

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Lokasi pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Teknologi Farmasi, Laboratorium Analisis Kimia, dan Laboratorium Bahan Alam Universitas An Nuur Purwodadi. Determinasi daun Katuk dilakukan di B2P2TOOT. Dan uji aktivitas sediaan salep terhadap proses penyembuhan luka sayat pada kelinci dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi. Dilakukan pada bulan Februari 2023-Agustus 2023.

B. Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini determinasi daun Katuk dilakukan di B2P2TOOT, sedangkan untuk proses esktraksi daun Katuk, skrining fitokimia, KLT, pembuatan salep, pengujian mutu fisik dan aktivitas sediaan untuk luka sayat dilakukan di Laboratorium Analisis Kimia, Bahan Alam serta Teknologi Farmasi Universitas An Nuur Purwodadi. Penelitian yang akan dilakukan bersifat eksperimental dan *post control randomized* yaitu dengan cara pengujian penyembuhan luka sayat pada kelinci menggunakan salep ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) merupakan tanaman obat yang memiliki potensi sebagai penyembuhan luka. Pertama yaitu pengambilan dan pembuatan serbuk. Serbuk simplisia yang sudah jadi di uji susut pengeringan dan kadar air. Ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) didapatkan dari ekstraksi maserasi, dimana ekstrak kental yang sudah didapatkan kemudian diuji bebas alkohol, skrining fitokimia dan KLT. Kemudian dibuat sediaan salep dan uji mutu fisik sediaan serta tipe krim, selanjutnya dilakukan pengujian terhadap penyembuhan luka sayat pada kelinci.

C. Populasi, Sampel dan Teknik Sampling

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan dari jumlah anggota dari suatu himpunan yang ingin diketahui karakteristiknya berdasarkan inferensi atau generalisasi. Daun Katuk didapatkan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Jawa Tengah, Indonesia.

2. Sampel

Sampel merupakan sebuah gugus atau sejumlah tertentu dari anggota himpunan yang dipilih dengan cara tertentu agar mewakili sebuah populasi. Sampel yang diambil dalam penelitian ini yaitu daun Katuk yang masih berwarna hijau segar dan tidak berwarna kuning.

3. Teknik Sampling

Sampling adalah cara pengambilan sejumlah sampel agar dapat mewakili karakteristik dan jumlah populasinya. Teknik yang digunakan dalam pengambilan sampel adalah purposive sampling yaitu pengambilan anggota sampel dari populasi dengan melakukannya kriteria-kriteria tertentu yang sesuai kita butuhkan.

D. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variable Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang menjadi sebab timbulnya atau berubahnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini ialah sediaan salep ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr).

2. Variable Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini ialah aktivitas luka sayat pada kelinci.

3. Variabel Control

Variabel control adalah variabel yang perlu disamakan atau dibuat konstan, sehingga tidak akan mempengaruhi hubungan variabel utama

