

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Maret 2024 di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Teknologi Sediaan 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 yaitu *rotary evaporator* (biobase), *waterbath* (bss), oven, timbangan analitik (HWH DJ2023A), bejana, alat-alat gelas (*pyrex*), cawan porselin, mortir dan stempel, blender, batang pengaduk, sudip, sendok tanduk, pot salep, pisau bedah, jangka sorong, aluminium foil dan kain flannel.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu etanol 96%, rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume), reagen dragendrof, HCl P, aquadest, FeCl₃, metil paraben, propil paraben, propilen glikol, vaselin album, salep betadin, etil klorida spray, kelinci jantan albino, alkohol swab dan stik pH.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi tiga tahapan yaitu tahap persiapan, tahap penelitian dan tahap akhir dengan variabel sebagai berikut:

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya dari variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi zat aktif ekstrak temu blenyeh pada sediaan salep.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi karena adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah persentase penyembuhan luka sayat terhadap kelinci jantan dengan melihat dari panjang ukuran luka.

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga variabel bebas dan variabel terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah tempat pengambilan sampel tanaman temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume), jenis kelamin kelinci, umur kelinci, dan berat badan kelinci.

3.4 Sampel Hewan Percobaan

Kelinci yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu memiliki kriteria berjenis kelamin jantan galur *New zealand* dengan usia 2-3 bulan, dengan bobot sekitar 2-2,5 kg, tidak adanya cacat secara fisik dan tidak ada tanda-tanda infeksi yang dialami hewan uji (Megawati, Ummah & Setiawan, 2020).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengambilan Bahan

Sampel yang digunakan yaitu temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) yang diperoleh dari Wisata Kesehatan Jamu (WKJ) Kalibakung Kabupaten Tegal.

3.5.2 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium bahan alam Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi. Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang akan digunakan dalam penelitian ini.

3.5.3 Pembuatan Serbuk Rimpang Temu Blenyeh

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rimpang temu blenyeh sebanyak 8 kg yang dilakukan pencucian dengan menggunakan air mengalir terlebih dahulu untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada rimpang temu blenyeh. Kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 55°C, pengeringan ini dilakukan supaya rimpang yang digunakan tidak mudah rusak sehingga lebih tahan lama dengan cara mengurangi kadar air. Serbuk temu blenyeh dibuat dengan cara menghaluskan rimpang temu blenyeh yang sudah kering menggunakan blender sampai rimpang benar-benar halus (Zonia, 2023).

3.5.4 Uji Karakteristik Rimpang

1) Uji makroskopik

Uji dilakukan dengan mengamati menggunakan panca indra terkait identifikasi organoleptis yang bertujuan untuk mengetahui keaslian sampel dari bentuk, warna dan bau (Partiwisari, Astuti & Ariantari, 2014).

2) Uji mikroskopik

Uji dilakukan dengan meletakkan irisan tipis rimpang temu blenyeh diatas kaca objek glass secukupnya. Kemudian ditutup menggunakan kaca objek dan diamati melalui mikroskop dengan perbesaran 400x (Novitasari, Nashihah & Zamzani, 2021).

3.5.5 Pembuatan Ekstrak

Metode yang digunakan dalam pembuatan ekstrak temu blenyeh yaitu maserasi. Serbuk rimpang temu blenyeh yang digunakan yaitu 500 g dimaserasi dengan menggunakan penyari etanol 96% sebanyak 2.500 mL yang dimasukkan kedalam bejana. Maserasi dilakukan sebanyak 5x24 jam dengan sesekali diaduk. Kemudian hasil maserasi disaring dengan menggunakan kain flannel dan kertas saring, hasil filtrat yang didapat kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dan diuapkan kembali dengan menggunakan *waterbath* untuk mendapatkan ekstrak yang sangat kental (Ardianto & Safitri, 2021 dan Pramiastuti & Murti, 2022).

