengeringan. Syarat dari susut pengeringan yaitu tidak lebih dari 12% (Mewar dan As'ad, 2023). Rumus persentase dari susut pengeringan sebagai berikut:

$$\%Susut\ pengeringan = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A : Bobot botol timbang + Ekstrak sebelum dipanaskan

B : Bobot botol timbang + Ekstrak sebelum dipanaskan

3.4.6.4. Uji Kadar Abu Total

Sebanyak 1 g ekstrak ditimbang dan dimasukkan dalam krus silikat yang sebelumnya telah dipijarkan dan ditimbang. Lalu ekstrak dipijar dengan menggunakan tanur secara perlahan-lahan hingga arang habis. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga bobot tetap. Selanjutnya hitung kadar abu total yang dinyatakan dalam % (b/b) dengan rumus (Marpaung dan Septiyani, 2020).

$$\%Kadar Abu Total = \frac{W2 - W0}{W1} \times 100$$

Keterangan :

W0 = Berat krus kosong

W1 = Berat krus + ekstrak

W2 = Berat krus + ekstrak setelah diabukan

3.4.6.5. Uji Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL HCl encer selama 5 menit. Kemudian bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring dengan krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, dan dipijarkan hingga bobot tetap. Setelah itu, ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara. Rentang kadar abu tidak larut asam untuk memenuhi persyaratan yaitu 0,7% (Supriningrum et al., 2019).

$$\%Kadar abu tidak larut asam = \frac{W2 - (C \times 0,0076) - W0}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = Berat krus kosong

W1 = Berat krus + kertas saring + abu

W2 = Berat krus + abu tidak larut asam

C = Berat kertas saring

3.4.6.6. Uji Bobot Jenis

Bobot jenis ekstrak ditetapkan dengan menggunakan hasil pengenceran ekstrak cair dengan pelarut etanol 96% dengan konsentrasi 1%. Digunakan piknometer yang bersih, kering, dan terkalibrasi, diukur berat piknometer dan berat air yang sudah dididihkan pada suhu 25°C. Dimasukkan ekstrak ke dalam

piknometer dan didinginkan hingga suhu 25°C, dibuang sisa ekstrak cair, dan ditimbang. Dihitung bobot jenis dengan rumus (Amin et al., 2024)

$$\text{Bobot Jenis Ekstrak} = \frac{W3 - W1}{W2 - W1}$$

Keterangan:

W1 = berat bobot piknometer kosong

W2 = berat bobot piknometer + air

W3 = berat bobot piknometer + ekstrak

3.4.6.7. Uji Ekstrak Bebas Etanol

Sebanyak 1 mL ekstrak kental dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 tetes H₂SO₄ dan 2 tetes asam asetat. Kemudian dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Tivani et al., 2021).

3.4.7 Skrining Fitokimia

3.4.7.1. Alkaloid

Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL aquadest, lalu dipanaskan kemudian didinginkan dan dibagi dalam 3 tabung reaksi, masing-masing 1 mL. Tiap tabung ditambahkan dengan masing-masing pereaksi. Pada penambahan pereaksi Mayer, positif mengandung alkaloid jika membentuk endapan berwarna putih atau kuning. Pada pereaksi Wagner, positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan berwarna coklat. Sedangkan pada pereaksi Dragendrof, positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan berwarna jingga (Aji et al., 2023).

3.4.7.2. Flavonoid

Sejumlah 0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan 2 mg bubuk Mg sulfat dan 3 tetes HCl pekat, lalu kocok dan amati perubahan yang terjadi. Reaksi positif senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada larutan (Rahmasiahi et al., 2023).

3.4.7.3. Saponin

Sejumlah 0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 10 mL air panas lalu dikocok secara vertikal selama ± 1 menit hingga menunjukkan adanya buih pada sampel. Reaksi positif dari senyawa saponin ditandai dengan terbentuknya buih setinggi 1-10 cm yang stabil selama minimal 10 menit (busa tidak hilang) (Suleman et al., 2022).

3.4.7.4. Tanin

Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1-2 tetes FeCl_3 , lalu amati perubahan warnanya. Reaksi positif senyawa tanin ditandai dengan adanya perubahan warna larutan menjadi biru tua atau hitam kehijauan (Ekawati et al., 2023).

