

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran pada penelitian ini. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan emulgel minyak kulit kayu manis dengan *gelling agent* karbopol yang diperoleh dari PT. Darjeeling Sembrani Aroma.

Sampel merupakan sebagian dari populasi yang karakteristiknya hendak diteliti. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan emulgel minyak kulit kayu manis dengan variasi konsentrasi *gelling agent* karbopol 1%, 1,5% dan 2%.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pada penelitian ini yaitu minyak kulit kayu manis yang dibuat sediaan emulgel. Variabel utama yang kedua pada penelitian ini adalah hewan uji kelinci *new Zealand*. Variabel utama yang ketiga dalam penelitian ini adalah aktivitas anti luka sayat minyak kulit kayu manis pada hewan uji.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama mengidentifikasi dari semua variabel yang akan diteliti secara langsung. Variabel yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas merupakan variabel yang digunakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini yang akan diteliti adalah konsentrasi karbopol dalam proses penyembuhan luka sayat.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar dapat berulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel yang dimaksud dalam penelitian ini adalah cara kerja, proses pembuatan emulgel, suhu penyimpanan sediaan, kondisi hewan uji, alat dan bahan yang akan digunakan, serta proses penyembuhan luka sayat pada hewan uji.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini

adalah Carbopol 940 sebagai *gelling agent* dan waktu penyembuhan luka sayat pada punggung kelinci setelah diberikan perlakuan emulgel minyak kulit kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*).

### 3. Definisi operasional variable utama

Pertama, minyak kulit kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*) merupakan bahan aktif yang diperoleh dari PT. Darjeeling Sembrani Aroma mengandung senyawa sinamaldehyd, eugenol, dan kamper yang disertai dengan Certificate of Analysis.

Kedua, kelinci percobaan adalah kelinci galur *new zealand* jantan dengan berat 2–4 kg dan bagian punggung kelinci yang telah dicukur.

Ketiga, variasi konsentrasi *gelling agent* yang digunakan yaitu carbopol 940 1%, 1,5% dan 2%. *Gelling agent* adalah bahan tambahan yang digunakan sebagai bahan pembentuk gel.

Keempat, konsentrasi minyak kulit kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*) yang diformulasikan ke dalam sediaan emulgel adalah 5%

Kelima, uji sifat fisik sediaan emulgel adalah pengujian sediaan yang dibuat berdasarkan pengamatan organoleptis, homogenitas, pH, viskositas daya sebar, dan daya lekat pada suhu ruang. Sediaan emulgel dikatakan memiliki mutu fisik yang baik ketika :

**3.1 Organoleptis.** Uji organoleptis adalah pengujian dari sediaan emulgel minyak kulit kayu manis dengan memperhatikan warna, bentuk dan bau dari sediaan emulgel yang sesuai dengan harapan yaitu mudah dan nyaman digunakan, warna yang menarik, bau yang baik, konsistensi yang nyaman dan aman untuk digunakan (Voigt, 1994)

**3.2 Uji Homogenitas.** Uji homogenitas bertujuan untuk mengetahui ketercampuran zat aktif dengan basis serta bahan tambahan lainnya tercampur merata agar sediaan dapat bekerja dengan efektif. Dilakukan dengan cara mengamati sediaan yang dioleskan tipis pada kaca transparan.

**3.3 Pengujian pH.** pH kulit berkisar antara 4,5-6,5 sehingga sediaan emulgel harus disesuaikan dengan pH kulit. Sehingga tujuan dari uji pH yaitu untuk melihat apakah sediaan emulgel minyak kulit kayu manis sudah sesuai dengan standar pH kulit (Daud dan Suyanti, 2017).

**3.4 Uji Viskositas.** Viskositas dari suatu sediaan sangat mempengaruhi sediaan maupun terdistribusinya obat ke dalam tubuh. Dilakukan uji viskositas agar dapat menentukan nilai kekentalan suatu zat. Semakin tinggi nilai viskositas maka semakin tinggi tingkat kekentalan sediaan emulgel. Nilai viskositas semi solid yang baik berkisar 40-400 dPas (Puspitasari, 2018).

