

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai dari bulan Desember 2021 sampai dengan bulan Maret 2022. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Farmasi, Laboratorium Analisa Farmasi, Laboratorium Biologi Farmasi dan Laboratorium Teknologi Farmasi Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya Inderalaya.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas (Pyrex®), alat maserasi, botol *spray*, timbangan analitik (Ohaus®), oven (UN55-Memmert®), pH meter (Thermo Scientific Eutech®), penggaris, viskometer, perlengkapan kembang (Abduh Tikus Palembang®), alat cukur (Joyko®), alat suntik (Disposable Syringe®), kulkas (Sharp®), autoklaf (Lequitron®), *magnetic stirrer* (IKA® C-MAG HS 4), *biopsy punch* (Ribbel®), *rotary evaporator* (Biobase®) dan *stopwatch* (Diamond®).

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), karbopol^{®940} (Hannong Chemicals®), propilen glikol (DOW Chemical Pacific®), trietanolamin (TEA) (Salicylates & Chemicals®), metil paraben (Salicylates & Chemicals®), propil paraben (Salicylates & Chemicals®), dimetil sulfoksida (DMSO) (EMSURE®), akuades (PT. Dira Sonita®), etanol 70% (PT. Brataco®), etanol 96% (PT. Brataco®), etil

asetat, lidokain 2%, metanol, natrium asetat, kloroform, hidroksietilselulosa (HEC), $AlCl_3$, NaCl, kertas saring (Whatman®), aluminium foil, plat KLT silika gel GF₂₅₄, krim veet®, dan tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* (Abduh Tikus Palembang®).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Penyiapan dan Pembuatan Ekstrak

Simplisia kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) didapat dari Desa Mulyorejo, Kecamatan Cepu, Kabupaten Blora, Provinsi Jawa Tengah. Jenis ekstraksi yang dilakukan berupa maserasi dengan pelarut etanol 70%. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan 1000 g serbuk simplisia kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dan pelarut etanol 70% sebanyak 10 liter. Maserasi pertama pada 1000 g serbuk simplisia ditambah dengan etanol 70% sebanyak 7500 ml dilakukan perendaman selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 3 hari dilakukan penyaringan dengan kain flannel atau kertas saring untuk memisahkan residu dan filtrat. Residu hasil maserasi pertama dilakukan maserasi yang kedua dengan penambahan sebanyak 2500 ml etanol 70% dan direndam selama 2 hari kemudian kembali disaring dengan menggunakan kertas saring. Hasil maserasi pertama dan kedua kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C (Komala, dkk., 2013).

3.3.2 Karakterisasi Ekstrak

3.3.2.1 Uji Kualitatif Ekstrak dengan KLT

Siapkan plat KLT silika gel GF₂₅₄ ukuran 1x5 cm dan ditandai batas awal dan akhir elusi 0,5 cm. Sebanyak 1 g ekstrak dilarutkan dalam 10 mL etanol 70%. Totolkan ekstrak pada garis batas awal plat KLT, kemudian dikeringkan. Elusi

dengan menggunakan pelarut etil asetat:n heksan dengan perbandingan pelarut 1:9 hingga diperoleh pola noda yang jelas. Amati bercak yang terbentuk di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm (Depkes RI, 2008).

3.3.2.2 Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan menggunakan panca indera untuk mendeskripsikan bau, warna dan tekstur dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) (Depkes RI, 2008).

3.3.2.3 Penetapan Kadar Sari larut Air

Penetapan kadar sari larut dilakukan dengan menimbang 0,5 g ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) kemudian dimasukkan kedalam labu ukur yang ditambahkan 10 mL kloroform. Campuran dihomogenkan berkali-kali selama 6 jam pertama kemudian didiamkan hingga 18 jam dan disaring. Sebanyak 2 mL campuran diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang sebelumnya telah dipanaskan dengan suhu 105°C. Sisa campuran dipanaskan pada 105°C hingga bobot tetap (Depkes RI, 2008). Kadar senyawa larut air dapat dihitung dengan Persamaan 1.

$$\% \text{ Kadar Sari Larut Air} = \frac{W_1 - W_0}{W_e} \times \frac{50}{10} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan

W₁ = bobot akhir filtrat + cawan penguap (g)

W₀ = bobot awal filtrat + cawan penguap (g)

W_e = bobot ekstrak

3.3.2.4 Penetapan Kadar Sari larut Etanol

Ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebanyak 0,5 g dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 10 mL dalam labu ukur. Pengujian ini dilakukan selama 24 jam dengan cara di homogenkan berkali kali selama 6 jam

pertama. Kemudian didiamkan selama 18 jam setelah itu disaring untuk menghindari penguapan. Uapkan filtrat sebanyak 2 mL dalam cawan yang telah ditimbang. Residu kemudian dipanaskan didalam oven pada suhu 105°C hingga bobot tetap (Depkes RI, 2008). Kadar senyawa larut etanol dapat dihitung dengan Persamaan 2.

$$\% \text{ Kadar Sari Larut Etanol} = \frac{W_1 - W_0}{W_e} \times \frac{50}{10} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan

W₀ = bobot awal filtrat + cawan penguap (g)

W₁ = bobot akhir filtrat + cawan penguap (g).