3.4.7.5. Steroid Triterpenoid

Sebanyak 2 mL ekstrak ditambahkan 1 tetes asam asetat anhidrat dan 2 tetes asam sulfat pekat. Hasil uji reaksi positif triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna merah dan terbentuk larutan warna hijau atau biru untuk hasil

positif mengandung steroid (Katja, 2020).

3.4.8 Formulasi

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan Gel Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Sawo dan Ekstrak Buah Tomat

No	Nama bahan	Konsentrasi (%)				Range (%)	Literatur	Fungsi bahan
		F0	F1	F2	F3			
1	Estrak daun sawo	-	6	8	10	16	(Supit et al., 2021)	Zat aktif
2	Ekstrak buah tomat	-	10	8	6	16	(Supit et al., 2021)	Zat aktif
3	CMC-Na	5	5	5	5	3,0 - 6,0	(Rowe et al., 2009)	<i>Gelling agent</i>
4	Propilenglikol	10	10	10	10	< 30	(Rowe et al., 2009)	Humektan
5	Metil paraben	0,2	0,2	0,2	0,2	0,02 - 0,3	(Rowe et al., 2009)	Pengawet
6	Aquadest	84,8	68,8	68,8	68,8	qs	-	Pelarut

3.4.9 Pembuatan Sediaan Gel

Proses pembuatan gel kombinasi ekstrak etanol daun sawo dan buah tomat diawali dengan cara menimbang seluruh bahan yang akan digunakan. Kemudian Na-CMC dikembangkan dalam 20 mL aquadest lalu tunggu hingga fase terdispersi dan diaduk hingga menjadi gel yang kental (Massa 1). Selanjutnya metil paraben dilarutkan menggunakan propilenglikol (Massa 2). Lalu (Massa 2) dituangkan kedalam (Massa 1) aduk hingga homogen. Kemudian tambahkan ekstrak etanol daun sawo dan ekstrak buah tomat kedalam campuran. Aduk hingga homogen, lalu tambahkan sisa aquadest hingga mendapatkan bobot yang telah ditentukan (Amanda et al., 2024).

3.4.10 Uji Mutu Fisik Sediaan Gel

3.4.10.1. Uji Organoleptik

Sediaan gel kombinasi ekstrak etanol daun sawo dan buah tomat diamati menggunakan panca indera meliputi bentuk, warna, serta bau dari sediaan gel yang di buat. Gel yang baik biasanya jernih dengan konsentrasi setengah padat (Setiawan et al., 2023).

3.4.10.2. Uji pH

Uji pH sediaan gel diukur dengan menggunakan stik pH universal dengan cara dicelupkan ke dalam sediaan dan diamkan beberapa saat hingga didapatkan pH yang tetap. Persyaratan pH sediaan topikal yaitu antara 4,5-6,5 (Irianto et al., 2020).

3.4.10.3. Uji Homogenitas

Sediaan gel ditimbang sebanyak 0,5 g, lalu diletakkan pada plat kaca yang ditindih dengan plat kaca lainnya. Kemudian amati sediaan. Homogenitas sediaan gel ditunjukkan dengan bercampurnya semua komponen penyusun sediaan gel (Nafisa et al., 2021).

3.4.10.4. Uji Daya Lekat

Sediaan gel ditimbang sebanyak 0,5 g dan diletakkan diatas kaca objek, lalu ditutup dengan kaca objek yang lain. Kemudian kaca objek ditekan dengan beban berat 1 kg selama 5 menit. Selanjutnya diletakkan beban 1 kg selama 5 menit.

Pasang kaca objek pada alat dan dilepaskan beban seberat 100 g. Selanjutnya yaitu catat waktu kedua kaca objek tersebut lepas. (Emelda, Husein, et al., 2020). Syarat dari daya lekat sediaan gel yaitu lebih dari 4 detik (Wahidah et al., 2024).

3.4.10.5. Uji Daya Sebar

Sediaan gel ditimbang sebanyak 0,5 g, lalu di letakkan di atas kaca dan bagian atasnya di beri kaca yang sama. Kemudian letakkan beban diatasnya. Amati daya sebar gel dalam waktu 1 menit dan ukur diameternya. Tingkatkan bebannya tiap rentang waktu 1 menit. Persyaratan daya sebar untuk sediaan topikal yaitu sekitar 5-7 cm (Tutik et al., 2021).