yang diteliti. Variabel control dalam penelitian ini adalah jenis hewan uji, pemberian pakan, perawatan, kebersihan ruang, suhu dan pelarut.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Daun katuk adalah daun yang masih berwarna hijau segar yang diambil dari B2P2TOOT Tawangmangu.
2. Pembuatan serbuk simplisia, penetapan susut pengeringan, dan penetapan kadar air.
3. Ekstrak daun katuk didapatkan dari hasil ekstraksi dengan etanol 70% menggunakan metode maserasi.
4. Pengujian bebas alkohol, skrining fitokimia, dan KLT pada ekstrak daun katuk yaitu uji flavonoid, uji tannin, uji saponin.
5. Pembuatan sediaan salep ekstrak daun katuk dengan variasi basis salep.
6. Uji mutu sifat fisik sediaan salep yaitu uji organoleptis, uji homogenitas, uji daya sebar, uji daya lekat, uji ph, uji viskositas dan uji tipe krim.
7. Pengujian aktivitas sediaan salep ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.), control positif yaitu salep *povidone iodine* 10% dan kontrol negatif menggunakan sediaan salep yang hanya terdiri dari basis salep terhadap luka sayat yang ditunjukkan dengan cepatnya penyembuhan luka sayat.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang kelinci beserta tempat makan dan minum, *surgical blade steril* (pisau bedah), spidol, seperangkat alat maserasi, gunting, cukuran, timbangan analitik, sarung tangan, cuttonbud, masker, ayakan mess nomor 40, mortir, stamper, *hot plate*, batang pengaduk, cawan porselen, cup salep, gelas ukur, beaker glass, tabung reaksi, dan pipet tetes, botol timbang, alat destilasi, gelas piala, silika GF₂₅₄, pipa kapiler, alat KLT.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) yang diambil dari B2P2TOOT. Etanol 70%, vaselin album, adeps lanae, metil paraben, salep povidone iodine 10%, kelinci, H₂SO₄ pekat, asam asetat, asam klorida (HCl) pekat, magnesium (Mg), aquades, air, besi (III) klorida (FeCl₃), toluene, metilen biru, n-butanol, asam asetat, air, kuersetin, sitroborat, kloroform, methanol, sapogenin, *Lieberman bouchard*, asam stearate, FeCl₃ 5%, katekin.

G. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bahan uji dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan kebenaran bahan yang akan digunakan pada penelitian. Maksud dari determinasi adalah mencocokkan ciri-ciri morfologi tanaman dengan referensi dalam literatur. Determinasi daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) pada penelitian ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Jawa Tengah, Indonesia.

2. Pengambilan dan Pembuatan Serbuk Simplisia

Daun katuk diambil dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Jawa tengah. Bagian tumbuhan yang digunakan untuk penelitian adalah daun muda dan daun tua memiliki ciri-ciri yaitu bagian atas dan bawah daun masih segar, tidak layu, berwarna hijau dan daun yang masih utuh atau tidak rusak. Daun katuk segar yang masih basah disortir dan dicuci dengan air hingga bersih, kemudian tiriskan dan sortasi kering. Selanjutnya keringkan daun katuk menggunakan oven dengan suhu 40°C. Simplisia yang sudah kering kemudian dijadikan serbuk yaitu dengan cara diblender sampai halus dan diayak menggunakan ayakan mesh nomor 40. Kemudian serbuk yang diperoleh ditimbang.

3. Penetapan Susut Pengeringan

Penetapan susut pengeringan dilakukan menggunakan alat moisture balance. Moisture balance dinyalakan dan dipanaskan selama 10 menit. Setelah 10 menit alat diatur dengan menekan menu, dipilih metode yang akan digunakan. serbuk daun katuk dimasukkan ke dalam wadah sampel di dalam moisture balance dan diratakan. Moisture balance ditutup kemudian ditunggu hingga alat berbunyi. Apabila alat berbunyi menandakan proses pemanasan sudah selesai (Andriani, 2022).

4. Ekstraksi

Pembuatan ekstrak etanol daun Katuk dilakukan dengan cara maserasi yaitu sebanyak 1000 g serbuk simplisia dimasukkan kedalam wadah, kemudian direndam dengan larutan etanol 70% dengan perbandingan 1:10 sebanyak 10 L. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Saring maserat dengan kertas saring. Filtrat 1 kemudian digunakan kembali untuk dilakukan maserasi kedua dengan pelarut etanol 70% sebanyak 5 L. Kumpulkan hasil maserat, kemudian diuapkan menggunakan *Rotary Evaporator* dengan suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental etanol daun katuk. (Kemenkes RI, 2017).

5. Uji Bebas Alkohol

2 tetes ekstrak etanol daun Katuk dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 3 tetes H_2SO_4 pekat dan asam asetat serta memanaskannya, amati perubahan bau yang terjadi. Jika berbau ester maka masih belum terbebas dari alkohol, tetapi jika baunya khas ekstrak makan ekstrak tersebut sudah terbebas dari alkohol atau tidak lagi mengandung alkohol (Afikoh, 2017).