**3.5 Uji daya sebar.** Daya sebar yang diharapkan untuk sediaan emulgel yaitu 5-7 cm. Uji daya sebar bertujuan untuk mengetahui kemampuan emulgel menyebar secara merata pada permukaan kulit ketika digunakan (Handayani, 2018).

**3.6 Uji daya lekat.** Tujuan dari uji daya lekat yaitu mengetahui waktu emulgel melekat pada kulit, semakin lama waktu sediaan mampu melekat pada kulit maka jumlah zat aktif yang dilepaskan untuk penetrasi ke dalam tiap lapisan kulit juga semakin banyak. Standar dari daya lekat sediaan semi solid yaitu lebih dari 1 detik (Afianti, 2015).

**3.7 Uji tipe emulsi dengan metode pemberian warna.** Pengujian ini dilakukan dengan tujuan membuktikan bahwa sediaan yang dibuat merupakan tipe emulsi minyak dalam air (M/A) atau tipe emulsi air dalam minyak (A/M) yang dilakukan dengan metode pewarnaan.

Keenam, uji stabilitas pada emulgel dilakukan dengan metode *cycling test* dimana uji ini dilakukan untuk mengetahui kestabilan fisik sediaan selama masa penyimpanan dalam waktu tertentu terhadap perubahan suhu yang ekstrim. Hasil penelitian jika menunjukkan tidak mengalami perubahan setelah melewati 6 siklus maka dapat dikatakan emulgel stabil.

Ketujuh, kecepatan penyembuhan luka adalah satuan laju per waktu luka pada hewan uji dapat sembuh yang ditandai dengan parameter penutupan luka.

Kedelapan, uji aktivitas penutupan luka yaitu pengujian penutupan luka sayat pada punggung kelinci yang telah diberikan perlakuan pemberian sediaan emulgel minyak kulit kayu manis dengan variasi gelling agent yang ditunjukkan dengan hasil penutupan luka sayat.

Kesembilan, formula emulgel minyak kulit kayu manis dengan sifat fisik yang memenuhi standar serta stabil juga dapat memberikan efek penyembuhan luka pada luka sayat dan setara dengan kontrol positif merupakan formula terbaik.

### C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

#### 1. Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah piknometer, beaker glass, batang pengaduk, mortir, stamper, penangas air, object glass, stopwatch, cawan porselin, pipet tetes, sendok tanduk, wadah sediaan emulgel, viskometer, alat uji daya sebar, pH meter, alat uji daya lekat, kandang hewan uji, oven, kulkas, tempat minum, penggaris, alat cukur, timbangan digital, tabung reaksi.

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah minyak kulit kayu manis dan carbopol 940 . Bahan tambahan untuk pembuatan emulgel yaitu propilen glikol, paraffin cair, Tween 80, Span 80, metil paraben, propil paraben, trietanolamin (TEA), aquades dan povidon iodine 10% sebagai kontrol positif.

#### 3. Hewan Uji

Pada penelitian ini menggunakan hewan uji kelinci jantan (galur new zealand) berusia 2 – 3 bulan, berat 2 – 4 kg, mau makan dan minum. Tidak terdapat edema dan eritema pada kulit punggung kelinci.

### D. Rencana Jalannya Penelitian

#### 1. Pengambilan Sampel

Minyak kulit kayu manis pada penelitian ini diperoleh dari PT. Darjeeling Sembrani Aroma, Kabupaten Bandung, Jawa Barat.

#### 2. Karakteristik minyak kulit kayu manis

**2.1 Organoleptis.** Minyak kulit kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*) dilakukan dengan mengamati secara visual warna, rasa dan bau dari minyak kulit kayu manis. Pemeriksaan warna minyak dengan ditempatkannya sampel dalam wadah berbahan kaca yang bersih dan jernih. Minyak atsiri memiliki rasa dan bau khas sesuai dengan tanaman asalnya, serta mudah menguap pada suhu kamar (Gunawan dan Mulyani, 2004)

