

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 daun alpukat yang berasal dari tanaman alpukat yang di tanam di daerah Kemuning kabupaten Karanganyar Jawa Tengah dan diambil pada bulan Februari 2019.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun alpukat 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 dan hama.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian yang dilakukan ini adalah ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.) yang diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

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 untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian yang dilakukan ini adalah basis sediaan salep dengan berbagai variasi konsentrasi dan waktu pengamatan.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian. Variabel tergantung dalam penelitian yang dilakukan ini adalah aktivitas penyembuhan luka bakar dengan parameter diameter luka setelah kelinci diberi salep ekstrak etanol daun alpukat dengan berbagai variasi konsentrasi basis salep.

Variabel terkontrol adalah variabel yang berpengaruh pada variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian yang dilakukan 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, dan galur, lingkungan tempat tinggal, serta laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun alpukat adalah daun yang berasal dari daerah Kemuning kabupaten Karanganyar Jawa Tengah dengan kondisi segar dan berwarna hijau.

Kedua, serbuk daun alpukat adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan, penggilingan, dan pengayakan daun alpukat.

Ketiga, ekstrak etanol daun alpukat adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% kemudian dipisahkan di atas *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Keempat, aktivitas penyembuhan luka bakar adalah kemampuan dari salep ekstrak kental daun alpukat terhadap penyembuhan luka berdasarkan diameter luka dan ada tidaknya eritema.

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

Keenam, luka bakar adalah luka yang dibuat dengan melakukan pemanasan lempeng logam berdiameter 1,5 cm untuk kemudian diletakkan pada kulit punggung hewan uji.

Ketujuh, salep adalah sediaan topikal yang dibuat dari campuran zat aktif dengan basis salep berupa vaselin dan minyak mineral.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah oven, blender, *aluminium foil*, perangkat ekstraksi, ayakan no 40, botol maserasi, corong, kertas saring, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, gelas ukur, beker

gelas, cawan porselin, timbangan gram, batang pengaduk, tabung reaksi, rak tabung reaksi, penangas air, mortir dan stamper, lempeng logam diameter 1,5 cm, alat pencukur bulu, penggaris dan gunting.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun alpukat (*Persea americana* Mill.) yang masih segar dan berwarna hijau berasal dari daerah Kemuning kabupaten Karanganyar 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 yang diinginkan. Bahan lain yang juga digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, amil alkohol, serbuk Mg, HCl pekat, HCl 2N, FeCl₃ 1 %, vaselin putih, paraffin cair, dan nipasol.

D. Formulasi Salep Ekstrak Daun Alpukat

Formulasi standar dasar salep yang digunakan menurut Agoes (2008) ialah vaselin putih, minyak mineral dan dibuat dalam sediaan salep yang dibuat sebanyak 50 gram. Formulasi salep ekstrak daun alpukat yang digunakan dalam penelitian mengandung konsentrasi ekstrak daun alpukat sebesar 50% yang dibuat sebanyak 50 gram. Basis salep yang digunakan adalah vaselin dan minyak mineral yaitu paraffin cair yang merupakan dasar salep hidrokarbon digunakan sebagai pembawa zat aktif. Agoes (2008) mengemukakan bahwa formulasi hidrokarbon terbaik adalah formula dengan perbandingan vaselin putih dan paraffin cair adalah sebesar 90%:10%. Sebagai zat pengawet ditambahkan nipasol dengan konsentrasi antara 0,01 – 0,6% untuk sediaan topikal.

Tabel 1. Rancangan Formulasi Salep Ekstrak Etanol Daun Alpukat

Bahan	Formulasi		
	F1 (g)	F2 (g)	F3 (g)
Ekstrak daun alpukat	25	25	25
Nipasol	0,01	0,01	0,01
Vaselin putih	12,495	17,493	22,491
Paraffin cair	12,495	7,497	2,499
Total	50	50	50

Keterangan :

F1 : mengandung basis hidrokarbon vaselin putih:parafin cair 50%:50%
 F2 : mengandung basis hidrokarbon vaselin putih:parafin cair 70%:30%
 F3 : mengandung basis hidrokarbon vaselin putih:parafin cair 90%:10%

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman daun alpukat

Determinasi bertujuan untuk memastikan bahwa tanaman daun alpukat (*Persea americana* Mill.) yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan jenis dan spesies dari tanaman yang diinginkan (Soemarie *et al* 2016). Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

2. Pengambilan daun alpukat

Sampel daun alpukat segar di dapat dari daerah Kemuning kabupaten Karanganyar Jawa Tengah. Pengambilan daun alpukat dilakukan dengan memetik bagian tangkai daun yang masih segar dan dipatahkan pada pangkal daunnya. Daun alpukat yang sudah diambil selanjutnya ditimbang untuk mengetahui berat basahnya.