6. Skrining Fitokimia

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif yang dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung didalam ekstrak daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) meliputi :

a. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 5 ml etanol dan dipanaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi. Setelah dipanaskan, kemudian ditambahkan 10 tetes asam klorida (HCl) pekat. Lalu ditambahkan 0,2 g serbuk magnesium (Mg). adanya flavonoid ditunjukkan timbulnya warna merah, jingga, dan kuning (Pangow, 2018).

b. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) ditambahkan dengan 10ml aquades kemudian dikocok selama kurang lebih 1 menit, lalu tambahkan dengan 2 tetes HCl. Selanjutnya didiamkan selama 10 menit dan diamati buih atau busa yang terbentuk. Keberadaan senyawa saponin dalam sampel ditandai terbentuknya buih yang stabil selama 10 menit (Pangow, 2018).

c. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 10 ml air panas, kemudian ditetesi menggunakan besi (III) klorida (FeCl_3), keberadaan tannin dalam sampel ditandai dengan timbulnya warna hijau kehitaman (Pangow, 2018).

7. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase diam yang digunakan adalah silika GF₂₅₄ ukuran 6x3 cm, Ekstrak etanol daun katuk ditotolkan pada fase diam dengan bantuan pipa kapiler. Untuk fase gerak pada setiap senyawa diidentifikasi berdasarkan golongan senyawa :

a. Golongan Flavonoid

Fase gerak menggunakan n-butanol : asam asetat : air dengan perbandingan (4:1:5). Baku pembandingnya yaitu kuersetin dengan penampak noda pereaksi sempnot amonia dalam etanol (Devi, 2020).

Jika timbul warna hijau kuning, kuning, coklat, merah atau jingga, biru muda fluerensi hijau kuning atau hijau biru, fluerensi biru muda terang hingga muda setelah penyemprotan pereaksi sitroborat dalam etanol menunjukkan adanya uap ammonia flavonoid dalam ekstrak (Nirwana *et al.*, 2015).

b. Golongan Saponin

Fase gerak menggunakan kloroform : methanol : air dengan perbandingan (13:7:2), penampak noda menggunakan *Lieberman Bouchard* dan baku pembanding sapogenin. Positif mengandung saponin akan timbul warna hijau dan biru setelah penyemprotan *Lieberman Bouchard* (Nafisah *et al.*, 2014).

c. golongan Tannin

Fase gerak menggunakan n-butanol : asam stearate : air dengan perbandingan (4:1:5). Penampak noda berupa pereaksi FeCl_3 5% dengan baku pembanding katekin. Adanya kandungan tannin terbentuknya noda berearna hitam (Banu dan Nagarajan, 2014).

Setelah itu masing-masing dari fase gerak dimasukkan ke dalam chamber dibiarkan sampai jenuh. Lalu chamber dijenuhkan dengan kertas saring. Setelah jenuh silika GF₂₅₄ yang sudah ditotol dimasukkan kedalam chamber. Setelah noda sampai pada batas atas lempeng kemudian diambil dan diamati hasil bercak noda dibawah sinar UV₂₅₄ nm dan UV₃₆₆ nm (Gandjar dan Rohman, 2007). Kemudian masing-masing dari fase diam di oven dengan suhu 110°C selama kurang lebih 15 menit setelah itu disemprot menggunakan pereaksi semprot yang sudah ditentukan.

