

### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan secara eksperimental bersifat laboratoris.

##### B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FKIK UMY) pada bulan Agustus – November 2014.

##### C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

###### 1. Variabel Penelitian

###### a. Variabel bebas :

Fase gerak pada metode kromatografi lapis tipis, kecepatan pengaduk homogenizer, jenis dan konsentrasi *gelling agent* CMC Na dan carbomer.

###### b. Variabel tergantung :

Warna bercak yang ditimbulkan dari identifikasi senyawa flavonoid, tannin dan saponin pada ekstrak tanaman patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.), karakteristik fisik sediaan gel berupa organoleptis (warna, bau dan bentuk sediaan), pH, homogenitas, daya sebar, daya lekat, daya proteksi dan stabilitas fisik sediaan gel yaitu *cycling test* dan *centrifugal test*.

c. Variabel terkendali :

Fase diam pada metode kromatografi lapis tipis, beban yang diberikan pada sediaan gel dengan uji daya sebar dan daya lekat, suhu penyimpanan dengan *cycling test*, dan kecepatan sentrifugator.

d. Variabel tidak terkendali :

Penotolan ekstrak pada metode Kromatografi lapis tipis, suhu dan kelembaban ruangan, dan alat (*Ultraturrax*, kulkas, oven, dan termometer) yang memenuhi standar.

## 2. Definisi Operasional

- a. Konsentrasi ekstrak patikan kebo disesuaikan dengan flora normal tetap dikulit yang dapat berpotensi patogen yaitu *Staphylococcus aureus* dengan daya hambat 12,5 % (Abu, *et al*, 2010).
- b. Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan identifikasi senyawa dengan warna bercak yang dideteksi menggunakan fase diam dan fase gerak yang sesuai.
- c. Fase diam yang digunakan plat selulosa untuk senyawa flavonoid dan plat silika untuk senyawa tannin dan saponin (Damayanti, 2001).
- d. Fase gerak yang digunakan n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) pada senyawa flavonoid dan tannin dan etil asetat : heksana (1 : 4) untuk senyawa saponin.
- e. Jenis *gelling agent* yang dipakai ada 2 yaitu CMC Na (basis alam) dan carbomer (basis sintetis) (Ida dan Noer, 2012).
- f. Konsentrasi *gelling agent* adalah seri kadar minimal basis CMC Na yaitu 1,5 %; 3 %; dan 4,5 % dan Carbomer yaitu 0,5 %; 1 %; dan 1,5 %.

- g. Kecepatan homogenizer (*Ultraturrax*) dipilih dengan variasi kecepatan pengadukan yaitu 3.400; 4.200; 5.000; 5.800 dan diuji secara makroskopis.
- h. Karakteristik fisik sediaan gel, evaluasi yang dilakukan sesaat setelah pembuatan gel untuk mendapatkan sediaan gel yang ideal dengan uji organoleptis (warna, bau dan bentuk sediaan), homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat dan daya proteksi.
- i. Stabilitas fisik sediaan gel, evaluasi yang dilakukan dengan *cycling test* dan *centrifugal test* untuk mendapatkan sediaan gel yang stabil dan ideal. Uji yang dilakukan selama *cycling test* meliputi organoleptis (warna, bau dan bentuk sediaan), homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat dan daya proteksi.
- j. Organoleptis, evaluasi gel secara makroskopis meliputi pengamatan pada warna, bau dan bentuk sediaan.
- k. Pengukuran pH, dilakukan dengan menggunakan *pH indicator stick* untuk mengetahui cocok tidaknya gel jika diberikan secara topikal pada telapak tangan.
- l. Homogenitas merupakan pengamatan sebaran partikel gel dengan tekstur tampak rata dan tidak adanya gelembung udara.
- m. Daya sebar merupakan kemampuan luas penyebaran gel pada telapak tangan sehingga gel nyaman digunakan.
- n. Daya lekat merupakan kemampuan dan berapa lama waktu yang dibutuhkan gel untuk melekat pada kulit.
- o. Daya proteksi merupakan kemampuan gel dalam melindungi kulit dari pengaruh luar.

