

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah tanaman patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) yang berada di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu batang tanaman patah tulang yang masih dalam keadaan segar dan bagus, tidak terkena serangan hama dan tidak cacat diambil dari pohon tanaman patah tulang yang tumbuh di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama penelitian ini adalah ekstrak batang patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dan diperoleh dengan metode maserasi kemudian dilanjutkan pembuatan sediaan emulgel.

Variabel utama kedua yaitu pembuatan formula sediaan emulgel dengan komposisi bahan seperti ekstrak etanol 96% batang patah tulang, HPMC, tween 80, span 80, propil paraben, metil paraben, propilenglikol dan aquades.

Variabel utama ketiga yaitu efektivitas sebagai penyembuh luka sayat sediaan emulgel dari ekstrak etanol batang patah tulang.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama diklasifikasikan menjadi beberapa variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang dimaksudkan untuk dimodifikasi sejak awal untuk menentukan pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variasi bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi *gelling agent* dalam ekstrak batang patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) pada sediaan emulgel.

Variabel tergantung merupakan persoalan inti yang menjadi parameter pengujian pada penelitian. Variabel tergantung pada penelitian ini yakni aktivitas penyembuhan luka sayat diamati area penutupan luka setelah pemberian emulgel ekstrak batang patah tulang dengan berbagai variasi konsentrasi *gelling agent* dalam sediaan emulgel.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mampu mempengaruhi variabel terikat. Sehingga perlu ditetapkan kualifikasi variabel terkontrol agar hasil yang diperoleh tidak menyebar dan dapat diulangi oleh penelitian lain secara cepat. Penelitian ini memiliki variabel terikat yakni pelarut yang digunakan, proses pembuatan ekstrak kental dan pembuatan sediaan emulgel.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, batang patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) yang digunakan adalah yang segar dan masih muda diperoleh dari tanaman patah tulang yang tumbuh di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak batang patah tulang merupakan hasil dari ekstraksi dengan cara maserasi dan menggunakan pelarut etanol 96%.

Ketiga, luka sayat adalah luka yang disayat menggunakan *scalpel* dengan panjang 2 cm dan kedalaman 0,2 cm.

Keempat, uji aktivitas penyembuhan terhadap luka sayat merupakan kemampuan sediaan emulgel ekstrak etanol batang patah tulang dalam menyembuhkan luka sayat berdasarkan pada pengamatan ada tidaknya inflamasi dan pengecilan luka.

Kelima, area penutupan luka merupakan ukuran luka yang diakibatkan kecepatan penyembuhan luka yaitu satuan laju per waktu luka pada hewan uji.

Keenam, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci New Zealand yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketujuh, sediaan emulgel ekstrak batang patah tulang merupakan sediaan yang dimaksudkan untuk penggunaan topikal yang diolah dengan mencampurkan zat aktif dengan komponen bahan tambahan seperti HPMC, tween 80, span 80, propil paraben, metil paraben, propilenglikol dan aquades.

Kedelapan, sifat fisik emulgel merupakan sifat atau karakteristik dari emulgel ekstrak batang patah tulang yang akan diuji yakni uji organoleptis, homogenitas, tipe emulgel, pH, daya lekat, daya sebar, viskositas.

Kesembilan, uji stabilitas merupakan uji untuk mengetahui kemampuan sediaan emulgel selama penyimpanan.

Kesepuluh, variasi konsentrasi *gelling agent* HPMC dalam sediaan emulgel merupakan konsentrasi yang memiliki aktivitas dalam menyembuhkan luka sayat tidak ada perbedaan berarti dengan kontrol

positif. Variasi konsentrasi *gelling agent* HPMC yang digunakan adalah 1%, 3% dan 5%.

C. Alat Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah tempat untuk memelihara kelinci beserta wadah makan dan minum, timbangan analitik, tempat emulgel, ayakan, *moinsture balance*, *rotary evaporator*, *water bath*, oven, *beaker glass*, *glass object*, gelas ukur, stik pH, mortar dan stamper, cawan penguap, kaca arlogi, pipet tetes, corong, kertas saring, gunting/pisau cukur, *scalpel*, kasa steril, plester.

