

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2023 hingga April 2024 di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat Dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, timbangan neraca, bejana maserasi, evaporatory (Biobase), mortir dan stemper, batang pengaduk, erlenmeyer (pyrex), beaker glass (pyrex), gelas ukur (pyrex), cawan porselen, tabung reaksi (pyrex), pipet tetes, sarung tangan, rak tabung reaksi, objek glass, pot krim ukuran 100 g, blender (miyako), alat pencukur bulu, stopwatch, anak beban timbangan 50 g, 100 g, 200 g, bisturi no 20.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan diantaranya ekstrak Kunyit putih (*Curcuma zedoaria* Rosc), Kencur (*Kaempferiae galanga* L.), Adeps lanae, Parafin cair, TEA, Asam stearat, Metil paraben, Propil paraben, Aquadest, Methanol, H₂SO₄ 2N, HCl pekat, Magnesium (Mg), Etanol 96%, FeCl₃ pereaksi Dragendorff, CH₃COOH glasial, H₂SO₄ pekat, Ethyl chloride, Betadine salep.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental di laboratorium. Sistem kerja dilakukan dengan pembuatan ekstrak kunyit putih dan ekstrak kencur, kemudian pembuatan krim kombinasi ekstrak kunyit putih dengan ekstrak kencur dan dilakukan uji evaluasi serta uji aktivitas antiinflamasi. Adapun variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat dirubah untuk mengetahui pengaruh terhadap variabel terikat. Dalam penelitian ini variabel bebas yang digunakan adalah konsentrasi kombinasi ekstrak kunyit putih dan ekstrak kencur untuk aktivitas antiinflamasi sebagai pengobatan luka sayat.

3.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang menjadi akibat adanya variabel bebas. Dalam penelitian ini variabel terikat yang digunakan adalah penyembuhan luka sayat pada hewan uji coba.

3.3.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol merupakan variabel yang tidak memberikan pengaruh terhadap variabel yang diteliti. Dalam penelitian ini variabel terkontrol yang digunakan adalah waktu pembuatan sampel, tempat pengambilan sampel, dan penimbangan bahan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengumpulan sampel

Dalam penelitian ini sampel kunyit putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) dan kencur (*Kaempferiae galanga* L.) sebanyak 3 kg diperoleh dari UPTD Wisata Kesehatan Jamu (WKJ) Kabupaten Tegal.

3.4.2 Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Program Sarjana Universitas Bhamada Slawi. Tujuan determinasi untuk memastikan kebenaran tanaman yang akan digunakan pada penelitian ini.

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

a. Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.)

Timbang rimpang kunyit putih sebanyak 3 kg, lalu disortasi basah agar terpisah dari kotoran, cuci rimpang dengan air bersih. Kemudian rajang kunyit putih dengan dipotong tipis-tipis. Tujuannya agar mudah dikeringkan. Pengeringan dilakukan dengan pengovenan dengan suhu 60°C. Setelah kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus dan diayak menggunakan ayakan 18 mesh (Kartika *et al.*, 2021).

Ekstraksi dilakukan dengan cara dingin yaitu dengan metode maserasi yang menggunakan pelarut etanol 96% perbandingan 1: 6. Timbang serbuk kunyit putih sebanyak 500 g. Dimasukkan ke dalam wadah maserasi. Rendam serbuk kunyit putih dengan etanol 96% sebanyak 3.000 mL. Tutup wadah yang berisikan serbuk simplisia dan etanol menggunakan alumunium foil. Aduk dan diamkan selama 3x24

jam (Nur *et al.*, 2023). Setelah 3 hari disaring menggunakan corong dan kertas whatman menghasilkan filtrat. Ekstrak yang didapat selanjutnya pekatkan menggunakan rotary vacuum evaporator pada suhu 60°C (Indriaty Sulistiorini *et al.*, 2020). Setelah ekstraksi selesai didapatkan ekstrak cair kemudian diuapkan menggunakan waterbath air dengan temperatur 60°C hingga menjadi ekstrak kental (Kartika *et al.*, 2021).

b. Kencur (*Kaempferiae galanga L.*)

Timbang rimpang kencur sebanyak 3 kg, lalu disortasi basah agar terpisah dari kotoran, dicuci rimpang dengan air bersih. Kemudian rajang kencur dengan dipotong tipis-tipis. Tujuannya agar mudah dikeringkan. Pengeringan dilakukan dengan pengovenan dengan suhu 60°C. Setelah kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus dan diayak menggunakan ayakan 18 mesh (Kartika *et al.*, 2021).

