

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium untuk menentukan kecenderungan formulasi gel ekstrak daging buah labu kuning (*cucurbita moschata D*) sebagai penyembuhan luka bakar. Daging buah labu kuning (*cucurbita moschata D*) diekstraksi menggunakan metode maserasi yaitu pelarut etanol 70%. Evaluasi sediaan gel yang dilakukan meliputi mutu fisik dan uji stabilitas. Kemudian, Sediaan gel untuk menyembuhkan luka bakar akan diuji cobakan pada tikus putih.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

B. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata D*) diperoleh dari petani langsung di daerah Bengkulu.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau sebab perubahan timbulnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata D*).

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh adanya variabel bebas. Karakteristik fisik sediaan gel (organoleptik, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat dan viskositas) serta uji efektivitas terhadap penyembuhan luka bakar pada tikus putih merupakan variabel tergantung dalam penelitian.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah lingkungan yaitu penempatan tikus di dalam wadah yang berukuran 20 cm x 40 cm ditutup dengan dengan penutup yang terbuat dari kawat dan dilengkapi sekam padi untuk menjaga kandang tetap kering. Penempatan kandang hewan berada pada suhu kamar sekitar 25°C – 30°C dengan pencahayaan yang cukup sehingga suhu dan kelembapan udara yang dapat berpengaruh terhadap luka bakar dikendalikan.

D. Pengumpulan Data

1. Pengumpulan bahan

Buah labu kuning (*Cucurbita moschata D*) yang dikumpulkan dalam penelitian ini berasal dari wilayah Bengkulu, buah yang dipilih adalah yang berkulit kuning kecoklatan, daging buah jingga, biji pipih, daging keras dan sedikit berair.

2. Determinasi tanaman

Determinasi buah labu kuning (*Cucurbita moschata D*) dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar Fakultas Sains dan Matematika Departemen Biologi Universitas Bengkulu.

3. Populasi dan sampel penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus L*) galur wistar yang diperoleh dari peternakan di Farmouse Jl. Merdeka Non.30 Beji Lewono, Ungaran Timur, dan sampel penelitian ini memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

- a. Tikus dalam kondisi sehat
- b. Tikus tanpa kelainan anatomi (cacat)
- c. Berat badan tikus berkisar 200 – 300 gram dan berumur 2 – 3 bulan

Dalam menetapkan jumlah sampel, peneliti menggunakan rumus Federer

$$(k-1)(n-1) > 15$$

$$(5-1)(n-1) > 15$$

$$4(n-1) > 15$$

$$4n > 15+4$$

$$n > 4,75 = 5$$

Ket :

k = jumlah kelompok

n = jumlah sampel dalam tiap kelompok

Semua sampel yang digunakan berasal dari 15 ekor tikus putih dengan 5 kelompok, 3 ekor tikus sebagai kontrol positif, 3 ekor tikus kontrol negatif dan 3 ekor tikus sebagai perlakuan dengan ekstrak etanol 70% daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata D*).

4. Alat dan bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mortir dan stick, gelas kimia, pengaduk, pipet, gelas ukur, timbangan analitik, filter vakum, dan pH meter (Prasongko *et al.*, 2020).

b. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata D*) Bahan tambahan yang digunakan adalah Carbopol 940, gliserin, metil paraben, propil paraben, propilen glikol, TEA dan aquadest (Prasongko *et al.*, 2020)

5. Pembuatan ekstrak etanol 70% daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata D*)

Simplisia daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata D*) dibuat dengan cara dijemur ditutupi kain hitam, kemudian dikeringkan pada suhu 50°C dalam oven. Buah yang sudah kering kemudian digiling menjadi serbuk, serbuk yang dihasilkan diayak dengan ayakan 100 mesh. Selain itu, ampas labu kuning (*Cucurbita moschata D*) sebanyak 300 gram diekstraksi dengan metode perendaman alkohol menggunakan etanol 70% selama 5x24 jam. Maserat yang dihasilkan (maserat) diuapkan menggunakan rotary

evaporator, maserat diuapkan kembali menggunakan penangas air untuk menghilangkan sisa pelarut dan memekatkan ekstrak. Ekstrak kental yang diperoleh dihitung dengan menggunakan rumus rendemen sebagai berikut :

$$\text{Rendemen: } \frac{\text{berat ekstrak yang didapat}}{\text{berat serbuk simplisia yang diekstrak}} \times 100\%$$

6. Skrining fitokimia

a. Uji flavonoid

Sampel dicampur dengan 3 ml etanol 70%, kemudian dikocok, dipanaskan dan dikocok kembali, kemudian disaring. Filtrat yang dihasilkan kemudian memberikan logam Mg dan 2 tetes HCl pekat. Terbentuknya warna merah, jingga, dan kuning pada lapisan etanol menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Prasongko *et al.*, 2020).

b. Uji kandungan senyawa saponin

Sebanyak 0,1 gram sampel ditambahkan ke 5 ml air suling dan dipanaskan selama 5 menit. Ekstrak kemudian disaring dan filtratnya dikocok. Adanya saponin ditunjukkan dengan munculnya buih dalam waktu ± 5 menit (Prasongko *et al.*, 2020).

