

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Pada penelitian ini menggunakan populasi yaitu populasi daun jambu biji (*Psidium guajava* linn.). populasi tersebut digunakan dalam keadaan yang segar, daun berwarna hijau, tidak dalam keadaan busuk, dan diharuskan dalam kondisi yang baik serta diperoleh dari dusun Pijenan, Bakalan, Jumapolo, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel merupakan bagian dari populasi yang digunakan sebagai persediaan catatan untuk semua informasi yang dimiliki untuk memecahkan masalah studi. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jambu biji.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun jambu biji. Variabel terikat adalah efektifitas penyembuhan luka bakar pada hewan uji kelinci.

2. Klasifikasi Variabel utama

Berdasarkan beberapa hal yang telah dijelaskan, variabel utama dalam penelitian ini dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variabel. Beberapa variabel tersebut yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas merupakan variabel yang dengan sengaja dilakukan perubahan secara terus menerus untuk dijadikan pelajaran mengenai pengaruh terhadap variabel tergantung. Pada penelitian ini peneliti menggunakan variabel bebas berupa variasi konsentrasi ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* linn.).

Variabel tergantung merupakan titik pusat atau titik utama yang menjadi persoalan yang sekaligus menjadi kriteria penilaian. Peneliti menggunakan variabel gantung berupa mutu fisik salep, aktivitas pemulihan luka bakar dengan parameter diameter luka setelah kelinci diberi salep ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* linn.).

Variabel terkendali merupakan suatu variabel yang memiliki pengaruh pada variabel tergantung, sehingga hal ini perlu ditentukan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Pada penelitian ini, peneliti menggunakan variabel terkendali yaitu proses produksi ekstrak kental, beberapa

peralatan yang digunakan, lingkungan, luas area luka yang digunakan, dalamnya pencukuran bulu, kondisi fisik hewan yang menjadi bahan uji, yang meliputi berat badan, usia, dan lingkungan tempat tinggal, serta laboratorium.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Definisi pertama yakni, sampel merupakan daun jambu biji (*Psidium guajava* linn.) yang diperoleh dari tanaman daun jambu biji dengan kondisi yang masih segar, tidak terlalu tua maupun terlalu muda, berwarna hijau tua, segar dan tidak rusak, dan terpenting yaitu harus dalam kondisi baik yang diperoleh dari dusun Pijenan, Bakalan, Jumapolo, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, simplisia daun jambu biji yaitu daun jambu biji yang telah melewati beberapa tahapan seperti tahap sortasi basah, pencucian, perajangan, dan pengeringan.

Ketiga, ekstraksi adalah hasil penarikan senyawa aktif yang terdapat pada daun jambu biji dengan memanfaatkan metode maserasi yang menggunakan etanol 96% sebagai bahan pelarut. Pemekatan filtrat dilakukan dengan menggunakan vakum evaporator sehingga didapatkan ekstrak dengan tekstur yang kental.

Keempat, fraksinasi adalah proses penambahan fraksi dengan pelarut non polar n-Heksan, pelarut semi polar etil asetat, dan pelarut polar. Fraksi asetat yang didapatkan dari fraksinasi berikutnya dipekatkan kembali dengan memanfaatkan *rotary evaporator* sehingga didapatkan hasil fraksi kental.

Kelima, hewan uji yang digunakan adalah kelinci New Zealand yang diperoleh dari Abimanyu farm di Surakarta.

Keenam, uji aktivitas luka bakar adalah kemampuan dari sediaan salep ekstrak daun jambu biji dalam menyembuhkan luka bakar yang diukur diameter luka bakar.

Ketujuh, luka bakar derajat II adalah luka bagian dermis superfisial sampai dalam, meliputi seluruh bagian epidermis dan dermis dengan memanaskan lempeng logam dengan diameter 2 cm diatas api biru selama 3 menit dan ditempelkan pada punggung kelinci selama 5 detik tanpa penekanan.

