

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini yaitu ranting tanaman patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) yang berada di daerah Tawangmangu Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ranting tanaman patah tulang yang masih dalam keadaan bagus dan segar, tidak cacat dan tidak terkena serangan hama diambil pada pohon tanaman patah tulang yang tumbuh di daerah Tawangmangu.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama penelitian ini adalah ekstrak etanol ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dan diperoleh dengan metode maserasi kemudian dilanjutkan pembuatan sediaan gel.

Variabel utama kedua yaitu pembuatan formula sediaan gel dengan komposisi bahan seperti ekstrak etanol 96% batang patah tulang, CMC - Na, propilen glikol, metil paraben, dan aquadest.

Variabel utama ketiga yaitu efektivitas sebagai penyembuh luka bakarsediaan gel dari ekstrak etanol batang patah tulang.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasi menjadi beberapa variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang dimaksudkan untuk dimodifikasi sejak awal untuk menentukan pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi konsentrasi ekstrak ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) pada sediaan gel.

Variabel tergantung merupakan persoalan inti yang menjadi parameter pengujian pada penelitian. Penelitian ini memiliki variabel tergantung yakni aktivitas penyembuhan luka bakar diamati diameter penyusutan luka setelah pemberian gel ekstrak batang patah tulang dengan berbagai variasi konsentrasi dalam sediaan gel.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang mampu mempengaruhi variabel tergantung. Oleh karena itu perlu ditetapkan kualifikasi variabel terkontrol supaya hasil yang diperoleh tidak

menyebarkan dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara cepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini meliputi proses pembuatan ekstrak kental dan pembuatan sediaan gel, peralatan yang dipakai, kondisi fisik hewan uji seperti bobot, usia, jenis kelamin, lingkungan tempat tinggal, serta kebersihan laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, batang patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) yang digunakan adalah yang masih muda dan segar diperoleh dari tanaman patah tulang yang tumbuh di daerah Tawangmangu Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak batang patah tulang adalah hasil dari ekstraksi dengan cara maserasi dan menggunakan etanol 96% sebagai pelarut kemudian diuapkan dengan rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak kental.

Ketiga, luka bakar adalah luka yang disebabkan oleh pelat logam berdiameter 2 cm yang dipanaskan pada suhu 90°C dan kemudian ditempelkan pada punggung kelinci selama 5 detik sesuai dengan metode akhoondinasab.

Keempat, uji aktivitas penyembuhan terhadap luka bakar adalah kemampuan sediaan gel ekstrak etanol batang patah tulang dalam menyembuhkan luka bakar berdasarkan pengamatan ada tidaknya inflamasi dan pengecilan luka.

Kelima, diameter luka adalah diameter luka yang dihasilkan dan diukur menggunakan jangka sorong.

Keenam, uji mutu fisik adalah prosedur pengujian yang dilakukan untuk menjamin mutu suatu produk agar stabil dan sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

Ketujuh, sediaan gel ekstrak batang patah tulang adalah sediaan yang dimaksudkan untuk penggunaan topikal yang diolah dengan mencampurkan zat aktif dengan komponen bahan tambahan seperti CMC Na, propilen glikol, gliserin, nipagin, dan aquades.

Kedelapan, sifat fisik gel adalah sifat atau karakteristik dari gel ekstrak batang patah tulang yang akan diuji diantaranya uji organoleptis, homogenitas, pH, daya lekat, daya sebar, viskositas.

Kesembilan, uji stabilitas adalah uji untuk mengetahui kemampuan sediaan gel selama penyimpanan dalam kurun waktu tertentu.

Kesepuluh, konsentrasi gel yang efektif adalah konsentrasi dengan kecepatan menyembuhkan luka bakar tidak ada perbedaan berarti dengan kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah tempat untuk memelihara kelinci beserta wadah makan dan minum, timbangan analitik, tempat gel, *water bath*, oven, *beaker glass*, gelas ukur, *glass object*, stik pH, mortir dan stamper, kaca arloji, cawan penguap, kertas saring, corong, dan pipet tetes.

