

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih (*Piper betle* L.)

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah emulgel dengan zat aktif ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* L.) dengan variasi konsentrasi ekstrak daun sirih 15%, 30 %, 45%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* L.) yang diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* L.) dengan berbagai konsentrasi 15%, 30%, 45%.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah mutu fisik sediaan emulgel yang baik dan pengaruh ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* L.) sebagai penyembuhan luka bakar derajat II pada punggung kelinci *New Zealand*.

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

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini

adalah ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* L.) dengan berbagai konsentrasi 15%, 30%, 45%.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah mutu fisik sediaan emulgel yang baik, dan pengaruh ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* L.) sebagai penyembuhan luka bakar derajat II pada punggung kelinci *New Zealand*.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah proses pembuatan ekstrak kental. Peralatan yang digunakan, lingkungan, luas luka bakar yang dibuat, kedalaman pencukuran bulu, kondisi fisik hewan uji, yang meliputi bobot hewan, usia, galur, lingkungan tempat tinggal, dan laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Daun sirih adalah daun yang diperoleh dari tanaman daun sirih yang berasal dari Jl. Raya Tawangmangu Kabupaten Karanganyar Jawa Tengah.

Serbuk daun sirih adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan, penggilingan, dan pengayakan daun sirih.

Ekstrak etanol daun sirih adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% selama 5 hari kemudian dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Uji aktivitas luka bakar adalah kemampuan dari emulgel ekstrak etanol daun sirih dalam menyembuhkan luka bakar yang diukur dari diameter luka bakar.

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

Emulgel adalah sediaan topikal yang dibuat dari campuran zat aktif dengan basis HPMC. Dilakukan evaluasi mutu fisik sediaan emulgel meliputi uji organoleptis, uji homogenitas, daya lekat, daya sebar, daya proteksi, dan stabilitas.

Pengujian organoleptis adalah pengujian yang dilakukan dengan menggunakan indra manusia sebagai alat utama untuk pengukuran daya

penerimaan terhadap produk, dengan mengetahui perubahan warna dan bau pada produk.

Pengujian homogenitas adalah seragam dalam komposisi yaitu warna, bentuk, dan ukuran sediaan emulgel yang tercampur antara ekstrak dengan bahan tambahan.

Pengujian viskositas adalah suatu pengujian pengukuran dari ketahanan fluida yang diubah baik dengan tekanan maupun tegangan.

Pengujian daya lekat adalah untuk mengetahui kualitas daya melekat sediaan emulgel pada kulit, hal tersebut akan berhubungan dengan lama waktu kontak emulgel dengan kulit hingga efek terapi yang diinginkan tercapai.

Pengujian daya sebar adalah pengujian yang dilakukan untuk mengetahui kualitas daya menyebar emulgel saat dioleskan pada kulit. Semakin besar daya menyebar maka sifat emulgel semakin baik.

Uji daya proteksi adalah pengujian yang dilakukan untuk melihat kemampuan emulgel dalam memberikan perlindungan pada kulit dari pengaruh luar seperti asam, basa, debu, polusi, dan sinar matahari.

Uji pH adalah pengujian yang dilakukan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan yang dimiliki oleh suatu larutan.

Uji stabilitas adalah pengujian untuk melihat kemampuan suatu produk untuk mempertahankan sifat dan karakteristiknya agar sama dengan yang dimilikinya pada saat dibuat, dalam batasan yang ditetapkan sepanjang periode penyimpanan dan penggunaan.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih (*Piper betle* L.), kelinci, etanol 70 %, tween 80, span 80, *hidroxypropyl methylcellulose* (HPMC), parafin cair, propilen glikol, propil paraben, metil paraben.

2. Alat

Alat yang digunakan antara lain timbangan analitik, blender, ayakan dengan no mesh 40, botol maserasi, gelas ukur, gelas beaker, cawan porselin, oven, *rotary*

evaporator, logam dengan diameter 2 cm, alat pencukur bulu, isolasi tebal, gunting, korek api sebagai alat standarisasi luka bakar, mortir, stemper, gelas ukur, pot emulgel, cawan porselin, viscometer cup and bob, objek glass, alat uji daya lekat, gelas objek, timbangan gram, stopwatch.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan bahan

Sampel daun sirih (*Piper betle* L.) yang masih segar dengan karakteristik daun tidak rusak, tidak hancur, daun utuh berwarna hijau muda dan memiliki aroma khas daun sirih, yang diperoleh dari Jl. Raya Tawangmangu Kabupaten Karanganyar Jawa Tengah. pengambilan daun sirih dilakukan dengan memetik bagian daun nya pada ranting daun yang menjalar yang masih segar.