Ekstraksi dilakukan dengan cara dingin yaitu dengan metode maserasi yang menggunakan pelarut etanol 96% perbandingan 1: 6. Timbang serbuk kencur sebanyak 500 g. Dimasukkan ke dalam wadah maserasi. Rendam serbuk kencur dengan etanol 96% sebanyak 3.000 mL. Tutup wadah yang berisikan serbuk simplisia dan etanol menggunakan aluminium foil. aduk dan diamkan selama 3x24 jam (Nur *et al.*, 2023). Setelah 3 hari disaring menggunakan corong dan kertas whatman menghasilkan filtrat. Ekstrak yang didapat selanjutnya pekatkan menggunakan rotary vacuum evaporator pada suhu 60°C (Indriaty Sulistiorini *et al.*, 2020). Setelah ekstraksi selesai didapatkan ekstrak cair kemudian diuapkan menggunakan waterbath air dengan temperatur 60°C hingga menjadi ekstrak kental (Kartika *et al.*, 2021).

3.4.4 Rendemen

Rendemen merupakan perbandingan antara berat kering dan berat bahan baku, semakin tinggi nilai rendemen ekstrak maka semakin tinggi zat yang tertarik dari bahan baku (Senduk *et al.*, 2020). Penetapan rendemen ekstrak dilakukan dengan cara menimbang sejumlah ekstrak kental dalam cawan porselen, ditentukan berat ekstrak dengan mengurangi bobot cawan kosong dengan bobot cawan dan ekstrak, kemudian hitung rendemen ekstrak (%b/b) sesuai dengan rumus. Rendemen menggunakan satuan persen (%). Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak (Tamrin, 2022). Rendemen dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang dihasilkan (gram)}}{\text{bobot simplisia yang di ekstraksi (gram)}} \times 100\%$$

(Tamrin, 2022).

3.4.5 Standardisasi Ekstrak

a. Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan cara mendeskripsikan bentuk, warna dan bau. (Departemen Kesehatan RI, 2000).

b. Susut Pengerinan

Uji susut pengerinan dilakukan dengan cara 1 g ekstrak dikeringkan dengan oven dengan suhu 105°C selama 30 menit lalu dimasukkan kedalam botol, lalu timbang ekstrak dalam keadaan sudah merata, lalu digoyangkan sampai lapisan setebal 5 hingga 10 mm. Selanjutnya masukan ekstrak ke dalam ruang pengerinan. Jika sudah kering buka tutup lalu keringkan kembali pada suhu 105°C hingga berat botol tetap. Syarat susut pengerinan yaitu tidak lebih dari 12% (Departemen Kesehatan RI, 2000).

$$\% \text{ Susut pengerinan} = \frac{\text{bobot sampel basah} - \text{bobot sampel kering}}{\text{bobot sampel basah}} \times 100\%$$

(Pandapotan Marpaung & Septiyani, 2020)

c. Kadar air

Uji kadar air dilakukan dengan cara 0,5 g ekstrak dimasukkan dan diratakan dalam alumunium foil. Masukan dalam *moisture analyzer* pada suhu 105°C, dengan syarat kadar yang baik tidak lebih dari 10% (Departemen Kesehatan RI, 2000).

d. Kadar abu

Uji kadar abu dilakukan dengan cara 1 gram ekstrak dimasukkan ke dalam krus, lalu dipijarkan perlahan. Kemudian suhu dinaikan secara bertahap hingga 600 °C hingga 15 menit, selanjutnya didinginkan dalam

desikator. Kemudian timbang berat abu. Kadar abu dihitung dalam persen terhadap berat sampel awal. Syarat kadar abu yang baik tidak lebih dari 10% (Departemen Kesehatan RI, 2000). Rumus kadar abu sebagai berikut:

$$\% \text{ Kadar abu} = \frac{\text{bobot krus+ekstrak setelah dipijarkan} - \text{bobot krus kosong}}{\text{bobot ekstrak awal}} \times 100\%$$

(Pandapotan Marpaung & Septiyani, 2020).