- p. *Cycling test* merupakan uji stabilitas gel yang dilakukan sebanyak enam siklus selama 2 minggu untuk mendapatkan sediaan gel yang stabil dan ideal.
- q. *Centrifugal test* merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui terjadi sineresis pada sediaan gel.

#### **D. Instrumen Penelitian**

##### **1. Alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik (Mettler toledo®), kain hitam, tampan, oven (Memert®), kulkas (Samsung®), blender (Philips®), *waterbath* (Memert®), alumunium foil, tabung reaksi, *rotary evaporator*, alat-alat gelas yang lazim (gelas beker, gelas obyek, gelas ukur, labu takar, cawan petri, spatula dan gelas arloji), penangas air, sentrifugator (Hettich®), mikropipet, mikroskop, bejana maserasi, kertas milimeter block, kamera, anak timbangan (Protinal®), *indicator stick* (MColorpHast®), kertas saring, kertas label, saringan (Corong *Buncher*), sarung tangan, masker, alat uji daya lekat, alat uji daya sebar, lilin, homogenizer (*Ultraturrax*), *rotary evaporator*, termometer, pipa kapiler, kaca objek (Sail brand®), sinar ultra violet 254 nm dan 366 nm, botol semprot, penggaris plastik, tissue, plat KLT silika gel GF254, plat KLT selulosa, *stopwatch*.

##### **2. Bahan Penelitian**

Bahan yang dipakai pada penelitian ini adalah tanaman patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) yang diperoleh dari area sekitar Kampus Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY), carbomer (*pharm grade*), CMC Na (*pharm*

*grade*), etanol 70 %, etanol 96 %, propil paraben (*pharm grade*), metil paraben (*pharm grade*), propilen glikol (*pharm grade*), gliserin (*pharm grade*), aquadest, *Trietanolamin* (TEA) (*pharm grade*), kalium hidroksida (KOH), fenolftalein, sitoborat, *Lieberman Burchard* (asam sulfat : asetat anhidrat : methanol), besi (III) klorida, n-butanol, asam asetat, etil asetat, heksana.

## **E. Cara Kerja**

### **1. Identifikasi Tanaman**

Identifikasi tanaman patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

### **2. Pembuatan Simplisia**

Tanaman patikan kebo diambil di area kampus Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY). Semua bagian pada tanaman patikan kebo (bunga, akar, daun, batang) digunakan untuk penelitian ini. Tanaman kemudian dicuci dan dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada tanaman. Kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam, agar sinar matahari yang dipancarkan tidak merusak senyawa-senyawa dalam tanaman yang peka terhadap sinar matahari. Bahan yang sudah kering diserbuk menggunakan blender sampai halus. Serbuk yang sudah jadi, disimpan pada wadah tertutup dan menghindari dari tempat yang lembab.

### **3. Ekstraksi**

Metode pembuatan ekstrak tanaman patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) dilakukan dengan cara maserasi dan remaserasi. Serbuk kering seberat 3 kg

disiapkan dan direndam dengan etanol 96 % dengan perbandingan 1 : 2 selama 3 hari dalam bejana maserasi dengan pengadukan secara manual agar penyarian sempurna dan tidak jenuh terlalu cepat. Setelah itu, disaring dan dipisahkan antara filtrat dan ampas dengan kertas saring, penyarian dilakukan sebanyak 3 kali. Ampas yang dihasilkan dilakukan remaserasi selama 2 kali dengan perbandingan 1 : 1 tiap 1 harinya.

Filtrat diuapkan dengan rotary evaporator dengan kecepatan 200 rpm suhu 70 °C sehingga diperoleh ekstrak pekat. Lalu diuapkan kembali menggunakan penangas hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental agar lebih stabil dan tahan lama bisa disimpan pada suhu 4 °C.