2. Bahan

Penelitian ini membutuhkan beberapa bahan yang terdiri dari ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli L.*), etanol 96%, CMC-Na, propilen glikol, metil paraben, dan aquadest. Hewan percobaan yang pakai adalah kelinci *New Zealand* yang mana telah diadaptasi sebelumnya sekitar satu minggu setelah itu diberi luka bakar memakai plat logam panas dengan diameter yang diinginkan.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Sebelum penelitian dilakukan deteminansi atau identifikasi tumbuhan yang bertujuan untuk memverifikasi jenis dan kebenaran tumbuhan yang digunakan. Determinasi dilakukan di laboratorium Herbal Materia Medica Batu Pasuruan, Malang, Jawa Timur dengan mencocokkan karakteristik dan morfologi tanaman patah tulang (*Euphorbia tirucalli L.*) yang akan diteliti.

2. Pengambilan ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli L.*)

Sampel ranting patang tulang (*Euphorbia tirucalli L.*) diperoleh dari pohon tanaman patah tulang yang tumbuh di daerah Tawangmangu Jawa Tengah. Batang tanaman patah tulang dipilih yang masih dalam keadaan segar dan bagus serta tidakterserang hama.

3. Pembuatan simplisia ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli L.*)

Ranting patah tulang yang dijadikan sampel pada penelitian dipilih dengan proses sortasi basah. Sampel disortir basah untuk memisahkan atau menghilangkan kontaminan yang terdapat pada simplisia dengan mencuci simplisia menggunakan air mengalir. Setelah dicuci, batang patah tulang dikeringkan dengan bantuan paparan sinar matahari.

4. Pembuatan serbuk ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.)

Ranting patah tulang yang telah kering dilanjutkan ke tahap penyerbukan menggunakan alat penyerbuk kemudian hasil penyerbukan diayak menggunakan ayakan nomor 40. Hasil dari serbuk kering batang patah tulang disimpan pada wadah yang telah disiapkan sebagai wadah penyimpanan.

5. Penetapan susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan ranting patah tulang dilakukan menggunakan alat *moisture balance* yang terdapat di Laboratorium Universitas Setia Budi dengan cara ditimbang sebanyak 2 gram serbuk ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) kemudian diukur kehilangan air dan bobotnya menggunakan *moisture balance*. Penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak 3 kali dengan waktu pengukuran selama 4 menit untuk satu kali pengukuran. Ditunggu sampai muncul angka dalam satuan persen (%) lalu dicatat sebagai hasil penetapan susut pengeringan. Kadar air memiliki syarat yaitu jika kadar air dalam sebuah simplisia kurang dari 10% (Depkes, 2013).

6. Penetapan kadar air serbuk ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.)

Penetapan kadar air serbuk ranting patah tulang menggunakan rangkaian alat Sterling-Bidwell. Langkah awal yaitu menimbang sampel serbuk sebanyak 20 gram lalu dimasukkan ke dalam labu destilasi ditambah dengan toluen jenuh air sebanyak 200 ml hingga sampel terendam secara menyeluruh. Setelah itu dirangkai alat Sterling-Bidwell lalu labu dipanaskan menggunakan api sedang dan dihentikan pemanasan ketika tidak ada air lagi yang menetes. Kadar air ditunjukkan pada volume yang terbaca pada skala alat tersebut

7. Pembuatan ekstrak ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L)

Sebanyak 500 gram serbuk ranting patah tulang ditimbang sebanyak 500 gram lalu ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 5 liter dalam bejana yang terlindung dari cahaya matahari. Wadah ditutup rapat dan dibiarkan selama 2 hari sambil diaduk sesekali. Setelah 2 hari dilakukan penyaringan ekstrak menggunakan kertas saring sampai mendapatkan hasil filtrat dan residu. Residu yang didapatkan dilakukan remaserasi dengan sisa pelarut yang sama didiamkan selama 1 hari sambil sesekali diaduk, apabila sudah 1 hari maka dilakukan

penyaringan lagi sampai menghasilkan filtrat dan residu. Hasil filtrat ekstrak I dan hasil filtrat dari remaserasi digabungkan, lalu dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada temperatur 40°C hingga didapatkan ekstrak kental (Depkes RI, 1986).

