

## **BAB III METODE PENELITIAN**

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

Populasi dalam penelitian ini adalah daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang diperoleh dari Desa Jatirejo, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia.

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang di buat dalam sediaan emulgel dengan konsentrasi ekstrak 10% dan variasi karbopol 0,8%, 1%, 1,2%.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variable utama**

Variabel utama pertama penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang diperoleh dengan teknik maserasi menggunakan pelarut etanol 70%

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah sediaan emulgel dari ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dengan variasi konsentrasi karbopol serta pengujian mutu fisik dan stabilitas dengan berbagai metode pengujian

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah aktivitas penyembuhan luka sayat emulgel dari ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dengan variasi konsentrasi karbopol 940 sebagai *gelling agent*.

#### **2. Klasifikasi variable utama**

Variabel utama terbagi dalam 3 jenis, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas yang sengaja dimodifikasi sehingga pengaruhnya pada variabel terikat dapat diketahui. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi karbopol 940 sebagai *gelling agent* dalam sediaan topikal emulgel

Variabel tergantung adalah inti permasalahan yang menggambarkan kriteria penelitian. Variabel tergantung dari penelitian ini yaitu mutu fisik, stabilitas, serta aktivitas penyembuh luka sayat pada sediaan emulgel ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dengan variasi konsentrasi karbopol 940.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat, dan kualifikasinya perlu dipastikan agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang secara tepat oleh peneliti

lain. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah alat dan bahan yang digunakan, proses pembuatan ekstrak, proses pembuatan emulgel, lingkungan, luas area luka yang dibuat, kedalaman pencukuran bulu, dan kondisi fisik hewan uji.

### 3. Definisi operasional variable utama

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) adalah bagian dari tanaman sirih hijau berwarna hijau dengan kondisi segar serta tidak terlalu tua atau tidak terlalu muda diambil secara acak di Desa Jatirejo, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia.

Simplisia daun sirih hijau adalah serbuk yang dibuat dengan proses pengeringan, penggilingan, dan pengayakan daun sirih.

Ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* L.) adalah ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Emulgel adalah sediaan yang diformulasikan dengan zat aktif yang sukar larut dalam air. Emulgel merupakan sediaan semi padat, berupa emulsi dengan penambahan *gelling agent* sehingga dihasilkan viskositas yang tinggi. Emulgel ekstrak daun sirih dibuat dengan 3 variasi konsentrasi karbopol 940 sebagai *gelling agent*.

Pengujian mutu fisik emulgel terdiri dari uji organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya lekat, daya sebar, dan tipe emulsi.

Uji stabilitas merupakan salah satu kriteria yang digunakan untuk mengetahui potensi suatu produk dalam penyimpanan metode yang digunakan yaitu metode *freeze thaw* dengan 6 siklus.

Uji aktivitas penyembuhan luka sayat merupakan kemampuan dari emulgel ekstrak etanol daun sirih hijau terhadap penyembuhan luka sayat yang dievaluasi dengan menggunakan panjang luka pada punggung kelinci.

Hewan percobaan yang digunakan adalah kelinci putih *New Zealand* berkelamin jantan.

Luka sayatan merupakan salah satu jenis luka terbuka dengan kerusakan pada kulit atau jaringan pembuluh yang cukup besar jika bentuk sayatan cukup dalam. Luka sayatan dibuat pada punggung kelinci dengan perkiraan panjang luka 2 cm dan kedalaman luka 2 mm sebanyak lima luka, lalu diamati panjang luka menggunakan penggaris dan diamati % kesembuhan luka sayat pada setiap kelinci.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain oven, timbangan analitik, blender, ayakan nomor mesh 40, botol maserasi, beaker glass, gelas ukur, batang pengaduk, cawan porselin, tabung reaksi, rotary evaporator, pot emulgel, mortar dan stamper, pH meter, objek *glass*, viscometer *Brookfield*, timbangan gram, *stopwatch*, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, wadah sediaan, pisau bedah, alat cukur bulu, penggaris, gunting, pembalut luka, masker, dan sarung tangan medis.