2. Identifikasi simplisia tanaman daun sirih

Identifikasi tanaman pada tahapan ini adalah untuk menetapkan kebenaran sampel tanaman daun sirih dengan mencocokkan ciri makroskopik serta mikroskopik tanaman yang akan diteliti untuk menghindari kesalahan dari simplisia tanaman yang akan digunakan untuk tahap penelitian. Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi F-MIPA UNS Surakarta.

3. Pembuatan serbuk daun sirih

Daun sirih segar yang telah diperoleh dari daerah Tawangmangu kemudian disortasi kering dengan cara di masukkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 5 hari. Simplisia kering tersebut kemudian diserbuk dengan alat penggiling atau blender. Lalu diayak dengan ayakan mesh 40.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun sirih

Penetapan susut pengeringan serbuk daun sirih menggunakan alat *moisture balance*. Prosedur dilakukan dengan menimbang seksama sebanyak 2 gram serbuk daun sirih, kemudian dimasukkan ke alat *moisture balance* dengan suhu 105°C sampai diperoleh berat konstan.

5. Penetapan kadar air serbuk daun sirih

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen. Toluena sebanyak 200 ml yang digunakan dijenuhkan dengan air 20 ml terlebih dahulu, setelah itu dikocok dan didiamkan, kedua lapisan air dan toluene akan memisah kemudian air dibuang. Sebanyak 20 gram serbuk ditimbang dengan seksama dimasukkan dalam labu alas bulat dan ditambahkan toluene yang telah dijenuhkan dengan air. Labu dipanaskan dengan hati-hati, setelah toluen mendidih, penyaringan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes/detik. Setelah semua toluene mendidih, dilanjutkan pemanasan selama 5 menit, kemudian dibiarkan hingga dingin sampai temperatur kamar. Lapisan air dan toluene memisah sempurna pada saat proses pendinginan, volume air dibaca dan dihitung kadar air dalam persen terhadap berat ekstrak semula (Saifudin *et al.* 2011).

6. Pembuatan ekstrak daun sirih

Sebanyak 500 gram serbuk daun sirih dimaserasi dengan etanol 70% sebanyak 3750 ml di dalam botol kaca gelap, kemudian didiamkan selama 5 hari dan digojok 8 jam sekali. Hasil maserasi disaring dengan kain flannel steril. Filtrat 1 dipakai kembali untuk maserasi ke-2 dengan penyari etanol ad 5000 ml, kemudian hasil ekstraksi digabungkan. Hasil ekstraksi dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental (Dirjen POM 2008). Skema pembuatan ekstrak daun sirih dapat dilihat pada gambar 16.

7. Uji bebas alkohol ekstrak daun sirih

Pemeriksaan bebas alkohol pada ekstrak bertujuan untuk memastikan bahwa ekstrak pekat bebas dari etanol dengan reaksi esterifikasi. Prosedur dilakukan dengan menambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat ke dalam tabung reaksi yang berisi ekstrak kemudian dipanaskan. Jika tercium bau ester khas dari alkohol maka ekstrak masih mengandung etanol.

8. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia dilakukan untuk menetapkan kandungan kimia dalam ekstrak daun sirih.

8.1. Identifikasi alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan menimbang 2 gram ekstrak ditambah dengan 5 ml larutan amoniak dan 5 ml kloroform, setelah itu dicampur dan dipanaskan, dikocok, dan disaring. Asam sulfat 2N ditambahkan kedalam filtrat kemudian dikocok. Bagian filtrat diuji dengan pereaksi reagent *Mayer*, *Wagner*, dan *Dragendroff*. Hasil positif *Mayer* ditandai dengan endapan putih. Hasil positif *Dragendroff* ditandai dengan endapan merah jingga dan hasil positif *Wagner* ditandai dengan endapan coklat (Yunita 2009).