W_e = bobot ekstrak (g)

3.3.2.5 Uji Cemar Mikroba

Ekstrak sebanyak 1 g dilarutkan dalam 10 mL pengencer berupa larutan NaCl, dikocok hingga homogen didapatkan pengenceran 1. Sebanyak 4 tabung disiapkan, lalu 9 mL pengencer dimasukkan pada masing-masing tabung. Pengenceran 10 dipipet sebanyak 1 mL kedalam tabung pertama, kocok hingga homogen sehingga pengenceran 2 didapatkan, selanjutnya dilakukan hingga didapatkan pengenceran 4. Tuang 15 mL media NA (Nutrien Agar) yang telah dicairkan pada suhu 45°C kedalam tiap cawan petri kemudian dipipet sebanyak 1 mL setiap pengenceran dengan pipet steril kedalam masing-masing cawan petri, lalu digoyang agar suspensi tersebar merata. Setelah media memadat, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan posisi terbalik. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dan dikalikan dengan faktor pengenceran (Depkes RI, 2000).

3.3.2.6 Uji Cemar Logam

Uji cemaran logam dilakukan untuk menunjukkan bahwa cemaran logam tidak melebihi batas logam berat yang telah dipersyaratkan. Logam berat yang

diidentifikasi untuk pengujian pada penelitian ini berupa timbal (Pb). Kadar logam berat ditentukan dengan menggunakan alat spektroskopi serapan atom (AAS) (Depkes RI, 2000).

3.3.2.7 Penetapan Kadar Air

Timbang 1 g ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). Ekstrak dikeringkan di oven pada suhu 105°C selama 5 jam dan dilakukan penimbangan. Penimbangan dilakukan dengan selisih antara 3 penimbangan berturut-turut dan perbedaan tidak lebih dari 0,25%. Persen kadar air dihitung dengan Persamaan 3.

$$\% \text{ Kadar Sari Larut Etanol} = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100 \% \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan
 W_0 = bobot awal
 W_t = bobot akhir (g)

3.3.2.8 Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 1 g ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) ditimbang bobotnya dimasukkan kedalam krus silikat yang telah dipijarkan sebelumnya. Dipanaskan dengan menggunakan tanur dengan menaikkan suhu secara bertahap hingga 600°C hingga arang habis dan ditimbang bobotnya (Depkes RI, 2000). Persen kadar abu total dihitung dengan menggunakan Persamaan 4.

$$\% \text{ Kadar Abu Total} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100 \% \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan
 W_0 = bobot cawan kosong
 W_1 = bobot cawan + ekstrak (g)
 W_2 = bobot cawan + residu (g)

3.3.2.9 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total di didihkan dalam 25 mL asam sulfat encer selama 5 menit. Bagian yang tidak larut asam disaring dengan

menggunakan kertas saring bebas abu dan residu dibilas dengan air biasa. Kertas saring bebas abu kemudian dipanaskan hingga menjadi abu didalam tanur dengan menaikkan suhu secara bertahap hingga 800°C lalu kemudian bobot ditimbang dengan selisih tiga kali penimbangan tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2000). Persen kadar abu tidak larut asam dihitung dengan menggunakan Persamaan 5.

$$\% \text{ Kadar Abu Tidak Larut Asam} = \frac{W_2 - (Cx0,0076) - W_0}{W_1} \times 100\% \dots\dots\dots (5)$$

- Keterangan
 W_0 = bobot cawan kosong
 W_1 = bobot cawan + ekstrak (g)
 W_2 = bobot cawan + residu (g)
 C = bobot kertas saring

3.3.3 Formula Sediaan *Spray Gel*

Tabel 1. Formula *spray gel* ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Bahan (b/v) (%)	Fungsi	P	F1	F2	F3	F4
Ekstrak etanol kelopak bunga rosella	Bahan aktif	-	10	15	20	25
Carbopol®940	<i>Gelling agent</i>	1	1	1	1	1
Trietanolamine (TEA)	Agen pembasa	qs	qs	qs	qs	qs
Propilen glikol	Humektan	5	5	5	5	5
Metil paraben	Pengawet	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Propil paraben	Pengawet	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
DMSO	Pelarut	7	7	7	7	7
Akuades	Pelarut	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

(Sikumbang *et al.*, 2020).