### 2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang diperoleh dari Desa, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci putih *New Zealand* yang telah diaklimatisasi selama 1 minggu kemudian dibuat luka sayat menggunakan pisau bedah sesuai dengan panjang 2 cm. Bahan lainnya yang digunakan dalam pembuatan emulgel yaitu etanol 70%, karbopol 940, trietanolamin (TEA), tween 80, span 80, propilen glikol, parafin cair, nipagin, nipasol, dan aquadest.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi tanaman daun sirih hijau

Determinasi tanaman dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan dilakukan penelitian, mencegah kesalahan dalam proses pengumpulan bahan, serta mencegah kemungkinan tanaman yang akan diteliti tercampur dengan tanaman lain. Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang digunakan dalam penelitian ini dideterminasi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia.

### 2. Pengambilan Bahan

Tanaman sirih hijau yang digunakan adalah daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dalam keadaan segar dengan daun berwarna hijau sempurna tidak terlalu tua atau tidak terlalu muda diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia.

### 3. Pembuatan serbuk simplisia

Daun sirih hijau (*Piper betle* L) kondisi segar yang telah diperoleh lalu dicuci dengan air mengalir, tiriskan, selanjutnya berat basah dari daun sirih hijau ditimbang dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C sampai 50°C hingga sampel kering. Sampel dikatakan kering bilang sudah rapuh (diperas menjadi hancur), lalu dilakukan sortasi kering dan timbang sampel sebagai berat kering yang akan dilakukan perhitungan presentase berat daun kering terhadap daun basah. Sampel kemudian di blender sampai menghasilkan serbuk kemudian di ayak dengan mesh nomor 40. Hasil dari serbuk simplisia disimpan dalam plastik yang tertutup rapat dan kering.

**3.1 Pemeriksaan organoleptis.** Pengujian ini memerlukan alat indra manusia untuk melakukan analisa meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes RI, 2000)

**3.2 Pemeriksaan susut pengeringan.** Pemeriksaan susut pengeringan pada daun sirih hijau dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* pada suhu 105°C. Metode ini dilakukan dengan menimbang serbuk simplisia daun sirih hijau sebanyak 2 gram, memasukkannya ke dalam alat, dan kemudian menunggu 4-5 menit hingga hasil pengukuran menghasilkan berat yang stabil. Hasil penetapan susut pengeringan yang baik adalah kurang dari 10% (Depkes RI, 2000).

**3.3 Penetapan kadar air.** Metode destilasi toluen digunakan untuk menentukan kadar air dari simplisia daun sirih hijau. Sejumlah 20 mL air digunakan untuk menjenuhkan toluena sebanyak 200 mL. Simplisia daun sirih hijau ditimbang sebanyak 20 g dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat lalu dilakukan penambahan toluen jenuh. Pemanasan labu dilakukan selama 15 menit sampai seluruh toluena mendidih dan dilanjutkan dengan penyulingan yang diatur pada kecepatan 2 tetes/detik, dilanjutkan dengan 4 tetes/detik. Setelah semua air disuling, dilanjutkan pemanasan selama lima menit. Tabung penerima dibiarkan dalam kondisi dingin hingga mencapai suhu kamar. Setelah toluena dan air benar-benar terpisah, volume air dapat diukur (Depkes RI, 2008).

### 4. Pembuatan ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* L.)

Metode maserasi digunakan untuk mengekstraksi simplisia daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dengan menimbang sebanyak 800 gram simplisia dan dimasukkan ke dalam botol maserasi berwarna coklat,

kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% hingga 8000 mL. Diamkan selama 24 jam sambil sesekali dilakukan pengadukan. Maserat yang dihasilkan disaring dengan menggunakan kain flanel steril kemudian ditampung dalam wadah. Filtrat yang dihasilkan kemudian dilakukan maserasi kembali dengan pelarut etanol 70% sebanyak 4000 mL (setengah jumlah volume pelarut yang pertama). Hasil ekstraksi digabungkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.