Kedelapan, salep ekstrak daun jambu biji adalah sediaan salep yang dibuat dari beberapa campuran zat aktif ekstrak daun jambu biji dengan tiga variasi konsentrasi yaitu 15%, 25%, dan 35%.

Kesembilan, evaluasi sediaan salep untuk melihat apakah masuk

dalam syarat pembuatan sediaan salep.

Kesepuluh, pengukuran presentase penyembuhan luka untuk melihat diameter kesembuhan luka bakar pada kelinci setelah perlakuan.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* linn.) yang diperoleh dari dusun pijenan di Jumapolo, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah. Salep mebo, adeps lanae, Vaseline album, Dinatrium EDTA, Methyl Paraben, Propyl Paraben, aquadest, etanol 96, amil alkohol, serbuk Mg, HCl pekat, HCl 2N, FeCl₃ 1%.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam pengujian ini adalah gelas, batang pengaduk, blender, *drip plate*, waterbath, gelas porselen, gunting, kasa steril, mortir dan stemper, spatula, kertas saring, timbangan analitik, pencukur balu, lempeng logam berdiameter 2 cm, jangka sorong/ penggaris, ayakan mess no.40, *rotary evaporator*, kapas, termometer, alat penginduksi panas dan wadah salep.

D. Metode Percobaan

1. Determinasi tanaman dan identifikasi tanaman daun jambu biji

Tumbuhan atau Daun jambu biji di determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan pengembangan Tanaman obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Pengambilan bahan dan determinasi sampel daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) telah diambil di Kabupaten Karanganyar. Sampel yang digunakan diubah menjadi serbuk jambu biji bersih kemudian dikeringkan sampai kadar air bahan menjadi tidak lebih dari 10%.

2. Pembuatan pengeringan daun jambu biji

Daun jambu biji yang telah disortir kemudian dicuci, dipotong-potong, dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C dan dihaluskan dengan menggunakan ayakan no.40 hingga menjadi serbuk. Serbuk yang diperoleh sebanyak 500 g.

3. Pembuatan ekstrak daun jambu biji

Serbuk daun jambu biji 500 gram direndam dalam 5 liter etanol

96%, dilindungi dengan aluminium foil dan dibiarkan selama tiga hari sambil sesekali diaduk. Setelah tiga hari, perendaman disaring menggunakan kertas bening untuk menyuplai filtrat 1 dan ampas 1. Ampas tersebut kemudian diencerkan dengan 750 mL larutan etanol 96%, dilindungi dengan aluminium foil dan dibiarkan selama dua hari, kemudian disaring menggunakan kertas bening untuk menyuplai filtrat 2 dan ampas 2. Apabila telah selesai lanjutkan proses dengan mengumpulkan seluruh filtrat yang ada. Filtrat yang diperoleh gunakan alat penguap vakum atau alat penguap tekanan rendah (*Rotary Evaporator*) untuk menguapkan sampai diperoleh ekstrak yang kental. Setelah itu hitunglah rendemen yang didapatkan dengan presentase berat antara berat (b/b) dan berat serbuk simplisia yang dipakai. Rendemen setidaknya harus memenuhi persyaratan sesuai dengan monografi. (Jeanly *et al.*, 2014).

4. Susut pengeringan

Ekstrak kering ditimbang secara hati-hati sebanyak 2 g dan dimasukkan ke dalam botol timbang yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama setengah jam dan dicairkan. Sebelum ditimbang, ekstrak dipipihkan dalam botol timbang, dengan cara mengocok botol hingga terbentuk lapisan setebal ± 5 mm sampai sepuluh mm. Kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengering, dibuka tutupnya, dikeringkan pada suhu 105°C sampai beban tetap. Sebelum dikeringkan, botol-botol tersebut didiamkan dalam desikator sampai suhu kamar (Depkes RI 2000).