#### **4. Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi disini menggunakan fase diam plat silika dan selulosa yang mana pelarut pengembang akan bergerak didalam fase diam, dengan adanya gaya kapiler pada lapisan berpori. Ekstrak dilarutkan terlebih dahulu baru bercak ditotolkan dengan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari tepi bawah lapisan dengan penotolan yang beragam. Siapkan bejana yang telah jenuh dengan fase gerak dan masukkan plat 10 x 3 cm kedalam bejana. Hasil dapat disimpulkan dengan warna bercak dan angka  $R_f$  dari ekstrak dengan deteksi sinar ultraviolet (254 nm dan 366 nm), bercak dapat diperjelas dengan reaksi penyemprotan. Rumus untuk menghitung  $R_f$  adalah sebagai berikut :

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen (b)}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut (a)}}$$

Nilai  $R_f$  dinyatakan hingga maksimal angka 1,0 dan nilai  $R_f$  yang baik akan menunjukkan pemisahan yang berkisar antara 0,2 – 0,8 (Gandjar dan Rohman, 2007). Analisis kandungan senyawa dengan kromatografi lapis tipis (KLT) terhadap ekstrak patikan kebo dilakukan sebagaimana berikut ini :

a. Flavonoid

Fase diam : Selulosa  
 Fase gerak : n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5)  
 Deteksi : sinar UV<sub>256</sub> , UV<sub>366</sub> , Sitoborat

b. Saponin

Fase diam : Silika Gel  
 Fase gerak : etil asetat : heksana (1 : 4)  
 Deteksi : sinar UV<sub>256</sub> , UV<sub>366</sub> , Lieberman Burchard

c. Tannin

Fase diam : Silika Gel  
 Fase gerak : n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5)  
 Deteksi : sinar UV<sub>256</sub> , UV<sub>366</sub> , FeCl<sub>3</sub>

### 5. Formulasi Gel *Hand Sanitizer*

Gel diformulasikan dengan tanaman patikan kebo (*Euphorbia hirta* L) sebagai zat aktif dan *gelling agent* yang digunakan adalah CMC Na dan Carbomer (Ida dan Noer, 2012). Pada penelitian ini dibuat 6 formula, yaitu formula gel dengan konsentrasi CMC Na 1,5 % (N1), konsentrasi CMC Na 3 % (N2),

konsentrasi CMC Na 4,5 % (N3) dan formula gel dengan konsentrasi carbomer 0,5 % (C1), konsentrasi carbomer 1 % (C2), konsentrasi carbomer 1,5 % (C3). Formula selengkapnya dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 1. Komposisi Formula Gel Ekstrak Tanaman Patikan Kebo

Komposisi/Bahan	Konsentrasi (% <sup>b</sup> / <sub>v</sub> )					
	N1	N2	N3	C1	C2	C3
Ekstrak Tanaman Patikan kebo	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
CMC Na	1,5	3	4,5	-	-	-
Carbomer	-	-	-	0,5	1	1,5
Trietanolamin	-	-	-	1	1	1
Gliserin	10	10	10	10	10	10
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Propilen glikol	10	10	10	10	10	10
Aquadest add	100	100	100	100	100	100

Pada pemilihan kadar *gelling agent* CMC Na dan carbomer, dipilih konsentrasi *range* terendah (Rowe, *et al.*, 2009). Diharapkan dengan konsentrasi rendah, formula yang dibuat sudah efektif untuk mendapatkan sediaan gel yang ideal dan stabil.

Pembuatan sediaan gel dilakukan dengan melarutkan metil paraben dan propil paraben sebagai kombinasi pengawet dalam aquadest panas dengan suhu hingga 70 °C (1). Kemudian, campurkan propilen glikol sebagai humektan dan kosolven untuk ekstrak tanaman patikan kebo sebagai zat aktif (2). Basis gel (CMC Na atau carbomer) ditambah dengan TEA (jika carbomer) sebagai platisizer dan

penetral pH baru dilarutkan dengan aquadest sedikit dan diaduk hingga mengembang membentuk gel yang jernih (3). Dari formula (2) dan (3) dicampurkan terlebih dahulu dengan homogenizer lalu ditambahkan dengan formula (1) dan menjadi formula (4), kemudian ditambahkan bahan lain seperti gliserin.