3. Pengeringan daun alpukat

Daun alpukat yang sebelumnya telah diambil kemudian dicuci bersih selanjutnya dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 40°C sampai kering (Winangsih *et al* 2013). Pengeringan dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Daun yang telah dikeringkan ditimbang sebagai berat kering yang selanjutnya dilakukan perhitungan persentase berat daun kering terhadap berat daun basah.

4. Pembuatan serbuk daun alpukat

Daun alpukat yang telah dikeringkan selanjutnya di serbuk dengan menggunakan mesin penyerbuk di Universitas Setia Budi Surakarta. Serbuk kering selanjutnya diayak dengan pengayak nomor 40 untuk memastikan keseragaman ukuran halus serbuk (Sentat & Rizky 2015). Hasil dari serbuk kering daun alpukat disimpan dalam plastik ukuran besar.

5. Analisis serbuk daun alpukat

Analisis serbuk daun alpukat dilakukan secara organoleptis, dengan berdasarkan bentuk, warna, ukuran dan bau dari serbuk daun alpukat yang diuji.

6. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan alat *Moisture balance* pada suhu 105°C. Serbuk daun alpukat yang digunakan

sebanyak 2 gram, dimasukkan kedalam alat dan ditunggu 4-5 menit sampai hasilnya keluar untuk setiap pengukuran. Hasil penetapan susut pengeringan yang baik yaitu tidak lebih dari 10% (Depkes RI 2008).

7. Pembuatan ekstrak kental daun alpukat

Ekstraksi simplisia daun alpukat dilakukan dengan metode maserasi dengan cara menimbang serbuk daun alpukat sebanyak 800 g yang dimasukkan ke dalam toples kaca gelap kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 4 L. Simplisia direndam selama 3 hari dan dilakukan pengadukan sesering mungkin dan hasil ekstrak cair yang disaring dengan menggunakan kertas saring serta ditampung dalam sebuah wadah kaca. Sisa ampasnya dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali dengan masing-masing pelarut sebanyak 2 L. Semua ekstrak cair yang didapat kemudian diuapkan di penangas air dan diperoleh ekstrak kental (Sentat & Rizky 2015).

8. Identifikasi ekstrak kental daun alpukat

8.1 Pemeriksaan organoleptis. Identifikasi ekstrak kental daun alpukat dilakukan secara organoleptis berdasarkan bentuk, warna, dan bau dari ekstrak daun alpukat.

8.2 Uji bebas alkohol. Pengujian bebas alkohol dilakukan dengan cara memasukkan ekstrak daun alpukat ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan asam asetat dan asam sulfat, lalu dipanaskan. Ekstrak dinyatakan bebas alkohol apabila tidak ada tercium bau ester yang khas dari etanol (Kurniawati 2015).

9. Identifikasi kandungan senyawa

9.1 Flavonoid. 10 tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 tetes HCl pekat, serbuk Mg, dan 2 tetes amil alkohol. Bila terbentuk warna kuning, jingga, atau merah pada lapisan amil alkohol memberikan indikasi adanya flavonoid (Sentat & Rizky 2015).

9.2 Saponin. 10 tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan air panas secukupnya, dikocok selama 15 menit dan 2 tetes HCl 2 N bila terbentuk buih permanen selama kurang lebih 10 menit maka memberikan indikasi adanya saponin (Sentat & Rizky 2015).

9.3 Tanin. Sepuluh tetes ekstrak daun alpukat ditambah dengan 10 mL air suling, disaring. Filtrat diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Diambil 2 mL filtrat lalu ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi FeCl. Bila terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman memberikan indikasi adanya tannin (Sentat & Rizky 2015).