**2.2 Bobot jenis.** Bobot jenis merupakan perbandingan berat suatu volume minyak pada suhu 25<sup>0</sup>C dengan berat air pada volume dan suhu yang sama. Bobot jenis ditetapkan dengan cara menimbang botol yang sudah dikeringkan terlebih dahulu, selanjutnya hasil penimbangan dicatat. Minyak kulit kayu manis ditimbang dalam botol timbang dan catat hasilnya. Data hasil penimbangan botol ditimbang dan minyak kulit kayu manis dikurangkan bobot botol timbang kosong sehingga didapatkan bobot minyak atsiri. Dilakukan perbandingan

antara bobot minyak dengan bobot air sehingga didapatkan bobot jenis dari minyak (Rohman dan Sumantri, 2018).

$$\text{Bobot jenis} = \frac{m_2 - m}{m_1 - m}$$

Keterangan :

m = massa piknometer kosong

m<sub>1</sub> = massa piknometer berisi air

m<sub>2</sub> = masa piknometer berisi minyak

**2.3 Indeks bias.** Pengukuran indeks bias bertujuan untuk mengetahui kualitas suatu larutan seperti minyak kulit kayu manis atau dengan kata lain yaitu untuk menguji kemurnian minyak (Wijaya, 2005). Indeks bias diukur dengan menggunakan alat refraktometer pada suhu 20<sup>0</sup>C. Langkah pertama yaitu pembersihan badan prisma dengan kapas yang dibasahi alcohol kemudian refraktomer diatur hingga garis dan skala tampak jelas. Catat suhu ruang tempat kerja lalu teteskan minyak yang diukur pada prisma dan akan muncul garis terang lalu dibaca skala dan catat indeks biasnya (Irawan, 2009).

### 3. Identifikasi minyak kulit kayu manis.

#### 1.1 Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS).

Minyak atsiri kulit kayu manis diidentifikasi dengan menggunakan alat GC-MS yang otomatis dilakukan melalui komputer. 1 ml minyak kulit kayu manis dimasukkan dalamz vial dan diencerkan dengan n-heksan. Dengan bantuan computer yang tersambung ke alat GC-MS akan bekerja sesuai dengan program dan akan menghasilkan peak sebagai hasil dari kandungan minyak atsiri kulit kayu manis setelah beberapa menit.

#### 4. Formula emulgel minyak kulit kayu manis.

Emulgel yang dibuat dengan zat aktif yaitu minyak kulit kayu manis. Formula dirancang dengan konsentrasi minyak kulit kayu manis yaitu 5% serta karbopol sebagai gelling agent dengan konsentrasi 1%, 1,5%, dan 2%. Rancangan formula emulgel anti luka sayat minyak kulit kayu manis dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Formula emulgel minyak kulit kayu manis**

Bahan	Fungsi	K(-) (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
<b>Minyak kulit kayu manis</b>	Bahan aktif	-	5	5	5
<b>Karbopol 940</b>	<i>Gelling agent</i>	1/1.5/2	1	1,5	2
<b>TEA</b>	Pembasa	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Parafin cair</b>	Fase minyak	5	5	5	5
<b>Propilen glikol</b>	<i>Humectant</i>	10	10	10	10
<b>Span 80</b>	Emulgator	0,42	0,42	0,42	0,42

Bahan	Fungsi	K(-) (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
<b>Tween 80</b>	Emulgator	1,08	1,08	1,08	1,08
<b>Metil paraben</b>	Pengawet	1,18	1,18	1,18	1,18
<b>Propil paraben</b>	Pengwet	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>Aquades ad</b>	Pelarut	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

Keterangan :

K(-) = emulgel tanpa minyak kulit kayu manis dan karbopol 1%, 1,5%, 2% sebagai kontrol negatif

F1 = emulgel minyak kulit kayu manis konsentrasi 5 % dan karbopol 940 1%

F2 = emulgel minyak kulit kayu manis konsentrasi 5% dan karbopol 940 1,5%

F3 = emulgel minyak kulit kayu manis konsentrasi 5% dan karbopol 940 2%

## 5. Cara kerja pembuatan emulgel minyak kulit kayu manis

**5.1 Pembuatan basis gel.** Gelling agent yaitu karbopol 940 didispersikan dengan aquadest selama 1 jam. Kemudian tambahkan TEA secukupnya untuk menetralkan pH karbopol, aduk hingga terbentuk massa gel 10-15 menit (Suryani *et al.*, 2019).