Kecepatan homogenizer bervariasi dimulai dari 3.400; 4.200; 5.000; 5.800 dengan pengamatan secara makroskopis untuk melihat sediaan gel yang terbentuk baik tanpa adanya gelembung udara dan memberikan kekentalan dan sifat alir yang baik. Setelah sediaan gel terbentuk secara homogen dan mengembang ditunggu hingga dingin agar sediaan stabil.

## 6. Uji Karakteristik Fisik Gel

Evaluasi dari keenam formula dilakukan sesaat setelah sediaan dibuat atau sewaktu dengan cara pengujian organoleptis, pengukuran pH, homogenitas, daya sebar, daya lekat, daya proteksi. Dari hasil uji tersebut, nantinya akan dipilih satu formula gel terbaik dari basis carbomer dan CMC Na yang akan masuk ke dalam pengujian stabilitas fisik sediaan gel berupa *cycling test* dan *centrifugal test*. Evaluasi karakteristik fisik sediaan gel adalah sebagai berikut :

### a. Pengamatan organoleptis

Pengamatan organoleptis dilakukan secara makroskopis dengan memeriksa warna, bau dan bentuk sediaan (Paye, *et al.*, 2001).

### b. Pengukuran pH

Pengukuran pH gel dilakukan dengan menggunakan pH *indicator stick* yang dicelup dengan sedikit sediaan gel selama 3 detik. Hasil pengukuran

dibandingkan dengan kisaran pH sesuai dengan perubahan warna yang terjadi pada kertas pH. Uji ini untuk mengetahui pH gel topikal yang sesuai yaitu berkisar 4,5 – 6,5 dimana jika gel memiliki pH yang terlalu basa maka dapat menyebabkan kulit menjadi kering dan jika terlalu asam akan menimbulkan iritasi pada kulit (Draelos dan Lauren, 2006).

c. Pengamatan homogenitas

Pengamatan homogenitas dilakukan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40 x untuk mengamati sebaran partikel gel yang diletakkan diantara dua kaca objek, dari sebaran tersebut dapat dilihat gel yang telah dibuat homogen atau tidak. Gel akan dinyatakan homogen apabila mempunyai tekstur yang tampak rata dan tidak menggumpal.

d. Uji daya sebar

Gel hasil formulasi sebanyak 0,5 gram diletakkan dengan hati-hati di atas kertas grafik yang ditindih kaca transparan, dibiarkan sesaat (60 detik). Luas daerah yang diberikan oleh sediaan dihitung. Gel kemudian ditutup lagi dengan kaca yang diberi beban sebesar 0 gram, 50 gram, 100 gram, 150 gram, 200 gram, dan 250 gram masing masing beban dibiarkan selama 60 detik.

Pertambahan luas yang diberikan oleh sediaan dapat dihitung. Selanjutnya dibuat grafik antara beban berbanding dengan luas sebaran gel. Semakin lebar diameternya, maka semakin baik penyebaran gelnya.

e. Uji daya lekat

Daya lekat gel diuji dengan cara melekatkan gel secukupnya di atas kaca objek yang ditandai 2 x 2 cm. Sampel 0,25 gram diletakan di atas 2 gelas obyek

yang telah ditentukan kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Setelah itu gelas obyek dipasang pada alat uji yang diberi beban 80 gram dan kemudian dicatat waktu pelepasannya gel dari gelas obyek. Semakin tinggi nilai daya lekat, maka waktu pelepasan sediaan akan semakin lama dan uji kemampuan gel untuk melapisi permukaan kulit secara kedap dan tidak menyumbat pori-pori serta tidak menghambat fungsi fisiologi kulit (Fujiastuti, 2013). Waktu pengamatan maksimal dibatasi selama 5 menit.