9.4 Alkaloid. Serbuk simplisia ditimbang 0,5 g kemudian ditambahkan 1 ml HCl 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, dinginkan dan disaring. Filtrat yang didapat digunakan untuk pengujian. Diambil 10 tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer dan terbentuk endapan putih/kuning. Selanjutnya, diambil 10 tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat sehingga terbentuk endapan coklat sampai hitam. Kemudian 10 tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof dan terbentuk endapan jingga sampai merah coklat. Bila sedikitnya 2 dari 3 pereaksi menghasilkan endapan yang sama maka positif mengandung alkaloid (Sentat & Rizky 2015).

10. Pembuatan salep ekstrak daun alpukat

Sebelum melakukan pencampuran bahan-bahan yang akan digunakan ditimbang terlebih dahulu dengan seksama sesuai dengan formula masing-masing. Basis yang akan digunakan adalah basis hidrokarbon yaitu vaselin putih dan paraffin cair. Metode pembuatan salep ini digunakan metode peleburan (Miranti 2009). Sebelum dilakukan pencampuran, terlebih dahulu vaselin putih dileburkan diatas alat *waterbath* pada suhu 95°C sampai mencair, mortir dan stemper dipanaskan dengan cara direndam dengan air panas sekitar 3-5 menit sampai mortir panas kemudian dikeringkan. Memasukkan vaselin putih yang mencair terlebih dahulu kedalam mortir kemudian memasukkan paraffin cair dan nipasol sambil digerus dengan kecepatan konstan hingga homogen. Ekstrak daun alpukat digerus dalam mortir lain yang telah dipanaskan, kemudian memasukkan campuran vaselin, parafin dan nipasol sedikit demi sedikit digerus hingga homogen sampai membentuk salep. Salep yang telah homogen tersebut dimasukkan ke dalam pot salep.

11. Pengujian sifat salep

11.1 Uji organoleptis. Sediaan salep diamati tampilan fisiknya dengan mata telanjang mulai dari warna, tekstur, serta bau.

11.2 Uji homogenitas. Sebanyak 0,5 gram sediaan salep diambil dan diratakan diatas obyek gelas, kemudian diamati secara visual permukaan yang rata. Sediaan salep diambil dari bagian atas, tengah dan bawah (Depkes RI 1979).

11.3 Uji viskositas. Sediaan salep diukur viskositasnya dengan alat uji viskositas *viskotester VT-04F RION CO., LTD.* Salep dimasukkan kedalam wadah, kemudian *spindle* yang sesuai dimasukkan kedalam wadah yang berisi salep sampai tenggelam. Rotor dinyalakan hingga jarum hasil menunjukkan angka yang stabil. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali.

11.4 Uji daya lekat. Sediaan salep sebanyak 0,5 gram diletakkan diatas lempeng pada alat uji daya lekat. Lempeng yang lain diletakkan diatas sediaan salep, kemudian ditekan dengan beban seberat 1000 gram dan dibiarkan selama 5 menit. Setelah itu, beban diambil dan lempeng yang saling menempel dilepas dengan beban seberat 80 gram, dicatat waktu saat kedua lempeng tersebut lepas. Dilakukan 3 kali pengulangan (Dara 2012).

11.5 Uji daya sebar. Sediaan salep ditimbang 0,5 gram, diletakkan pada pusat antara dua lempeng *extensometer*, dibiarkan selama 5 menit lalu diukur diameter salep yang menyebar. Timbangan seberat 50 gram ditambahkan pada lempeng sebelah atas, didiamkan 5 menit dan dicatat diameter salep yang menyebar. Kemudian beban seberat 100 gram ditambahkan lagi diatas lempeng, dan dibiarkan selama 5 menit, dicatat diameter salep yang menyebar. Untuk memperoleh hasil yang lebih akurat dilakukan 3 kali pengulangan (Naibaho *et al* 2013).

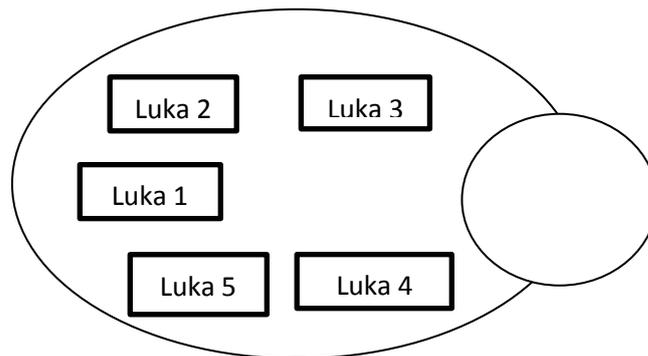
11.6 Uji pH. Sediaan salep diukur pH dengan menggunakan pH meter yang dicelupkan kedalam sediaan salep. Nilai pH dilihat pada skala dan dicatat setelah tercapai kestabilan. Pengulangan sebanyak 3 kali.