3.5.6 Uji Rendemen Ekstrak

Ekstrak kental yang telah diperoleh kemudian ditimbang dalam cawan porselin dan dihitung rendemen ekstrak dengan menggunakan rumus (Ardianto & Safitri, 2021):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

3.5.7 Uji Parameter Ekstrak

1) Uji Parameter Spesifik

Uji ini dilakukan dengan mengamati ekstrak dengan menggunakan panca indra untuk mengetahui bentuk, bau dan rasa dari ekstrak temu blenyeh (Mangalu, Simbala & South, 2022).

2) Uji Parameter Non Spesifik

a. Penetapan susut pengeringan

Ekstrak sebanyak 1 g ditempatkan dalam wadah krus porselen tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan dengan suhu 105°C selama 30 menit dan sudah ditara. 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. Syarat susut pengeringan yaitu < 10% (Muqowwiyah & Dewi, 2021) (Kementerian Kesehatan RI, 2017)

b. Penetapan kadar abu total

Ekstrak sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara. Kemudian pijarkan secara perlahan-lahan dengan menggunakan tanur hingga arang habis. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga mencapai bobot yang tetap. Dihitung kadar abu total dengan menggunakan rumus persamaan (5) (Utami *et al.*, 2017 dan Yana, Gummy & Marpaung, 2022).

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

c. Penetapan kadar abu larut tidak larut asam

Hasil abu dari kadar abu total didihkan selama lima menit dalam 25 mL HCl pekat selama 5 menit. Bagian yang tidak dapat larut dalam asam dikumpulkan dan disaring melalui kertas saring bebas abu. Kemudian kadar abu yang tidak larut dalam asam dapat dihitung terhadap berat bahan uji dan dinyatakan dalam % b/b (Utami *et al.*, 2017). Syarat kadar abu tidak larut asam yaitu tidak boleh lebih dari 0,7% (Hidayati *et al.*, 2018)

d. Penetapan kadar air

Ekstrak ditimbang kurang lebih 0,5 g diletakkan kedalam cawan aluminium. Kemudian ekstrak temu blenyeh dimasukkan kedalam alat *Mouisture analyzer* dan atur suhu alat

menjadi 105°C, selanjutnya tutup alat dan tunggu proses hingga selesai dengan ditandai bunyi *beep* (Nurhidayati & Warmiati, 2021). Syarat mutu kadar air pada ekstrak kental yaitu antara 5-30%, ekstrak cair >30% dan ekstrak kering <10% (Utami *et al.*, 2017).

e. Penetapan bobot jenis

Ekstrak diencerkan 5% menggunakan air kemudian dimasukkan ke dalam piknometer yang telah dibersihkan dan dikeringkan, dibuang kelebihan ekstrak cair dan ditimbang (Utami *et al.*, 2017).

$\text{Bobot jenis} = \text{bobot piknometer kosong} - \text{bobot piknometer terisi}$
--

f. Penetapan cemaran mikroba

Ekstrak sebanyak 1 g dilarutkan dalam 10 mL NaCl dikocok hingga homogen dan didapatkan pengenceran 10^{-1} . Sebanyak 3 tabung disiapkan kemudian 9 mL pengencer dimasukkan pada masing-masing tabung. Hasil pengenceran 10^{-1} dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung pertama, kocok hingga homogen sehingga didapat pengenceran 10^{-2} . Selanjutnya dilanjutkan untuk pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} (Utami *et al.*, 2017).

g. Penetapan Angka Lempeng Total (ALT)

Pada pengenceran 10^{-1} sebanyak 1 mL dipipet dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang berisi media NA

(*Nutrient Agar*) sebanyak 15 mL kemudian digoyangkan supaya suspensi tersebar merata. Setelah media memadat, cawan petri diinkubasikan dengan suhu 37°C selama 24-48 jam dengan posisi terbalik. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung. Syarat angka lempeng total yaitu < 10.000 koloni/g (Saweng, Sudimarti & Suartha, 2020 dan Utami et al., 2017).

h. Penetapan angka kapang dan khamir

Pada pengenceran 10^{-1} sebanyak 1 mL dipipet dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang berisi media PDA (*Potato Dextrose Agar*) sebanyak 15 mL kemudian digoyangkan supaya suspensi tersebut merata. Setelah media memadat cawan petri diinkubasikan dengan suhu 25°C selama 3 hari dengan posisi terbalik. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung. Syarat total kapang yaitu < 1.000 koloni/g (Utami et al., 2017).