3.4.10.6. Uji Viskositas

Uji viskositas sediaan gel ditentukan menggunakan viskometer *Brookfield* dan dilakukan dengan cara menimbang gel sebanyak 50 g pada *beaker glass*. Letakkan *beaker glass* pada *spindle* lalu nyalakan viskometer dan pastikan rotor dapat berputar pada kecepatan 60 rpm. Kemudian amati hasil yang diperoleh. Viskositas dari sediaan gel yang baik yaitu 500-10.000 mPa.s (Astuti et al., 2018).

3.4.11 Perlakuan Hewan Uji

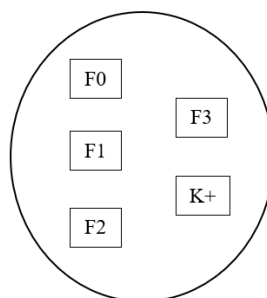
3.4.11.1 Preparasi Hewan Uji

Pada penelitian ini menggunakan hewan uji berupa kelinci albino jantan dengan galur *New Zealand* yang sehat dengan berat badan berkisar antara 1,5-2,5 kg sebanyak 3 ekor

dan berusia antara 2-3 bulan. Sebelum percobaan, kelinci diadaptasikan selama 5 hari pada lingkungan percobaan dengan tujuan untuk membiasakan hidup pada lingkungan yang baru. Selama masa adaptasi, hewan uji diberi makan dengan pakan standar seperti pelet, rumput kering, wortel, dan kangkung (Megawati et al., 2020).

3.4.11.2 Perlakuan Hewan Uji

Perlakuan pertama yang dilakukan yaitu punggung kelinci dibersihkan dari bulu lalu kelinci dianestesi menggunakan kloroform, kemudian dibersihkan punggung kelinci menggunakan alkohol swab. Selanjutnya yaitu dibuat 5 area perlakuan dengan jarak antar area 2 cm dan kulit kelinci disayat menggunakan pisau bisturi no. 22 dengan panjang 2 cm dengan kedalaman $\pm 0,2$ cm dengan cara memberi tanda pada bisturi yang telah diukur. Pada 1 ekor kelinci terdapat 5 kelompok perlakuan dan dibuat triplo untuk tiap konsentrasi (Halim, 2014). Rencana lokasi perlakuan pada hewan uji kelinci jantan dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Lokasi Perlakuan Hewan Uji (Dokumen Pribadi, 2024)

Tabel 3.2 Kelompok Perlakuan Hewan Uji

Kelompok	Perlakuan
I (F1)	Luka diberikan formula gel yang mengandung ekstrak dengan konsentrasi daun sawo 6% dan buah tomat 10%.
II (F2)	Luka diberikan formula gel yang mengandung ekstrak dengan konsentrasi daun sawo 8% dan buah tomat 8%.
III (F3)	Luka diberikan formula gel yang mengandung ekstrak dengan konsentrasi daun sawo 10% dan buah tomat 6%.
IV	Luka diberikan kontrol positif (Bioplacenton).
V (F0)	Luka dioleskan kontrol negatif (formula gel tanpa ekstrak)

Pemberian sediaan pada luka dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan tersebut pada kulit setiap 1x24 jam. Kemudian dilakukan pengukuran panjang luka. Perlakuan ini dilakukan hingga luka sembuh. Catat hari mulai menurunnya panjang luka dan hari luka tertutup 100% (Halim, 2014). Pengukuran persentase penyembuhan panjang luka dapat menggunakan rumus:

$$\% \text{Penyembuhan luka} = \frac{\text{Panjang luka awal} - \text{panjang luka hari}}{\text{Panjang luka awal}} \times 100\%$$

3.5 Analisis Data

Analisis data sediaan gel kombinasi ekstrak etanol daun sawo (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen) dan ekstrak buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.) menggunakan analisis deskriptif (menunjukkan tabel ataupun gambar). Analisis pada uji efektivitas penyembuhan luka sayat menggunakan software SPSS. Analisis data terdiri dari uji normalitas (uji *Shapiro-Wilk*) dan uji homogenitas (*Levene's Test of Homogeneity of Variance*). Apabila kondisi data normal dan

varians homogen, maka dilanjutkan uji Anova satu faktor (*One-Way Anova*).

Apabila data tidak normal dan/atau homogen maka uji statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.