2. Bahan

Dalam penelitian ini membutuhkan beberapa bahan yang terdiri atas tanaman batang patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.), etanol 96%, HPMC, tween 80, span 80, propil paraben, metil paraben, propilenglikol dan aquades.

3. Hewan Uji

Hewan percobaan yang dipakai adalah kelinci New Zealand yang telah diadaptasi sebelumnya sekitar satu minggu setelah itu diberi luka sayat menggunakan *scalpel* dengan panjang 2 cm dan kedalaman 0,2 cm.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Sebelum penelitian dilakukan identifikasi tumbuhan atau determinasi yang bertujuan memverifikasi jenis dan kebenaran tumbuhan yang digunakan. Determinasi dilakukan di laboratorium B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah dengan mencocokkan karakteristik dan morfologi tanaman patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) yang akan diteliti.

2. Pengambilan Batang Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.)

Sampel batang patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) diperoleh dari pohon tanaman patah tulang yang tumbuh di daerah Tawangmangu Jawa Tengah. Batang tanaman patah tulang dipilih yang masih dalam keadaan segar dan bagus serta tidak terserang hama.

3. Pembuatan Simplisia Batang Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.)

Batang patah tulang yang dijadikan sampel untuk penelitian dipilih dengan proses sortasi basah. Proses sortir dilakukan untuk

memisahkan dan menghilangkan kontaminan yang terdapat pada simplisia dengan menggunakan air mengalir. Selanjutnya, batang patah tulang dikeringkan di bawah paparan sinar matahari langsung.

4. Pembuatan Serbuk Batang Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.)

Batang patah tulang yang sudah kering dilanjutkan ke tahap penyerbukan menggunakan alat penyerbuk. Hasil penyerbukan kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 40. Hasil serbuk kering batang patah tulang disimpan pada wadah yang sudah disiapkan sebagai wadah penyimpanan.

4.1 Uji organoleptik. Analisis serbuk batang patah tulang dilakukan dengan mengamati bentuk, warna bau dan rasa yang dilakukan secara organoleptik. (Kemenkes RI, 2014).

4.2 Penetapan susut pengeringan serbuk. Penetapan susut pengeringan *Euphorbia tirucalli* dilakukan menggunakan alat *moisture balance* yang terdapat di Laboratorium Universitas Setia Budi dengan cara ditimbang sebanyak 2 gram serbuk batang patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) kedalam alat yang sudah diatur suhunya 105°C dan diratakan. Penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak 3 kali dengan langkah yang sama dan dilakukan perhitungan hingga diperoleh rata-rata (Sediarso *et al.*, 2019). Hasil penetapan susut pengeringan dalam satuan persen (%). Menurut Departemen Kesehatan (2013) kadar air memiliki syarat yaitu jika kadar air dalam simplisia kurang dari 10%.

5. Pembuatan Ekstrak Batang Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.)

Serbuk batang patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) ditimbang sebanyak 500 gram lalu ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 5 liter dalam bejana gelap dan terlindung dari cahaya matahari. Wadah ditutup rapat dan dibiarkan selama 2 hari sambil diaduk sesekali. Setelah 2 hari dilakukan penyaringan ekstrak menggunakan kertas saring sampai mendapatkan hasil filtrat dan residu. Selanjutnya dilakukan remaserasi pada residu menggunakan pelarut yang sama sebanyak 2,5 liter didiamkan selama 1 hari sambil diaduk sesekali. Setelah 1 hari dilakukan penyaringan sampai menghasilkan filtrat dan residu. Hasil filtrat maserasi dan remaserasi digabungkan, lalu dipekatkan menggunakan evaporator pada temperatur 40 °C hingga didapatkan ekstrak kental (Depkes RI, 1986).

6. Identifikasi Ekstrak Kental Batang Patah Tulang

6.1 Uji organoleptik. Ekstrak batang patah tulang diidentifikasi secara organoleptik dengan melihat bentuk, warna, dan bau dari ekstrak yang diuji.