12. Pengelompokan hewan uji

Penelitian ini menggunakan 5 ekor hewan uji kelinci. Kriteria inklusi kelinci yang digunakan adalah berusia 8-12 minggu dan berat badan sebesar

2500-3000 g. Setiap kelinci mendapatkan 5 perlakuan berbeda dipunggungnya dengan 5 lokasi luka. Pembuatan luka pada masing-masing kelinci dapat dilihat pada lampiran 4.

- a. Kelompok perlakuan I : kontrol positif (dioleskan salep Mebo[®])
- b. Kelompok perlakuan II : kontrol negatif (dioleskan basis salep)
- c. Kelompok perlakuan III : dioleskan salep ekstrak etanol daun alpukat formula 1 (F1)
- d. Kelompok perlakuan IV : dioleskan salep ekstrak etanol daun alpukat formula 2 (F2)
- e. Kelompok perlakuan V : dioleskan salep ekstrak etanol daun alpukat formula 3 (F3)



Gambar 7. Model lokasi pembuatan luka bakar pada kelinci

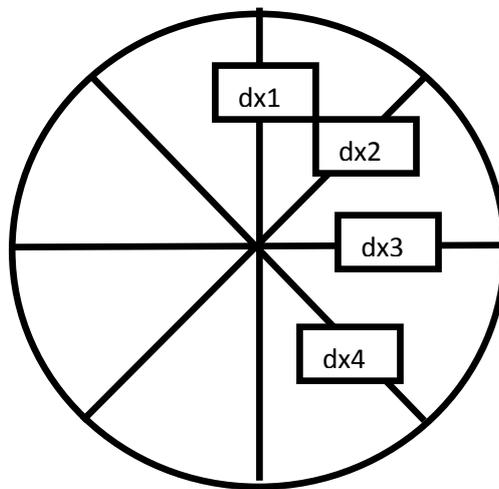
13. Perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 kelompok kelinci. Setiap kelompok berisi 1 ekor kelinci. Kelinci terlebih dahulu diaklimatisasi sebelum diberi perlakuan 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 digunting dan dicukur sampai kulit punggung terlihat. Kelinci kemudian dianestesi dengan etil klorida yang disemprotkan 2-3 kali sampai kulit punggung kelinci mulai berwarna putih. Pembuatan luka derajat dua pada punggung kelinci dilakukan setelahnya. Luka bakar dibuat dengan lempeng logam berdiameter 1,5 cm yang dipanaskan selama 5 menit kemudian ditempelkan pada kulit punggung kelinci selama 5 detik sampai

terbentuk luka bakar derajat dua yang ditandai oleh terjadinya pelepasan dan kulit terkelupas. Setelah dilakukan pembuatan luka bakar pada punggung kelinci, luka yang terbentuk diukur diameternya dengan penggaris untuk mengetahui diameter luka pada hari pertama. Setelah itu luka bakar diberi perlakuan. Pemberian perlakuan dilakukan 2 kali sehari yaitu pada pagi dan sore hari.

14. Pengukuran persentase penyembuhan luka bakar

Persentase penyembuhan luka dilakukan dengan mengukur diameter luka bakar dari hewan uji yang dimulai pada hari ke-2 setelah dilakukannya perlakuan. Pengamatan dilakukan selama 14 hari pada sore hari berturut-turut dengan mengamati secara makroskopik perkembangan penyembuhan luka pada punggung hewan uji dan pengukuran luas permukaan luka dengan menggunakan penggaris. Luka bakar dirawat hingga sembuh yang ditandai dengan merapat dan tertutupnya luka. Persentase kesembuhan luka bakar dilakukan berdasarkan diameter luka.