3.4.6 Skrining Fitokimia Ekstrak Kunyit Putih dan Ekstrak Kencur

a. Uji Flavonoid

Ekstrak rimpang kunyit putih dan ekstrak rimpang kencur masing-masing ditimbang 0,5 g, masukan dalam tabung reaksi dan ditambahkan HCl pekat 10 tetes lalu kocok kuat, selanjutnya tambahkan serbuk magnesium (Mg) sebanyak 0,2 g, kocok kuat kembali. Hasil positif jika adanya perubahan warna menjadi jingga (Rante *et al.*, 2020).

b. Uji Tanin

Ekstrak rimpang kunyit putih dan ekstrak rimpang kencur masing-masing ditimbang sebanyak 0,5 g dimasukan kedalam tabung reaksi ditambah 10 ml air panas. Kemudian tambahkan FeCl_3 1% sebanyak 2-3 tetes. Hasil positif mengandung tanin jika terjadi perubahan warna hijau kehitaman (Rante *et al.*, 2020).

c. Uji Alkaloid

Ekstrak rimpang kunyit putih dan ekstrak rimpang kencur masing-masing ditimbang sebanyak 0,5 g, masukan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan dengan sedikit larutan H_2SO_4 2N sebanyak 2 tetes. Kemudian tambah pereaksi Dragendorff sebanyak 3 tetes. Hasil positif jika adanya endapan berwarna coklat kemerahan (Rante *et al.*, 2020).

d. Uji Terpenoid

Ekstrak rimpang kunyit putih dan ekstrak rimpang kencur masing-masing ditimbang sebanyak 0,5 g. Larutkan dengan kloroform dan tambahkan 10 tetes CH_3COOH glasial dan tetes H_2SO_4 pekat. Hasil positif jika larutan berwarna coklat kemerahan (Rante *et al.*, 2020).

e. Uji Saponin

Ekstrak etanol rimpang kunyit putih sebanyak 0,5 g. tambahkan aquadest dan kocok kuat selama 1 menit, kemudian tambah 1 tetes HCl 1%. Hasil positif jika adanya busa stabil setinggi 1 cm (Rante *et al.*, 2020).

3.4.7 Formulasi Krim Ekstrak Kunyit Putih dan Ekstrak Kencur

Tabel 3. 1 Formulasi Sediaan

No	Nama Bahan	Konsentrasi (%)				Range	Literatur	Fungsi Bahan
		F0	F1	F2	F3			
1	Ekstrak kunyit putih	-	3%	6%	9%	-	-	Zat aktif
2	Ekstrak kencur	-	5%	10%	15%	-	-	Zat aktif
3	Adeps lanae	3	3	3	3	-	-	Emollient
4	Paraffin cair	15	15	15	15	1- 20	Handbook eksipien	Humektan
5	TEA	3	3	3	3	2-4	Handbook eksipien	Emulgator
6	Asam stearate	14.5	14.5	14.5	14.5	-	-	Emulgator
7	Metil paraben	0.1	0.1	0.1	0.1	0,02-0,3	Handbook eksipien	Pengawet
8	Propil paraben	0.05	0.05	0.05	0.05	0,01-0,6	Handbook eksipien	Pengawet
9	Aquadest	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100ml	-	-	Pelarut

Keterangan :

Kontrol positif (+) : Betadine salep

Kontrol negatif (-) : Basis Krim (F0)

3.4.8 Pembuatan Krim Ekstrak Kunyit Putih Kombinasi Kencur

Pada pembuatan krim terdiri dari dua fase, yaitu fase minyak yang meliputi asam stearat, adeps lanae, parafin cair dan metil paraben. Fase air meliputi trietanolamin, dan propil paraben. Fase minyak dan fase air masing masing dileburkan diatas kompor dengan suhu 60°C hingga lebur. Aduk hingga homogen, Fase minyak ditambahkan ekstrak kunyit putih dan ekstrak kencur dengan masing masing konsentrasi, aduk hingga homogen, Kemudian fase ditambahkan aquadest sedikit demi sedikit dengan diaduk secara konstan hingga terbentuk krim (Wahyuni *et al.*, 2022).