3.5.8 Uji Skrining Fitokimia

1) Identifikasi Alkaloid

Ekstrak sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam 1 mL HCl dan 9 mL aquadest dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, dinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi tiga tabung reaksi dan masing-masing tabung reaksi diberikan pereaksi mayer, wagner dan dragendrof 2 tetes. Hasil dikatakan positif apabila terbentuk endapan putih dengan pereaksi mayer, endapan

coklat dengan pereaksi wagner dan endapan jingga dengan pereaksi dragendrof (Islami *et al.*, 2022).

2) Identifikasi Flavonoid

Ekstrak sebanyak 0,5 g diletakkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl 2N kemudian dipanaskan diatas penangas air selama 15 menit. Hasil dikatakan positif apabila menunjukkan warna merah kecoklatan (Hadi, Meilian & Ulfah, 2023).

3) Identifikasi Tanin

Ekstrak sebanyak 0,5 g dicampurkan dengan 2 mL etanol, kemudian ditambahkan 5-10 tetes FeCl₃ 1%. Hasil dikatakan positif apabila menunjukkan warna hitam atau hijau kehitaman, biru tua, biru kehitaman (Ningsih, Hanifa & Hasbiyah., 2018).

4) Identifikasi Saponin

Ekstrak ditempatkan secukupnya pada tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas secukupnya dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil dikatakan positif apabila terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama 5 menit, dan tidak hilang ketika ditambahkan 1 tetes HCl 2N (Ardianto & Safitri, 2021 dan Novriyanti, Putri & Rijal, 2022).

5) Identifikasi Triterpenoid

Ekstrak dimasukkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Kemudian ditambahkan 1-2 mL

H₂SO₄ melalui dinding tabung reaksi. Hasil dikatakan positif triterpenoid apabila terbentuk warna cincin coklat atau violet (Pramiastuti & Murti, 2022).

3.6 Rancangan Formulasi Salep

Rancangan pembuatan salep ekstrak etanol temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) dibuat dengan bobot 50 gram, berikut tabel formulasi salep yang akan dibuat:

Tabel 3.1 Rancangan Formulasi Salep (Adeliana *et al.*, 2021)

No	Bahan	Formulasi (%)				Range (%)	Fungsi
		F0	F1	F2	F3		
1.	Ekstrak Temu Blenyeh	-	5	10	15	-	Zat Aktif
2.	Metil Paraben	0,3	0,3	0,3	0,3	0,02-0,3	Zat Pengawet
3.	Propil Paraben	0,2	0,2	0,2	0,2	0,01-0,6	Zat Pengawet
4.	Propilen Glikol	5	5	5	5	5-80	Zat Pelarut
5.	Vaselin Album	ad 50 g	ad 50 g	ad 50 g	ad 50 g	-	Basis Salep

Keterangan :

Kontrol negatif (-) : Basis salep (F0)

3.6.1 Pembuatan Sediaan Salep

Menyiapkan alat dan bahan, menimbang bahan-bahan yang akan digunakan, melarutkan propil paraben, metil paraben dan propilen glikol dalam cawan porselin. Kemudian panaskan mortir dengan air panas, buang air yang ada dalam mortir. Masukkan propil paraben, metil paraben dan propilen glikol yang telah dilarutkan kedalam mortir, tambahkan sebagian vaselin album gerus dengan cepat ad

homogen, tambahkan ekstrak kental temu blenyeh kemudian tambahkan sisa vaselin album gerus cepat ad homogen, kemudian masukkan salep kedalam wadah pot salep (Azkiya, Ariyani & Nugraha, 2017).