8.2. Identifikasi flavonoid. Uji dilakukan dengan menimbang 1 gram ekstrak ditambah dengan serbuk Mg 0,2 ml HCL pekat, dan beberapa tetes amilalkohol. Larutan dikocok dan dibiarkan memisah. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah coklat (Yunita 2009).

8.3. Identifikasi saponin. Uji dilakukan dengan memasukan serbuk sampel kedalam tabung reaksi yang telah berisikan aquadest 10 ml, kemudian dikocok, ditambahkan satu tetes larutan asam klorida 2 N dan di diamkan. Hasil positif untuk saponin dengan terbentuknya busa yang stabil selama 10 detik dengan ketinggian 1-3 cm (Novitasari dan Putri 2016).

8.4. Identifikasi tanin. Uji tanin dilakukan dengan melarutkan 80 mg ekstrak kedalam 50 ml air panas, disaring, filtrat dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan pereaksi $FeCl_3$ dan *Stiasny*. Filtrat yang terbentuk berwarna biru tinta atau hitam menunjukkan positif tanin galat, namun, jika filtrat ditambahkan dengan pereaksi *Stiasny* dan asam klorida (2:1) dipanaskan 30 menit. Jika terbentuk endapan merah berarti menunjukkan hasil positif tanin katekol (Densita 2015).

9. Rancangan formulasi emulgel

Formula dirancang dengan variasi konsentrasi ekstrak daun sirih pada tiap formula. Rancangan formula emulgel luka bakar ekstrak daun sirih dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rancangan formula emulgel luka bakar ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*)

Bahan	Formula %			
	F I	F II	F III	F IV
Ekstrak / Zat Aktif daun sirih (<i>Piper betle L.</i>)	15	30	45	-
HPMC	1,5	1,5	1,5	1,5
Paraffin cair	6,5	6,5	6,5	6,5
Span 80	1	1	1	1
Tween 80	0,5	0,5	0,5	0,5
Propilen glikol	10	10	10	10
Propilparaben	0,03	0,03	0,03	0,03
Metilparaben	0,02	0,02	0,02	0,02
Aqua purificata	100	100	100	100

Keterangan :

Formula 1 : emulgel ekstrak daun sirih konsentrasi 15%

Formula 2 : emulgel ekstrak daun sirih konsentrasi 30%

Formula 3 : emulgel ekstrak daun sirih konsentrasi 45%

Formula 4 : emulgel tanpa ekstrak daun sirih

10. Pembuatan sediaan emulgel

Pembuatan emulgel dilakukan sesuai komposisi formula yang tertera pada tabel. Semua bahan untuk pembuatan emulgel ditimbang terlebih dahulu dengan seksama, kemudian dilakukan pembuatan basis emulgel dengan cara pembuatan emulsi fase minyak dibuat dengan mencampurkan span 80 dengan paraffin cair pada suhu 70°C. Fase air dibuat dengan mencampurkan tween 80 dengan sebagian air pada suhu 70°C. Fase minyak dimasukkan kedalam fase air pada suhu 70°C sambil terus diaduk dengan pengaduk hingga terbentuk emulsi, kemudian pembuatan basis gel dengan mendispersikan HPMC dengan sedikit demi sedikit air panas dengan suhu 80°C, digerus sampai terbentuk basis gel, metil paraben dan propil paraben dilarutkan dalam propilen glikol, lalu dicampurkan dengan gel, kemudian emulsi dan gel yang sudah terbentuk dicampur dengan alat *homogenizer* pada kecepatan 300 rpm selama 30 menit sampai terbentuk emulgel, lalu ditambahkan ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle L.*) sebagai zat aktif sesuai komposisi formula yang tertera pada tabel menggunakan alat *homogenizer* pada

kecepatan 300 rpm selama 30 menit sampai homogen. Skema pembuatan emulgel dapat dilihat pada gambar 17.

11. Uji mutu fisik sediaan emulgel

11.1. Uji organoleptis. Pengujian ini dilakukan dengan menilai perubahan warna, bentuk, dan bau.

11.2. Uji homogenitas. Uji homogenitas dilakukan dengan cara mengambil sediaan dari emulgel pada bagian atas, tengah, dan bawah. Kemudian emulgel diletakkan pada objek glass lalu digosok dan diamati. Sediaan terbukti homogen karena tidak ada pemisahan komponen penyusun (Depkes RI 1979).