3.4.9 Uji Sifat Fisik Krim Kombinasi Ekstrak Kunyit Putih dan Ekstrak Kencur

Tahap uji sifat fisik sediaan krim ekstrak kunyit putih kombinasi ekstrak kencur dilakukan sebagai berikut:

3.4.9.1 Organoleptik

Uji organoleptik bertujuan untuk menentukan kualitas sediaan menggunakan indera mata, dilakukan dengan cara mengamati bau, warna dan bentuk sediaan. (Purwaningsih *et al.*, 2020).

3.4.9.2 Uji pH

Uji pH bertujuan untuk mengetahui keamanan dari sediaan yang digunakan agar tidak mengakibatkan iritasi pada kulit. Evaluasi pH dilakukan menggunakan alat stik pH, dengan cara memasukan pH strip pada krim yang sudah dilarutkan dengan aquadest, kemudian pH strip diangin – anginkan dan dicocokkan dengan warna acuan yang tertera pada kemasan indikator pH strip. Syarat pH yang baik sekitar 3,5- 8 (Maryam *et al.*, 2020). Jika pH terlalu besar akan mengakibatkan kulit menjadi bersisik, sedangkan jika pH terlalu asam maka akan terjadi iritasi pada kulit.

3.4.9.3 Uji Homogenitas

Uji homogenitas bertujuan untuk mengetahui zat aktif dan bahan yang digunakan tercampur (homogen), dan tidak adanya butiran kasar yang tersisa. Sediaan diamati secara subjektif dengan cara mengoleskan sedikit krim diatas kaca objek dan amati susunan partikel yang terbentuk atau ketidak homogenan partikel terdispersi dalam krim yang

terlihat pada kaca objek atau sejumlah krim yang akan diamati dioleskan pada kaca objek yang bersih dan kering sehingga membentuk suatu lapisan yang tipis kemudian ditutup dengan kaca preparat. Krim yang dinyatakan homogen apabila krim tidak ada bahan padat (Purwaningsih *et al.*, 2020).

3.4.9.4 Uji Daya Sebar

Uji daya sebar bertujuan untuk mengetahui kemampuan penyebaran krim di dalam kulit. dilakukan dengan menggunakan kaca transparan dan anak timbangan. Digunakan sampel sebanyak 0,5 g diletakan pada kaca transparan kemudian diberi 50 g, 100 g, dan 200 g beban anak timbangan selama 1 menit. Setelah itu diukur diameter penyebarannya. Daya sebar krim yang baik antara 5-7 cm (Purwaningsih *et al.*, 2020).

3.4.9.5 Uji Daya Lekat

Uji daya lekat bertujuan untuk mengetahui kemampuan krim untuk melekat pada permukaan kulit. Dilakukan dengan cara melekatkan krim 0,5 g diatas kaca objek. Kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Kaca objek dipasang pada alat tes dengan ketinggian 50 cm dari permukaan tanah dan dilepaskan beban seberat 80 gram yang dipasang pada kaca objek. Dicatat waktu yang diperlukan hingga kaca objek terlepas. Rentang nilai daya lekat sediaan yang baik adalah > 60 detik. (Purwaningsih *et al.*, 2020).

3.4.9.6 Uji Viskositas

Uji viskositas bertujuan untuk mengetahui tingkat kekentalan dari sediaan. Viskositas merupakan tahanan dari suatu cairan untuk mengalir. Nilai viskositas yang baik berkisar antara 2.000- 50.000 cps .

Uji ini dilakukan menggunakan alat viscometer Brookfield, dengan memasang spindle no 4 pada alat, kemudian spindle dicelupkan ke dalam sediaan krim yang sudah dimasukkan kedalam *beaker glass* 50 ml, lalu atur kecepatan 60 rpm dan rotor dijalankan. setiap masing-masing pengukuran dibaca skalanya dan catat hasil (Saryanti et al., 201).

3.4.9.7 Uji Tipe Krim

Uji ini bertujuan untuk mengamati tipe krim pada sediaan. Dilakukan dengan cara sebanyak 1 g krim dioleskan pada kaca preparat dan ditetesi metilen blue hingga menyebar diatas krim lalu diamati. Apabila terlihat warna biru merata maka krim merupakan tipe M/A atau minyak dalam air (Saryanti et al., 2019).