5. Kadar Air dan Ekstrak Daun Jambu Biji

Kadar air serbuk daun jambu biji menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Prinsip alat ini dikerjakan melalui cara 10 g serbuk didalam labu destilasi ditambahkan 200 mL toluena jenuh air kemudian dipasangkan dalam alat *Sterling Bidwell*. Panaskan labu dengan api kecil dalam waktu 15 menit, proses pemanasan dihentikan hingga tetesan air tidak terlihat lagi. Kemudian lihat volume air pada sekala yang tertera pada alat *Sterling Bidwell*.

Penetapan kadar air ekstrak menggunakan metode *Gravimetri* dengan cara menimbang 10 g sampel, masukkan pada wadah yang sudah ditara. Keringkan pada suhu 105C selama 5 jam, serta timbang. Lalu, pengeringan serta timbang di selang waktu 1 jam hingga perbedaan dua penimbangan berturut tidak lebih dari 0,25%.

E. Identifikasi Senyawa

1. Flavonoid

Ekstrak kental 0,1g dilarutkan dalam 10mL etanol kemudian dibagi menjadi 4 tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai tabung pengatur, tabung kedua, ketiga, dan keempat masing-masing diberi NaOH, H₂SO₄, dan serbuk Mg-HCl terfokus. Warna pada setiap tabung dibandingkan dengan tabung pengatur, jika ada pergantian warna, itu bagus untuk flavonoid (Gafur *et al.*, 2013).

2. Alkaloid

Sebanyak 0,1g ekstrak dilarutkan dengan 10mL kloroform amonia dan efeknya telah dibagi ke dalam tabung. Tabung pertama dimasukkan dengan 2N H₂SO₄. Lapisan asam dipisahkan, dibagi menjadi 2 tabung periksa dan masing-masing tabung diperiksa menggunakan pereaksi Mayer dan Wagner. Tabung kedua menjadi diperiksa penggunaan reagen Hager. Jika terbentuk endapan, polanya baik untuk alkaloid (Gafur *et al.*, 2013).

3. Saponin

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,1g dilarutkan dalam 15mL air hangat kemudian dipanaskan selama lima menit. Kemudian disaring dan filtratnya diambil sebanyak 10mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok. Pemeriksaan baik untuk keberadaan saponin di dalam jawaban menjadi ditunjukkan melalui pembentukan buih atau buih (Gafur *et al.*, 2013).

4. Tanin

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 1g, diekstraksi dengan 10ml air suling kemudian disaring. Filtrat diencerkan dengan air sampai tidak berwarna. 2ml larutan diambil dan dimasukkan dengan 1-2 tetes reagen besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru kehitaman atau kehitaman yang tidak alami menunjukkan adanya tanin (Gafur *et al.*, 2013).

5. Terpenoid

Ekstrak kental ditimbang sebanyak 1g kemudian ditambahkan 20mL etanol, 2mL kloroform, dan 3mL H₂SO₄ pekat. Pemeriksaan yang baik untuk keberadaan terpenoid ditunjukkan melalui alternatif dalam warna jawaban merah (Gafur *et al.*, 2013).

F. Pembuatan Sediaan Salep

Sediaan salep dalam upaya yang akan dilakukan pada penelitian ini memiliki konsentrasi ekstrak daun jambu biji 15%, 25%, dan 35%, kontrol negatif basis salep, kontrol positif diberikan pengobatan salep mebo. Dibuat sebanyak 20 gram setiap konsentrasi. Prosedur pembuatan salep dimulai dengan memasukkan adeps lanae dan vaseline album ke dalam mortir kemudian diaduk hingga homogen. Setelah basis salep menjadi homogen, dinatrium EDTA, metil paraben dan propil paraben dimasukkan ke dalam mortir yang berisi basis salep sambil diaduk hingga homogen. Selanjutnya, ekstrak daun jambu biji dimasukkan sedikit demi sedikit dan terus diaduk sampai homogen.