3.6.2 Evaluasi Sediaan Salep

1) Uji Organoleptis

Uji ini dilakukan dengan mengamati warna, bentuk dan bau dari sediaan salep yang dibuat serta dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Lidyawati, Hidayati & Ceriana, 2021).

2) Uji Homogenitas

Sejumlah salep dioleskan pada plat kaca kemudian amati homogenitasnya serta dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Salep yang homogen ditandai dengan tidak adanya gumpalan pada pengolesan, dan warna yang seragam (Megawati, Ummah & Setiawan, 2020).

3) Uji pH

Sejumlah 0,5 g salep dilarutkan kedalam 5 mL aquadest, kemudian diukur pH nya menggunakan stik pH serta dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Sediaan salep pH yang baik yaitu 4,5-6,5 (Samirana & Arisanti, 2019).

4) Uji Daya Sebar

Sejumlah 0,5 g salep diuji daya sebar pada kaca objek dengan diberi beban 100 g, diamkan selama 1 menit dan diukur diameternya

menggunakan penggaris. Selanjutnya diberikan beban 200 dan 300 g lalu diameter salep diukur kembali dengan menggunakan penggaris, uji ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Daya sebar salep yang baik yaitu 5-7 cm (Susanti, Hajrin & Hanifa, 2022).

5) Uji Daya Lekat

Sejumlah 0,5 g salep diuji daya lekatnya dengan meletakkan diatas gelas objek dan diberi beban 1 kg selama 5 menit. Kemudian dipasangkan alat pada gelas objek dan dicatat waktu saat kedua gelas obyek tersebut terpisah, uji ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Daya lekat salep yang baik yaitu tidak <4 detik (Hadi, Meilian & Ulfah, 2023).

3.6.3 Uji Efektivitas Penyembuhan Luka Sayat

Pada pengujian efektivitas penyembuhan luka sayat ini menggunakan hewan uji kelinci jantan galur *new zealand* sebanyak 3 ekor dengan umur 2-3 bulan dan memiliki berat badan \pm 2-2,5 kg. Sebelum pembuatan luka, kelinci dikarantina terlebih dahulu selama 5 hari guna membiasakan hidup di lingkungan baru dan diberi penanda pada telinga kelinci untuk memudahkan perbedaan tiap kelinci. Hewan uji diberi makan dan minum sesuai kebutuhan setiap hari, sehari sebelum pembuatan luka, punggung kelinci dibersihkan terlebih dahulu menggunakan alat pencukur bulu sampai bersih dari bulu kemudian dibuat 5 zona perlakuan dengan jarak antar zona 2 cm yang ditandai dengan spidol. Area yang telah dicukur dibersihkan dengan

menggunakan alkohol 70% dan dilakukan pembiusan menggunakan etil klorida spray pada punggung kelinci dan dibuat luka sayatan dengan menggunakan pisau bedah dengan panjang 2 cm dan kedalaman $\pm 0,2$ cm dengan memberi tanda pada pisau bedah yang telah diukur. Aplikasikan salep ekstrak temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) dengan konsentrasi 5% ; 10% dan 15%, kontrol positif dan kontrol negatif dengan cara dioleskan dua kali sehari (pagi dan sore) pada masing-masing kelinci dengan luka sayatan dan dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Kontrol negatif yang digunakan yaitu basis salep tanpa ekstrak, sedangkan untuk kontrol positif menggunakan salep betadine yang beredar di pasaran. Pengamatan penyembuhan luka sayat pada punggung kelinci dilakukan pada hari ke 0,2,4,6,8,10,12 dan 14 dengan melihat dan mengamati panjang ukuran penyembuhan luka menggunakan penggaris serta untuk mengetahui adanya udem, eritema maupun luka menutup. Perhitungan pengukuran luka sayat setelah diberikan perlakuan dapat dinyatakan dalam dx (cm), kemudian dapat dihitung persentase kesembuhan luka dengan menggunakan rumus: (Aprillyanti, Budiawan & Nugroho 2021; Djajanti & Asfi, 2018; Fazri, 2019; Megawati, Ummah & Setiawan 2020; Rahman *et al.*, 2017 dan Zonia, 2023).