3.4.10 Uji Aktivitas Antiinflamasi

3.4.10.1 Preparasi Hewan Uji

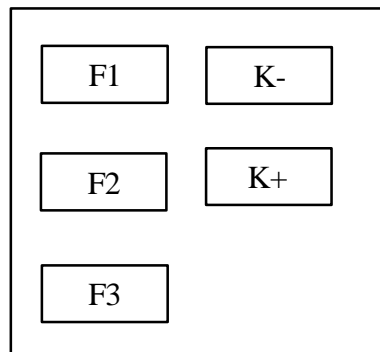
Kelinci yang digunakan pada penelitian ini yaitu kelinci jantan dengan galur *New Zealand* sebanyak 3 ekor dengan usia kelinci 2-3 bulan. Memiliki berat badan antara 1,5-2 kg. Kelinci diadaptasi dengan kondisi ruangan selama 5 hari, diberi makan dan minum (Wahyuni *et al.*, 2021).

3.4.10.2 Perlakuan Hewan Uji

Mula-mula kelinci dilakukan cukur bulu kelinci terlebih dahulu pada daerah punggung hingga licin. Wilayah punggung bersihkan menggunakan alkohol swab, lalu diukur punggung kelinci dengan panjang 2 cm. Kemudian anastesi menggunakan ethyl chloride spray dan ditunggu hingga 5-10 menit agar obat bius bereaksi. Tujuan di anastesi ini agar kelinci tidak merasakan sakit jika di lakukan sayatan

pada punggung kelinci. Lalu buat luka sayatan di bagian punggung hingga ke dalaman 2 mm yang ditandai dengan keluarnya darah. Penyayatan dilakukan menggunakan bisturi no 20. Dibuat 5 sayatan pada punggung kelinci secara rata. Setelah di sayat kemudian luka dibersihkan menggunakan alkohol swab, lalu dioleskan sediaan krim kombinasi ekstrak kunyit putih (*Curcuma zedoaria* Rosc) dengan kencur (*Kaempferiae galanga* L) secara merata dengan mengoleskan 2 kali hingga luka menutup sempurna. Luka ditutup menggunakan kassa steril (Mufidah, Sunarsih, Dini., 2023). Dibuat 5 kelompok perlakuan uji yaitu :

1. Kelompok luka I dioleskan sediaan krim F1 yang mengandung ekstrak kunyit putih konsentrasi 3% kombinasi ekstrak kencur konsentrasi 5% pada punggung kelinci.
2. Kelompok luka II dioleskan sediaan krim F2 yang mengandung ekstrak kunyit putih konsentrasi 6% kombinasi ekstrak kencur konsentrasi 10% pada punggung kelinci.
3. Kelompok luka III dioleskan sediaan krim F3 yang mengandung ekstrak kunyit putih konsentrasi 9% kombinasi ekstrak kencur konsentrasi 15% pada punggung kelinci.
4. Kelompok IV luka dioleskan dengan kontrol negatif (basis krim) pada punggung kelinci.
5. Kelompok V luka dioleskan dengan kontrol positif (betadine salep) pada punggung kelinci.



Gambar 1. Rencana perlakuan pada kelinci
(Mufidah, Sunarsih, Dini., 2023).

3.4.10.3 Persentase Penyembuhan Luka

Pengamatan terhadap luka sayat dilakukan selama 14 hari mengamati rata-rata waktu sembuh. (Mufidah, Sunarsih, Dini., 2023).

Dilakukan pengukuran panjang luka yang sembuh menggunakan penggaris dengan rumus:

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

(Mufidah, Sunarsih, Dini., 2023)

3.5 Analisis Data

Data penelitian ini diuji menggunakan uji statistika yaitu dengan menentukan normalitas dan homogenitas pada data persentase penyembuhan luka sayat dan uji sediaan fisik krim yang meliputi uji daya sebar, uji daya lekat dan uji viskositas dilakukan analisis statistik dengan uji *One way anova* apabila kedua syarat uji anova terpenuhi yaitu data terdistribusi normal dan homogen. Jika kedua syarat tidak terpenuhi maka digunakan analisis statistik dengan uji *Kruskal-wallis*, jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji *Mann-witney*, sedangkan uji sifat fisik organoleptis, homogenitas pH dan tipe krim dianalisis secara deskriptif.