**4.1 Pemeriksaan organoleptis.** Pengujian ini memerlukan alat indra manusia untuk melakukan analisa meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes RI, 2000)

**4.2 Pemeriksaan susut pengeringan.** Pemeriksaan susut pengeringan pada daun sirih hijau dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* pada suhu 105°C. Metode ini dilakukan dengan menimbang serbuk simplisia daun sirih hijau sebanyak 2 gram, memasukkannya ke dalam alat, dan kemudian menunggu 4-5 menit hingga hasil pengukuran menghasilkan berat yang stabil. Hasil penetapan susut pengeringan yang baik adalah kurang dari 10% (Depkes RI, 2000)

**4.3 Uji bebas alkohol.** Ekstrak daun sirih hijau dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan CH<sub>3</sub>COOH dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Ekstrak dikatakan masih mengandung alkohol jika ada aroma khas dari alkohol

## **5. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun sirih hijau (Piper betle L)**

**5.1 Pembuatan larutan uji kandungan kimia.** Sebanyak 1 g ekstrak daun sirih hijau ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 100 mL etanol 70% dan digunakan sebagai larutan stok untuk uji mengidentifikasi kandungan kimia ekstrak daun sirih hijau.

**5.2 Alkaloid.** Sebanyak 2 mL Ekstrak daun sirih hijau dimasukkan ke dalam cawan porselen lalu dilakukan penguapan hingga terbentuk residu, dan ditambahkan 5 mL HCL 2 N. Larutan hasil dibagi dan ditambahkan dalam tiga tabung reaksi. Tabung pertama dilarutkan dengan HCL 2 N untuk digunakan sebagai blanko. Tiga tetes pereaksi Dragendorff ditambahkan ke tabung kedua dan tiga tetes pereaksi Mayer ditambahkan ke tabung ketiga. Keberadaan alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan jingga di tabung kedua dan endapan kekuningan di tabung ketiga (Lisdiani *et al.*, 2022)

**5.3 Flavonoid.** Sebanyak 2 mL larutan stok ekstrak daun sirih hijau dipanaskan  $\pm$  5 menit, lalu tambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 5 tetes HCl pekat, positif mengandung flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning atau warna jingga hingga kemerahan (Lisdiani *et al.*, 2022)

**5.4 Tanin.** Sebanyak 2 mL larutan stok ekstrak daun sirih hijau ditambahkan dengan beberapa tetes larutan besi (III) klorida. Positif tanin ditunjukkan dengan adanya warna biru tua atau hitam kehijauan

**5.5 Saponin.** Larutan stok ekstrak daun sirih hijau diambil sebanyak 5 mL dan ditambahkan dengan 5 mL air panas kemudian dikocok dengan kuat, keberadaan saponin dilihat selama kurang lebih 10 menit akan terbentuk busa dengan tinggi busa 1-10 cm dan tidak menghilang (Lisdiani *et al.*, 2022)

## 6. Rancangan komposisi emulgel ekstrak daun sirih hijau

Penelitian ini menggunakan 3 formula dengan konsentrasi dosis ekstrak daun sirih sebanyak 10% yang dibuat menjadi sediaan emulgel. Penelitian ini menggunakan komponen zat aktif ekstrak daun sirih dengan konsentrasi mengacu dari penelitian terdahulu oleh peneliti (Palumpun *et al.*, 2017) menyatakan konsentrasi ekstrak daun sirih hijau 10% secara topikal dapat mempercepat penyembuhan luka dengan peningkatan ketebalan epidermis serta jumlah fibroblas dan kolagen pada luka tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan.

Formula emulgel ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L) dibuat dengan 3 variasi konsentrasi *gelling agent* karbopol 940. Rancangan komposisi dalam pembuatan sediaan emulgel ekstrak daun sirih hijau sebagai penyembuhan luka sayat tersedia pada tabel 1.

**Tabel 1. Rancangan komposisi sediaan emulgel ekstrak daun sirih hijau**

| Bahan                           | F0   | F1   | F2   | F3   | Fungsi        |
|---------------------------------|------|------|------|------|---------------|
| Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau | -    | 10   | 10   | 10   | Zat aktif     |
| Karbopol 940                    | 1    | 0,8  | 1    | 1,2  | Gelling agent |
| Parafin cair                    | 5    | 5    | 5    | 5    | Pembawa       |
| Tween 80                        | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 2,5  | Emulgator     |
| Span 80                         | 1    | 1    | 1    | 1    | Emulgator     |
| Metil paraben                   | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,18 | Pengawet      |
| Propilparaben                   | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | Pengawet      |
| Propilenglikol                  | 5    | 5    | 5    | 5    | Humektan      |
| Trietanolamin (TEA)             | 0,9  | 0,9  | 0,9  | 0,9  | Alkally agent |
| Aquadest                        | Ad   | Ad   | Ad   | Ad   | Pelarut       |
|                                 | 100  | 100  | 100  | 100  |               |