11.3. Uji viskositas. Pengujian viskositas dilakukan dengan alat viscometer Cup and Bob. Bagian cup diisi dengan sediaan emulgel kemudian dilakukan penentuan viskositas dengan melihat jarum yang menunjukkan angka yang stabil dengan satuan dpas. Pengujian dilakukan pada hari ke pertama setelah dibuat emulgel selanjutnya dilakukan pengamatan pada hari ke-7, ke-14, dan hari ke-21.

11.4. Uji daya lekat. Ditimbang emulgel sebanyak 1 gram kemudian sampel diatas gelas objek yang telah diketahui luasnya. Gelas objek yang lain diletakan diatas sediaan tersebut, kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Kemudian lepas beban kemudian hitung berapa lama waktu yang diperlukan gelas objek terlepas satu sama lain (Setiawan *et al.* 2018). Pengujian dilakukan pada hari ke pertama setelah dibuat emulgel selanjutnya dilakukan pada hari ke-7, ke-14, dan hari ke-21.

11.5. Uji daya sebar. Ditimbang sampel sebanyak 0,5 gram kemudian diletakan ditengah-tengah alat uji daya sebar kemudian di tutup dengan kaca penutup yang sudah ditimbang kemudian diukur dan dicatat. Selanjutnya ditambah beban dengan kelipatan 50 gram sebanyak 3 kali kemudian diukur daya sebar nya. Lakukan replikasi sebanyak 3 kali. Pengujian dilakukan pada hari ke pertama setelah dibuat emulgel selanjutnya dilakukan pada hari ke-7, ke-14, dan hari ke-21.

11.6. Uji daya proteksi. Pengujian daya proteksi dilakukan untuk mengetahui kemampuan emulgel melindungi kulit dari debu, polusi dan sinar

matahari. Pengujian daya proteksi emulgel dilakukan dengan cara penambahan KOH 0,1 N pada kertas saring.

11.7. Uji stabilitas. Pengujian dilakukan dengan metode *freeze thaw* yaitu menyimpan sediaan gel dalam kondisi suhu 4° C selama 48 jam kemudian dipindahkan pada suhu 48° C selama 48 jam (1 siklus). Uji stabilitas dilanjutkan sampai lima siklus. Setiap satu siklus dilihat ada atau tidaknya ketidakstabilan atau pemisahan fase gel (Ramadhani 2017).

11.8. Uji Ph. Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Emulgel dilarutkan dalam aquadest dengan perbandingan 1:9.

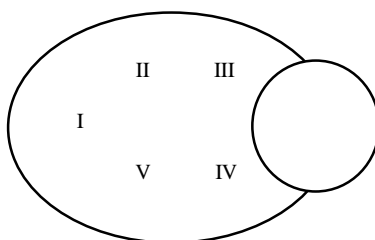
12. Pengelompokan hewan uji

Terdapat 5 kelinci dengan 5 perlakuan 5 luka pada kulit punggung kelinci :

Keterangan :

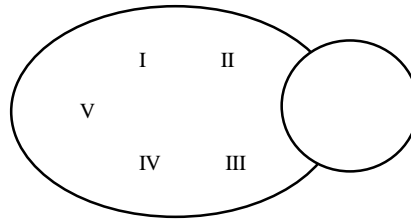
- Luka I : dioleskan emulgel ekstrak daun sirih 15%
- Luka II : dioleskan emulgel ekstrak daun sirih 30%
- Luka III : dioleskan emulgel ekstrak daun sirih 45%
- Luka IV : dioleskan emulgel tanpa ekstrak (kontrol negatif)
- Luka V : dioleskan bioplacenton (kontrol positif)

1. Perlakuan kelinci 1



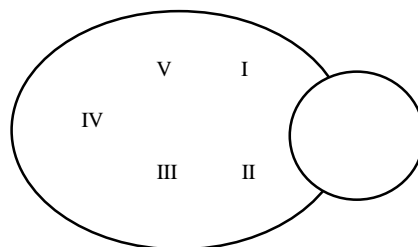
Gambar 10. Model lokasi pembuatan luka bakar pada kelinci 1

2. Perlakuan kelinci 2



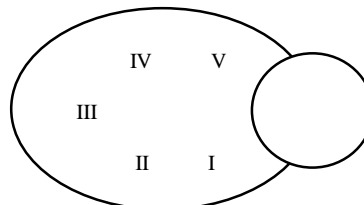
Gambar 11. Model lokasi pembuatan luka bakar pada kelinci 2