8. Pembuatan Salep

a. Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Daun Katuk

Pada penelitian ini akan dibuat sediaan salep ekstrak etanol daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) dengan variasi konsentrasi basis adeps lanae yaitu Salep akan dibuat formulasi 100 gram dengan tiga variasi konsentrasi basis sebagai berikut :

Nama bahan	Formulasi (%)				Ket.
	Basis	F1	F2	F3	
Ekstrak daun Katuk	-	2,4g	2,4g	2,4g	Zat aktif
Adeps lanae	15g	10g	12,5g	15g	Basis
Metil paraben	0,12g	0,12g	0,12g	0,12g	Pengawet
Vaselin album	Add 100g	Add 100g	Add 100g	Add 100g	Emolient

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan Salep

b. Pembuatan Salep Ekstrak Etanol Daun Katuk

Pembuatan salep dengan ekstrak daun Katuk terlebih dahulu dilakukan dengan penimbangan bahan-bahan yang akan dibutuhkan sesuai formulasi salep. Pertama masukkan masing-masing adeps lanae kedalam cawan, kemudian ditambahkan ekstrak daun Katuk 2,4g sedikit demi sedikit hingga ekstrak daun Katuk tercampur dengan basis. Tambahkan metil paraben dan gerus hingga homogen. Selanjutnya tambahkan vaselin album dan digerus hingga homogen kembali. Langkah terakhir sediaan salep ekstrak etanol daun Katuk dengan variasi basis 10%, 12,5% dan 15% dimasukkan kedalam pot salep dan diberi label (Paju *et al.*, 2013).

9. Uji Mutu Fisik Sediaan Salep

a. Uji Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna, dan bau yang diamati secara visual (Suardi *et al.*, 2008). Menurut Depkes RI, spesifikasi salep yang harus memenuhi syarat yaitu memiliki bentuk sediaan padat, warna harus sesuai dengan spesifikasi pada saat pembuatan awal salep dan bau tidak tengik (Sari *et al.*, 2016).

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas sediaan salep dilakukan dengan cara melakukan pengolesan salep sebanyak 0,5 g pada sekeping kaca atau bahan transparan lain yang cocok digunakan untuk susuan homogen.

Salep yang homogen ditandai dengan tidak terdapatnya gumpalan pada hasil pengolesan, struktur yang rata dan memiliki warna yang seragam dari awal pengolesan sampai akhir pengolesan, bagian atas, tengah dan bawah dari wadah salep (Sari *et al.*, 2016).

c. Uji Daya Sebar

Sebanyak 0,5 g salep diletakkan diatas kaca bulat lalu diletakkan satu kaca bulat lagi diatasnya dan dibiarkan kurang lebih selama 1 menit. Diameter sebar salep diukur, setelah itu 100 g beban ditambahkan diatas plat kaca lalu diamkan selama 1 menit, selanjutnya diukur diameter salep yang konstan (Pramitasari *et al.*, 2015). Diameter daya sebar salep yang baik antara 5-7 cm (Sari *et al.*, 2016).

d. Uji pH

0,5 g salep diencerkan dengan 10ml aquades. Elektroda pH meter dimasukkan ke dalam salep yang sudah diencerkan. pH larutan akan muncul dan terbaca di layar alat pH meter (Lumentut *et al.*, 2022).

e. Uji Daya Lekat

Sebanyak 0,25 g salep diletakkan diatas gelas obyek yang telah ditentukan luasnya. Kemudian gelas obyek yang lain diletakkan diatas salep tersebut. Salep diantara lempeng gelas obyek ditekan dengan beban 100 g selama 5 menit. Gelas obyek yang saling menempel dipasang pada alat uji daya lekat. Beban seberat 80 g dilepaskan, dicatat waktunya saat kedua gelas obyek tersebut terlepas (Rahmawati *et al.*, 2010).

f. Uji Viskositas

Pengujian viskositas ini menggunakan alat viskometer dengan rotor yang sesuai. Rotor diletakkan ditengah wadah salep yang berisi salep, kemudian alat dihidupkan, rotor mulai berputar. Secara otomatis jarum akan bergerak kekanan menunjukkan viskositas. Setelah stabil, kemudian dibaca viskositas pada skala yang ada pada viscometer tersebut (Soemarie *et al.*, 2017).