**5.2 Pembuatan emulsi.** Siapkan fase minyak yang terdiri dari paraffin cair, span 80 dan propil paraben dalam beaker glass lalu diletakkan pada *hot plate* dengan suhu 60-70<sup>0</sup>C. setelah itu siapkan fase air yang terdiri dari campuran metil paraben, propilen glikol, tween 80, dan aquades dalam beaker glass panaskan dengan suhu 60-70<sup>0</sup>C. Tuang fase air kedalam fase minyak lalu aduk secara konstan hingga terbentuk emulsi. Setelah emulsi terbentuk dan suhu mulai menurun antara 30-40<sup>0</sup>C tambahkan minyak kulit kayu manis lalu lakukan pengadukan hingga terbentuk emulsi yang homogeny (Riski *et al.*, 2016).

**5.3 Pembuatan emulgel.** Emulgel dibuat dengan cara emulsi yang tadinya sudah ditambahkan minyak kulit kayu manis dicampur kedalam gel lalu aduk dengan kecepatan yang konstan hingga homogeny dan terbentuk massa emulgel yang dikehendaki (Riski *et al.*, 2016).

## 6. Pengujian mutu fisik emulgel

**6.1 Uji Organoleptis.** Uji organoleptis yaitu dilihat secara visual bentuk, warna, bau serta konsistensi dari sediaan emulgel yang sudah dicampur dengan beberapa komponen (Handayani *et al.*, 2012)

**6.2 Uji Homogenitas.** Sampel diambil dalam jumlah tertentu lalu dioleskan pada objek glass kemudian diamati apakah terdapat butiran-butiran kasar yang menunjukkan sediaan belum homogen. Pengujian dilakukan pada hari pertama setelah sediaan dibuat.

**6.3 Uji pH.** Digunakan pH meter yang sudah dikalibrasi untuk mengetahui kadar keasaman dari sediaan emulgel dengan cara menyelupkan alat (elektroda) pada sediaan emulgel yang diuji lalu tunggu beberapa detik dan amati sampai layar stabil kemudian catat nilai pH yang muncul pada layar. Standar nilai pH yang dapat diterima pada kulit yaitu 4-7,5 (Aswal, 2013). Pengujian dilakukan pada hari pertama setelah sediaan dibuat.

**6.4 Uji Viskositas.** Uji Viskositas emulgel dengan menggunakan alat viscometer. Langkah pertama yaitu pasang viscometer pada klem searah horizontal atau tegak lurus dengan arah klem. Pasang rotor pada alat lalu menguncinya ke arah berlawanan jarum jam. Siapkan sediaan emulgel pada posisinya lalu nyalakan viscometer dan rotor akan mulai berputar, biarkan beberapa saat sampai jarum penunjuk stabil pada angka tertentu. Pengujian viskositas pada emulgel dilakukan pada hari pertama setelah sediaan dibuat.

**6.5 Uji daya sebar.** Ambil sediaan emulgel lalu letakkan sebanyak 1 gram pada kaca bulat dibagian tengah lalu tutup dengan kaca bulat lainnya. Diamkan selama 1 menit lalu ukur diameter sebar emulgel. Selanjutnya berikan beban secara bertahap 50 gram, 100 gram dan 150 gram dengan masing-masing waktu yaitu 1 menit lalu ukur diameter sebar emulgel. Proses ini dilakukan dengan replikasi sebanyak 3 kali setiap formula. Pengujian dilakukan pada hari pertama setelah sediaan dibuat. Nilai daya sebar uji yang baik yaitu 5-7 cm (Febriani *et al.*, 2020).

**6.6 Uji daya lekat emulgel.** Pengujian daya lekat pada sediaan emulgel dengan menggunakan alat tes daya lekat. Langkah pertama ambil sediaan yang akan diuji sebanyak 1 gram diletakkan diatas kaca objek lalu ditutup dengan kaca objek lainnya. Tambahkan beban 1 kg diatas kaca objek selama 5 menit kemudian beban diangkat dan tuas ditarik bersamaan dengan stopwatch yang dinyalakan dan catat waktu hingga kaca objek terlepas. Lakukan dengan 3 kali replikasi (Puspitasari dan Setyowati, 2018) Pengujian dilakukan pada hari pertama setelah sediaan dibuat.