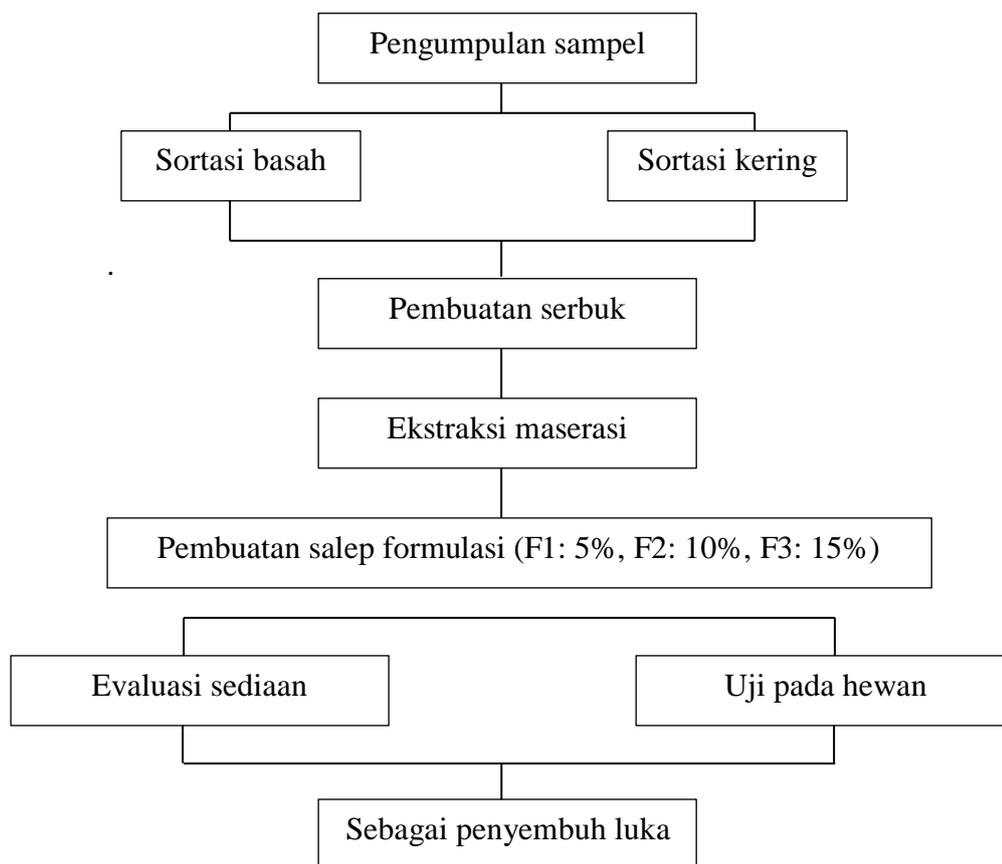
$$\% P = \frac{d_0 - dx}{d_0} \times 100\%$$

Keterangan:

P : Persentase penyembuhan luka

d0 : Panjang awal luka sayat

dx : Panjang luka sayat setelah diberi perlakuan

3.7 Kerangka Konsep Penelitian**Bagan 3.1 Kerangka Konsep Penelitian****3.8 Analisis Data**

Data hasil uji dilanjutkan dengan mengolah data menggunakan statistik SPSS untuk mengetahui normalitas dan homogenitas pada data penyembuhan luka sayat dan uji sediaan fisik salep yang meliputi daya lekat dan daya sebar dengan uji *One way anova* apabila kedua syarat uji anova terpenuhi yaitu data terdistribusi normal dan homogen. Apabila kedua syarat tidak terpenuhi maka digunakan analisis statistik dengan uji *Kruskal-wallis*

dan jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji *Mann-whitney*. Sedangkan untuk uji sifat fisik organoleptis, homogenitas dan pH dianalisis secara deskriptif.