Tabel 1. Rancangan Formula ekstrak etanol daun jambu biji

Bahan	Kosentrasi				
	FI	FII	FIII	K-	K+
Ekstrak Daun Jambu Biji	15 (%)	25 (%)	35 (%)	Basis salep	Mebo
Dinatrium EDTA	0,1g	0,1g	0,1g	Adeps Lanae	
Metil Paraben	0,1g	0,1g	0,1g	VaselineAlbum	
Propil Paraben	0,05g	0,05g	0,05g		
Adeps Lanae	10g	10g	10g		
Vaseline album	74,75g	64,75g	54,75g		
Total	100g	100g	100g		

Keterangan :

FI : Salep ekstrak daun jambu biji konsentrasi 15%

FII : Salep ekstrak daun jambu biji konsentrasi 25%

FIII : Salep ekstrak daun jambu biji konsentrasi 35%

K- : Kontrol negatif ekstrak daun jambu biji

K+ : Kontrol positif salep Mebo

G. Evaluasi Sediaan Salep

1. Uji organoleptis

Proses pada uji organoleptis, sediaan salep harus dilakukan pengamatan dari segi penampilan fisiknya. Pengamatan tersebut dilakukan dengan mata telanjang tanpa menggunakan alat apapun dan ditemukan secara visual untuk tekstur dan warna dan bau.

2. Uji homogenitas

Pada uji homogenitas, sediaan salep akan diambil dan diratakan di sebuah objek berupa gelas sebanyak 0,5 gram salep. Lalu setelah itu peneliti harus mengamati secara visual permukaan yang rata tersebut.

3. Uji viskositas

Sediaan 100g salep dipasang gelas ukur dan diukur kekentalannya dengan menggunakan *Viskometer VT-04F brookfield*

spindle. Viskositas terlihat pada ukuran di dalam perangkat setelah keseimbangan tercapai.

4. Daya sebar.

Pengujian daya sebar, sediaan salep akan ditimbang sebanyak 0,5 gram dan diletakan di atas pusat antara kedua lempeng *extensometer* berada. Lalu, biarkan kurang lebih 5 menit dan hitung diameter salep yang menyebar tersebut. Pada lempeng bagian sebelah atas, tambahkan timbangan sebesar 50 gram dan diamkan terlebih dahulu dalam waktu 5 menit. Lakukan hal yang sama dengan sebelumnya yaitu mencatat lebar salep yang menyebar. Lalu tambahkan beban sebanyak 100 gram diatas lempeng, biarkan selama 5 menit dan catat diameternya.

5. Daya lekat.

Pengujian daya lekat yaitu dengan meletakan sediaan salep disebuah lempeng pada alat uji daya lekat sebanyak 0,5 gram salep. Lempeng yang digunakan tidak hanya satu, melainkan ada lempeng lain yang digunakan untuk menekan salep dengan diletakannya di atas sediaan salep. Tekan lempeng dengan menggunakan beban seberat 1 kg dengan kurun waktu 5 menit. Selanjutnya, beban yang diletakan di atas lempeng diangkat dan lempeng yang saling menempel tersebut di lepas dengan beban seberat 80 gram. Ketika kedua lempeng tersebut lepas, peneliti harus mencatat waktu lepasnya kedua lempeng tersebut. Lakukan rangkaian proses tersebut selama 3 kali.

6. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH meter yang dimasukan atau dicelupkan ke dalam sediaan salep. Proses pertama yang harus dilakukan yaitu siapkan sediaan salep yang akan diukur, lalu celupkan alat ukur pH ke dalamnya. Catat dan lihat hasil nilai pH setelah mencapai nilai yang stabil dan lakukan sebanyak 3 kali (Arif, 2016).

7. Uji stabilitas

Metode *cycling test* adalah metode yang dipakai untuk menguji kestabilan sediaan. Uji ini dilakukan dengan cara menyimpan sampel selama 24 jam disuhu sekitar 4 °C, selanjutnya memasukan sampel pada oven dengan 1 siklus memakan waktu 24 jam dengan suhu 40 °C. Uji stabilitas sediaan dilangsungkan sejumlah 6 siklus lalu hasil dibandingkan pada setiap siklus lalu amati kondisi sediaan sebelum dan sesudah di uji meliputi homogenitas, organoleptik, pH dan viskositas. Pengujian dikerjakan masing-masing tiga kali pada setiap formula (Rahman, 2020).