c. Uji kandungan tanin

Ekstrak seluruh 0,1 gram sampel dengan 10 mL aquades, saring, lalu encerkan filtratnya dengan aquades sampai tidak berwarna. Filtrat yang diperoleh, ambil 2 ml larutan dan tambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida, munculnya warna biru atau biru tua menunjukkan adanya tanin. Warna hitam kehijauan atau biru tua yang terbentuk menandakan adanya tanin (Louis, 2021).

d. Uji bebas etanol

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak daging buah labu kuning benar-benar bebas dari etanol dengan cara menambahkan ekstrak dengan kalium dikromat dan asam sulfat H₂SO₄. Reaksi negatif ditunjukkan dengan tidak berubahnya warna menjadi biru yang menunjukkan tidak terdapatnya etanol dalam sampel.

7. Formulasi sediaan gel

Tabel 3.1 Formulasi sediaan gel daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata D*)

Formulasi				
Bahan	Kontrol	Formula I	Formula II	Formula III
	-	(F1)	(F2)	(F3)
Ekstrak daging buah labu kuning	-	2,5%	5%	7,5%
Karbopol 940	2%	2%	2%	2%
TEA	2%	2%	2%	2%
Gliserin	10%	10%	10%	10%
Propilen glikol	5%	5%	5%	5%
Metil paraben	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
Propel paraben	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
Aquadest ad	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Keterangan :

F1 : formulasi gel konsentrasi ekstrak 2,5%

F2 : formulasi gel konsentrasi ekstrak 5%

F3: formulasi gel konsentrasi ekstrak 7,5%

8. Pembuatan sediaan gel

Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Gel yang dikembangkan dibuat dengan menimbang 940 karbomer yang dilarutkan dalam aquades dan ditambahkan trietanolamin dan didiamkan selama 1x24, dimasukkan ke dalam mortir dan digerus hingga homogen. Timbang

gliserin, masukkan ke dalam mortir hingga homogen dan membentuk gel bening. Timbang metil paraben dan propil paraben dalam gelas kimia, diaduk hingga larut dan homogen. Campuran dalam gelas kimia dimasukkan ke dalam mortir mengandung massa gel, campur dan kocok hingga homogen. Timbang propilen glikol, campur dengan ekstrak yang telah ditimbang, aduk hingga homogen, kemudian tambahkan ke dalam mortir dan giling hingga homogen. Gel yang sudah homogen dimasukkan ke dalam wadah tertutup (Prasongko *et al.*, 2020).

9. Evaluasi sediaan gel ekstrak daging buah labu kuning

a. Uji organoleptik

Meliputi bentuk, warna dan bau. Gel yang dihasilkan memiliki bentuk semi padat yang menjadi ciri khas dari gel itu sendiri (Prasongko *et al.*, 2020).

b. Uji homogenitas

Uji homogenitas adalah pengujian campuran komponen dalam sediaan gel yang menunjukkan susunan yang homogen. Pengujian ini dilakukan pada basis geldan juga gel dengan konsentrasi 2,5%, 5% dan 7,5% (Prasongko *et al.*, 2020).

c. Uji pH

Sebanyak 1 gram diencerkan dengan 10 ml akuades. Elektroda pH meter dikalibrasi dengan buffer pH 7. Elektroda dicuci dengan akuades kemudian dikeringkan. Elektroda dicelupkan ke dalam larutan yang diperiksa. Elektroda dibiarkan di tempatnya sampai tampilan pH

meter menunjukkan angka yang stabil. Nilai pH sediaan topikal harus sesuai dengan pH kulit, antara 5 dan 6,5. Nilai pH yang terlalu asam dapat mengiritasi kulit dan nilai yang terlalu basa dapat menyebabkan kulit mengelupas (Prasongko *et al.*, 2020).

d. Uji daya sebar

Sebanyak 0,5 gram sediaan ditempatkan di tengah kaca bening yang dilapisi kertas kotak-kotak di bawahnya, kemudian ditutup dengan lembaran kaca bening lainnya dan diberi beban (100 gram) didiamkan selama 1 menit setelah diameter daerah penyebaran gel dilepaskan lalu diukur (Ratnapuri *et al.*, 2019) Spread 5-7 cm menunjukkan konsistensi semi-padat sangat nyaman digunakan.

e. Uji daya lekat

Sebanyak 0,5 gram ditebarkan pada kaca objek dengan permukaan yang telah ditentukan. Sebuah benda kaca seberat 1 kg kemudian diletakkan selama 5 menit. Bilah dipasang pada alat uji, beban yang dilepaskan ditimbang 100 gram dan dicatat waktu sampai kedua bilah dilepaskan (Ratnapuri *et al.*, 2019). Persyaratan untuk daya lekat yang baik tidak kurang dari 1 detik (Priawantom And Hadning, 2017).

f. Uji viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield Rotor dijalankan dan diuji dengan nomor spindel yaitu 4 dan menggunakan kecepatan 30 dan 60 rpm. Pembacaan dial

dikalikan dengan faktor koreksi yang tercantum dalam bagan dokumentasi instrumen untuk mendapatkan nilai viskositas. Persyaratan viskositas yang baik adalah 2000-50000 cPs (Mayangkara, 2011).