3. Perlakuan kelinci 3



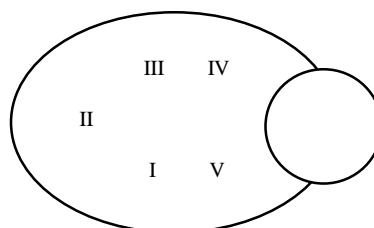
Gambar 12. Model lokasi pembuatan luka bakar pada kelinci 3

4. Perlakuan kelinci 4



Gambar 13. Model lokasi pembuatan luka bakar pada kelinci 4

5. Perlakuan kelinci 5



Gambar 14. Model lokasi pembuatan luka bakar pada kelinci 5

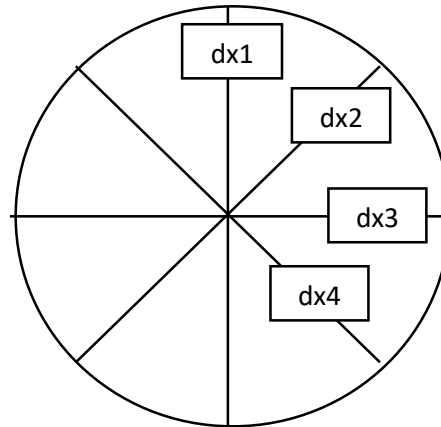
13. Perlakuan hewan uji penyembuhan luka bakar

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 ekor kelinci jantan yang sudah dirandomisasi terlebih dahulu, umur kelinci berkisar 8 sampai 12 bulan dengan berat badan antara 3,25 sampai 3,75 kg, warna putih, asal dari amerika serikat, hasil persilangan dengan kelinci *flemish giant*, mampu bertahan sampai 10 tahun (Sarfani *et al.* 2016). Kelinci *new zeland* diambil sebanyak 5 ekor dirandomisasi terlebih dahulu, kemudian ditempatkan kedalam kandang sesuai kelompok perlakuan dan diadaptasi selama 7 hari. Kelinci sebelum dua puluh empat jam perlakuan, rambut atau bulu punggung kelinci dicukur. Setelah itu kelinci dianestesi dengan ketamin disuntikkan secara intramuskular, setelah hewan sudah dalam kondisi teranestesi, dilakukan pembuatan luka pada punggung kelinci *new zeland* (Yudaniyanti *et al.* 2010). Pembuatan luka bakar derajat II dilakukan dengan cara lempeng logam diameter 2 cm dan tebal 1 cm dipanaskan dengan nyala api selama 5 menit lalu ditempelkan pada kulit punggung kelinci selama 5 detik. Emulgel dioleskan sesuai perlakuan 2 kali sehari selama 14 hari (Sutrisno *et al.* 2016).

14. Pengukuran parameter penyembuhan luka

Penyembuhan luka dilakukan dengan mengukur diameter luka bakar hewan uji dimulai pada hari ke-2, dengan menggunakan penggaris. Pengukuran dilakukan setiap hari pada hewan uji, sampai luka bakar dinyatakan sembuh. Parameter yang digunakan adalah presentase penyembuhan luka bakar pada hari ke-x.

Pengukuran presentase penyembuhan luka bakar dilakukan dengan rumus sebagai berikut :



Gambar 15. Pengukuran presentase penyembuhan luka bakar

Keterangan :

dx1 : Pengukuran dilakukan secara horizontal (dari atas kebawah)

dx2 : Pengukuran dilakukan dari kemiringan sudut 45°

dx3 : Pengukuran dilakukan secara vertical (dari kanan ke kiri)

dx4 : Pengukuran dilakukan dari kemiringan sudut 135°

Pengukuran presentase luka bakar dilakukan dengan rumus :

$$Px = \frac{dx_1 - dx_n}{dx_1} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan :

Px : presentase penyembuhan luka bakar hari ke-x

dx1 : diameter luka bakar hari ke pertama (cm)

dxn : diameter luka bakar hari ke n (cm)