H. Perlakuan Hewan Uji

Kelinci sengaja disimpan dan dibiakkan untuk digunakan sebagai model hewan, selain untuk melihat dan memperluas berbagai bidang pengetahuan ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorium. Kelinci jantan *new zealand* berumur 5-6 tahun dengan berat 1,2-2,0 kg digunakan dalam penelitian ini sebagai hewan percobaan. Hewan percobaan diberi periode aklimatisasi selama 7 hari untuk membantu mereka menyesuaikan diri dengan lingkungan baru mereka.

Setiap hewan percobaan ditempatkan dalam kandang berukuran 35 x 18 cm² dengan jaring kawat. Sekam digunakan sebagai dasar, dan diisi ulang setiap tiga hari untuk memastikan kebersihan. Konsentrat Turbo 521 digunakan untuk pakan ternak secara *ad libitum*. Lima ekor hewan percobaan ditempatkan di setiap kandang.

I. Pembuatan Luka Bakar

Sehari sebelum pemeriksaan, semua kelompok kelinci telah ditimbang. Guna meminimalisir rasa sakit yang dirasakan oleh kelinci saat memberikan perlakuan di punggung kelinci, peneliti harus melakukan anestesi terlebih dahulu. Kelinci dicukur dan dibersihkan dengan menggunakan alkohol dengan kadar 70% diulas memakai kapas di daerah punggung kelinci lalu diberikan anestesi lokal menggunakan ethyl chloride 2-3 kali semprot. Lakukan pengukuran diameter pada punggung kelinci selebar luka yang akan dibuat. Gunakan lempeng logam dengan ukuran diameter sebesar 2 cm untuk membuat perlakuan luka di punggung kelinci. Cara membuat perlakuan luka tersebut yaitu panaskan logam pada api biru selama kurang lebih 3 menit dan tempelkan logam panas tersebut pada punggung kelinci selama kurang lebih 5 detik tanpa menggunakan penekanan. Panaskan lempeng logam, kemudian dibuat luka bakar dengan lempeng logam.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak 5 kelinci putih telah dibagi menjadi lima kelompok.

Tabel 2. Pembagian Kelompok Kelinci Putih

Kelompok	Formula
Ekstrak 15%	Kelinci <i>New Zealand</i> dengan luka bakar pengobatan SEDJB 15%
Ekstrak 25%	Kelinci <i>New Zealand</i> dengan luka bakar pengobatan SEDJB 25%
Ekstrak 35 %	Kelinci <i>New Zealand</i> dengan luka bakar pengobatan SEDJB 35 %
K (-)	Kelinci <i>New Zealand</i> dengan luka bakar tanpa pengobatan
K (+)	Kelinci <i>New Zealand</i> dengan luka bakar pengobatan Mebo

Keterangan : SEDJB = Salep Ekstrak Daun Jambu Biji

J. Uji Aktivitas sediaan salep daun jambu biji

Pengujian aktivitas salep ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* linn.) dilakukan pada semua kelompok kelinci yang telah dilukai dengan diameter 2,5 cm. Kemudian luka bakar diolesi salep Mebo (kontrol positif), basis salep (kontrol negatif), dan salep ekstrak daun jambu biji 15%, 25%, dan 35%. Masing-masing dioleskan secukupnya pada luka bakar. Pengamatan tersebut dilakukan 2 kali sehari. Proses penyembuhan luka ini akan dilakukan selama 21 hari berturut-turut.