Keterangan :

|                      |  |
|----------------------|--|
| F0 (kontrol negatif) | : Basis emulgel tanpa ekstrak                                  |
| F1                   | : Emulgel ekstrak daun sirih hijau konsentrasi karbopol (0,8%) |
| F2                   | : Emulgel ekstrak daun sirih hijau konsentrasi karbopol (1%)   |
| F3                   | : Emulgel ekstrak daun sirih hijau konsentrasi karbopol (1,2%) |
| Kontrol positif      | : lukajel®   |

## 7. Pembuatan sediaan emulgel ekstrak daun sirih hijau

Pembuatan sediaan emulgel dilakukan dengan menimbang semua bahan berdasarkan formula pada tabel secara teliti dan sesuai. Pembuatan basis gel dimulai dengan karbomer 940 secara perlahan didispersikan dalam aquadest panas dan dilakukan pengadukan hingga terdispersi sempurna. TEA kemudian ditambahkan dalam basis gel campuran karbopol 940 sedikit demi sedikit hingga terbentuk masa gel, lalu dilanjutkan dengan pembuatan emulsi fase minyak dan fase air. Fase minyak dibuat dengan melarutkan span 80, parafin cair, dan propil paraben dalam cawan proselen di atas *waterbath* pada suhu 70°C, diaduk hingga homogen. Fase air dibuat dengan melarutkan tween 80, metilparaben, propilen glikol, dan aquadest dalam cawan proselen di atas *waterbath* pada suhu 70°C diaduk hingga homogen. Fase minyak ditambahkan secara perlahan ke fase air sambil diaduk hingga membentuk emulsi.

Ekstrak daun sirih hijau lalu ditambahkan ke dalam basis emulsi dan diaduk hingga homogen. Emulsi yang telah terbentuk ditambahkan ke dalam basis gel hingga membentuk emulgel ekstrak daun sirih hijau yang homogen dan dimasukkan dalam jar emulgel.

## 8. Pengujian mutu fisik sediaan emulgel ekstrak daun sirih hijau

**8.1 Uji organoleptis.** Pengujian dilakukan secara langsung dengan mengamati warna, bau, dan konsistensi

**8.2 Uji homogenitas.** Pengujian ini dilakukan dengan meletakkan sediaan pada objek glass lalu diratakan dan dilihat ada tidaknya butiran kasar.

**8.3 Uji pH.** Pengujian dilakukan dengan pH stick, melakukan kalibrasi elektroda lalu elektroda dimasukkan ke dalam sampel lalu amati nilai yang pada layar.

**8.4 Uji viskositas.** Pengujian dilakukan dengan meletakkan sampel ke dalam cup lalu di pasang pada alat *viscometer brookfield*. Amati jarum yang bergerak hingga menunjukkan nilai yang angka yang stabil dalam satuan dpa.s

**8.5 Uji daya lekat.** Pengujian dilakukan dengan menimbang 0,5 emulgel lalu tempatkan ditengah kaca berukuran 10x10 cm dan ditutup dengan kaca penutup yang sebelumnya sudah dilakukan penimbangan. Amati dan catat diameter emulgel yang menyebar setelah 1 menit. Selanjutnya, letakkan beban 50 gram didiamkan selama 1 menit lalu amati dan catat diameter emulgel yang menyebar

**8.6 Uji daya sebar.** Pengujian dilakukan dengan menimbang 1 gram emulgel plat kaca. Kemudian plat kaca lainnya diletakkan diatasnya lalu ditekan dengan beban seberat 1 kg selama 5 menit Waktu yang diperlukan kedua lempeng untuk terpisah dicatat, dan proses ini diulangi tiga kali untuk setiap formula (Faruki, 2021).

**8.7 Uji tipe emulsi.** Pengujian tipe emulsi pada sediaan emul ekstrak daun sirih hijau dengan menggunakan tiga metode.