6.2 Penetapan kadar air batang patah tulang. Kandungan air pada ekstrak batang patah tulang diuji menggunakan gravimetri. Ekstrak batang patah tulang ditimbang 10 gram selanjutnya dimasukkan pada kurs dan diatur suhu oven 105°C selama 5 jam dan timbang. Pengeringan dilanjutkan dan timbang selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%.

7. Identifikasi Kandungan Senyawa

7.1 Flavonoid. Ekstrak simplisia batang patah tulang sebanyak 3 gram diambil dan larutkan dalam 10 ml air suling, kemudian dipanaskan selama 5 menit. Setelah itu, larutan disaring, filtratnya dicampur dengan serbuk magnesium dan ditambahkan 2 tetes HCl. Selanjutnya, tambahkan 2 ml alkohol amil. Keberadaan senyawa flavonoid ditunjukkan oleh munculnya warna merah tua pada lapisan alkohol amil (Lisdiana *et al.*, 2022).

7.2 Saponin. Sebanyak 3 gram ekstrak simplisia batang patah tulang dilarutkan dalam 10 mL air suling dan dipanaskan selama 5 menit. Setelah disaring, 5 mL filtratnya ditransfer ke dalam tabung reaksi. Larutan dikocok selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit kemudian tambahkan HCl 2N. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya buih yang tetap stabil (Lisdiana *et al.*, 2022).

7.3 Tanin. Sebanyak 3 gram ekstrak simplisia batang patah tulang dilarutkan dalam 10 mL air suling, kemudian dipanaskan selama 5 menit. Setelah disaring, larutan tersebut ditambahkan dengan 3 tetes FeCl 10%. Identifikasi positif tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam (Lisdiana *et al.*, 2022).

8. Pembuatan Sediaan Emulgel Ekstrak Batang Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.)

Persiapkan peralatan dan bahan yang akan digunakan terlebih dahulu, kemudian timbang semua bahan sesuai dengan konsentrasi yang diperlukan sesuai formula. Ekstrak batang patah tulang ditimbang dengan konsentrasi 10%. Pembuatan massa gel dilakukan dengan cara mendispersikan *gelling agent* HPMC secara bertahap ke dalam air panas dengan suhu 80°C, diamkan selama 15-30 menit untuk membiarkan HPMC mengembang, dan kemudian digerus hingga membentuk gel.

Metil paraben dan propil paraben dilarutkan dalam propilenglikol, dicampurkan ke dalam basis gel, dan diaduk hingga membentuk massa gel yang homogen. Pembuatan emulsi melibatkan pencampuran fase minyak (span 80 dan parafin cair yang telah dilelehkan) ke dalam fase air (tween 80 dan air suling yang dipanaskan) pada suhu 70°C. Emulsi ini ditambahkan ke dalam massa gel, diikuti dengan penambahan bertahap ekstrak batang patah tulang dan sisa air suling. Proses pengadukan emulgel dilakukan sampai homogen (Daud *et al.*, 2018).

Tabel 1. Formula sediaan emulgel yang dikembangkan dari penelitian Daud dan Evi (2017)

Bahan	F0	F1	F2	F3	Fungsi
Ekstrak batang tulang	-	10%	10%	10%	Zat aktif
HPMC	3%	1%	3%	5%	Basis gel
Parafin cair	5%	5%	5%	5%	Emolien
Span 80	0,42%	0,42%	0,42%	0,42%	Pengemulsi
Tween 80	1,08%	1,08%	1,08%	1,08%	Pengemulsi
Propil paraben	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%	Antimikroba
Metil paraben	0,18%	0,18%	0,18%	0,18%	Pengawet
Propilenglikol	10%	10%	10%	10%	Humektan
Aquadest	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	Pelarat

9. Pengujian Sifat Fisik Emulgel Ekstrak Batang Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.)

9.1 Uji organoleptik. Pengujian ini dilakukan dengan cara melihat dan mengamati tampilan sediaan emulgel secara kasat mata meliputi : bentuk, bau, warna dan tekstur sediaan (Yuniarsih *et al.*, 2020).

