

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan unit atau individu dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi dalam penelitian ini adalah teh hijau yang ditanam di daerah Tawangmangu.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah teh hijau yang diambil secara acak dengan memilih daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau dari pangkal daun sampai ujung daun, masih segar, dan bebas dari penyakit.

A. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol daun teh hijau (*Camelia sinensis O.K. var assamica* (Mast.) yang diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi/ mempunyai hubungan dengan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah basis salep hidrokarbon dengan berbagai variasi konsentrasi.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas penyembuhan luka bakar dengan parameter pengecilan diameter luka setelah kelinci diberikan ekstrak metanol teh hijau dengan konsentrasi basis hidrokarbon yang berbeda-beda dan mutu fisik sediaan salep.

Variabel terkendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah proses pembuatan ekstrak kental, peralatan yang digunakan, lingkungan, luas luka yang dibuat, kedalaman pencukuran bulu, kondisi fisik hewan uji, yang meliputi berat badan, usia, galur, lingkungan tempat tinggal dan laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun teh hijau adalah daun teh hijau yang berasal dari Tawangmangu.

Kedua, serbuk daun teh hijau adalah serbuk daun teh hijau yang berasal dari pengeringan daun teh hijau segar.

Ketiga, ekstrak metanol daun teh hijau adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol kemudian dipekatkan diatas *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Keempat, uji aktivitas luka bakar adalah kemampuan dari salep ekstrak metanol daun teh hijau dalam menyembuhkan luka bakar yang diukur dari diameter luka bakar.

Kelima, luka bakar derajat dua adalah luka bakar bagian dermal superfisial sampai dalam, meliputi seluruh epidermis dan bagian dermis.

Keenam, salep adalah sediaan topikal yang dibuat dari campuran zat aktif dengan basis vaselin putih dan parafin cair dengan beberapa variasi konsentrasi.

Ketujuh, formulasi salep ekstrak metanol daun teh hijau yang efektif adalah formulasi salep ekstrak metanol daun teh hijau yang tidak memiliki perbedaan signifikan terhadap kontrol positif, memiliki perbedaan signifikan terhadap kontrol negatif dan memiliki persentase penyembuhan luka bakar yang paling besar.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian yang dilakukan ini antara lain adalah oven, blender, gelas ukur, ayakan mesh 40, penggaris, beaker glass, cawan porselin, timbangan gram, lempengan besi dengan diameter 2 cm, alat pencukur bulu, isolasi tebal, gunting, dan korek api sebagai alat standarisasi luka bakar,

rotary evaporator, mortir, stamper, batang pengaduk, cawan porselin, sudip, obyek glass, lempeng kaca extensometer, viskometer (VT-04E RION) dan pH meter.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun teh hijau (*Camelia sinensis O.K. var assamica* (Mast.) yang berasal dari pengeringan daun teh segar diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa tengah. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci yang telah dikondisikan selama satu minggu yang kemudian dengan sengaja dibuat luka bakar menggunakan lempeng logam dengan diameter 2 cm. Bahan lain yang juga digunakan dalam penelitian ini adalah metanol dan basis untuk pembuatan salep yaitu vaselin putih dan parafin cair, serta pengawet nipasol.

C. Formulasi Salep Ekstrak Daun Teh Hijau

Rancangan formulasi salep ekstrak daun teh hijau dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rancangan formulasi salep ekstrak daun teh hijau

Bahan (g)	Formula Salep Ekstrak Daun Teh Hijau		
	FI	FII	FIII
Ekstrak daun teh hijau	20	20	20
Nipasol	0,01	0,01	0,01
Vaselin putih	39,995	55,993	71,991
Parafin cair	39,995	29,997	7,999
Bobot total	100	100	100

Keterangan :

Sediaan salep ekstrak daun teh hijau dibuat dalam 3 formula :

FI : mengandung basis salep vaselin putih : parafin cair dengan konsentrasi 50% : 50%

FII : mengandung basis salep vaselin putih : parafin cair dengan konsentrasi 70% : 30%

FIII: mengandung basis salep vaselin putih : parafin cair dengan konsentrasi 90% : 10%

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan daun teh hijau

Sampel daun teh hijau (*Camelia sinensis O.K. var assamica* (Mast.) segar, didapat dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah, dan dilakukan Determinasi di Universitas Setia Budi. Pengambilan daun teh hijau dilakukan dengan memetik bagian tengah (2-4 daun dari atas pucuk). Daun teh hijau yang sudah diambil

selanjutnya ditimbang sebagai bobot kering dan setelah itu dilakukan perhitungan persentase bobot kering.