**8.7.1 Metode pewarnaan.** Metode ini menggunakan zat warna air metilen biru dan zat warna minyak sudan III. Setiap wadah dimasukkan emulgel lalu ditambahkan dengan zat warna masing-masing, selanjutnya dioleskan pada objek glass dan amati dibawah mikroskop. Tipe emulgel (M/A) terjadi apabila warna biru dominan dan sebaliknya untuk tipe emulsi (A/M). Tipe emulgel (A/M) terjadi apabila warna merah dominan dan sebaliknya.

**8.7.2 Metode pengukuran daya hantar listrik.** Metode ini dilakukan menggunakan alat voltmeter dengan cara mencelupkan *probe* positif dan negeatif dari voltmeter ke dalam emulgel kemudian amati jarum pada layar, apabila bergerak maka tipe emulgel (M/A) dan sebaliknya.

**8.7.3 Metode pengenceran.** Metode ini menggunakan air dan minyak. Emulgel dicampur dengan air, jika tercampur homogen maka tipe emulsi (M/A) dan sebaliknya. Jika dicampurkan dengan minyak dan terjadi campuran homogen maka tipe emulsi (A/M) dan sebaliknya.

**8.8 Uji stabilitas.** Pengujian dilakukan dengan metode *freeze thaw* yaitu emulgel disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam kemudian disimpan pada suhu 40°C selama 24 jam (siklus pertama). Uji ini dilakukan sebanyak 6 siklus.

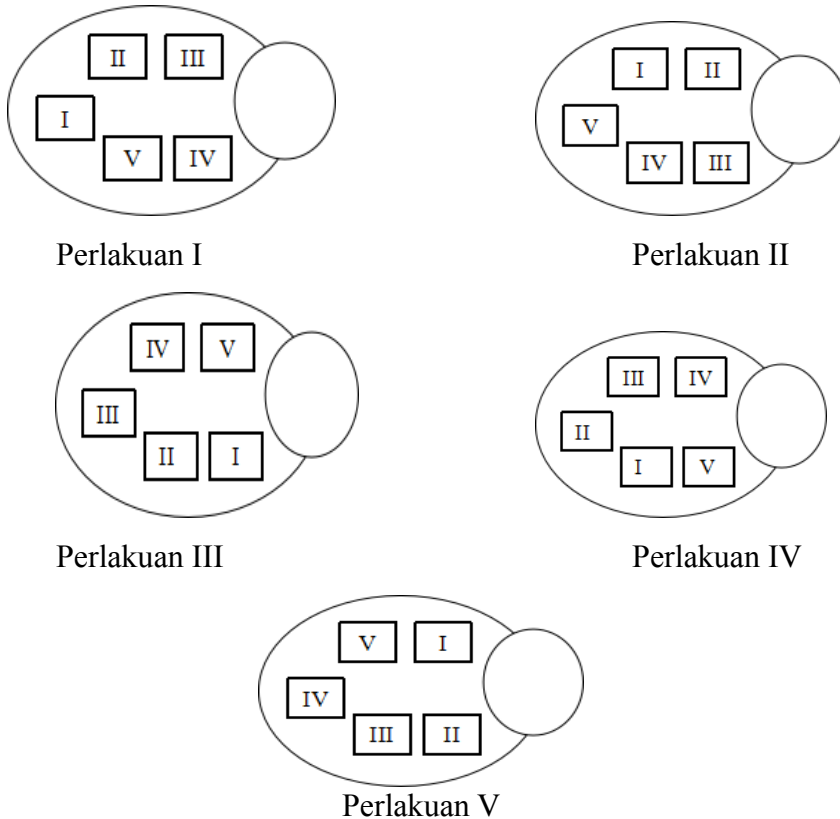
## **9. Pengelompokkan hewan uji**

Penelitian menggunakan sebanyak 5 ekor kelinci sebagai hewan uji. Kelinci percobaan yang digunakan memiliki standar berat badan antara 1500 hingga 3000 gram dan berusia antara 8 hingga 12 minggu.



Setiap kelinci menerima 5 perlakuan berbeda di lima lokasi luka pada area punggung.