9.2 Uji homogenitas. Pengujian homogenitas dilakukan untuk memastikan bahwa formulasi tercampur secara merata. Metode ini melibatkan menimbang 0,1 gram sampel uji dan menempatkannya di antara dua objek kaca. Tujuannya adalah untuk memeriksa keberadaan ketidak seragaman atau partikel kasar di bawah kaca objek (Depkes RI, 1979).

9.3 Uji pH. Pengukuran untuk pengujian pH menggunakan pH meter atau pH universal. pH meter atau pH universal dimasukkan ke dalam sediaan, hasil angka pH akan muncul pada instrumen pH meter dan pH universal, dicocokkan hasil indikator kemudian dicatat hasilnya (Yuniarsih *et al.*, 2020). Kisaran pH yang dapat diterima untuk menghindari iritasi pada kulit wajah adalah 4,5-6,5 (Noor dan Desy, 2009).

9.4 Uji viskositas. Viskositas merupakan suatu parameter uji untuk menentukan fluiditas suatu sediaan. Pengukuran viskositas

emulgel diukur menggunakan viskometer Brookfield. Pengujian dilakukan dengan cara sampel uji dimasukkan kedalam wadah. Alat di set dengan spindle yang sesuai diposisikan di tengah wadah. Selanjutnya alat dijalankan, maka spindle akan berputar. Rotasi poros menyebabkan indikator viskositas otomatis bergerak ke kanan. Dibaca hasil viskositas pada jarum penunjuk (Yuniarsih *et al.*, 2020).

9.5 Uji daya lekat. Pengujian ini dilakukan dengan cara menimbang sediaan uji sebanyak 0,5 gram diletakkan ditengah-tengah *object glass* dan *object glass* lainnya digunakan untuk menutup. Letakkan beban 1 kg diatas *object glass* selama 5 menit. Kedua ujung *object glass* dijepit dengan alat uji, selanjutnya penyangga beban dilepas. Waktu lekat sediaan dihitung dari lamanya dua *object glass* terlepas dari alat uji. Lakukan pengujian dengan 3 kali replikasi (Puspitasari dan setyowati, 2018).

9.6 Uji daya sebar. Pengujian daya sebar dilakukan dengan cara menempatkan 0,5 gram sampel uji di tengah kaca extensometer berskala, kemudian menutupnya dengan kaca bundar yang sudah ditimbang terlebih dahulu. Setelah dibiarkan selama 1 menit, diameter sebaran diukur. Dilanjutkan dengan menambahkan beban awal sebesar 50 gram di atas kaca bundar, lalu dibiarkan selama 1 menit lagi dan diukur kembali diameter sebaran. Proses ini diulang dengan menambahkan beban tambahan sebesar 50 gram hingga skala stabil, kemudian diukur diameter sebaran yang terbentuk (Kusumawati, 2018).

9.7 Uji tipe emulsi. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode kelarutan zat warna, pengenceran, dan hantar Listrik (Wahyuddin *et al.*, 2020).

9.7.1 Kelarutan zat warna. Pengujian ini dilakukan dengan mengambil sediaan uji secukupnya masukkan dalam kaca arloji, lalu teteskan *methylene blue* lalu diaduk. Apabila zat warna terlarut dan berdifusi homogen pada fase eksternal air maka tipe emulsi adalah M/A.

9.7.2 Pengenceran. Pengujian ini dilakukan dengan cara sediaan uji dituang kedalam wadah, lalu diencerkan dengan aquades. Jika campuran homogen maka tipe emulsi adalah M/A

9.7.3 Hantar listrik atau konduktivitas. Pengujian ini dilakukan dengan cara sediaan uji sebanyak 5 gram dimasukkan dalam *beaker glass*, kemudian celupkan alat konduktometer. Apabila jarum konduktometer bergerak ke kanan maka tipe emulsi adalah O/W. Jika jarum konduktometer tidak bergerak maka emulsi memiliki tipe W/O.

