

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi, Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Bahan Alam 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 yaitu waterbath (bss), *rotary* evaporator (biobase), oven (Getra), neraca analitik (HWH DJ2023A), blender (Philip), chamber maserasi, alat-alat gelas (*Pyrex*), cawan porselin, mortir dan stamper, kain flannel, batang pengaduk, aluminium foil, sudip, pisau bedah, jangka sorong dan pot salep.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu etanol 96%, klorofom, ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill), lendir bekicot (*Achatina fulica*),  $\text{FeCl}_3$ , HCl 2N, pereaksi *dragendroff*, magnesium, aquadest, metil paraben, propil paraben, propilen glikol dan adeps lanae.

#### **3.3 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian ini terdapat beberapa variabel yaitu:

### 3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab timbulnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi zat aktif kombinasi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) dengan bekicot (*Achatina fulica*).

### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu pengaruh ekstrak salep kombinasi daun alpukat (*Persea americana* Mill) dengan bekicot (*Achatina fulica*) terhadap penyembuhan luka sayat pada kelinci.

### 3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga berpengaruh pada variabel bebas. Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu umur kelinci, jenis kelamin, berat badan kelinci serta metode ekstraksi.

## 3.4 Sampel Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan yaitu kelinci dengan kriteria berjenis kelamin Jantan galur *New Zealand* dengan usia kelinci 2-3 bulan dengan berat badan antara 1,5-2,5 kg dan tidak memiliki cacat secara fisik (Megawati *et al.*, 2020).

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Pengambilan bahan**

Sampel yang digunakan yaitu daun alpukat dengan ciri-ciri warnanya hijau tua, segar dan tidak memiliki bercak. Kemudian lendir bekicot diambil dari bekicot yang memiliki ciri dewasa, ukuran cangkang 4-6 cm. Kedua sampel ini diperoleh dari kebun desa Bojong kecamatan Bojong Kabutan Tegal.

#### **3.5.2 Determinasi**

Determinasi tanaman dan hewan uji dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Farmakologi Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi

#### **3.5.3 Penyiapan Ekstak Daun Alpukat**

##### **a. Pengolahan**

Daun alpukat dibersihkan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang terdapat pada daun, kemudian dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 55°C. Pengeringan dilakukan kurang lebih selama 2-5 hari. Pengeringan ini bertujuan supaya kadar air dalam daun alpukat berkurang dan tidak mudah mengalami pembusukan.

##### **b. Ekstraksi**

Metode pembuatan ekstrak yang digunakan yaitu ekstraksi jenis maserasi. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan

cara merendam daun alpukat kering sebanyak 1000 g dalam larutan etanol 96% sampai terbasahi semua  $\pm$  3000 mL. Maserasi ini dilakukan selama 3x24 jam dengan pengadukan 2 kali sehari, kemudian hasil maserasi disaring dan filtrat yang didapat diuapkan dengan *rotary evaporator*. Setelah itu diuapkan kembali dengan *waterbath* supaya menghasilkan ekstrak yang kental dan pekat.

#### 3.5.4 Uji Rendemen Ekstrak

Ekstrak kental yang dihasilkan ditimbang dalam cawan porselin dan kemudian dihitung rendemennya dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{B1}{B2} \times 100\%$$

Keterangan:

B1 = Berat ekstrak kental

B2 = Berat serbuk simplisia awal

#### 3.5.5 Uji Parameter Ekstrak

##### a Penetapan Organoleptik

Uji organoleptik meliputi warna, bau, rasa, dan kenampakan dengan pengamatan dengan panca indra (Daeng Pine *et al.*, 2023)

##### b Penetapan Susut Pengerinan

Ekstrak sebanyak 1 g ditempatkan dalam wadah krus porselin tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan dengan suhu 105°C selama 30 menit dan ditimbang. Sebelum ditimbang

ekstrak diratakan dalam krus porselen dengan cara digoyang-goyangkan hingga membentuk lapisan setebal kurang lebih 5–10 mm. Kemudian dimasukkan ke dalam oven, dibuka tutupnya dan dikeringkan serta disimpan dalam suhu kamar sampai bobot tetap (Marpaung & Septiyani, 2020). Persentase susut pengeringan dihitung dengan rumus:

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{Bobot ekstrak kering (g)}}{\text{Bobot ekstrak basah (g)}} \times 100\%$$

c Penetapan Kadar Air

Sebanyak 1 g ekstrak ditimbang dalam cawan yang telah ditara. Lalu dikeringkan pada suhu 105°C selama  $\pm$  3 jam di dalam oven. Kemudian dimasukkan cawan dalam desikator hingga suhu kamar dan dicatat bobot tetap yang diperoleh. Syarat mutu kadar air dari suatu bahan berupa ekstrak kental adalah 5-30%, ekstrak cair >30%, dan ekstrak kering <10% (Marpaung & Septiyani, 2020) Rumus dalam menentukan kadar air yaitu:

$$\text{Kadar Air} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A: Bobot sampel sebelum dipanaskan