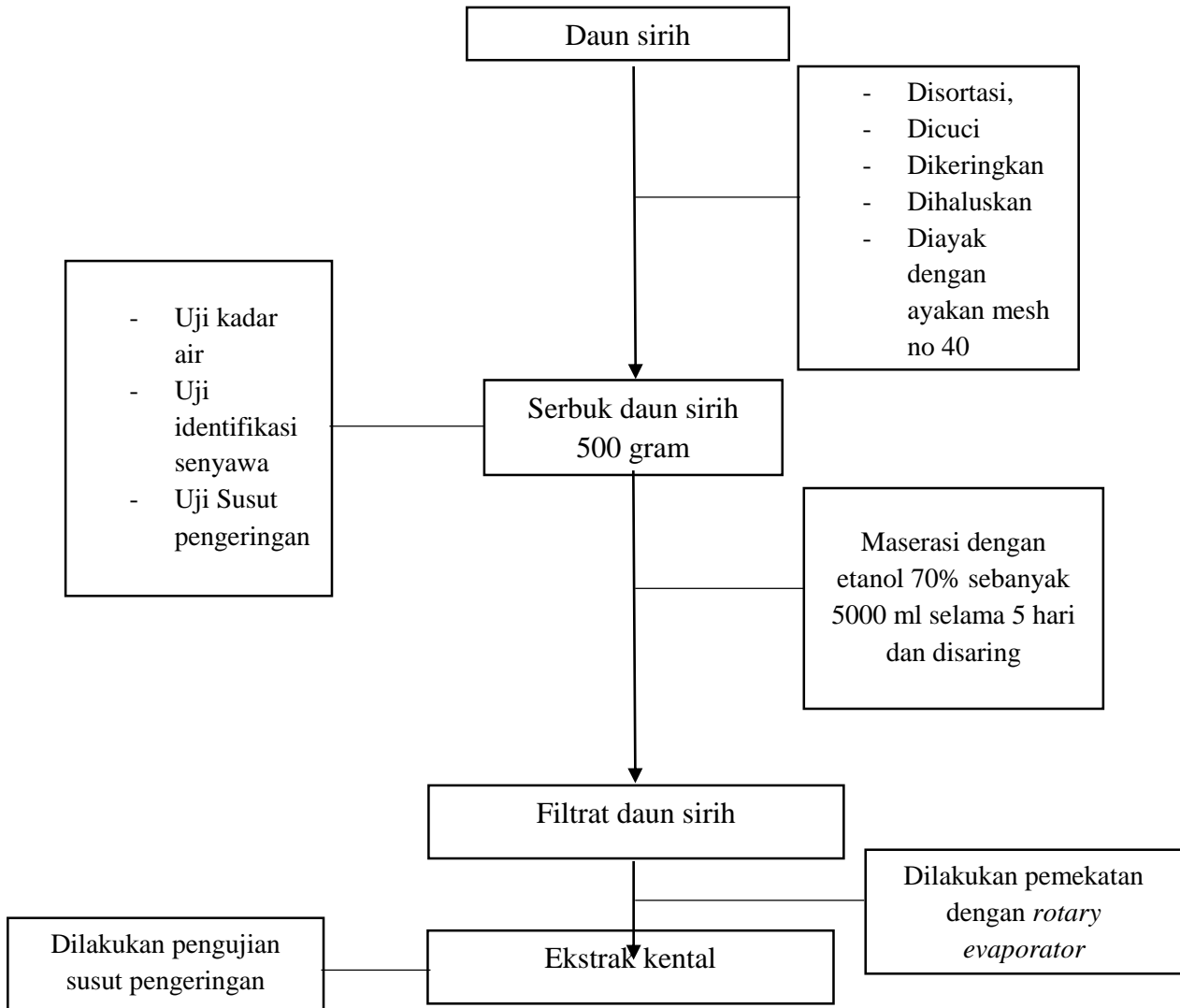
Pengamatan luka dilakukan 2 kali sehari selama 14 hari pada sore hari. Luka dianggap sembuh apabila diameter luka mencapai 0 cm atau merapat dan menutup lukanya (Handayani *et al.* 2016). Skema pengukuran diameter luka bakar dapat dilihat pada gambar 18.