Metode ini menggunakan prinsip Dimana air memiliki kemampuan untuk menghantarkan listrik, sedangkan minyak tidak memiliki kemampuan untuk menghantarkan listrik.

10. Uji Stabilitas Dipercepat

Pengujian stabilitas dilakukan menggunakan metode cycling test, di mana sediaan uji disimpan pada suhu sekitar $\pm 4^{\circ}$ C selama 24 jam. Kemudian, sediaan uji dipindahkan ke suhu 40° C selama 24 jam. Proses ini diulang secara teratur setiap 24 jam sebagai satu siklus, dan pengujian dilakukan selama 6 siklus (Indriaty *et al.*, 2019). Setelah siklus selesai, sediaan diuji untuk kualitas organoleptik, tipe emulsi, pH, dan viskositas.

11. Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci New Zealand sebanyak 5 ekor yang telah diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari. Setelah diadaptasi kelinci diberikan luka sayat pada hari ke-8 dan diberikan makan dan minum secukupnya. Daerah punggung kelinci yang akan dibuat luka dicukur terlebih dahulu lalu dibius dengan menyemprotkan larutan etil alkohol pada daerah yang akan dibuat luka sayat. Luka sayat dibuat dengan *scalpel* yang diberi *stopper* untuk membuat sayatan agar kedalam merata pada semua hewan uji, panjang sayatan kulit 2 cm dengan kedalaman 0,2 cm. Semua sediaan dioleskan pada area perawatan yang disayat menggunakan *cotton bud*.

11.1 Pengelompokkan hewan uji. Kelinci yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 5 ekor dan dibuat 5 luka pada punggung kelinci yang mendapat perlakuan berbeda untuk setiap lukanya yakni :

Luka I : Diberikan kontrol negatif basis emulgel 3%

Luka II : Diberikan emulgel ekstrak batang patah tulang formula I

Luka III : Diberikan emulgel ekstrak batang patah tulang formula II

Luka IV : Diberikan emulgel ekstrak batang patah tulang formula III

Luka V : Diberikan kontrol positif betadine salep 10%

Setelah proses perlakuan pada luka kelinci selesai lalu tutup luka dengan kain kasa steril dan plester untuk mengurangi kemungkinan kontaminasi bakteri. Oleskan perlakuan setiap hari sebanyak 2 kali sehari setiap pagi dan sore.

12. Pengujian Efek Penyembuhan Luka Sayat

Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan kelinci sebagai hewan percobaan. Pengamatan dan dan evaluasi luka sayatan dinilai dari hari ke-1 sampai hari ke-14 saat mencapai stadium proliferasi.

Selanjutnya luka tertutup (kedua tepi luka bertemu) dan dicatat sebagai tanggal penyembuhan luka sempurna 100%.

Parameter pada penelitian ini adalah melihat penurunan panjang luka, saat terbentuk koreng, dan saat koreng terlepas dengan sendirinya. Perhitungan persentase laju penyembuhan luka dilakukan dengan menggunakan rumus (Rahman *et al.*, 2017).