2. Pengeringan daun teh hijau

Daun teh hijau (*Camelia sinensis O.K. var assamica* (Mast.) yang sebelumnya telah diambil kemudian dicuci bersih selanjutnya dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 50°C sampai kering. Pengeringan dilakukan di Pabrik Teh Kemuning.

3. Pembuatan serbuk daun teh hijau

Daun teh hijau (*Camelia sinensis O.K. var assamica* (Mast.) yang telah di keringkan selanjutnya di serbuk dengan menggunakan mesin penyerbuk yang berada di Universitas Setia Budi Surakarta. Serbuk lalu diayak dengan ayakan mesh 40 lalu ditimbang untuk mendapatkan bobot akhir serbuk. Disimpan dalam wadah yang kering dan bersih. Rendemen serbuk dapat dihitung dengan cara :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot serbuk yang diperoleh}}{\text{Bobot daun kering}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

(Depkes 1995).

4. Analisis serbuk daun teh hijau

Analisis serbuk daun teh hijau dilakukan secara organoleptis. Organoleptis serbuk diperoleh berdasarkan bentuk, warna, dan bau dari serbuk daun teh hijau yang diuji.

5. Pengukuran kadar kelembapan serbuk daun teh hijau

Serbuk daun teh hijau ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian serbuk diukur kadar lembabnya dengan menggunakan *moisture balance* yang terlebih dulu dipanaskan selama kurang lebih 10 menit. Kemudian diletakkan 2 gram serbuk diatas wadah aluminium secara merata. Temperatur dan waktu diatur secara otomatis, lalu menyalakan alat, ditunggu sampai alat selesai membaca kadar kelembapannya. Catat nilai yang terbaca pada alat (Voigt 1994).

6. Pembuatan ekstrak daun teh hijau

Serbuk daun teh hijau sebanyak 400 gram direndam dengan 20 liter metanol dan didiamkan selama 2 jam serta ditutup dengan menggunakan aluminium foil untuk menjaga agar tidak terjadi penguapan dan hasil ekstrak

yang diperoleh akan lebih baik. Proses ini disebut sebagai tahap maserasi. Rendeman serbuk daun teh hijau disaring dengan menggunakan kertas saring. Prosedur selanjutnya, hasil saringan daun teh hijau dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C selama 4 jam yang berguna untuk memisahkan pelarut dengan ekstrak daun teh hijau agar diperoleh ekstrak yang kental.

7. Identifikasi ekstrak kental daun teh hijau

Identifikasi ekstrak kental teh hijau dilakukan secara organoleptis. Organoleptis ekstrak kental teh hijau didapatkan berdasarkan bentuk, warna, dan bau dari ekstrak kental teh hijau.

8. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak daun teh hijau

8.1 Alkaloid. Ekstrak sebanyak 10 mg ditambahkan 5 mL amonia 25%, lalu ditambahkan 20 mL kloroform. Campurannya disaring sehingga diperoleh lapisan air dan lapisan pelarut organik. Lapisan air ditambahkan 2 tetes pereaksi dragendorff, jika terbentuk warna orange berarti ekstrak mengandung alkaloid (Farnworth 1966).

8.2 Flavonoid. 2 ml ekstrak metanol daun teh hijau yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 0,5 ml HCl pekat dan logam Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah, orange dan hijau tergantung pada struktur flavanoid yang terkandung dalam sampel (Alfinda *et al* 2008).

8.3 Saponin. 0,5 gram serbuk ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan dan dikocok kuat selama 10 detik, kemudian didiamkan selama 10 menit, terbentuk buih setinggi 1 hingga 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2 N buih tidak hilang (positif saponin) (Robinson 1995).

8.4 Tanin. 10 gram serbuk daun teh hijau tambah 100 ml air dididihkan selama 15 menit, saring filtratnya direaksikan dengan FeCl₃ 1%. Positif tanin jika terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan (Mutiatikum *et al* 2010).