**6.7 Uji tipe emulsi dengan metode pemberian warna.** Pengujian tipe emulsi dilakukan dengan penambahan *metilen blue* pada sediaan. Hasil jika menunjukkan warna biru yang dominan maka dapat dikatakan tipe emulsi minyak dalam air (M/A). Emulgel selain itu juga

ditambahkan sudan III jika muncul warna merah dominan maka dikatakan tipe emulsi yaitu air dalam minyak (A/M).

### 7. Uji stabilitas emulgel.

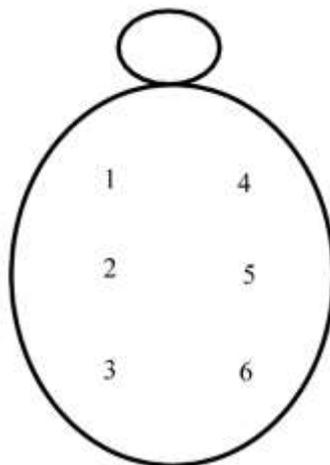
Uji stabilitas emulgel dilakukan dengan metode *cycling test* dengan tujuan untuk mengetahui kestabilan fisik sediaan selama masa penyimpanan dalam waktu tertentu terhadap perubahan suhu yang ekstrim. Sediaan emulgel disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam lalu dipindahkan ke dalam oven bersuhu 40°C selama 24 jam. Waktu selama penyimpanan 2 suhu tersebut dikatakan 1 siklus. Percobaan diulangi selama 3 siklus kemudian dilakukan evaluasi sediaan meliputi organoleptis, pH dan viskositas pada awal dan akhir masa siklus, terjadi pemisahan fase atau tidak (Yani, 2016).

### 8. Pembuatan Luka Sayat.

Langkah pertama yang dilakukan yaitu menggunakan pisau cukur atau gunting untuk mencukur bulu kelinci. Sterilkan area luka sayat menggunakan alcohol swab 70% kemudian ambil *scalpel* yang sudah diberi stopper agar kedalaman merata pada semua hewan uji yaitu  $\pm 0,5$  cm serta panjang luka 1,5 cm. Oleskan emulgel minyak kulit kayu manis dengan *cotton bud* pada punggung kelinci sebanyak 2 kali sehari.

### 9. Pengujian Efek Penyembuhan Luka Sayat emulgel minyak kulit kayu manis dengan karbopol 940 sebagai gelling agent.

Digunakan 5 kelinci jantan untuk pengujian efek penyembuhan luka sayat. Kelinci I, dibuat 5 area dengan luka sayat yaitu area (1,2,3,4,5,6) kemudian direplikasi juga pada kelinci II, III, IV dan IV sama dengan perlakuan pada kelinci I.



Gambar 18. Model lokasi pembuatan luka sayat di bagian punggung kelinci

Masing – masing luka sayat diberi perlakuan sebagai berikut :

**Tabel 2. Perlakuan Terhadap Hewan Uji**

<b>Area</b>	<b>Perlakuan</b>
1	Diberi <i>povidon iodine</i> 10% sebagai kontrol positif
2	Diberi emulgel tanpa minyak kulit kayu manis dengan karbopol 1,5%
3	Diberi emulgel minyak kulit kayu manis 5% dengan <i>gelling agent</i> carbopol 940 1%
4	Diberi emulgel minyak kulit kayu manis 5% dengan <i>gelling agent</i> carbopol 940 1,5%
5	Diberi emulgel minyak kulit kayu manis 5% dengan <i>gelling agent</i> carbopol 940 2 %
6	Diberi kontrol minyak kayu manis (zat aktif )

Pada luka sayat yang dibuat di punggung kelinci akan diberi sediaan emulgel dengan cara diolesi 2x sehari. Selanjutnya akan ditutup dengan kain kassa steril dan plaster untuk menghindari kontaminasi. Diamati dengan cara membuka kain kassa lalu ukur panjang luka dan ditutup kembali hingga luka sembuh. Lakukan pengamatan dimulai dari hari ke-1 sampai hari ke-14 yaitu hingga tahap proliferasi. Catat pada hari keberapa luka menutup secara sempurna.