8. Penetapan kadar air ekstrak ranting patah tulang

Ekstrak ranting patah tulang ditimbang sebanyak 30 gram kemudian dibagi ke dalam 3 kurs porselin yang telah ditimbang terlebih dahulu dengan bobot ekstrak untuk masing – masing kurs adalah 10 gram. Timbang dan catat bobot kurs porselin setelah ditambahkan ekstrak lalu dimasukkan dalam oven selama 5 jam dengan suhu 105°C. Setelah 5 jam kurs porselin ditimbang lagi kemudian dilanjutkan dengan pemanasan dan penimbangan setiap 1 jam sampai mencapai bobot konstan. Bobot dikatakan konstan apabila selisih 2 kali penimbangan berturut – turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2000).

9. Identifikasi kandungan senyawa

9.1 Flavonoid. Sebanyak 2 gram sampel ekstrak diambil lalu diberikan 100 ml air panas setelah itu sekitar 5 menit dipanaskan lalu disaring dengan kertas saring. Dipipet filtrat hasil penyaringan sebanyak 5 ml masukan pada tabung reaksi lalu tambahkan secukupnya bubuk magnesium. Ditambahkan 5 mL amil alkohol dan 1 mL HCl pekat. Campuran digojok lalu diamati pemisahan yang terjadi. Tes positif dilihat saat adanya warna merah, kuning atau jingga (Harborne, 1987).

9.2 Saponin. Ambil ekstrak secukupnya masukkan dalam tabung reaksi lalu tambahkan air panas secukupnya. Tambahkan HCl 2N 1 tetes lalu campuran digojok kuat sekitar kurang lebih 10 detik lalu amati gelbung atau buih yang dihasilkan tetap mengapung minimal selama 10 menit. Buih atau busa itu tidak menghilang jika diberikan HCl 2N 1 tetes (Jones & Kinghorn, 2006).

9.3 Tannin. Ambil ekstrak ranting patah tulang sebanyak 1 mL lalu tambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi FeCl. Jika muncul warna biru tua atau hijau kehitaman menandakan terdapat tannin (Sentat & Rizky, 2015).

10. Pembuatan sediaan gel ekstrak ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L)

Disiapkan alat dan bahan yang diperlukan terlebih dahulu kemudian menimbang bahan sesuai dengan konsentrasi yang dicantumkan pada formula. Ekstrak yang telah ditimbang dengan

konsentrasi 5%, 10%, dan 20% dilarutkan dengan air secukupnya lalu dipanaskan pada temperatur 50°C. Kemudian tambahkan CMC-Na diaduk sampai tercampur merata. Tambahkan komponen lainnya seperti propilen glikol, gliserin, dan metil paraben lalu diaduk secara kontinyu sampai membentuk gel. Berdasarkan orientasi terhadap penelitian sebelumnya maka disusun formula sediaan gel sebagai berikut :

Tabel 1. Formula basis sediaan gel

Bahan	Formula 0
CMC Na	3%
Gliserin	10%
Propilen glikol	15%
Metil paraben	0,03%
Aquadest	ad 100 ml

Tabel 2. Formula sediaan gel ekstrak ranting patah tulang

Bahan	Formula I	Formula II	Formula III
Ekstrak ranting patah tulang	5%	10%	20%
CMC Na	3%	3%	3%
Gliserin	10%	10%	10%
Propilen glikol	15%	15%	15%
Metil paraben	0,03%	0,03%	0,03%
Aquadest	ad 100 ml	ad 100 mL	ad 100 mL

11. Pengujian sifat fisik gel ekstrak ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L).

11.1 Uji organoleptis. Pengujian organoleptis dilakukan dengan cara melihat dan mengamati tampilan sediaan gel. Uji ini mengamati bentuk, bau, dan warna sediaan tersebut (Arif, 2016).

11.2 Uji homogenitas. Uji ini dilakukan dengan cara sejumlah gel dioleskan pada *glass object* yang bersih dan diamati lapisan tipis yang terbentuk. Sediaan gel dikatakan homogen apabila gel yang diamati mempunyai tekstur yang merata dan tidak terdapat gumpalan.

11.3 Uji daya lekat. Pengujian ini memerlukan peralatan seperti *stopwatch*, *glass object*, dan anak timbangan. Prosedur uji ini diawali dengan mengoles gel ke seluruh permukaan *glass object* lalu ditutup dengan *glass object* yang lain. Kemudian diletakkan beban 100 gram pada kedua *glass object*. Setelah menunggu selama 5 menit maka beban diangkat dan catat waktu yang diperlukan sampai kedua *glass object* terlepas satu sama lain.