E. Analisis Data

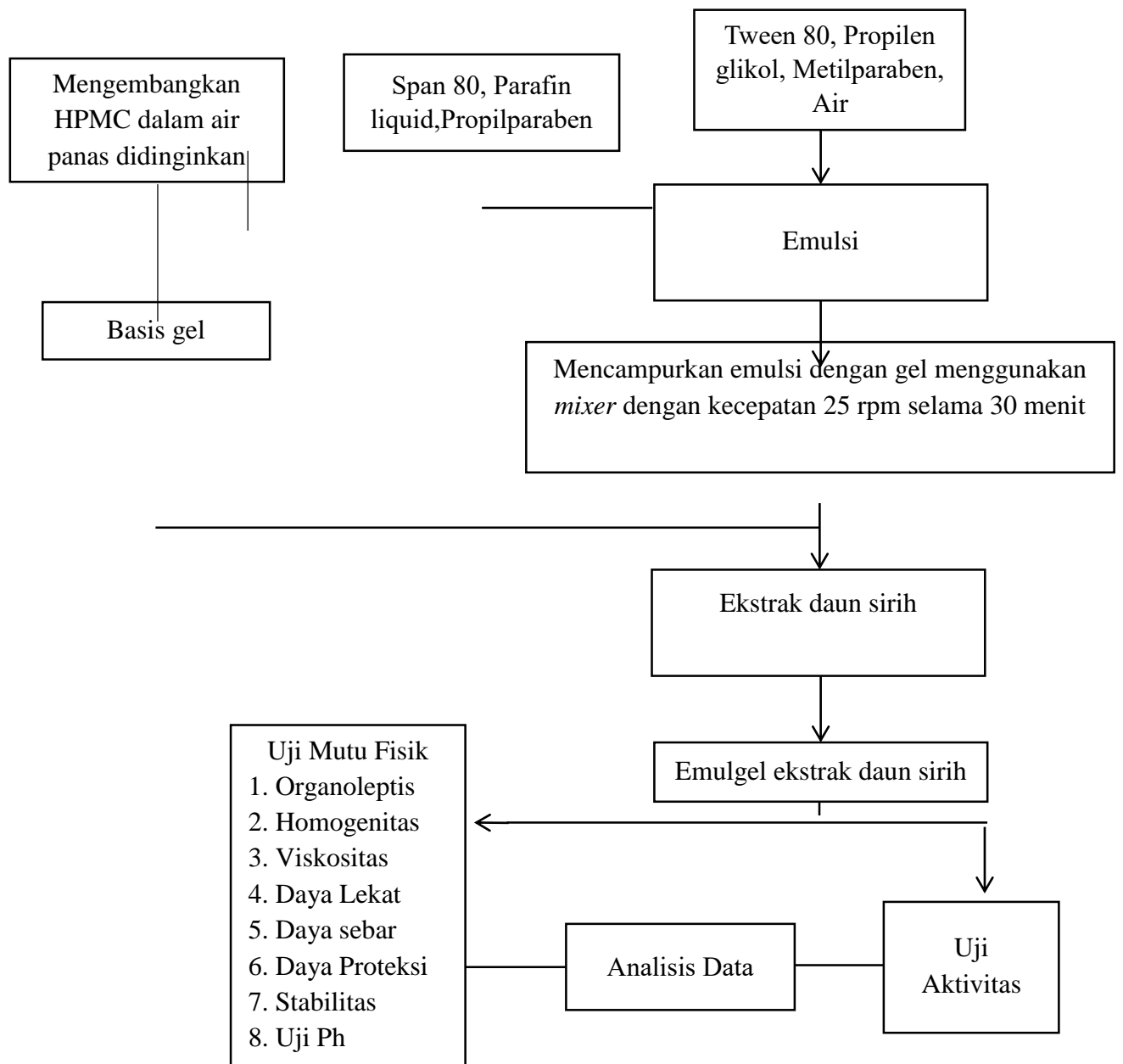
Data pengukuran hasil uji viskositas, daya lekat, daya sebar, dan luka bakar pada kelinci *New zealand*. Hasil formulasi dilakukan pendekatan statistic dengan menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Hasil data yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan uji Kolmogrof-Smirnof, jika data yang didapatkan terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji ANOVA (*Analysis of Variant*) dengan nilai 0,05 sebagai tingkat kepercayaan. Bila hasil parametrik dari uji ANOVA menunjukkan data tidak signifikan maka tidak dilanjutkan dengan uji *Post hoc test*.