Gambar 8. Cara mengukur diameter luka bakar

$$dx_n = \frac{dx_1 + dx_2 + dx_3 + dx_4}{4}$$

Keterangan :

dx1 : pengukuran dilakukan secara horizontal dari atas ke bawah

dx2 : pengukuran dilakukan dari kemiringan sudut 45°

dx3 : pengukuran dilakukan secara vertical dari kanan ke kiri

dx4 : pengukuran dilakukan dari kemiringan sudut 135°

dxn : diameter luka bakar pada hari ke-n

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

$$P_x = \frac{(dx_1)^2 - (dx_n)^2}{(dx_1)^2} \times 100\%$$

Keterangan :

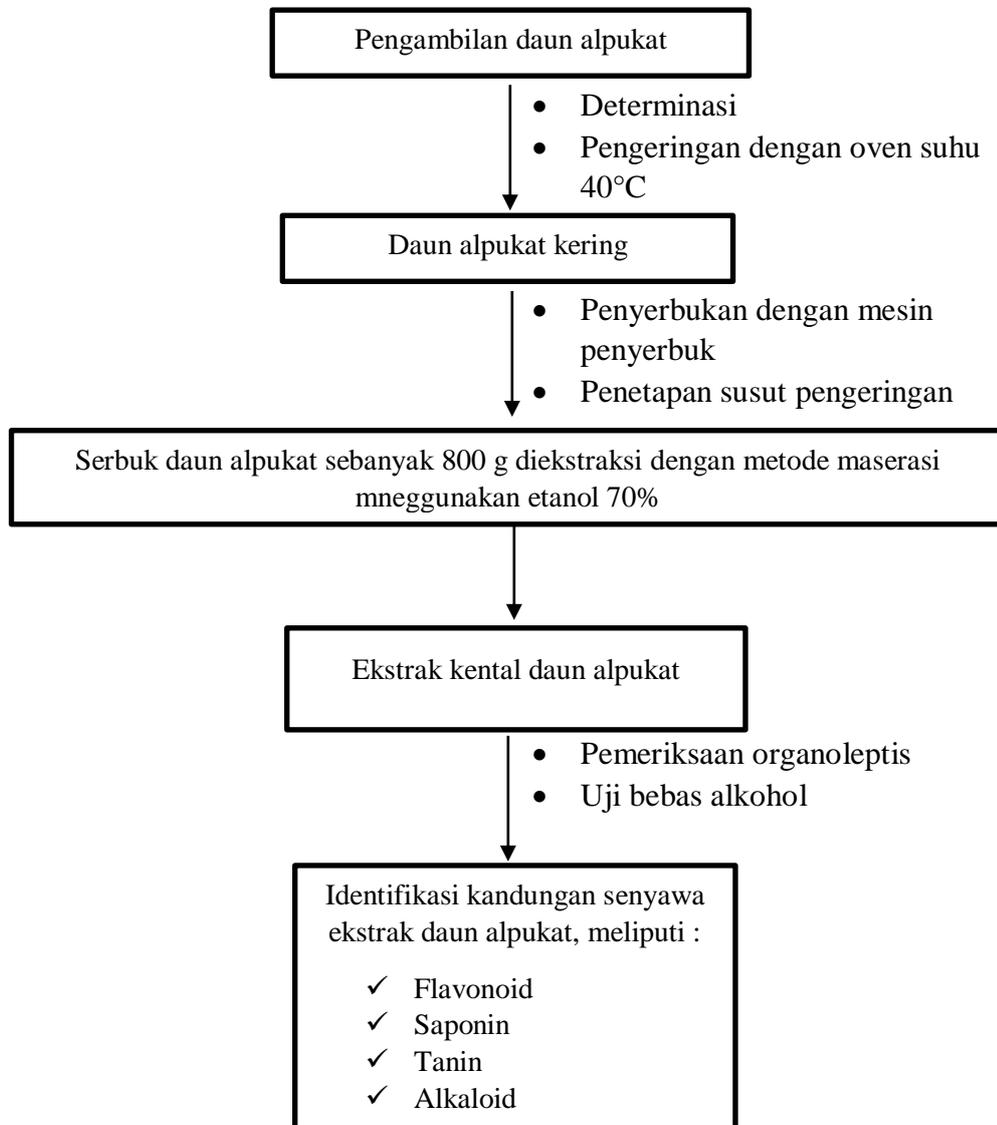
Px = persentase penyembuhan luka pada hari ke x