9. Penentuan dosis ekstrak kental dan basis salep

Dosis yang ditetapkan untuk ekstrak kental teh hijau sesuai dengan penelitian sebelumnya adalah 20%. Basis salep hidrokarbon yang digunakan

dibagi dalam 3 kelompok dengan perbandingan vaselin putih dan parafin cair yang berbeda. Kelompok I yaitu 50%:50% kelompok II yaitu 70%:30%, dan kelompok III yaitu 90%:10% dengan melakukan orientasi terlebih dahulu.

10. Pembuatan salep ekstrak daun teh hijau

Vaselina putih dan parafin cair dilelehkan di atas *waterbath*, diaduk hingga homogen didalam mortir panas. Ekstrak daun teh hijau dan nipasol ditambahkan perlahan-lahan ke dalam basis salep pada mortir panas kemudian diaduk sampai homogen dan didiamkan sampai dingin. Salep kemudian dimasukkan dalam pot salep.

11. Pengujian sifat salep

11.1 Uji organoleptis. Sediaan salep diamati tampilannya secara visual mulai dari warna, tekstur, serta bau.

11.2 Uji homogenitas. Sebanyak 0,5 gram sediaan salep ambil diratakan pada obyek glass kemudian diamati secara visual. Sediaan uji harus menunjukkan susunan yang homogen.

11.3 Uji viskositas. Alat yang digunakan untuk uji viskositas adalah viskosimeter (VT-04E RION) dengan rotor yang sesuai (rotor nomor 1 dan nomor 2). Rotor ditempatkan di tengah-tengah beaker glass yang berisi salep, kemudian alat dihidupkan agar rotor mulai berputar. Jarum menunjukkan viskositas secara otomatis akan bergerak ke kanan. Setelah stabil, kemudian dibaca viskositas pada skala yang ada pada viskotester tersebut.

11.4 Uji daya lekat. Sediaan salep sebanyak 0,5 gram diletakkan di atas obyek glass yang telah ditentukan luasnya kemudian diletakan obyek glass yang lain di atas salep tersebut. Salep di antara lempeng obyek glass ditekan dengan beban 500 g selama 5 menit. Obyek glass yang saling menempel dipasang pada alat uji daya lekat dan dilepas dengan beban seberat 60 gram, kemudian dicatat waktu saat kedua obyek glass tersebut lepas.

11.5 Uji daya sebar. Sediaan salep ditimbang 0,5 gram, diletakkan pada pusat antara dua lempeng kaca extensometer, dibiarkan selama 1 menit lalu ukur diameter salep yang menyebar. Anak timbangan 50 gram ditambahkan pada lempeng sebelah atas, didiamkan 1 menit, dicatat diameter salep yang menyebar,

diulangi masing-masing dengan penambahan sampai beban 250 gram pada tiap salep yang diperiksa.

11.6 Uji pH. Pengukuran pH salep dilakukan dengan menggunakan alat pH meter. Sebanyak 0,5 g salep ekstrak metanol daun teh hijau dilarutkan dalam 50 mL air suling di dalam beaker glass. Alat pH meter dikalibrasikan terlebih dahulu dengan menggunakan larutan standar buffer 4, 7, dan 9. Elektroda dicelupkan dalam beaker glass selama 10 menit dan pH meter dibiarkan sampai menunjukkan angka yang konstan (Depkes RI 1995).

12. Pengelompokkan hewan uji

Pada penelitian ini digunakan 5 ekor hewan uji. Kriteria inklusi yang digunakan adalah 1 ekor kelinci mendapat 5 kelompok perlakuan, yaitu:

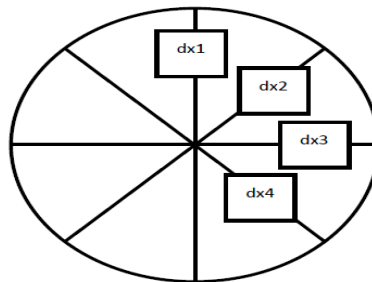
- a. Kelompok I : kontrol negatif (dioleskan basis salep)
- b. Kelompok II : dioleskan formula I
- c. Kelompok III : dioleskan formula II
- d. Kelompok IV : dioleskan formula III
- e. Kelompok V : kontrol positif (dioleskan salep mebo)

13. Perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 kelompok kelinci. Setiap kelompok berisikan 1 ekor kelinci putih. Sebelum diberi perlakuan, kelinci diaklimatisasi dengan lingkungan tempat penelitian selama 7 hari sambil tetap diberi pakan standar dan minum secukupnya. Pada hari ke-8 sebelum pembuatan luka, bulu disekitar punggung kelinci dicukur dan kulitnya diolesi dengan alkohol 70% kemudian kelinci dianastesi dengan ethyl chloride. Selanjutnya dilakukan pembuatan luka bakar derajat II pada punggung kelinci. Luka bakar dibuat menggunakan lempeng logam berdiameter 2 cm yang dipanaskan pada api sampai suhu 90°C kemudian ditempelkan pada kulit punggung kelinci selama 5 detik sampai terbentuk luka bakar derajat II yang ditandai oleh terjadinya pelepasan dan kulit terkelupas (Hasyim *et al* 2012). Setelah pembuatan luka bakar, dilakukan pengukuran diameter luka bakar. Pengolesan salep dilakukan setiap 2 kali sehari (pagi dan sore).

14. Pengukuran persentase penyembuhan luka bakar

Persentase penyembuhan luka dilakukan dengan mengukur diameter luka bakar dari hewan uji yang dimulai pada hari pertama dengan menggunakan penggaris. Pengukuran diameter dilakukan setiap hari dipagi hari pada masing-masing hewan uji sampai sembuh, setelah itu dilakukan perhitungan persentase penyembuhan luka bakar. Cara pengukuran diameter luka bakar dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 1. Cara mengukur diameter luka bakar (Suratman *et al* 1996)

$$dxn = \frac{dx1+dx2+dx3+dx4}{4} \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan :

- dx1 = pengukuran dilakukan secara horizontal dari atas ke bawah
- dx2 = pengukuran dilakukan dari kemiringan sudut 45°
- dx3 = pengukuran dilakukan secara vertikal dari kanan ke kiri
- dx4 = pengukuran dilakukan dari kemiringan sudut 135°

Parameter yang digunakan untuk pengukuran adalah persentase penyembuhan luka bakar pada hari ke-x. Perhitungan persentase penyembuhan luka dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

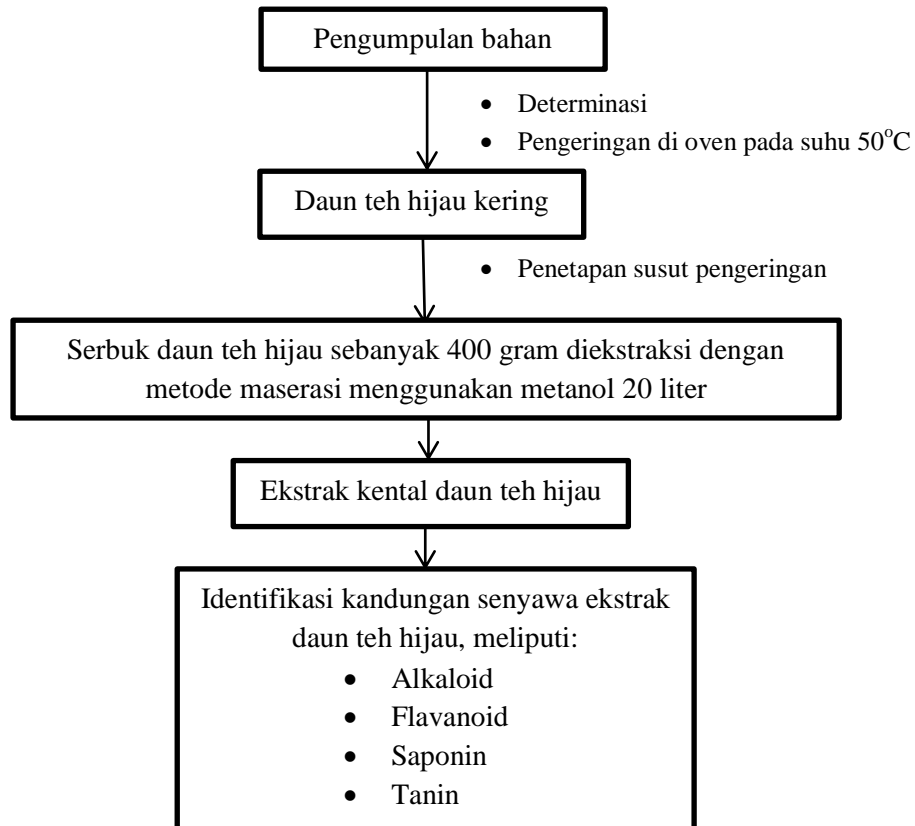
$$Ptn = \frac{(dt0)^2-(dtn)^2}{(dt0)^2} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