11.4 Uji daya sebar. Tahapan awal dalam pengujian ini yaitu menimbang 0,5 gram sediaan gel yang telah dibuat lalu gel tersebut

diletakkan pada lempeng kaca bulat yang memiliki skala diameter. Kemudian ditutup menggunakan lempeng kaca lainnya yang telah ditimbang terlebih dahulu didiamkan selama semenit lalu diukur diameter penyebarannya. Ketika sudah 1 menit, diletakkan beban 50 gram di atasnya lalu ditunggu hingga 1 menit lalu diukur diameter penyebarannya. Hal ini dilakukan berulang dengan penambahan bobot 50 gram setiap 1 menit sampai didapat diameter yang cukup untuk menggambarkan efek dari pemberian beban terhadap luas daerah penyebaran sediaan gel yang telah dibuat.

11.5 Uji pH. Pengujian pH menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi terlebih dahulu. Setelah itu, sediaan gel ditimbang sebanyak 1 gram lalu dilarutkan menggunakan aquades sebanyak 10 mL. Ketika sediaan gel telah larut maka bagian ujung pH meter dimasukkan ke dalam gel kemudian amati dan catat nilai pH yang ditunjukkan oleh pH meter. Hasil pengukuran akan menunjukkan target pH kulit yaitu 4,5-6,5 (Naibaho, 2013).

11.6 Uji viskositas. Pengujian viskositas menggunakan alat viskometer. Wadah yang dalamnya berisi sediaan gel akan diuji dan rotor diletakkan tepat ditengah wadah kemudian alatnya dinyalakan. Hasil pengujian viskositas dibaca berdasarkan nomor spindel yang dipakai dengan satuan yang sesuai dengan jenis viskometer yang digunakan. Pengujian ini dilakukan pengulangan untuk setiap sampel sebanyak 3 kali.

12. Uji stabilitas sediaan gel

Uji stabilitas (*cycling test*) bertujuan untuk mengevaluasi sediaan yang dibuat memiliki stabilitas jangka panjang. Pengujian ini akan dilakukan dengan cara mengamati dan menguji sifat fisik sebelum dan sesudah geldalam penyimpanan yang dipercepat pada suhu 4°C dan 40°C secara bergantian setiap 24 jam. Percobaan dilakukan sampai 6 siklus, setiap siklus dilakukan pengamatan pada perubahan organoleptis, pH, viskositas, dan pemisahan (Kamil dan Rusli, 2018).

13. Perlakuan terhadap hewan uji

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode Akhoondinasab. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci New Zealand sebanyak 5 ekor yang telah diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari. Setelah diadaptasi kelinci tersebut diberi luka bakar pada hari ke 8 dan diberi makan minum secukupnya. Daerah punggung kelinci yang akan diuji dicukur lalu dibius dengan menyemprotkan larutan etil

alkohol pada area yang akan dibuat luka bakar. Luka bakar dibuat menggunakan lempeng logam yang telah dipanaskan dengan yang mempunyai diameter 2 cm. Setelah lempeng logam dipanaskan selama 5 menit pada suhu 90°C. kemudian ditempelkan pada punggung kelinci kurang lebih selama 5 detik hingga terbentuk luka pada kulit kelinci berbentuk lingkaran lalu diukur diameter awal luka bakar yang terbentuk menggunakan jangka sorong. Setelah itu diberi perlakuan dengan mengoleskan sediaan gel sehari 2 kali.

13.1 Pengelompokan hewan uji. Kelinci yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 5 ekor dan dibuat 6 luka pada punggung kelinci dimana mendapat perlakuan yang berbeda untuk setiap lukanya yakni :

- Luka I : diberikan kontrol negatif basis gel
- Luka II : diberikan kontrol positif gel Centabio^R
- Luka III : diberikan gel ekstrak batang patah tulang formula I
- Luka IV : diberikan gel ekstrak batang patah tulang formula II
- Luka V : diberikan gel ekstrak batang patah tulang formula III
- Luka VI : kelompok normal tanpa perlakuan apapun