- Perlakuan I : Kontrol positif (dioleskan lukajel®)
- Perlakuan II : Kontrol negatif (dioleskan basis emulgel)
- Perlakuan III : dioleskan formula 1
- Perlakuan IV : dioleskan formula 2
- Perlakuan V : dioleskan formula 3



**Gambar 11. Rancangan perlakuan pada kelinci**

Sebanyak 5 ekor kelinci putih dilakukan randomisasi lalu diaklimatisasikan di lingkungan tempat penelitian selama 7 hari. Kelinci yang digunakan adalah kelinci putih *New Zealand* jantan yang dibagi dalam 5 kelompok. Hari ke delapan, bulu disekeliling punggung kelinci dipangkas dan dihilangkan seluruhnya, sehingga memperlihatkan kulitnya. Kelinci kemudian diberi etil klorida sebagai anestesi dengan cara disemprotkan ke punggung kelinci sebanyak dua atau tiga kali, hingga kulit punggung kelinci menjadi berwarna putih. Kelompok kelinci diberi perlakuan sebanyak dua kali dalam sehari setiap pagi dan sore hari. Pengamatan pada penyembuhan luka sayat di

lakukan dengan melihat secara kasat mata adanya eritema, udem, dan penutupan luka serta pengukuran panjang luka dilakukan menggunakan penggaris. Penyembuhan luka pada kelinci percobaan diamati pada sore hari selama empat belas hari sampai sayatan sembuh.

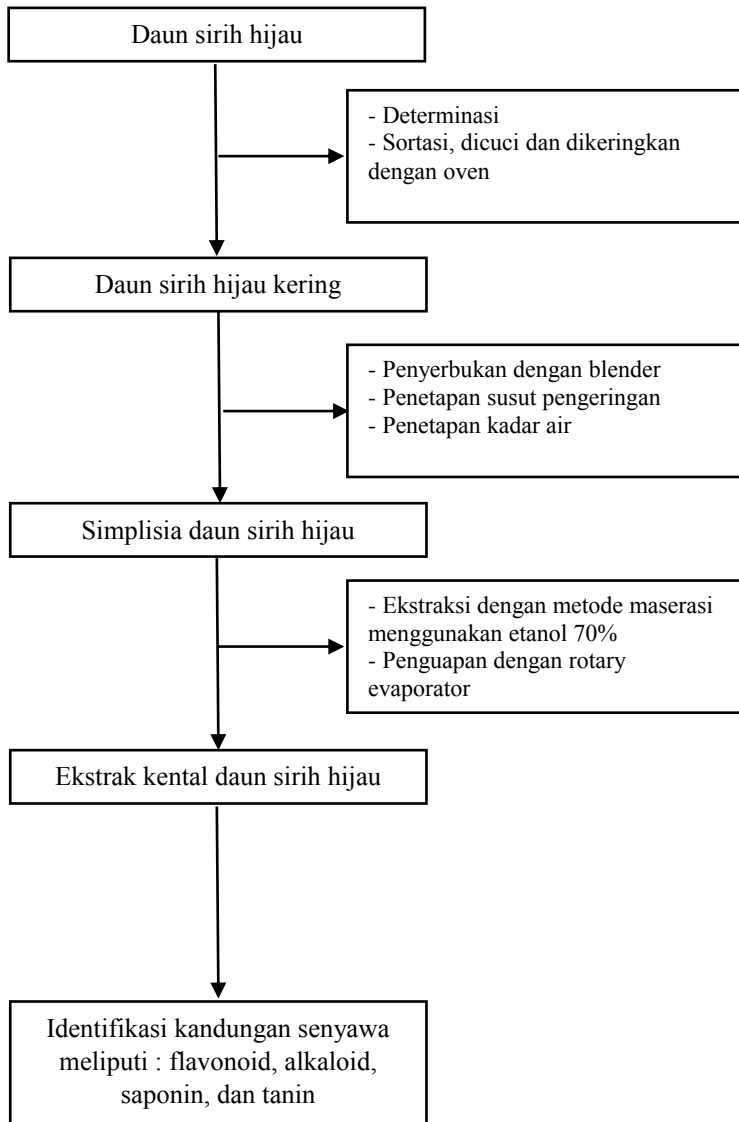
Pengukuran efek penyembuhan luka sayat dihitung menggunakan persamaan *Wound closure (%)* =

$$\frac{(\text{Area luka pada hari ke-0}) - (\text{Area luka pada hari ke- n})}{\text{Area luka pada hari ke-0}} \times 100\%$$