10. Uji Tipe Salep

Salep yang telah dibuat kemudian dimasukkan kedalam gelas piala, selanjutnya ditetesi beberapa tetes larutan metilen biru. Jika warna biru segera terdispersi keseluruh atau larut secara merata maka tipe salepnya yaitu M/A. Sebaliknya, jika warna biru tidak terdispersi seluruhnya atau tidak larut secara merata maka tipe salepnya adalah A/M (Sanjay, 2003).

11. Uji Luka Sayat

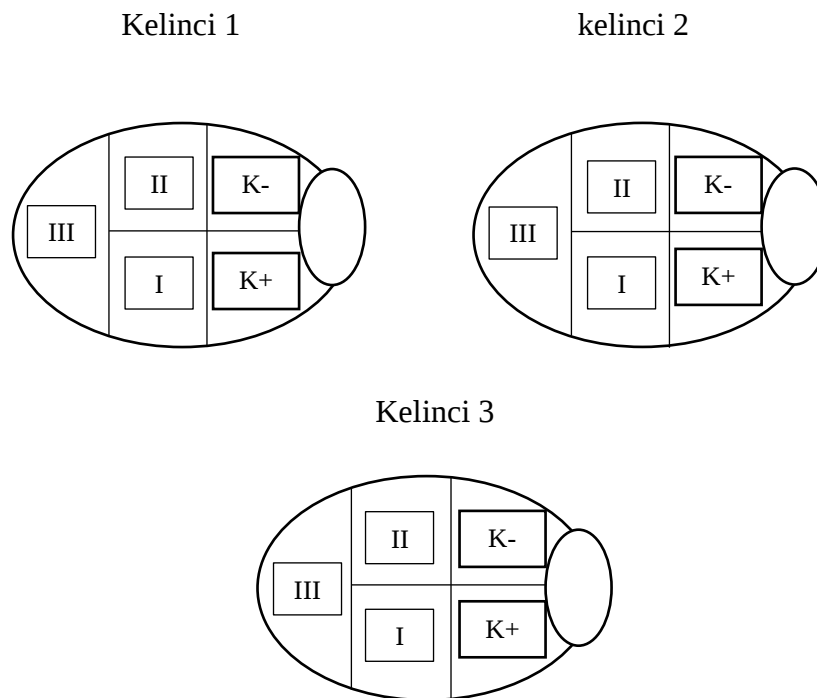
a. Perawatan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah kelinci jenis *New Zealand* sebanyak 3 ekor yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan antara 1,2-1,5 kg. Sebelum pembuatan luka, kelinci diaklimatisasi selama 5 hari dengan tujuan untuk membiasakan hidup pada lingkungan dan perlakuan yang baru. Setiap hari kelinci diberi pakan yang bermutu, kandang juga dibersihkan setiap 2 hari sekali. (Megawati *et al.*, 2020).

b. Pengelompokan Hewan Uji

Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan yaitu tiga kelompok perlakuan, kelompok kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-).

- 1) Kelompok I : Pemberian kontrol positif (+) salep *povidon iodine* 10%.
- 2) Kelompok II : Pemberian kontrol negatif (-) basis salep tanpa ekstrak.
- 3) Kelompok III : Pemberian salep dengan komposisi basis seberat 10g.
- 4) Kelompok IV : Pemberian salep dengan komposisi basis seberat 12,5g.
- 5) Kelompok V : Pemberian salep dengan komposisi basis seberat 15g.



Ket :

K+ : kelinci diberikan *povidone iodine* 10%

K- : kelinci tidak diberikan ekstrak

I : kelinci diberikan basis salep 10%

II : kelinci diberikan basis salep 12,5%

III : kelinci diberikan basis salep 15%

Gambar 3.1 Pengelompokan Hewan Uji

c. Metode Pengujian Luka Sayat

Sehari sebelum pembuatan luka, punggung kelinci dibersihkan atau dicukur dari bulu sampai licin dengan dibuat 1 kelinci 5 luka sayat jarak cm dengan 3 pemberian perlakuan. Area yang sudah dicukur dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian diistirahatkan selama 24jam. Pada keesokan harinya, pada masing-masing bagian yang sudah ditandai kemudian disayat menggunakan *surgical blade steril* (pisau bedah) dengan panjang 2 cm dan kedalaman $\pm 0,2$ cm dengan cara memberi tanda pada pisau bedah yang telah diukur.