B: Bobot sampel setelah dipanaskan

d. Penetapan Kadar Abu Total

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

$$\text{Kadar Abu total} = \frac{\text{Bobot abu (g)}}{\text{Bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

3.5.6 Uji Skrining Fitokimia

a. Identifikasi Tanin

Ekstrak sebanyak 1 g dilarutkan dalam aquadest, disaring kemudian filtratnya ditambahkan dengan 5 mL dengan FeCl<sub>3</sub> 1%. Dikatakan positif apabila hasil menunjukkan warna biru tua atau hitam (Handayani *et al.*, 2021).

b. Identifikasi Alkaloid

Ekstrak sebanyak 1 g dicampurkan dengan 5 mL HCl 2N, kemudian dipanaskan selama 2 menit dan ditambahkan dengan pereaksi *dragendroff* sebanyak 3 tetes. Dikatakan positif apabila terbentuk endapan berwarna kuning jingga hingga merah bata (Handayani *et al.*, 2021).

c. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak sebanyak 1 g dicampurkan dengan 0,2 g serbuk magnesium dan ditambahkan 5 mL HCl Pekat. Dikatakan positif apabila terbentuk warna jingga, merah atau kuning (Handayani *et al.*, 2021).

d. Identifikasi Saponin

Diletakkan ekstrak secukupnya pada tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas dan dikocok hingga berbuih. Dikatakan positif apabila terbentuk busa yang stabil selama 5 menit dan tidak hilang setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N (Handayani *et al.*, 2021).

### 3.5.7 Penyiapan Lendir Bekicot

Lendir bekicot di ambil dari bekicot yang masih hidup, sebelum dilakukan pengambilan bekicot diadaptasi terlebih dahulu selama 1 hari pada wadah yang telah dilapisi daun pisang dan tertutup. Setelah proses adaptasi selesai, kemudian bekicot dibersihkan menggunakan air mengalir supaya bersih dari kotoran yang menempel pada bekicot, kemudian ujung cangkang dipecahkan lendir yang mengalir ditampung pada wadah yang steril (Suarni & Badri, 2016). Lendir yang diperoleh kemudian di *centrifuge* untuk memisahkan lendir dari pengotornya (Shoviantari *et al.*, 2021).

### 3.5.8 Rancangan Formulasi Salep

Pembuatan salep kombinasi ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dan lendir bekicot (*Achatina fulica*) sebagai obat luka sayat pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)

Tabel 3.1 Rancangan Formulasi Salep

No	Bahan	Fungsi	Formulasi (%)					Range(%) (Rowe <i>et al.</i> , 2009).
			F1	F2	F3	F4	F5	
1	Ekstrak Daun Alpukat	Zat Aktif	10	-	5	4	6	-
2	Lendir Bekicot	Zat Aktif	-	10	5	6	4	-
3	Metil Paraben	Zat Pengawet	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,02-0,3
4	Propil Paraben	Zat Pengawet	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,01-0,6
5	Propilen Glikol	Pelarut	5	5	5	5	5	5-80
6	Adeps Lanae	Basis Salep	ad 25 g	ad 25 g	ad 25 g	ad 25 g	ad 25 g	-

Keterangan:

F1 : salep dengan konsentrasi ekstrak daun alpukat 10%

F2 : salep dengan konsentrasi lendir bekicot 10%

F3 : salep dengan konsentrasi kombinasi ekstrak daun alpukat 5% dan lendir bekicot 5%

F4 : salep dengan konsentrasi kombinasi ekstrak daun alpukat 4% dan lendir bekicot 6%

F5 : salep dengan konsentrasi kombinasi ekstrak daun alpukat 6% dan lendir bekicot 4%

### 3.5.9 Pembuatan salep

Menyiapkan alat dan bahan, menimbang bahan bahan yang akan digunakan, panaskan mortar dan stamper kemudian dilarutkan propil paraben, metil paraben dan propilen glikol dalam mortar yang sudah dipanaskan dan aduk hingga homogen, tambahkan sedikit

adeps lanae dan diaduk hingga homogen. Lalu tambahkan sedikit demi sedikit ekstrak daun alpukat dan lendir bekicot, kemudian tambahkan sisa adeps lanae pada mortar dan digerus kembali hingga homogen. Selanjutnya keluarkan salep dalam mortir menggunakan sudip dan masukkan dalam pot salep.

#### 3.5.10 Evaluasi sediaan salep

##### a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan terhadap penampilan fisik dari sediaan salep yang meliputi bentuk sediaan, bau dan warna.

##### b. Uji homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk melihat bahan-bahan dari sediaan salep tercampur dan tersebar menjadi homogen, tidak terdapat partikel-partikel yang menggumpal serta memiliki warna yang merata pada seluruh bagian salep (Hamzah *et al.*, 2013).