#### **10. Pengukuran Efek Penyembuhan Luka Sayat**

Pada penelitian ini pengukuran terhadap efek penyembuhan luka dilakukan berdasarkan profil dari penyembuhan luka antara lain: waktu penutupan luka, dan penurunan atau pengecilan dari panjang luka yang dibuat pada punggung kelinci new Zealand. Luas area luka pada punggung kelinci diukur dimulai dari hari pertama hingga hari ke-14.

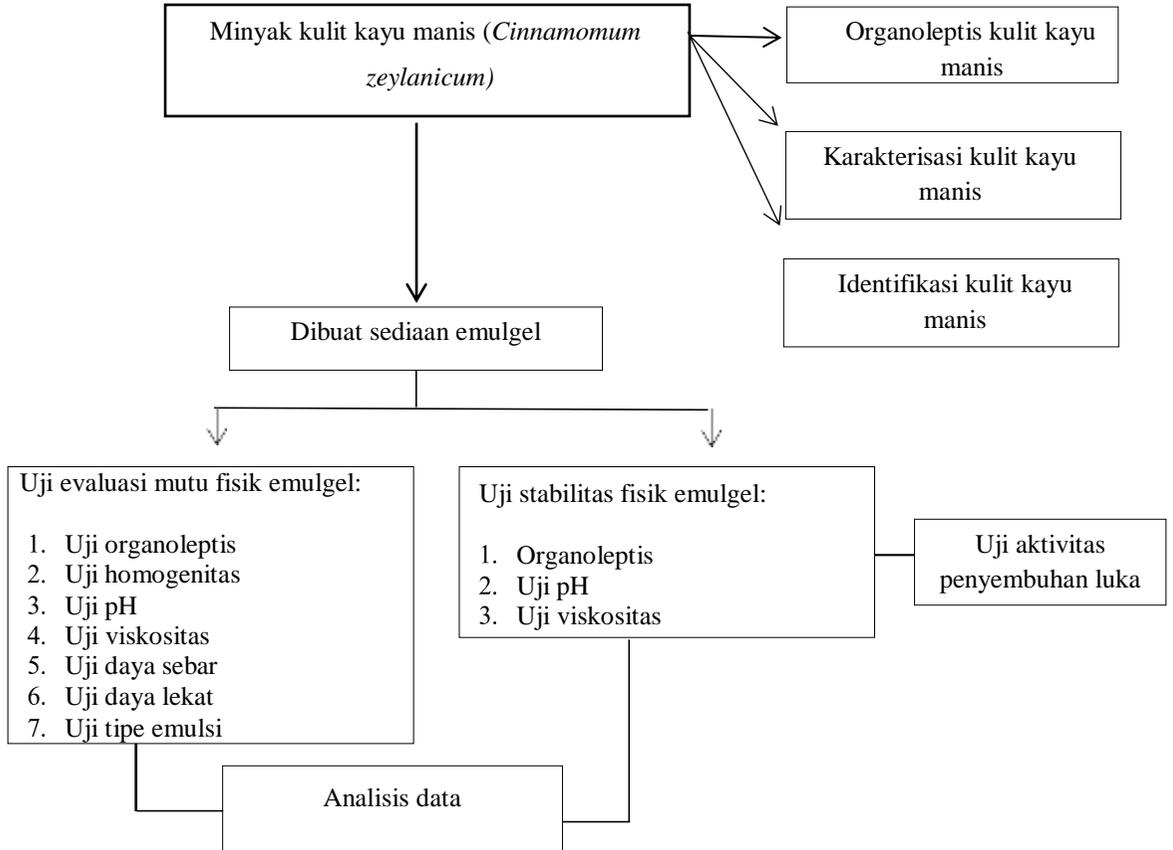
#### **E. Analisa Hasil**

Data yang telah terkumpul diproses dan dianalisis dengan langkah-langkah sebagai berikut :

