

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Dalam menyelesaikan penelitian ini, peneliti menggunakan penelitian eksperimen. Jenis penelitian ini digunakan untuk melakukan suatu percobaan (*experiment research*) yang memiliki tujuan untuk mengetahui adanya gejala atau pengaruh yang timbul terhadap variabel eksperimen, sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu dari suatu percobaan (Supardi,2014). Pada penelitian ini yang akan di amati adalah pengaruh sediaan salep ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*) terhadap kesembuhan luka sayat yang dilakukan pada hewan uji tikus.

B. Lokasi dan waktu penelitian

1. Determinasi pada tanaman dilakukan dilaboratorium sistematika tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Diponegoro pada bulan Desember 2021.
2. Proses pembuatan ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*), salep ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*) dan uji aktivitas pada salep dilakukan dilaboratorium fitokimia, dan laboratorium farmasetika Universitas Ngudi Waluyo pada bulan November 2021 – Januari 2022.

C. Subyek Penelitian

Subyek dalam penelitian ini adalah sediaan salep ekstrak tanaman patikan kebo (*Euphorbia hirta*) sebagai uji aktivitas terhadap luka sayat pada

tikus putih jantan galur wistar. Sampel tanaman patikan kebo (*Euphorbia hirta*) tersebut selanjutnya akan diformulasikan menjadi sediaan salep.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar sebanyak 25 ekor. Penentuan pada jumlah sampel hewan uji menggunakan rumus Federer (1991).

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = banyaknya kelompok

n = banyaknya hewan uji tiap kelompok

Sampel dibagi menjadi 5 kelompok, sehingga :

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1)(4) \geq 15$$

$$(n-1)(4) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Jumlah sampel untuk hewan uji yang digunakan yaitu masing-masing kelompok sebanyak 5 ekor tikus pada 5 kelompok. Total keseluruhan hewan uji yang digunakan adalah 25 ekor.

Terdapat 5 kelompok pada penelitian ini yang telah ditentukan berdasarkan perlakuan dari kontrol yaitu :

1. Kelompok 1 adalah kelompok yang diberi perlakuan ekstrak salep patikan kebo (*Euphorbia hirta*) 5%.
2. Kelompok 2 adalah kelompok yang diberi perlakuan ekstrak salep patikan kebo (*Euphorbia hirta*) 10%.
3. Kelompok 3 adalah kelompok yang diberi perlakuan ekstrak salep patikan kebo (*Euphorbia hirta*) 15%.
4. Kelompok 4 adalah kelompok kontrol positif yang diberi perlakuan povidone iodine 10%.
5. Kelompok 5 adalah kelompok kontrol negatif yang diberi basis salep.

D. Definisi operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah :

1. Metode Maserasi

Metode maserasi merupakan proses atau metode yang dilakukan secara sederhana tanpa melakukan sistem pemanasan atau yang sering disebut dengan ekstraksi dingin. Proses maserasi dilakukan dengan mencampurkan serbuk simplisia yang direndam dengan pelarut etanol 96% di dalam wadah yang tertutup rapat pada suhu kamar selama 3 hari.

2. Ekstrak herba patikan kebo (*Euphorbia hirta*).

Ekstrak herba patikan kebo (*Euphorbia hirta*) merupakan sediaan yang diperoleh dari proses maserasi dengan pelarut etanol 96% kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi.

3. Salep ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*)

Salep ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*) merupakan sediaan setengah padat yang dibuat dari hasil ekstrak herba patikan kebo (*Euphorbia hirta*).

4. Aktivitas penyembuhan luka sayat pada tikus jantan galur wistar.

Aktivitas penyembuhan luka sayat pada tikus jantan galur wistar adalah uji yang dilakukan pada ekstrak herba patikan kebo pada tikus jantan galur wistar yang telah dilukai dengan cara disayat kemudian diamati proses penyembuhan lukanya selama 21 hari.

5. Uji in vivo pada penelitian menggunakan hewan uji tikus jantan galur wistar.

Pada penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih jantan galur wistar karena pada hewan tersebut mudah diperoleh, mudah dalam perawatannya dan dapat beradaptasi dengan baik pada lingkungan yang baru serta memiliki kemampuan metabolik yang sangat cepat hal ini sangat berpengaruh dalam penelitian yang bersangkutan dengan metabolisme tubuh.

E. Variabel bebas

Dalam penelitian ini variabel bebas yang digunakan ialah menggunakan beberapa konsentrasi dari ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*) dalam bentuk sediaan salep, dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15% .

F. Variabel terikat

Dalam penelitian yang dilakukan ini menggunakan variabel terikat ialah skrining fitokimia ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*), formulasi sifat fisik salep yang paling baik, dan konsentrasi yang paling cepat dalam waktu penyembuhan luka sayat.