K. Pengukuran persentase penyembuhan luka bakar

Persentase penembuhan luka bakar berdasarkan diameter luka dimana setelah diberi perlakuan dengan mengoleskan salep ekstrak etanol daun jambu biji sebanyak dua kali sehari, pada pagi hari dilakukan pengukuran diameter luka. Pengukuran persentasi penyembuhan luka berdasarkan diameter dan iritasi dilakukan setiap hari pada pagi hari selama 21 hari. Adapun rumus yang digunakan untuk melakukan persentase penyembuhan luka bakar:

$$dx = \frac{dx(1) + dx(2) + dx(3) + dx(4)}{4}$$

Keterangan:

dx1 : pengukuran dilakukan secara horizontal (dari atas ke bawah)

dx2 : pengukuran dilakukan dari kemiringan sudut 45°

dx3 : pengukuran dilakukan secara vertikal (dari kanan ke kiri)

dx4 : pengukuran dilakukan dari kemiringan sudut 135o

$$px = \frac{(dx1)^2 - (dxn)^2}{(dx1)^2} \times 100\%$$

Keterangan :

Px = persentase penyembuhan luka pada hari ke x

dx1 = diameter luka bakar pada hari pertama

dxn = diameter luka bakar pada hari ke-n

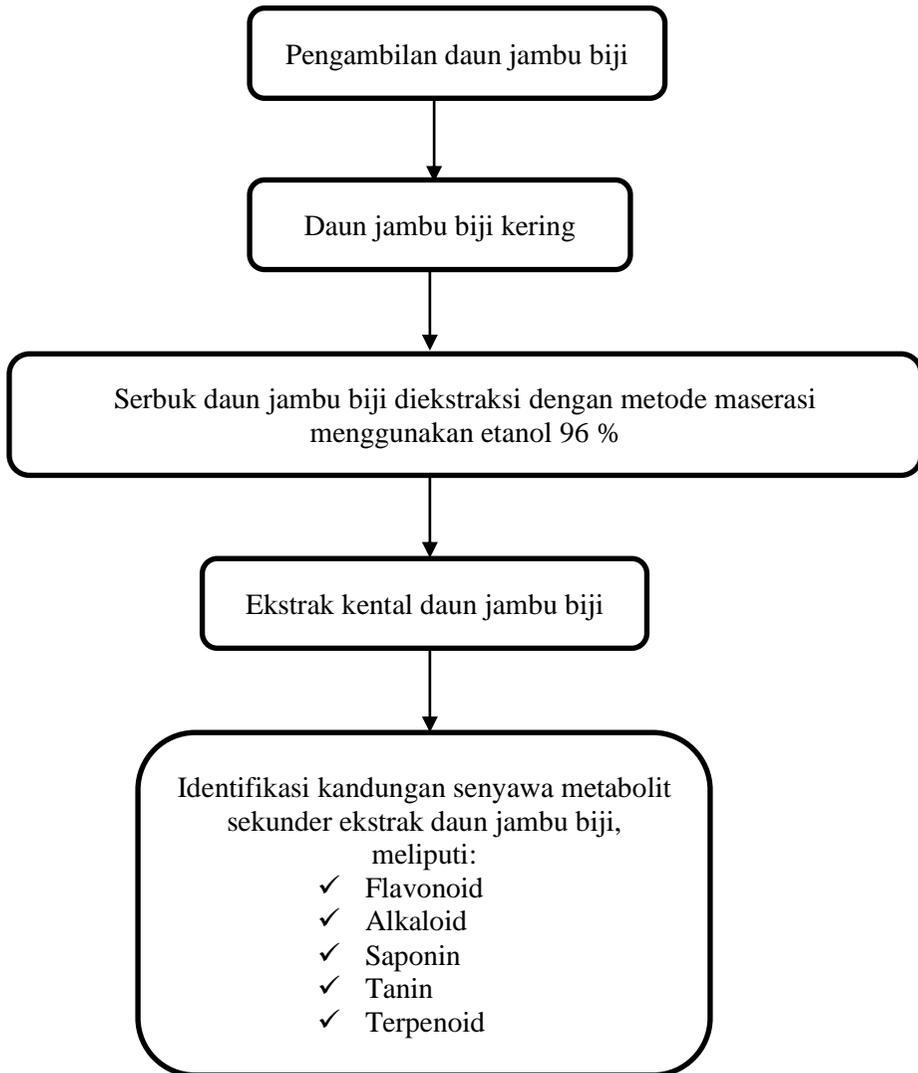
L. Analisis Data

Peneliti menganalisis penggunaan program IBM® SPSS® Statistics 20 dengan uji normalitas penggunaan uji *Kolmogorov-Smirnov*, uji homogenitas menggunakan *test of homogeneity of variance*, *one-way ANOVA*, dan uji *post hTukey HSD*.