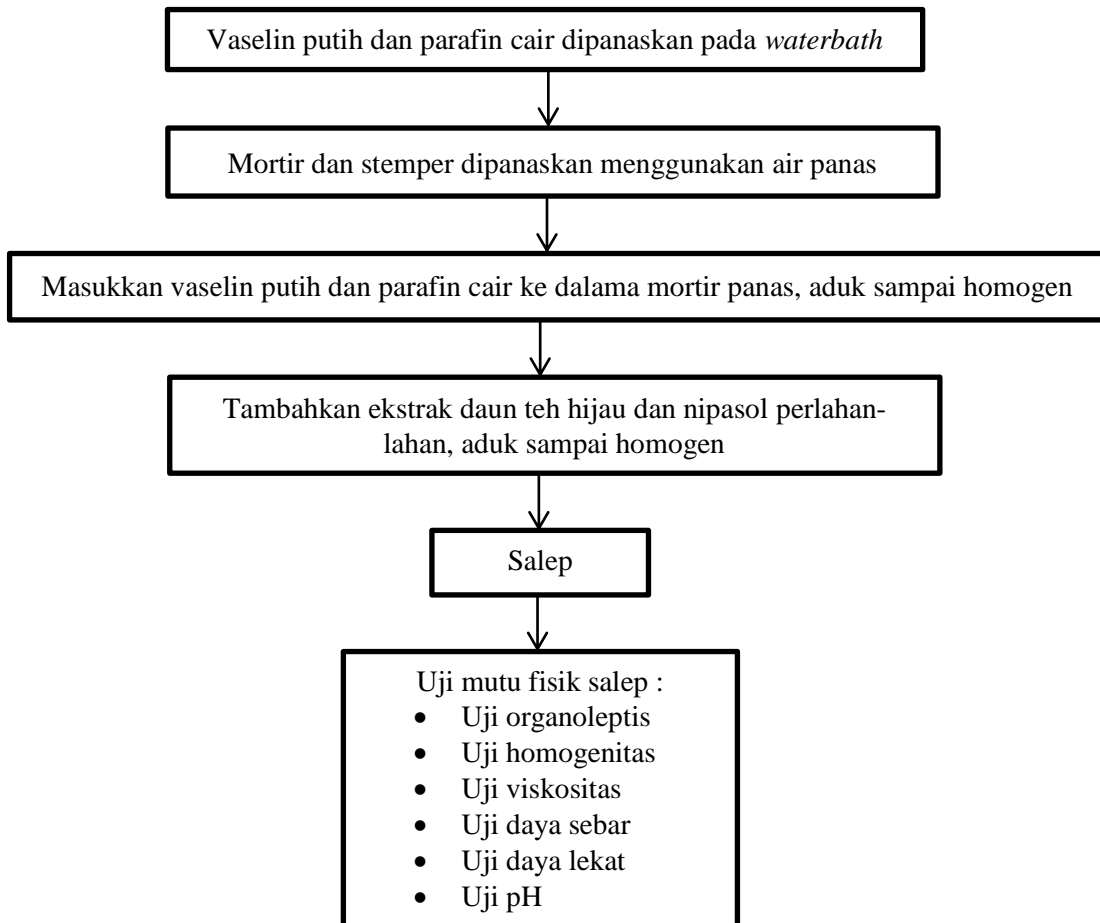
- Pt_n = persentase penyembuhan luka pada hari ke n
- dt₀ = diameter luka bakar hari pertama
- dt_n = diameter luka bakar hari ke-n