f. Uji daya proteksi

Siapkan kertas saring dengan ukuran 5 x 5 cm di tiap sisinya, lalu buat beberapa potong. Setelah itu basahi kertas saring dengan tetesan larutan reagen fenolftalein (PP) sebagai indikator dan dikeringkan. Lalu oleskan sediaan gel (tipis dan rata) pada kertas saring A. Sementara itu siapkan kertas saring B yang lain dengan ukuran 5 x 5 cm dan diberi lilin yang telah dicairkan guna untuk merekatkan kertas A ke kertas saring B.

Setelah merekat siapkan larutan kalium hidroksida (KOH) 1 N sebagai pewarna merah muda pada reagen fenolftalein (PP), catat waktu dan berilah beberapa tetes di atas kertas saring B. Catat waktu jika ada perubahan warna merah muda pada kertas saring ini maksimal dilakukan selama 5 menit. Uji untuk melihat kekuatan sediaan topikal gel *hand sanitizer* dalam melindungi kulit dari pengaruh luar (kotoran).

## 7. Uji Stabilitas Fisik Gel

Pada pengujian ini, dilakukan dengan cara memilih salah satu formula gel antiseptik *hand sanitizer* terbaik dari basis CMC Na dan carbomer yang memiliki karakteristik fisik sewaktu terbaik, selanjutnya dilakukan uji stabilitas fisik sediaan gel dengan dua metode, yaitu :