Area sembuh = Area luka awal – Area luka yang tersisa

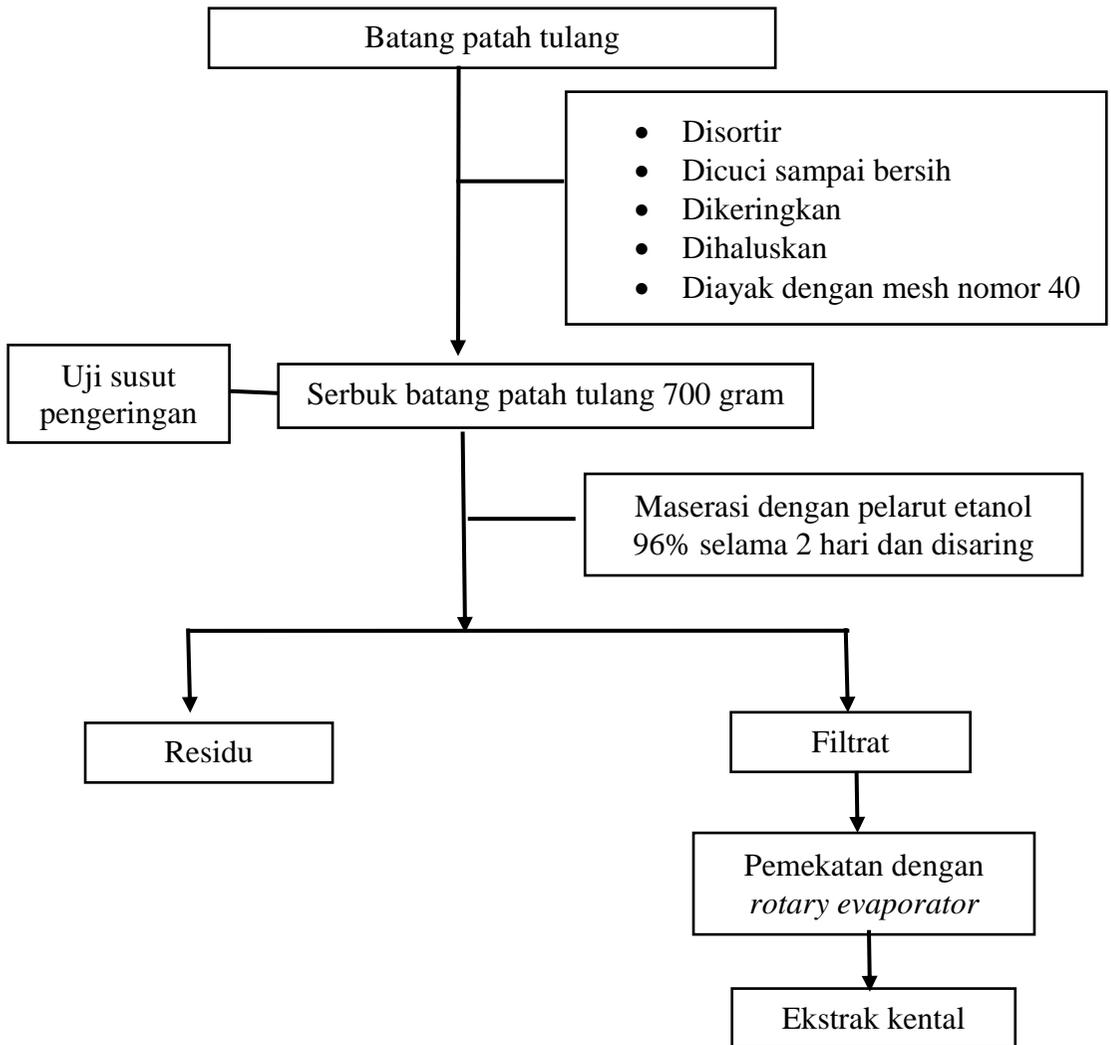
$$\% = \frac{\text{Area sembuh}}{\text{Area luka awal}} \times 100\%$$