Data hasil luka bakar untuk hari ke-14 pada emulgel luka bakar derajat II ekstrak daun sirih dapat dianalisis secara statistik menggunakan metode *Kolmogorv-Smirnov*. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan metode *one way ANOVA*.

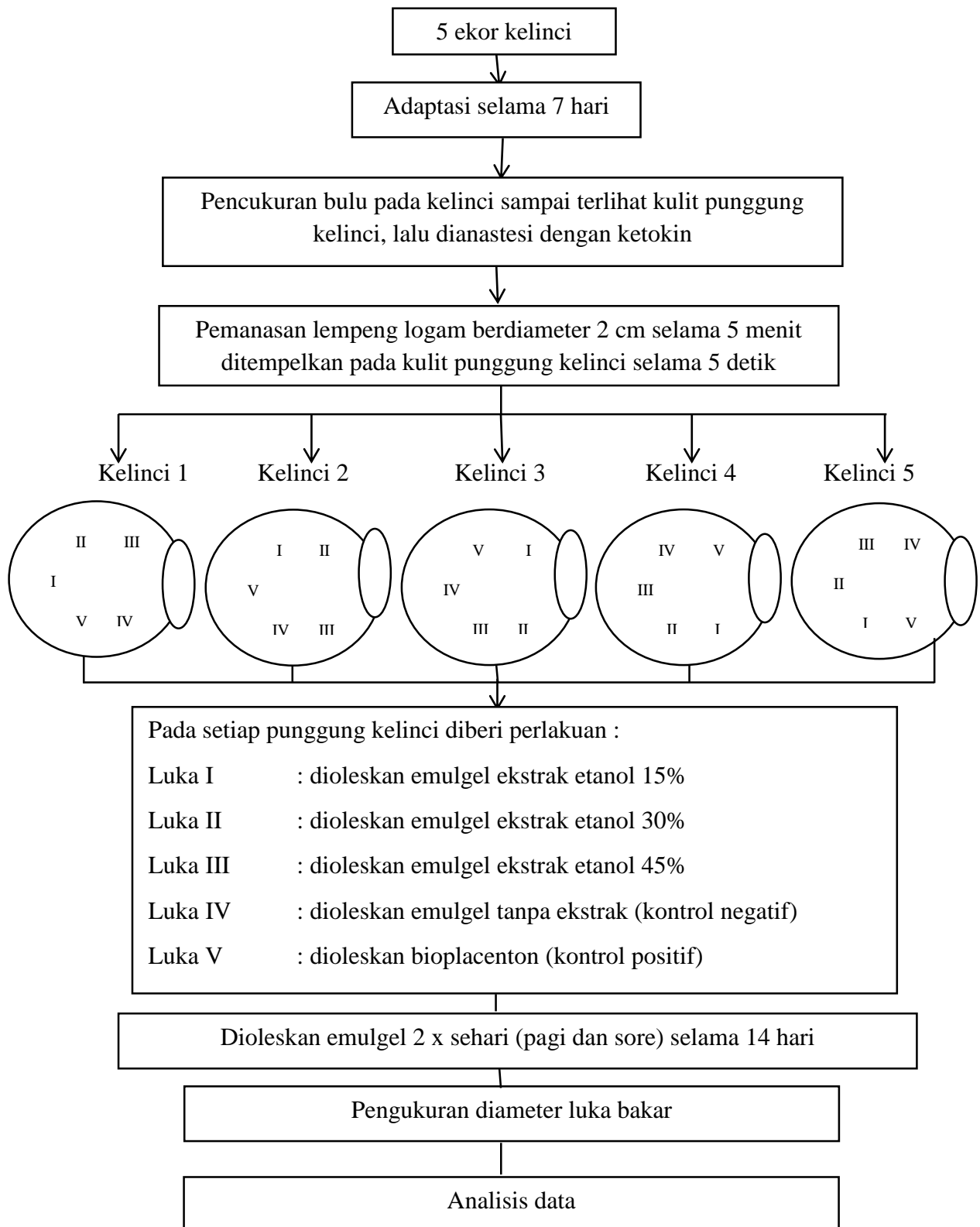
F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 16. Pembuatan ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*)



Gambar 17. Skema pembuatan emulgel luka bakar ekstrak daun sirih



Gambar 18. Skema Jalannya penelitian