dx1 = diameter luka bakar pada hari pertama

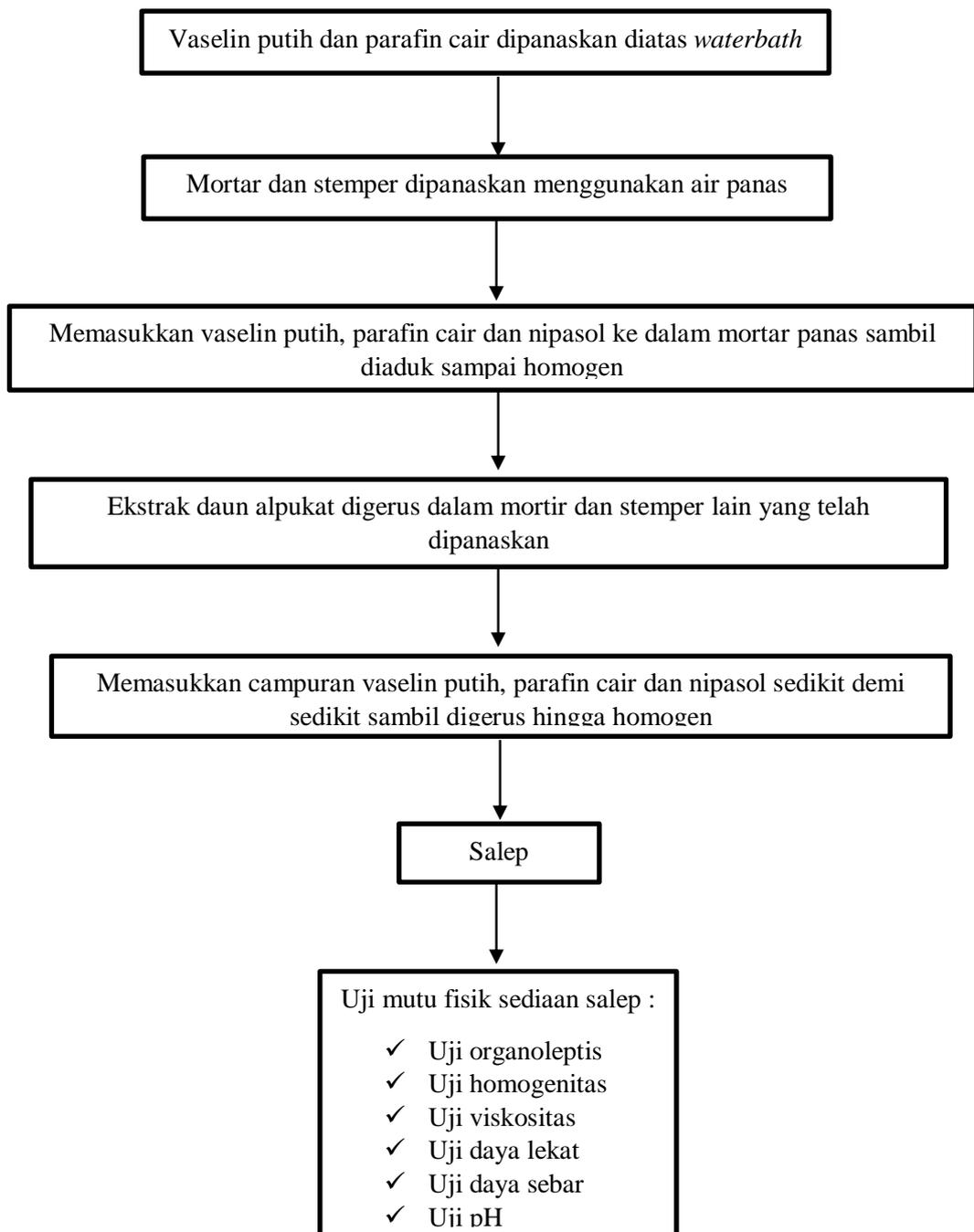
dxn = diameter luka bakar pada hari ke-n