E. Analisis Data

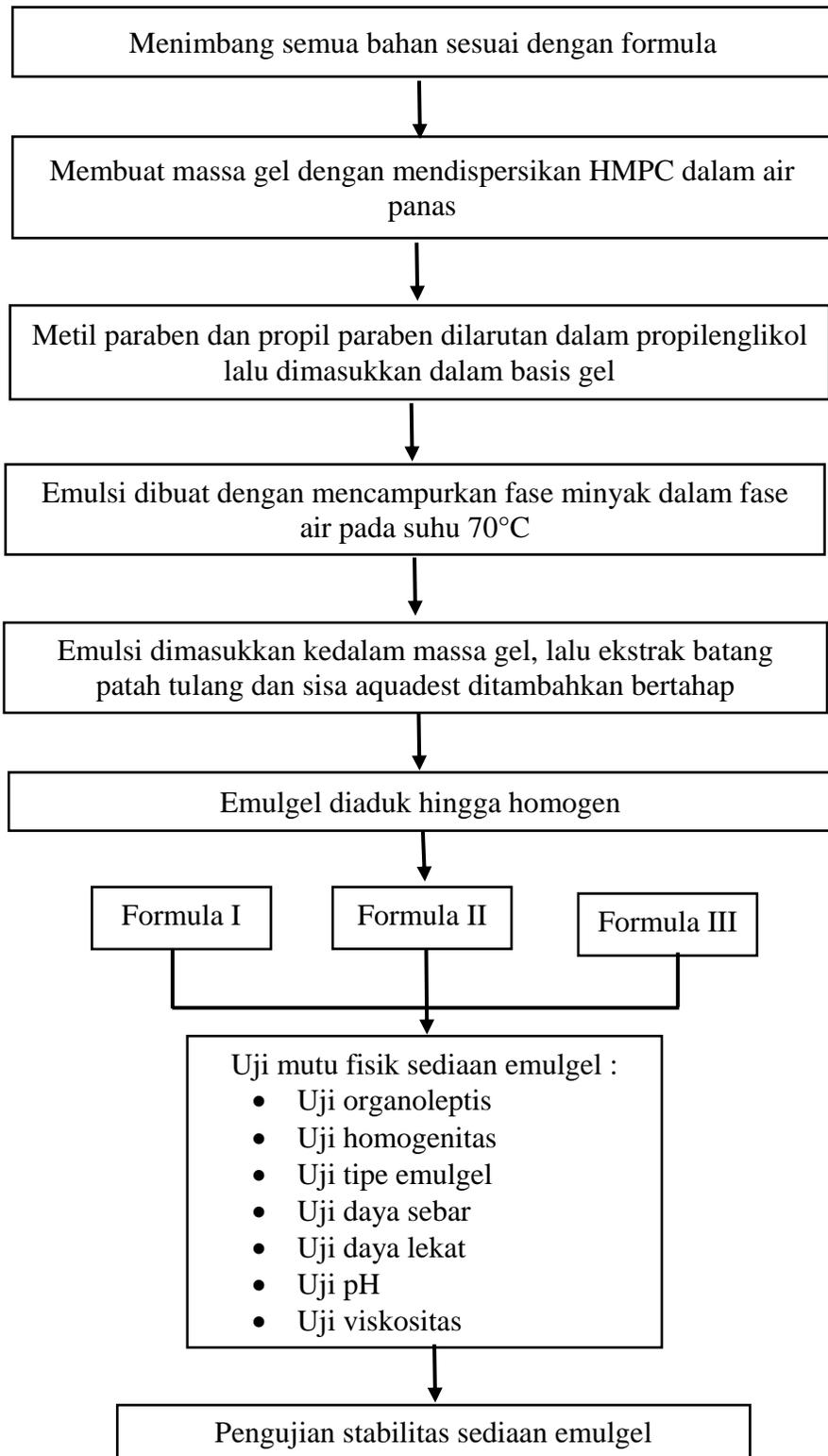
Data hasil pengujian mutu fisik sediaan emulgel dianalisis menggunakan program komputer SPSS dengan metode *Shapiro-Wilk*. Apabila diperoleh hasil yang terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan analisis *One Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95% akan tetapi jika data yang diperoleh tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan metode *Kruskal-Wallis*. Data hasil pengujian stabilitas emulgel dianalisis dengan uji t dimana membandingkan mutu fisik sediaan emulgel sebelum dan sesudah siklus *cycling test* berakhir.

Sedangkan untuk mengetahui adanya perbedaan penurunan panjang luka sayat setiap hari pengamatan maka dianalisis secara statistik dengan menggunakan metode *Shapiro-wilk*. Jika data yang diperoleh terdistribusi normal dengan $p > 0,05$ maka dilakukan metode analisis *One Way Anova* namun jika data yang dihasilkan tidak terdistribusi normal maka dilakukan menggunakan metode uji *Friedman*.