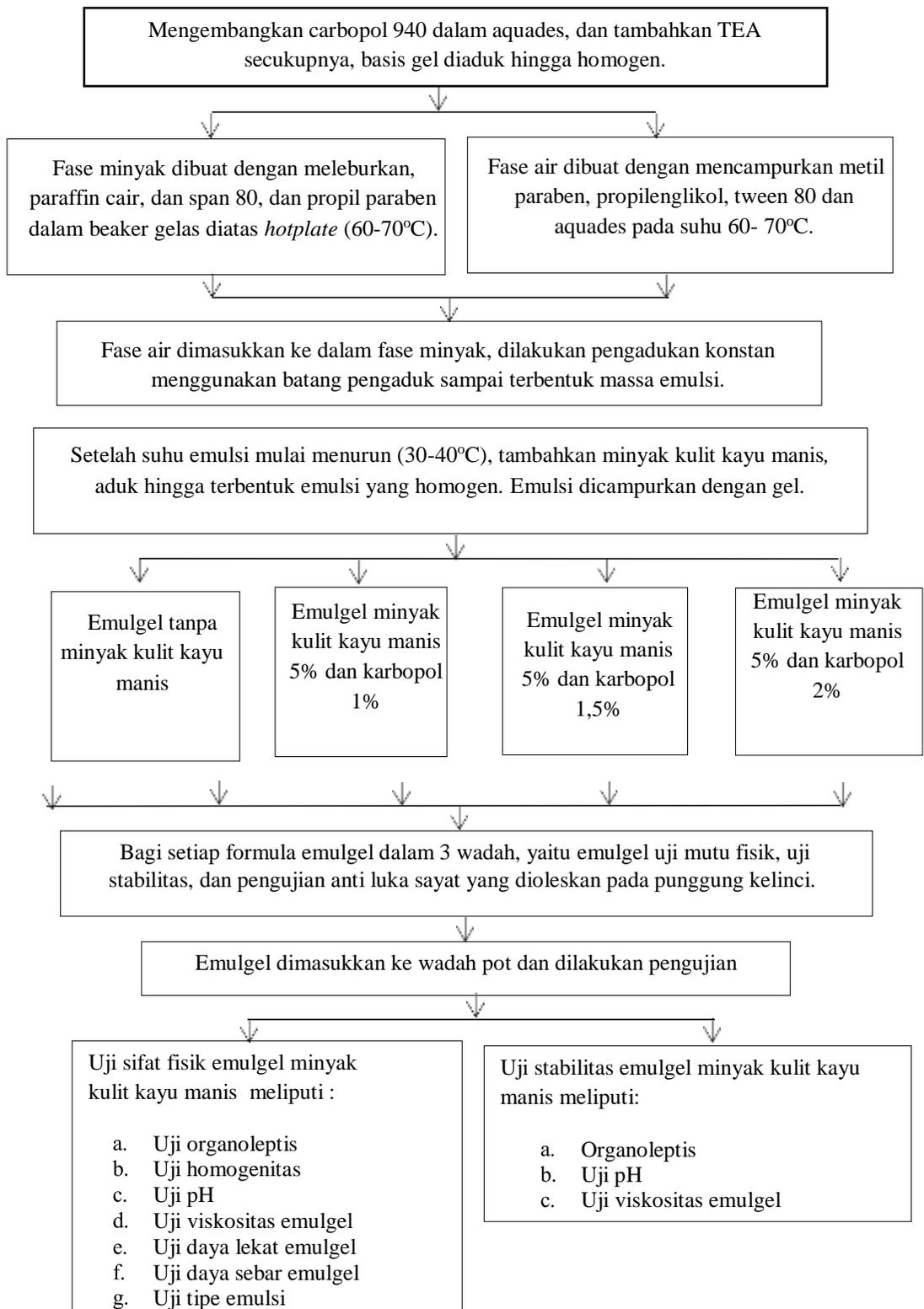
Pada data uji mutu fisik emulgel yaitu pH, viskositas, daya sebar dan daya lekat yang diperoleh dianalisis menggunakan *statistic Test of Normality* agar dapat dilihat distribusi normal data. Kemudian dilakukan uji *statistic One Way Anova* untuk melihat perbedaan keseluruhan yang dilanjutkan *uji Tukey* dan *independent sample t-test* .

Hasil uji aktivitas penyembuhan luka sayat hewan uji dengan parameter waktu penutupan luka, dan penurunan panjang luka. sebelum dan sesudah diolesi emulgel di uji dengan analisis ANOVA dilanjutkan *post hoc test Tukey*.