F. Skema jalannya penelitian

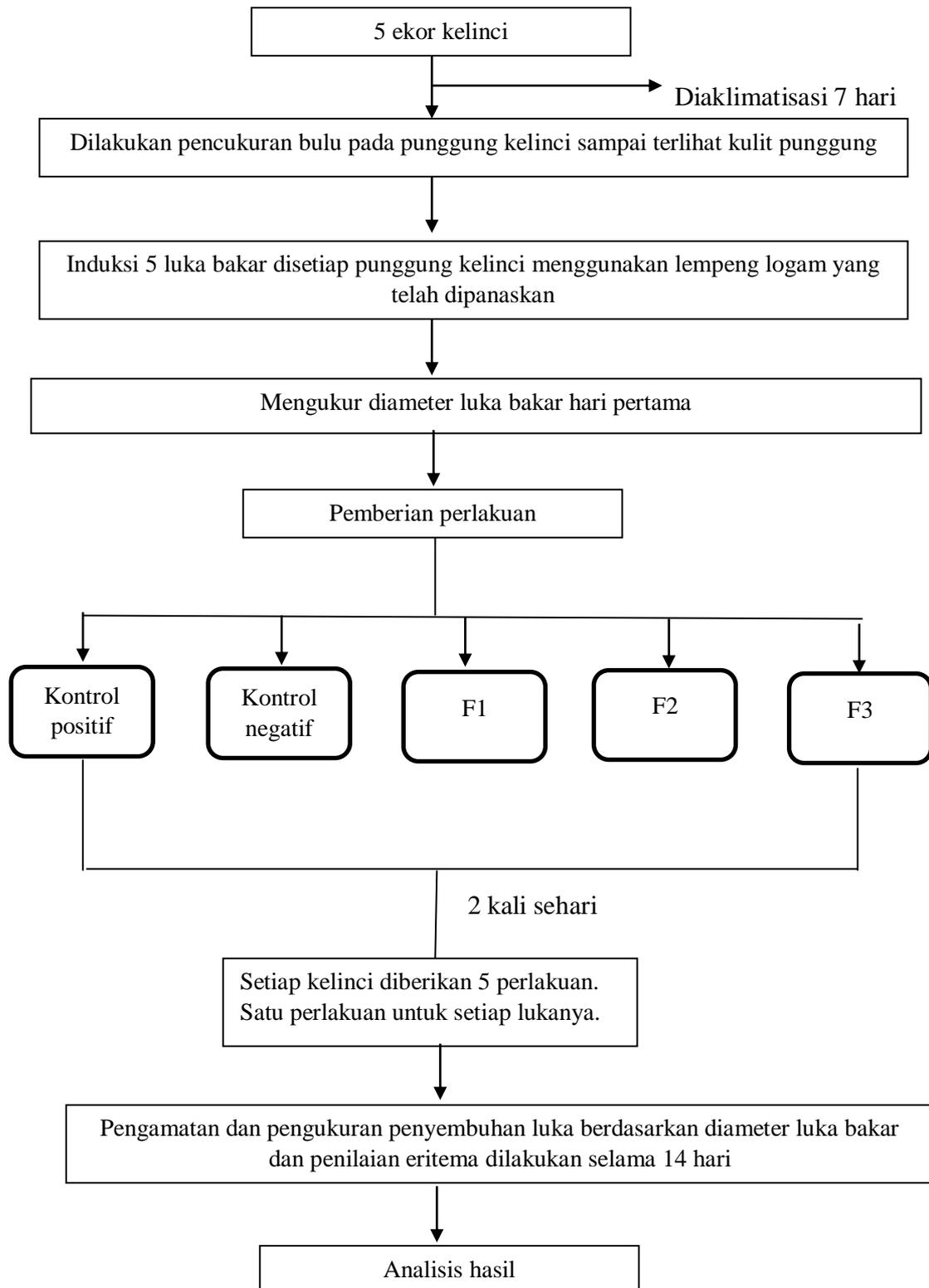
Skema jalannya penelitian dapat dilihat pada gambar 9, 10 dan 11.



Gambar 9. Skema pembuatan ekstrak etanol daun alpukat



Gambar 10. Skema pembuatan salep ekstrak etanol daun alpukat



Gambar 11. Skema perlakuan hewan uji

G. Analisis Data

Data pengukuran persentase penyembuhan luka bakar pada kelinci dianalisis statistik menggunakan uji *Kolmogrof-Smirnof* untuk memperoleh data normalitas. Kemudian dilanjutkan dengan uji parametrik *two way ANOVA* (*Analysis of Varian*) dengan tingkat signifikansi 5% atau 0,05.