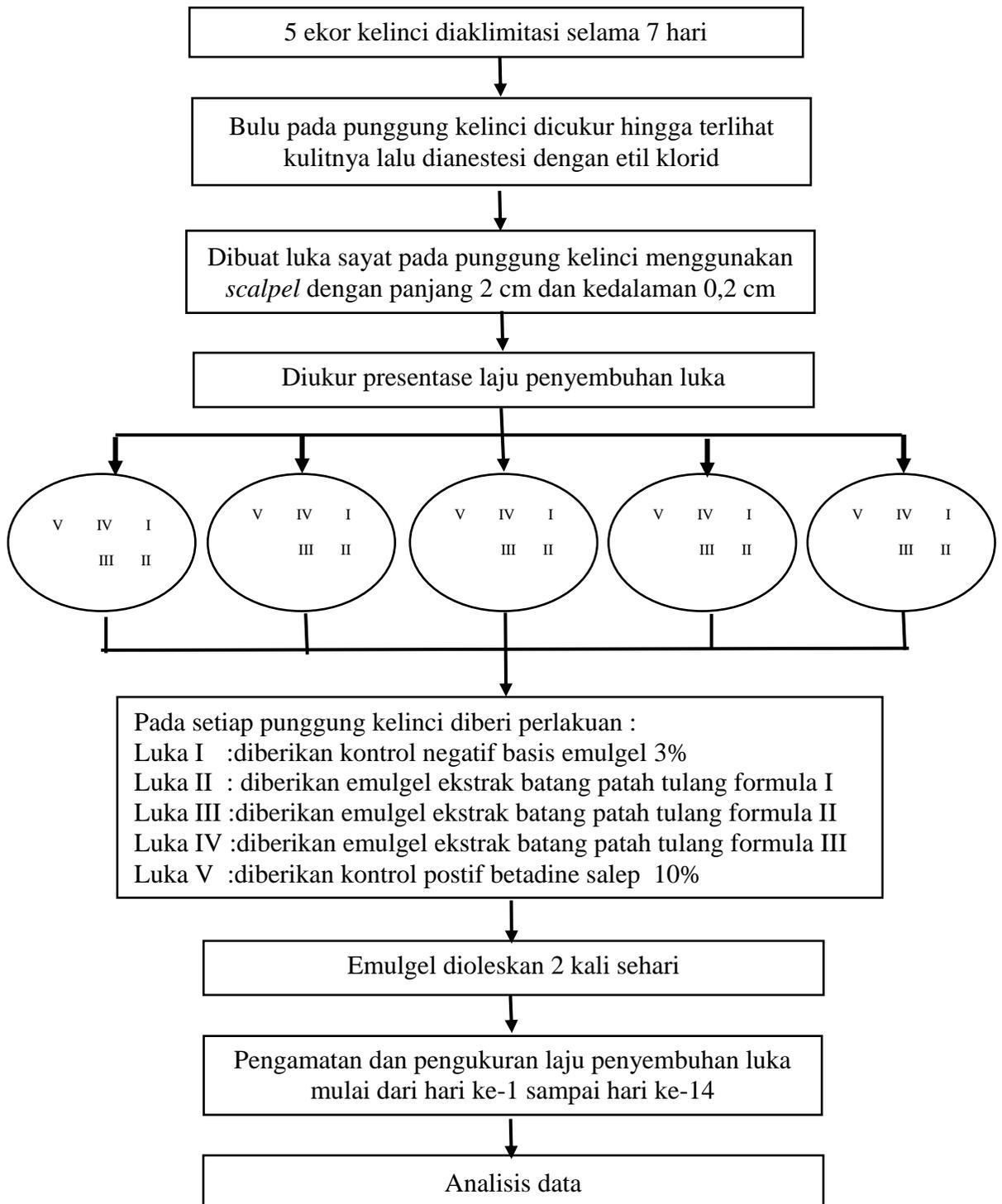
F. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak batang patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.).



Gambar 6. Skema pembuatan emulgel dan uji mutu fisik emulgel ekstrak batang patah tulang.



Gambar 7. Skema perlakuan terhadap hewan uji.