G. Variabel terkontrol

Dalam penelitian ini variabel terkontrol adalah alat, bahan, metode dan lama waktu ekstraksi, jumlah pelarut dan jumlah sampel.

H. Pengumpulan Data

1. Alat dan bahan penelitian

a) Alat

Dalam penelitian ini alat yang digunakan ialah penimbang berat badan tikus, kandang tikus, tempat minum, alat cukur, blade, scapel, kain flanel, ayakan nomor 40, batang pengaduk, cawan penguap, *waterbath*, mortir, stamper, gelas ukur, *beaker glass*, rotary evaporator, timbangan analitik, blender, timbangan gram, tabung reaksi, pipet tetes, dan pot salep.

b) Bahan

Dalam penelitian ini bahan yang digunakan ialah ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*), adeps lanae, vaselin album, etanol 96%, reagen mayer, HCl pekat, serbuk Mg, FeCl₃, dan aquadest.

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman patikan kebo (*Euphorbia hirta*) diperoleh untuk memperoleh kepastian bahwa tanaman yang ada digunakan pada penelitian ini adalah tanaman yang dimaksud sehingga kemungkinan timbulnya kesalahan dalam pengumpulan bahan penelitian dapat dihindari. Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium sistematika tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Diponegoro.

3. Pemanenan Herba patikan kebo (*Euphorbia hirta*)

Proses pemanenan herba dilakukan dengan cara menggunakan tangan atau menggunakan alat yang tidak mengandung logam, dikarenakan dapat berpotensi merusak kandungan metabolit sekunder oleh reaksi dengan logam tersebut (Handoyo *et al.*, 2020). Sampel diambil yang masih segar berwarna hijau belum terdapat bagian yang kering, diambil pada bagian daun batang hingga akar, dengan cara mencabut secara perlahan agar tumbuhan yang diperoleh tidak mengalami kerusakan.

4. Pembuatan serbuk simplisia

Proses awal pembuatan serbuk dimulai dari pengambilan sampel herba patikan kebo (*Euphorbia hirta*) yang masih segar, kemudian dilakukan sortasi basah, pencucian dengan air bersih kemudian ditiriskan. selanjutnya dilakukan pengeringan secara tidak langsung dibawah sinar matahari, proses sortasi kering kemudian di timbang dan di dapatkan berat, Herba patikan kebo (*Euphorbia hirta*) yang sudah kering kemudian di

blender hingga menjadi serbuk lalu diayak dengan menggunakan ayakan mesh 40 agar memperoleh serbuk yang lebih halus.

5. Standarisasi simplisia parameter non spesifik

a. Uji kadar air

Prosedur penentuan kadar air simplisia dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*, yaitu dengan cara menyalakan tombol on/off terlebih dahulu, kemudian piringan diletakan di tengah dan penahan punch di atasnya. Kemudian di set program, akurasi dan temperatur 105°C sesuai dengan simplisia yang akan diuji, lalu ditara. Ditimbang sebanyak 2 gram simplisia disimpan di atas punch, diratakan sampai menutupi permukaan punch lalu ditutup, setelah proses selesai maka persen kadar air dari simplisia akan tertera secara otomatis. Kadar air simplisia pada umumnya yaitu tidak lebih dari 10 % (Latifah, 2015).

b. Uji kadar abu

Pada uji kadar abu masing-masing simplisia sebanyak 2 gr dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijar pada suhu 600°C, pada proses pijar perlu diperhatikan untuk melakukan dengan perlahan-lahan hingga suhu yang menyebabkan senyawa organik terdestruksi dan menguap sampai tinggal unsur mineral dan anorganik. Selanjutnya didinginkan kemudian ditimbang bobotnya hingga memperoleh bobot yang tetap. Kadar abu total dihitung terhadap bobot serbuk awal dalam %b/b (Kemenkes RI, 2014).

Kadar abu (%)

$$= \frac{(\text{bobot krus} + \text{abu simplisia}) - \text{bobot krus kosong}}{\text{bobot sampel simplisia serbuk}} \times 100\%$$

6. Pembuatan ekstrak etanol patikan kebo (*Euphorbia hirta*)

Proses pembuatan ekstrak etanol yaitu dengan menggunakan metode maserasi. Sebesar 600 gram serbuk simplisia ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 3000 mL. Pada maserasi ini dilakukan selama 3 hari dalam ruangan yang terlindungi dari cahaya matahari dan selama penyarian sesekali untuk diaduk, lalu disaring dengan menggunakan kertas saring, sehingga akan diperoleh filtrat. Filtrat tersebut kemudian diuapkan dengan menggunakan (rotavapor) pada suhu 50°C, proses filtrasi ini dilakukan terus menerus sampai pelarut sudah tidak lagi menetes dan dilakukan pemanasan diatas water bath hingga di dapatkan ekstrak kental. Kemudian disimpan pada wadah gelas tertutup (Djanggola *et al.*,2016).