Formula sediaan dapat dilihat pada Tabel 1 dengan beberapa variasi konsentrasi ekstrak. Formula sediaan *spray gel* didapat dari penelitian Sikumbang *et al.*, (2020) dengan karbopol sebagai basis gelnya dan digunakan sebesar 2,25%. Bahan lain yang digunakan berupa TEA 0,5%, propilen glikol 5%, metil paraben 0,2%, propil paraben 0,1%, dimetil sulfoksida 7% dan akuades sebagai pelarut. Penelitian Sikumbang *et al.*, (2020) dilakukan pengamatan selama 20 hari untuk melihat efektivitas sediaan *spray gel* sebagai penyembuh luka terbuka.

3.3.4 Pembuatan *Spray Gel*

Pembuatan *spray gel* ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) didispersikan terlebih dahulu dengan karbopol[®]940 dalam air hangat hingga homogen. Setelah homogen ditambahkan trietanolamin sesuai takaran kemudian larutan tersebut diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen dan dijadikan sebagai massa pertama. Dalam wadah terpisah masing-masing jumlah ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dilarutkan dalam dimetil sulfoksida hingga homogen dan dijadikan massa 2. Dalam wadah selanjutnya sebagai massa 3 bahan pengawet metil paraben dan propil paraben dilarutkan dengan ditambahkan larutan propilen glikol. Massa 3 dimasukkan kedalam massa 2 hingga aduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen setelah itu dimasukkan kembali ke dalam massa 1 dan aduk kembali hingga homogen. Kemudian campuran tersebut ditambahkan akuades dan aduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen sampai larutan jernih (Sikumbang *et al.*, 2020).

3.3.5 Evaluasi *Spray Gel*

3.3.5.1 Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik meliputi, bau, warna, kejernihan, pemisahan, dan perubahan-perubahan lainnya diamati dengan menggunakan panca indra (Martono & Suharyani, 2018).

3.3.5.2 Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan dengan cara mengusapkan sediaan untuk setiap formula diatas kaca preparat dan diamati sebaran partikel yang terbentuk

secara visual untuk partikel yang tidak larut. Setiap formula pengamatan dilakukan replikasi 3 kali (Martono & Suharyani, 2018).

3.3.5.3 Uji pH

Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi pada larutan buffer pH 4,7 dan 10. Pengujian pH dilakukan bertujuan mengamati stabilitas pH apakah masih masuk dalam rentang persyaratan pH sediaan topikal atau tidak (4,5-7) untuk menjamin sediaan tidak menimbulkan iritasi pada kulit (Martono & Suharyani, 2018).

3.3.5.4 Uji Viskositas

Pengujian viskositas dilakukan menggunakan viscometer VT-04F dengan jenis *Uni-cylinder rotational viscometer*. Diambil sebanyak 50 mL sediaan *spray gel* dimasukan kedalam gelas beker, masukan rotor alat kedalam gelas beker. Kemudian, alat viscometer dinyalakan pada kecepatan 62.5 rpm dan diamati pergerakan kesetabilan jarum penunjuk pada alat yang akan mengarahkan pada angka skala viskositas. Viskositas memiliki nilai dengan satuan cPs (Febrisiantosa *et al*, 2013).

3.3.5.5 Uji Pola Penyemprotan

Sediaan disemprotkan pada lembar plastik yang telah ditandai dengan nomor dan jarak yang sama. Yang diamati pada uji ini berupa diameter terpanjang dan terpendek kemudian dirata-ratakan. Pengujian dilakukan berulang dengan formula yang berbeda (Martono & Suharyani, 2018).

3.3.5.6 Uji Pump Delivery

Sediaan disemprotkan ke bagian permukaan kaca arloji yang telah ditimbang bobotnya sebanyak satu kali semprotan, kemudian dihitung berat *spray gel* yang keluar. Pengujian dilakukan sebanyak 5 kali, selanjutnya dihitung %CV. Nilai perhitungan %CV yang diperbolehkan adalah $\leq 5\%$ (Pawar *and* Chaudhary, 2015).

3.3.5.7 Uji Daya Tercuci

Uji daya tercuci dilakukan dengan menyemprotkan sebanyak satu kali sediaan *spray gel* kemudian diratakan lalu aliri air hingga noda pada sediaan hilang. Noda-noda sediaan yang hilang dicatat volume air yang digunakan (Niyogi *et al.*, 2012).