##### c. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan cara melarutkan 0,5 g sediaan dalam 5 mL aquadest. Kemudian pH stik dicelupkan selama 1 menit, dilihat perubahan warna pada pH stik. Perubahan warna pada pH stik menunjukkan nilai pH dari salep (Arif, 2016). Nilai pH kulit yaitu 4,5-6,5 (Hamzah *et al.*, 2013).

d. Uji daya lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan menimbang salep 0,5 g di atas objek glass dan diletakkan lagi *objec glass* yang lain untuk menutupi bagian atas, diletakan beban dengan berat 1 kg di atasnya selama 5 menit. Dipasang *objec glass* pada alat uji daya lekat salep dan dilepaskan beban seberat 80 g dan dicatat waktunya hingga kedua *objec glass* tersebut terlepas, dilakukan replikasi 3 kali. Nilai daya lekat yang baik yaitu  $> 4$  detik (Arif, 2016).

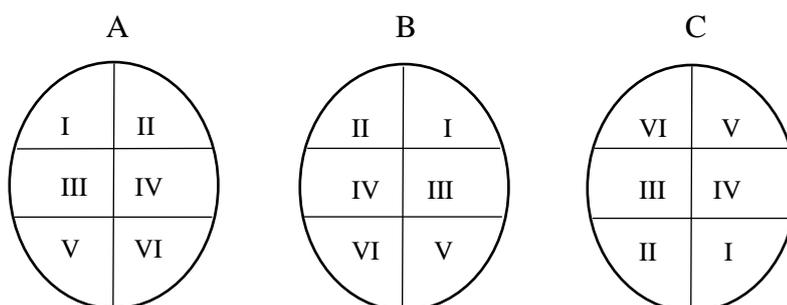
e. Uji daya sebar

Uji daya sebar dilakukan dengan cara penimbangan 0,5 g salep dan diletakkan pada kaca objek. Kaca objek yang satu ditimbang dan diletakkan kaca objek yang lainnya di atas massa salep diberi beban 100 g kemudian didiamkan 1 menit. Diameter salep yang tersebar kemudian diukur. Selanjutnya kaca objek diberi beban 200 g dan kembali diukur diameter penyebaran. Penyebaran diteruskan dan tetap ditambah beban sebanyak 300 g hingga mendapatkan penyebaran yang stabil dan dicatat diameter penyebarannya, pengujian direplikasi sebanyak 3 kali. Nilai daya sebar yang baik yaitu 5-7 cm (Arif, 2016).

### 3.5.11 Uji efektivitas penyembuhan luka sayat

Pengujian efektivitas dalam penyembuhan luka sayat ini menggunakan hewan kelinci jantan dengan galur *New Zealand*

sebanyak 3 ekor dengan usia kelinci 2-3 bulan dengan berat badan antara 1,5-2,5 kg. Sebelum dilakukan pembuatan luka, kelinci dikarantina terlebih dahulu selama 7 hari dan dibersihkan bulu pada punggung kelinci sampai licin dengan menggunakan alat pencukur supaya untuk mempermudah pada saat melukai, pemberian perlakuan dan pengamatan. Selanjutnya dilakukan disinfeksi area punggung kelinci yang telah dicukur dengan menggunakan alkohol 70%, kemudian dilakukan anestesi pada punggung kelinci menggunakan kloroform dan ditunggu selama 4-6 menit hingga obat bius bereaksi kemudian dilakukan penyayatan pada kulit (luka derajat 1) dengan membentuk 6 zona perlakuan menggunakan pisau bisturi dengan kedalaman  $\pm 0,2$  mm dengan panjang 2 cm seperti gambar 3.1 (Arif, 2016).



Gambar 3.1 Model perlakuan luka sayat pada kelinci

**Keterangan:**

- I : Kontrol Negatif
- II : Luka diberi salep F1
- III : Luka diberi salep F2
- IV : Luka diberi salep F3
- V : Luka diberi salep F4
- VI : Luka diberi salep F5

Setelah 5 menit dilakukan perlakuan sayatan pada kelinci, selanjutnya oleskan salep kombinasi dari ekstrak daun alpukat dan lendir bekicot dioleskan secara merata dengan frekuensi 2 kali sehari pada luka sayatan. Pengamatan penyembuhan luka sayat pada kelinci dilakukan secara kasat mata dan mengukur panjangnya penyembuhan luka menggunakan jangka sorong pada hari ke-0 sampai 14 hari dengan melihat adanya edema, eritema serta penutupan luka (Megawati *et al.*, 2020). Luka dapat dikatakan sembuh apabila diameter luka mendekati 0 cm atau telah terbentuknya jaringan baru pada kulit yang menutupi luka (Kurnia Kolibu *et al.*, 2022). Kemudian persentase penyembuhan luka dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$P_x = \frac{d_1 - d_x}{d_1} \times 100\%$$

(Asfi, 2019)

Keterangan:

P<sub>x</sub> : persentase penyembuhan luka hari ke-x

d<sub>1</sub> : diameter luka hari pertama

d<sub>x</sub> : diameter luka hari ke-x

### 3.6 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini diperoleh dari hasil uji evaluasi fisik sediaan dan uji efektivitas penyembuhan luka sayat dengan mengukur diameter panjang luka menggunakan pada masing masing perlakuan. Kemudian dianalisis secara statistik dengan SPSS menggunakan metode *One Way ANOVA*.