7. Perhitungan Rendemen Ekstrak

Rendemen ekstrak dapat dihitung berdasarkan perbandingan antara berat akhir (berat ekstrak dihasilkan) dengan berat awal (berat biomassa sel yang digunakan) kemudian dikalikan 100% (Sani *et al.*, 2014).

$$\text{Rumus : } \% \text{ rendemen} = \frac{\text{jumlah berat ekstrak kental (g)}}{\text{berat serbuk kering}} \times 100\%$$

8. Uji bebas etanol

Pemeriksaan bebas etanol dalam ekstrak dilakukan dengan menambahkan H₂SO₄ (p) kemudian CH₃COOH dilanjutkan dengan

pemanasan. Tidak adanya tercium bau khas ester hasil uji menandakan negatif (Kurniawati,2015).

9. Skrining fitokimia

a. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dapat dilakukan dengan cara menambahkan ekstrak pekat daun patikan kebo sebanyak 0,5 g dengan 5 mL etanol dan reagen mayer, jika pada tabung terbentuk endapan putih maka sampel positif mengandung alkaloid (Karim *et al.*,2015).

b. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dapat dilakukan dengan cara menambahkan ekstrak pekat daun patikan kebo sebanyak 0,5 g dengan 5 mL HCl pekat dan 0,1 g serbuk Mg. Apabila timbul warna merah pada tabung maka ekstrak positif mengandung flavonoid (Karim *et al.*,2015).

c. Uji Tanin

Uji tanin dapat dilakukan dengan cara sebanyak 1 ml ekstrak kental tumbuhan patikan kebo (*Euphorbia hirta*) dari pelarut methanol dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 5 tetes FeCl₃. Terbentuknya endapan menandakan adanya tanin (Widiarto *et al.*,2018).

d. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara menambahkan ekstrak pekat patikan kebo sebanyak 0,5 g dengan 10 mL aquades panas dan 2 tetes HCl pekat, jika dikocok dan terbentuk buih maka positif mengandung saponin (Karim *et al.*,2015).

10. Pembuatan sediaan salep ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*)

a. Penyiapan bahan Salep

Bahan yang akan digunakan untuk membuat salep yaitu ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*), vaselin album, dan adeps lanae di timbang sesuai takaran.

b. Formulasi salep

Pada basis salep yang telah dibuat kemudian ditambahkan dengan ekstrak patikan kebo kemudian di aduk dengan menggunakan alu dan lumpang yang panas hingga homogen yang telah disesuaikan dengan konsentrasinya masing-masing.

Formula standar dasar salep yang digunakan menurut Agoes goeswin, (2006) ialah :

R/ Adeps Lanae	15 g
Vaselin Album	85 g
m.f salep	100 g

Sediaan salep yang akan digunakan pada penelitian ini memiliki masing-masing konsentrasi ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*) yaitu 5%, 10% dan 15% dibuat sebanyak 25 gr.

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Patikan Kebo

Bahan	KN	FI 5%	FII 10%	FIII 15%
Ekstrak patikan kebo	-	1,25 gr	2,5 gr	3,75 gr
Adeps lanae	15 gr	3,5625 gr	3,375 gr	3,187 gr
Vaselin album	85 gr	20,1875 gr	19,125 gr	18,062 gr

Keterangan :

KN : Kontrol negatif / basis salep

FI 5% : Ekstrak patikan kebo konsentrasi 5%

FII 10% : Ekstrak patikan kebo konsentrasi 10%

FIII 15% : Ekstrak patikan kebo konsentrasi 15%

c. Basis salep

Basis salep yang digunakan merupakan basis berlemak yaitu adeps lanae dan vaselin album. Sebelum membuat basis salep terlebih dahulu alu dan lumpang untuk dipanaskan pada suhu 50°C hingga panas. Setelah panas kemudian air yang ada didalam mortir dikeluarkan dan masukkan adeps lanae terlebih dahulu aduk hingga lebur kemudian dilanjutkan dengan memasukkan vaselin album diaduk dengan menggunakan kecepatan konstan hingga homogen dan telah membentuk basis salep (Paju,*et al.* 2013).

Cara pembuatan salep terlebih dahulu mortir dan stamper untuk dipanaskan pada suhu 50°C dengan cara menuangkan air panas kedalam mortir, Setelah panas air yang berada didalam mortir dikeluarkan kemudian masukkan adeps lanae terlebih dahulu aduk hingga lebur dilanjutkan dengan memasukkan vaselin album di aduk dengan menggunakan kecepatan konstan hingga homogen dan telah

membentuk basis salep, kemudian akan ditambahkan dengan ekstrak patikan kebo diaduk dengan menggunakan mortir dan stamper yang panas hingga homogen yang telah disesuaikan dengan konsentrasinya masing-masing yaitu 5%,10% dan 15% (Paju,*et al.* 2013).