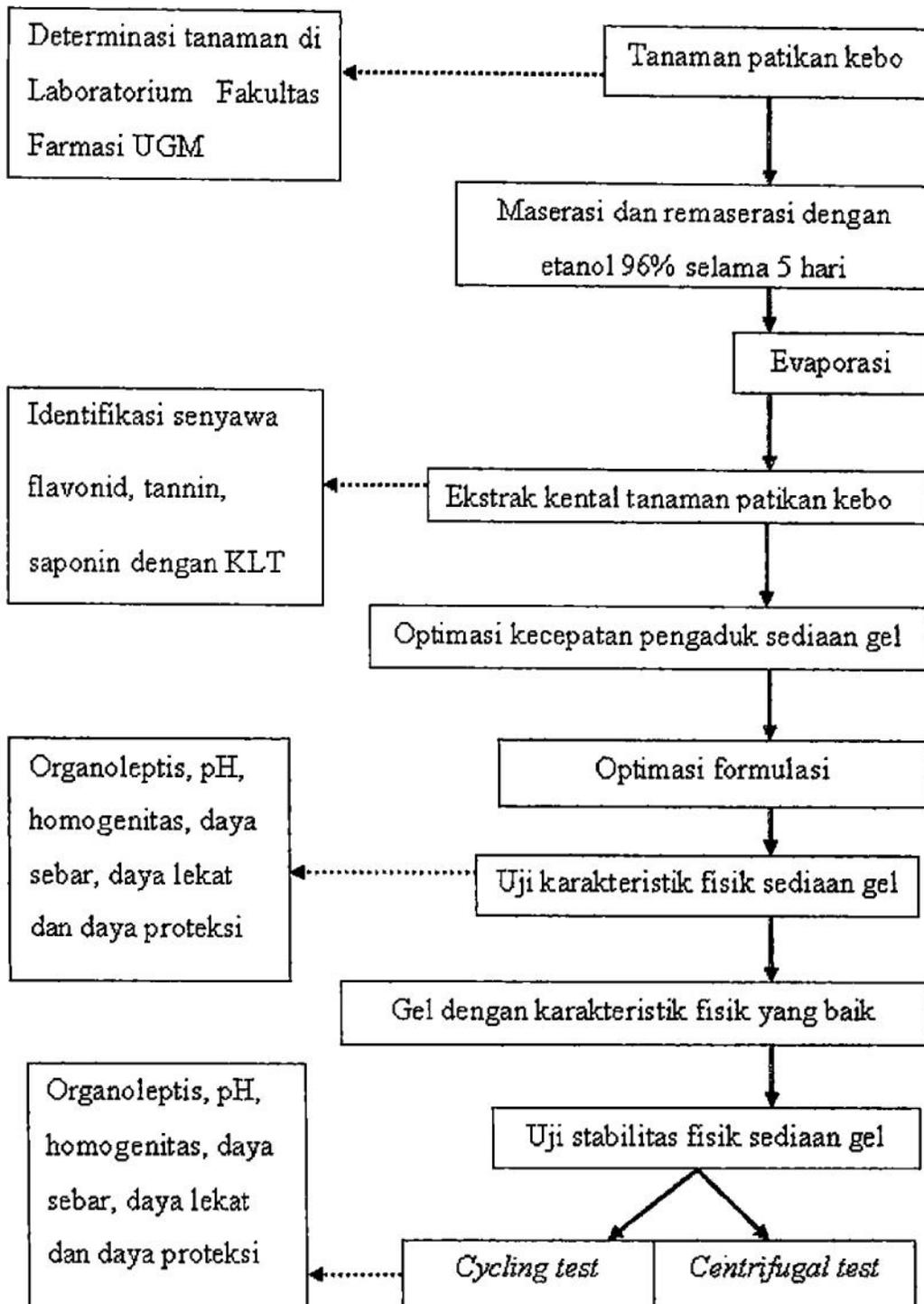
### a. *Cycling test*

Uji ini akan dilakukan sebanyak 6 siklus. Sampel disimpan pada suhu  $7 \pm 2$  °C selama 12 jam lalu dipindahkan ke dalam oven bersuhu  $40 \pm 2$  °C selama 12 jam, waktu selama penyimpanan dua suhu dalam dua hari tersebut dianggap satu siklus. Uji stabilitas dilakukan selama 2 minggu kemudian diamati karakteristik sediaan gel yang sama dengan yang diamati pada karakteristik fisik sewaktu yaitu pengujian organoleptis, pengukuran pH, homogenitas, daya sebar, daya lekat, daya proteksi.

### b. *Centrifugal test*

*Centrifugal test* sering disebut juga uji mekanik, pengujian dilakukan dengan cara sampel gel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dimasukkan ke dalam sentrifugator pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Gel lalu diamati ada tidaknya sineresis pada sediaan Apabila tidak terjadi pemisahan fase terdispersi dapat diartikan bahwa sediaan gel yang dibuat stabil dalam penyimpanan selama 6 bulan.

### F. Skema Langkah Kerja



Gambar 10. Skema Langkah Kerja

### G. Analisis Data

Hasil pemeriksaan kandungan senyawa flavonoid, tannin dan saponin dalam ekstrak tanaman patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) dengan metode kromatografi lapis tipis yang akan dibandingkan dengan warna bercak yang tampak pada penelitian sebelumnya dari profil hasil kromatografi lapis tipis dengan ekstrak tanaman patikan kebo (Damayanti, 2001). Pengamatan secara makroskopis pada variasi kecepatan pengadukan dalam pembuatan sediaan gel dengan *gelling agent* CMC Na dan carbomer.

Hasil dari optimasi formulasi dapat dilakukan pengujian karakteristik fisik sediaan gel berupa data yang diperoleh dengan replikasi tiga kali pada pengamatan organoleptis, nilai pH, homogenitas, daya lekat, daya proteksi yang disajikan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi dan daya sebar dalam bentuk grafik. Sedangkan data yang diperoleh dari stabilitas fisik formula terbaik dari basis CMC Na dan carbomer dengan metode *cycling test* dan *centrifugal test* yang dilakukan selama dua minggu dengan replikasi tiga kali uji karakteristik sediaan gel meliputi pengamatan organoleptis, homogenitas, nilai pH, daya lekat, daya proteksi yang disajikan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi dan daya sebar dalam bentuk grafik.