Pengolesan salep (F1 : kontrol positif, F2 : kontrol negatif, F3 : salep dengan basis 10%, F4 : salep dengan basis 12,5% dan F5 : salep

dengan basis 15%) pada setiap luka sayat dilakukan dua kali sehari pagi dan sore jam 09.00 dan 16.00. Kontrol positif yang digunakan adalah salep *povidone iodine* 10%, sedangkan kontrol negatif yang digunakan yaitu basis salep tanpa ekstrak. Pengamatan penyembuhan luka sayat pada kelinci dilakukan dengan cara melihat secara kasat mata selama 14 hari dan mengukur panjangnya penyembuhan luka menggunakan penggaris. Pengamatan dilakukan hingga luka dinyatakan sembuh.

d. Perlakuan Hewan Uji Setelah Penelitian

Prosedur perawatan dan perlakuan selama penelitian merupakan tanggung jawab atas tindakan manusiasi, hewan uji akan dilakukan euthanasia pada akhir penelitian. Euthanasia dilakukan secara manusiawi dengan cara meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan percobaan. Euthanasia dilakukan dengan tindakan dislokasi servikal untuk menewaskan hewan percobaan. Kemudian, cadaver hewan percobaan akan dimasukkan kedalam plastic, ditutup rapat dengan cara dibakar (Ridwan, 2013).