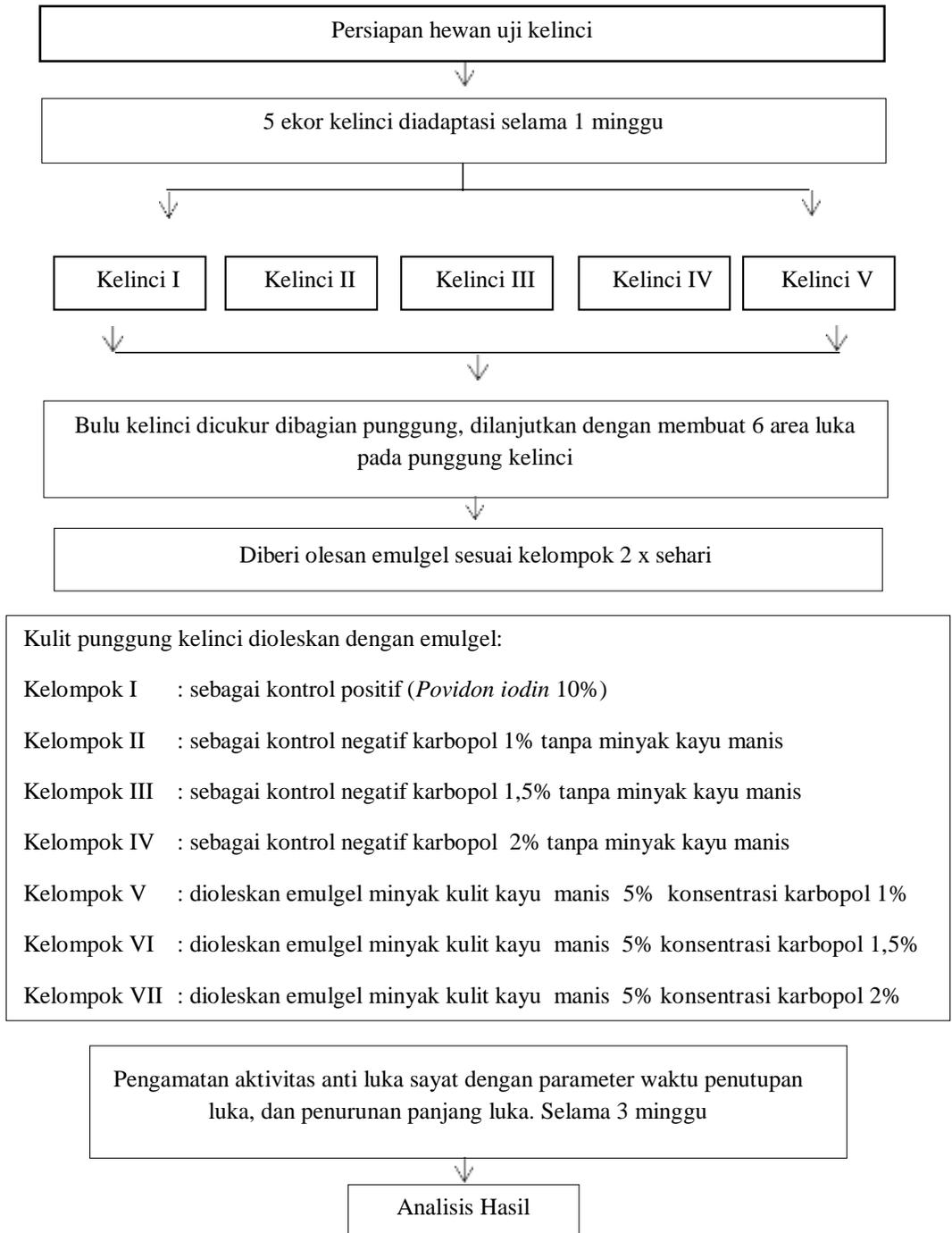
## F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 19. Skema jalannya penelitian



**Gambar 20. Skema Pembuatan dan pengujian sediaan emulgel minyak kulit kayu manis**



**Gambar 21. Skema pengujian efek penyembuhan luka sayat pada hewan kelinci**