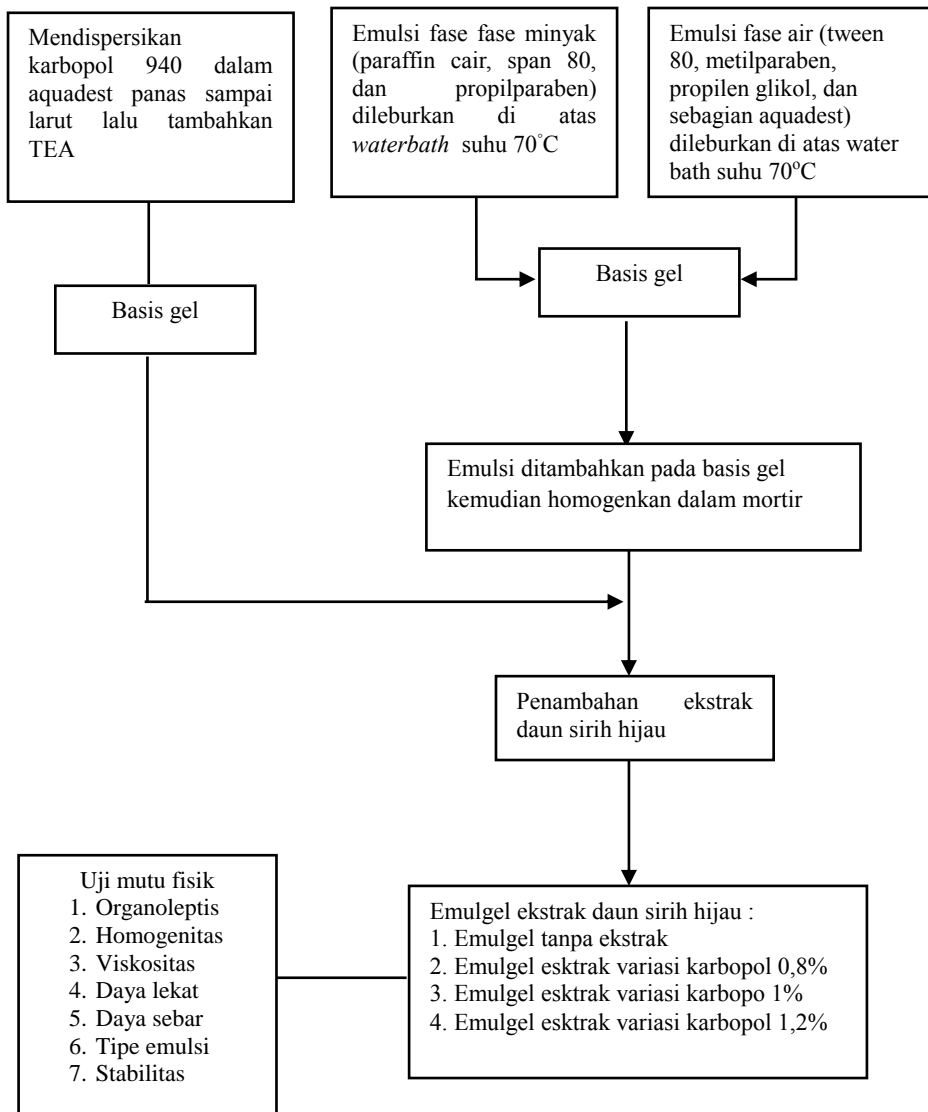
## 10. Metode analisis data

Hasil pengujian dilanjutkan dengan pengolahan data secara statistik dan visual. Analisis data pengujian mutu fisik sediaan emulgel ekstrak daun sirih hijau menggunakan metode *Kolmogorov-Smirnor*. Analisis *One-Way Anova* dilanjutkan dengan tingkat kepercayaan 95% bila data yang diperoleh terdistribusi normal. Jika data yang diperoleh tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan analisis *Kruskal-Wallis*. Data hasil pengamatan uji luka sayat dianalisis dengan menggunakan uji statistik *Shapiro-Wilk*. Jika data terdistribusi normal, dilanjutkan dengan *One way-Anova* dan metode *Kruskal-Wallis* digunakan apabila data tidak terdistribusi normal.