Pengukuran penyembuhan luka diperoleh dengan uji normalitas yang menunjukkan diameter penyembuhan luka bakar kelinci jika lebih dari 0,05 maka nilai residual terdistribusi normal dan diuji homogenitasnya. Kemudian selanjutnya dilakukan uji ANOVA *one way* kemudian dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang meluas di setiap kelompok perlakuan obat dengan ketentuan $\rho < 0,05$.

M. Skema Jalannya Penelitian

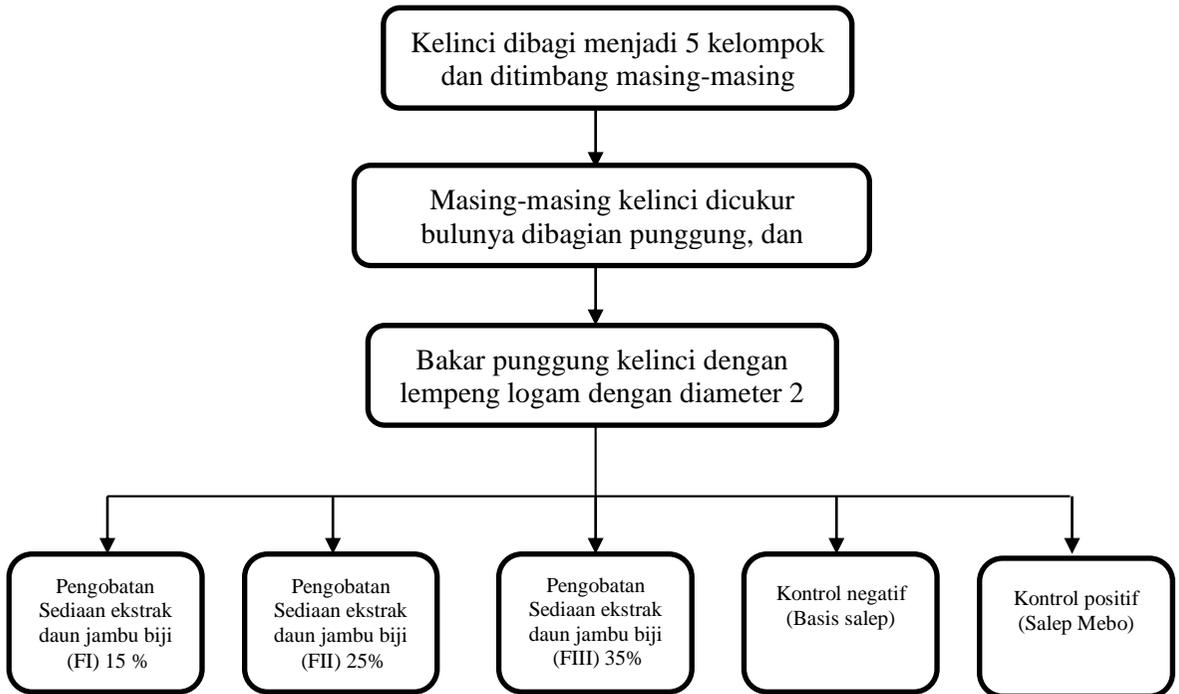
1. Skema jalannya penelitian sebagai berikut:



Gambar 3. Skema Jalannya Penelitian

2. Skema pengujian luka bakar

skema pengujian luka bakar sebagai berikut:



Gambar 4. Skema Pengujian Luka Bakar