3.3.5.8 Uji Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan cara menyemprotkan sediaan pada kulit bagian lengan atas manusia dari jarak 3 cm (Kamishita *et al.*, 1992).

3.3.5.9 Uji Stabilitas

Pengujian sediaan *spray gel* dilakukan dengan cara sediaan diletakkan pada suhu dingin ($4\pm^{\circ}\text{C}$) selama 48 jam dilanjutkan dengan meletakkan sediaan dengan suhu panas ($40\pm^{\circ}\text{C}$) selama 48 jam (1 siklus). Pengujian dilakukan sebanyak 6 siklus dan diamati apakah terjadi perubahan selama pengujian. Pengamatan yang dilakukan meliputi organoleptis, homogenitas, viskositas dan pH (Suyudi, 2014).

3.3.6 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* dengan berat badan 200-300 g berumur 8 hingga 12 minggu yang

kemudian diadaptasi selama 7 hari. Pengadaptasian dilakukan dengan tujuan agar tikus dapat menyesuaikan dengan lingkungannya dan dilakukan pengamatan terhadap penimbangan berat badan serta kondisi perilaku tikus.

3.3.7 Pemberian Perlakuan

3.3.7.1 Pembuatan Luka Terbuka

Pengadaptasian tikus dilakukan selama 7 hari. Pada hari selanjutnya dilakukan pembuatan luka terbuka dengan cara mencukur rambut pada punggung tikus. Punggung tikus disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%. Tikus dianestesi menggunakan sediaan injeksi lidokain 2% dengan dosis 4 mg/kgBB. Luka dibuat dengan kedalaman ± 2 mm dan diameter lingkaran sebesar ± 8 mm pada bagian dorsal dengan menggunakan alat *biopsy punch* (Yunitasari, dkk., 2016).

3.3.7.2 Pemberian Sediaan *Spray Gel*

Pemberian perlakuan dibagi menjadi 8 perlakuan yang berbeda-beda selama 20 hari dengan penyemprotan sediaan *spray gel* sebanyak 1 kali sehari, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus Federer. Nilai n pada rumus Federer menunjukkan jumlah sampel pada kelompok dan nilai t pada rumus Federer menunjukkan jumlah kelompok hewan uji.

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

$$(8-1)(n-1) \geq 15$$

$$(8n-8-n+1) \geq 15$$

$$(7n-7) \geq 15$$

$$(7n) \geq 22$$

$$(n) \geq 3,14 \sim 3$$

Keterangan:

n = besar sampel per kelompok

t = jumlah kelompok uji

Dilihat dari hasil perhitungan dengan menggunakan rumus Federer didapatkan pengamatan dilakukan dengan menggunakan 4 ekor tikus dengan 8 perlakuan yang berbeda. Untuk mengatasi jika ada tikus yang mati maka setiap perlakuan uji ditambah 1 ekor tikus.

Tabel 2. Pemberian bahan uji

Kelompok	Perlakuan
Normal	Tidak diberi apapun
Positif	Diberi Tekasol® 1g/kgBB
1	Formula 1
2	Formula 2
3	Formula 3
4	Formula 4
5	Plasebo
6	Ekstrak 15%

3.3.8 Pengamatan Penyembuhan Luka

Pengamatan penyembuhan luka terbuka dihitung persen *recovery* atau luas area penyembuhan luka (Kusmiati et al., 2006). Penurunan diameter area luka merupakan tanda dari aktivitas penyembuhan pada luka. Pengamatan penyembuhan luka dilakukan selama 20 hari yaitu pada hari ke-4, 8, 12, 16, dan 20. Rumus persentase penyembuhan luka dapat dilihat dalam Persamaan 6.

$$\% Recovery = \frac{d_0 - dx}{d_0} \times 100 \dots \dots \dots (7)$$

Keterangan:

d = diameter rata-rata

d₀ = diameter luka setelah pemberian perlakuan luka

dx = diameter luka pada hari ke-x pengamatan

3.3.9 Analisis Data

Hasil pengujian pengamatan kemudian akan dianalisis dengan menggunakan software pengolah data yaitu SPSS. Uji normalitas dengan metode Shapiro-Wilk, jika data yang dihasilkan terdistribusi normal (nilai $p > 0,05$) maka dapat dilakukan dengan pengujian data menggunakan uji oneway ANOVA. Hasil pengujian dapat dilihat ada perbedaan atau tidaknya perbedaan yang signifikan antar kelompok dengan metode *Duncan*.