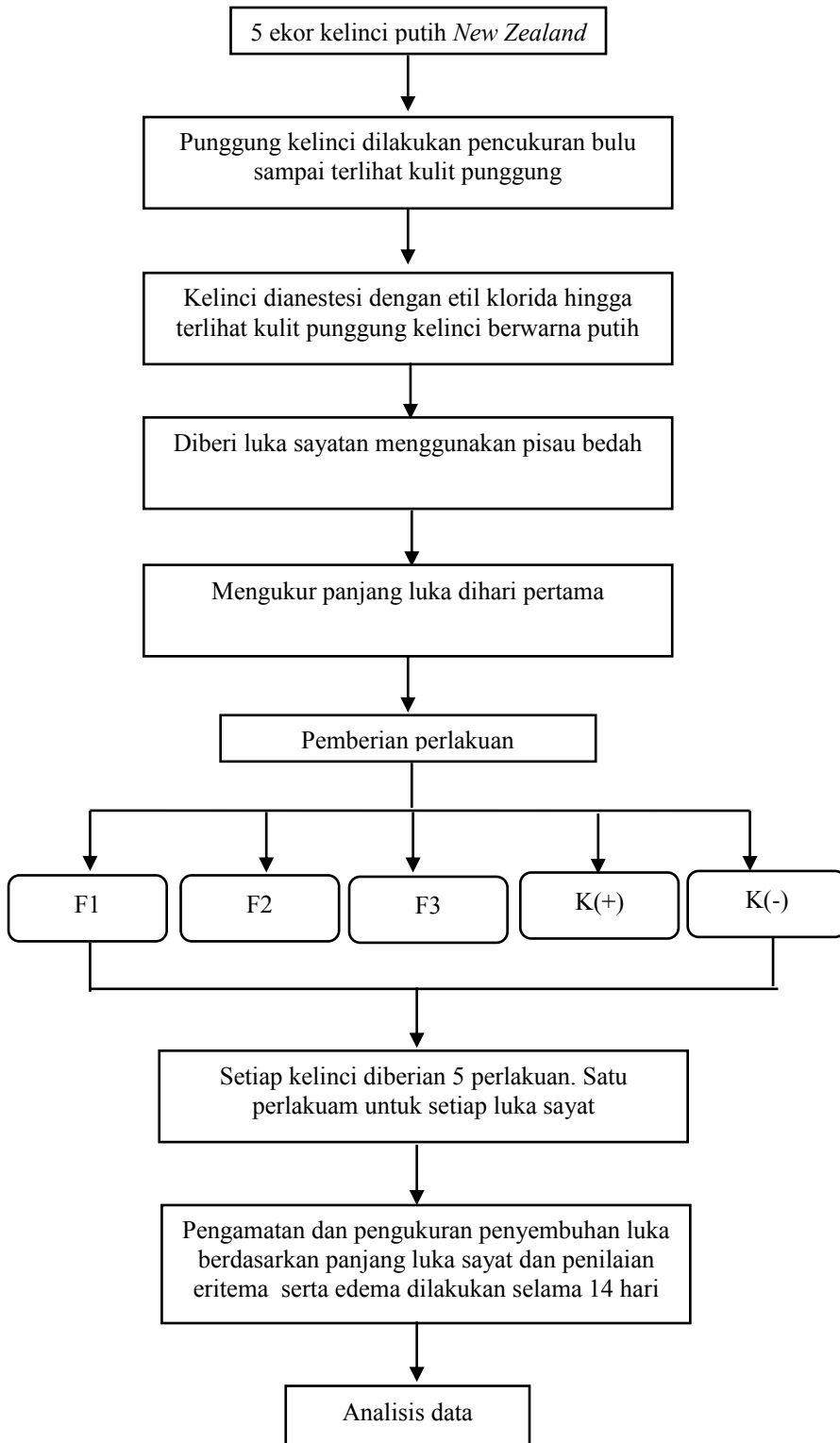
### E. Skema Jalannya Penelitian



**Gambar 12. Skema pembuatan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.)**



**Gambar 13. Skema pembuatan sediaan emulgel ekstrak daun sirih hijau (Piper betle L.)**



**Gambar 14. Skema perlakuan hewan uji**