11. Pengujian sediaan salep

a. Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan dengan mengamati sediaan salep dari bentuk, bau dan warna sediaan. Menurut Depkes RI, pada salep yang harus dipenuhi ialah harus memilih spesifikasi bentuk setengah padat, warna yang harus sesuai pada spesifikasi saat pembuatan awal salep dan memiliki bau yang tidak tengik (Sari *et al.*, 2016).

b. Uji Homogenitas

Pemeriksaan homogenitas sediaan salep dilakukan dengan mengoleskan salep pada bahan transparan atau kaca yang harus menunjukkan susunan yang homogen. Salep yang homogen ditandai dengan tidak adanya gumpalan pada hasil pengolesan, strukturnya rata dan memiliki warna yang seragam dari titik awal pengolesan sampai titik akhir pengolesan. Salep yang di uji diambil tiga tempat yaitu bagian atas, tengah dan bawah dari wadah salep (Sari *et al.*, 2016).

c. Uji pH

Pengukuran nilai pH pada salep menggunakan alat pH meter dengan yang dicelupkan ke dalam 0,5 g salep yang telah diencerkan

terlebih dahulu dengan 5 mL aquadest. Nilai pH yang baik untuk salep ialah 4,5-6,5 atau sesuai dengan nilai pH kulit manusia (Sari *et al.*, 2016).

d. Uji daya sebar

Pengujian daya sebar dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 gr salep diletakkan diatas kaca bulat dengan kaca lainnya diletakkan diatasnya dan dibiarkan selama 1 menit. Kemudian diameter sebar salep diukur. Setelah itu beban 100 gram ditambahkan dan didiamkan selama 1 menit lalu diukur kembali diameter yang konstan. Diameter daya sebar salep yang baik antara 5-7 cm (Sari *et al.*, 2016).

e. Uji daya lekat salep

Uji daya lekat salep dilakukan dengan cara salep yang telah ditimbang sebesar 0,25 gram diletakkan di atas gelas objek lalu diletakkan gelas objek yang lain di atas salep tersebut dan ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Selanjutnya pasang gelas objek pada alat uji. Beban seberat 80 gr dilepaskan dan dicatat waktunya hingga kedua gelas objek tersebut terlepas syarat waktu daya lekat yang baik adalah tidak kurang dari 4 detik.(Sandi *et al.*,2018).

12. Pembuatan luka sayat

Sebelum dilakukan penyayatan,tandai pada bagian punggung tikus yang akan dibuat luka.Cukur bulu tikus pada bagian yang akan disayat dan dibuat luka. Kemudian bagian yang akan dibuat luka tersebut dibersihkan dengan kapas yang mengandung alkohol 70%. Buat luka dengan menyayat

kulit tikus menggunakan scapel yang sudah steril (bilas dengan alkohol 70%) sampai sobek jaringan otot (Yadaf, et al., 2012). Buat luka dengan panjang 2 cm dengan kedalaman 2 mm. Luka yang dibuat pada masing-masing tikus sebanyak 1 sayatan, yaitu pada punggung tikus, ditandai dengan spidol dan diukur menggunakan jangka sorong.

Pada setiap kelompok diberikan perlakuan sebagai berikut :

- a. Kelompok 1 : Luka sayat ditutup salep ekstrak Patikan kebo 5% sebanyak 0,5 g (2x sehari)
- b. Kelompok 2 : Luka sayat ditutup salep ekstrak Patikan kebo 10% sebanyak 0,5 gr (2x sehari)
- c. Kelompok 3 : Luka sayat ditutup salep ekstrak Patikan kebo 15% sebanyak 0,5 gr (2x sehari)
- d. Kelompok 4 : Luka sayat diberi Povidone Iodine 10%, sebanyak 0,5 gr (2x sehari)
- e. Kelompok 5 : Luka sayat diberi basis salep sebanyak 0,5 gr (2x sehari)

Perlakuan dilakukan setiap hari pada jam yang sama, dioleskan salep ekstrak ekstrak patikan kebo sebanyak 0,5 gram. Parameter yang dipakai dalam penentuan kesembuhan luka adalah lama waktu penyembuhan luka.

13. Analisis Data

Sumber data didapatkan dari hasil pengamatan sebagai sumber data primer dan literatur buku ataupun hasil penelitian yang lain sebagai sumber data sekunder. Teknik pengolahan data yang digunakan dalam penelitian ini

yaitu hasil pengamatan diolah secara statistik dengan menggunakan metode analisa variasi (ANOVA) satu arah dan dilanjut dengan uji T.