E. Skema Penelitian

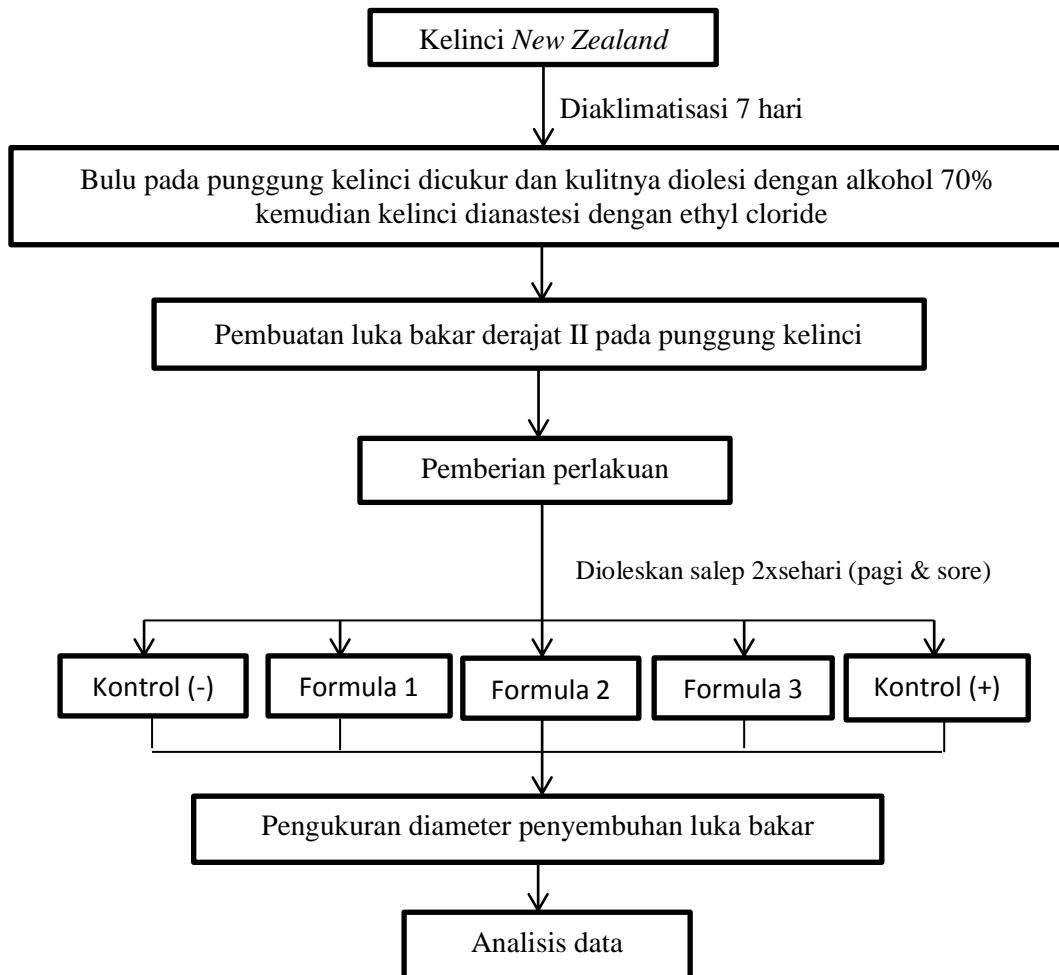
Skema penelitian dapat dilihat pada gambar 10, 11 dan 12.



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak daun teh hijau



Gambar 11. Skema pembuatan salep



Gambar 12. Skema uji aktivitas luka bakar

F. Analisis Data

Data pengukuran hasil persentase penyembuhan luka bakar pada kelinci dianalisis statistik menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat normalitas dan menggunakan uji *Levene* untuk melihat homogenitas. Bila data yang didapatkan dari pengujian tersebut terdistribusi normal dan homogen, maka dari itu dilanjutkan dengan analisis ANOVA (*Analysis of Variant*) dengan 0,05 atau 5 % sebagai tingkat kepercayaan. Bila hasil parametrik dari uji ANOVA menunjukkan data yang tidak signifikan maka tidak dilanjutkan dengan uji *Post hoc test*, dengan teknik *LSD*. Sebaliknya jika hasil uji menunjukkan ada perbedaan yang signifikan, maka uji lanjut (*Post Hoc Test*) harus dilakukan. Sedangkan jika tidak terdistribusi normal maka menggunakan *Kruskal Wallis*.