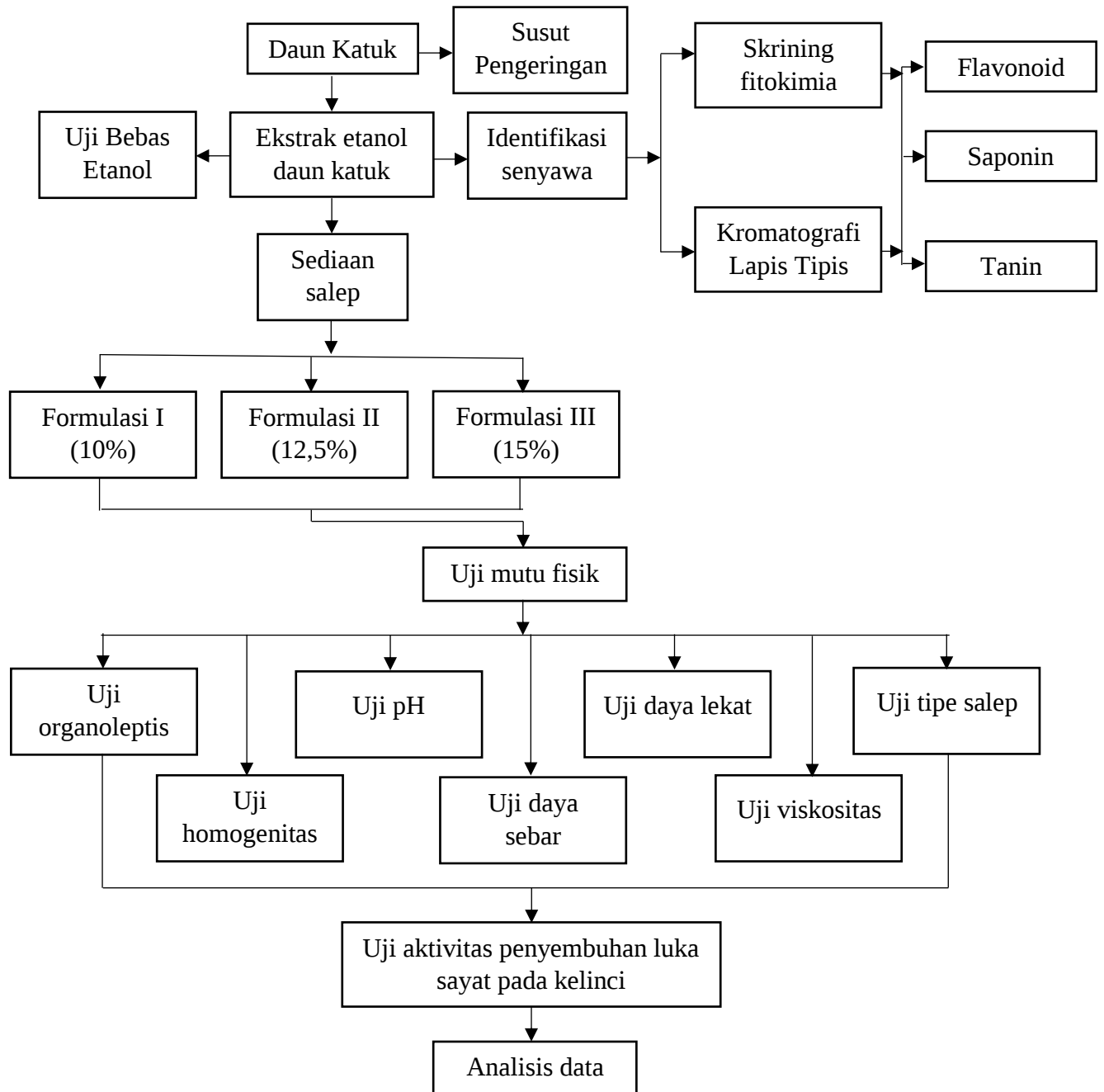
H. Analisis Data

Statistika adalah ilmu atau seni yang mengacu pada metode pengumpulan data, analisis data dan interpretasi hasil analisis untuk memperoleh informasi untuk kesimpulan dan keputusan. Metode statistik sering digunakan untuk menganalisis data dari suatu eksperimen yang terancang adalah teknik analisis varian atau sering disebut dengan ANOVA. Analisis varian adalah sebuah metode untuk memeriksa hubungan antara dua atau lebih data. Dengan kata lain, ada hubungan antara data dengan melakukan analisis varians. Analisis varian terkadang disebut dengan F-test. Karakteristik analisis varian adalah bahwa model ini terparameterisasikan secara lebih, artinya model ini mengandung lebih banyak parameter daripada yang diperlukan untuk mewakili efek yang diinginkan. Salah satu jenis analisis varian adalah *one-way* ANOVA. Analisis varians satu jalur atau satu arah adalah proses menganalisis data dari eksperimen beberapa tingkat faktor,

biasanya lebih dari tingkat faktor. Tujuan dari analisis ini adalah untuk mengidentifikasi variabel bebas yang penting dan bagaimana variabel tersebut dapat mempengaruhi respon (Fajrin *et al.*, 2016).

Analisis data hasil pengujian sediaan salep meliputi uji organoleptis, uji homogenitas, uji daya sebar, uji pH, uji daya lekat, uji viskositas, dan uji luka sayat. Data hasil uji organoleptis, uji homogenitas, uji daya sebar, uji pH, uji daya lekat, uji viskositas, dan uji luka sayat dianalisis menggunakan program SPSS. Data uji SPSS yang dianalisis diuji homogen menggunakan uji *Kolmogorov-smirnov* dan apabila didapatkan data yang terdistribusi homogen dan normal ($P > 0,05$), maka akan dilanjutkan uji parametrik *One Way ANOVA* dan uji *Post-Hoc*. Jika data tidak terdistribusi homogen dan normal, maka dilakukan analisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* (Halim, 2021).

I. Skema Kerja/Penelitian



Tabel 3.2 Kerangka Penelitian