10. Uji efektivitas sediaan gel terhadap penyembuhan luka

a. Penyiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar. Ukurannya lebih besar dari mencit, mudah dipelihara dalam jumlah banyak, dengan kriteria mendatangkan ras murni, umur 2-3 bulan, 200-300 gram dan sehat. (Kemenkes RI, 2016).

b. Pembuatan luka bakar pada tikus putih

Dilakukan perlakuan bulu pada punggung tikus dicukur dengan diameter kurang lebih 2 cm lalu di anestesi lokal dengan etil klorida spray untuk mengurangi rasa sakit. Setelah disemprotkan etil klorida spray, logam berdiameter 2 cm dengan permukaan datar dipanaskan pada api bunsen selama 1 menit (diusahakan jarak antara api dengan logam sama setiap replikasinya) kemudian tempelkan ke punggung tikus yang dicukur selama 5 detik. Logam yang ditempelkan pada punggung tikus tidak boleh ditekan sehingga hanya terjadi luka bakar dangkal / luka bakar derajat II (Ghofroh, 2017).

Luka bakar pada tikus putih diobati dengan menerapkan formulasi seperti yang ditunjukkan pada Tabel 1. Setiap kelompok 3 tikus putih diperlakukan sebagai berikut:

- 1) Perlakuan A: Luka bakar ditutup dengan gel ekstrak daging labu 2,5% 3 kali sehari
- 2) Pengobatan B: Luka bakar ditutup dengan ekstrak daging buah labu kuning 5% 3 kali sehari.
- 3) Perlakuan C: Luka bakar dioleskan gel ekstrak ampas labu kuning 7,5%, 3 kali sehari
- 4) Pengobatan D: Luka bakar topikal bioplacenton (kontrol positif) 3 kali sehari.
- 5) Perlakuan E: Luka bakar dioleskan basis gel (kontrol negatif) 3 kali sehari.

Luka bakar yang terjadi diolesi dengan sediaan uji. Oleskan 3 kali sehari (pagi, siang dan sore) sampai luka bakar sembuh (diameter luka nol bila luka tertutup jaringan baru) (Arsyad, 2020). Data yang dianalisis adalah persentase penyembuhan luka bakar yang diperoleh dengan mengukur rata-rata diameter luka bakar. Pengukuran dilakukan sekali sehari setelah perlakuan dilakukan sebagai diameter rata-rata luka bakar pada setiap pengulangan perlakuan (Prasongko *et al.*, 2020).

Data yang dianalisis adalah persentase penyembuhan luka bakar yang diperoleh dengan mengukur rata-rata diameter luka bakar. Pengukuran dilakukan sekali sehari setelah perlakuan dilakukan dengan d_x (1,2,3) sebagai diameter rata-rata luka bakar pada setiap pengulangan perlakuan, d adalah jumlah perlakuan dalam rumus $d_x = \frac{d_1+d_2+d_3}{3}$

merupakan rata-rata diameter luka bakar (mm) dan setiap hewan uji (Prasongko *et al.*, 2020).

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan metode Anova satu arah (One Way Anova) untuk melihat apakah gel yang dibuat memiliki efek penyembuhan terhadap luka bakar yang pengambilan keputusannya didasarkan pada nilai F hitung dan F tabel. penyembuhan terhadap luka bakar dan jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ maka gel daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata D*) tiap perlakuan memiliki efek penyembuhan terhadap luka bakar.

Uji Anova satu arah dipilih karena hanya ada satu variabel independen yang akan diteliti, yaitu persentase penyembuhan luka bakar. presentase penyembuhan luka bakar.

$$\text{Rumus perhitungannya : } P\% = \frac{d_0 - dx}{d_0} \times 100\%$$

Keterangan :

P% : presentase penyembuhan luka

d₀ : diameter luka awal

dx : diameter luka pada hari pengamatan

c. Analisa data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan metode One Way Anova untuk melihat apakah ekstrak etanol 70% daging buah labu kuning (*Cucurbita moschata D*) yang dihasilkan

memiliki efek penyembuhan pada luka bakar. Keputusan didasarkan pada nilai F yang dihitung dan F tabel. Jika $F_{\text{hitung}} < F_{\text{tabel}}$, bagian ekstrak etanol 70% daging buah labu kuning (*Cucurbita moaschata D*) dari setiap perawatan memiliki efek penyembuhan pada luka bakar. Uji coba anova satu arah dipilih karena hanya ada satu variabel independen yang diteliti, yaitu persentase penyembuhan luka bakar. Jika hasil uji Anova menunjukkan nilai probabilitas 0,05 atau lebih kecil, maka akan terjadi perbedaan efek penyembuhan luka bakar antara masing-masing perlakuan. Uji statistik dilanjutkan dengan menggunakan LSD (Least Significant Difference) untuk melihat apakah ada perbedaan yang signifikan atau dapat diabaikan antara masing-masing perlakuan (Prasongko *et al.*, 2020).