14. Pengukuran persentase penyembuhan luka.

Persentase penyembuhan luka bakar diperoleh dengan mengukur diameter luka bakar pada hewan uji selama 21 hari pengamatan menggunakan jangka sorong sebelum dan sesudah mendapat perlakuan dengan mengoleskan sediaan gel yang dibuat dan sediaan gel kontrol positif serta kontrol negatif 2 kali sehari. Rata - rata diameter luka dapat dihitung menggunakan rumus :

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

Keterangan :

- dx : diameter luka hari ke-x
- Dx1 : diameter luka bakar dari sudut 0°
- Dx2 : diameter luka bakar dari sudut 45°
- Dx3 : diameter luka bakar dari sudut 90°
- Dx4 : diameter luka bakar dari sudut 135°

Persentase luka bakaar yang sembuh dihitung menggunakan rumus berikut :

$$Ptn = \frac{dt_0^2 - dt_n^2}{dt_0^2} \times 100\%$$

Keterangan :

Ptn : persentase penyembuhan luka bakar hari ke x

Dt0 : Diameter luka bakar pada hari pertama (cm)

Dx2 : diameter luka bakar pada hari ke n (cm)

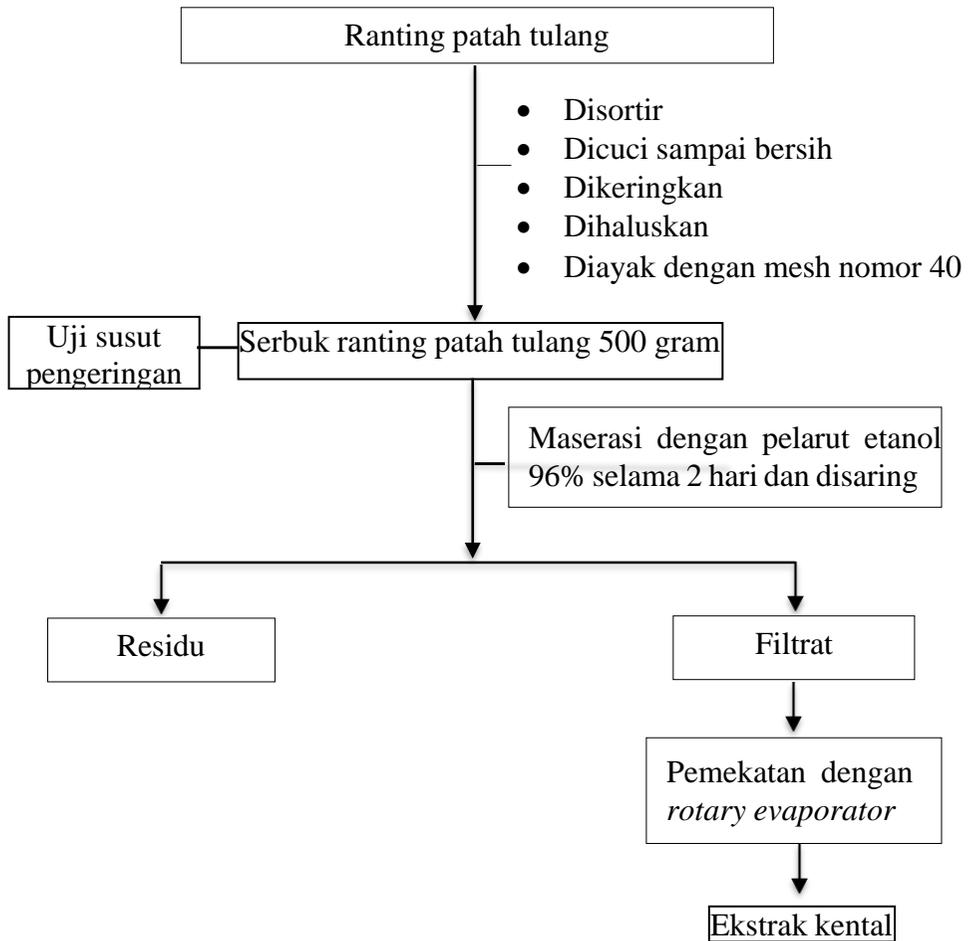
E. Analisis Data

Data hasil pengujian mutu fisik sediaan gel dianalisis menggunakan program komputer SPSS dengan metode *Shapiro-Wilk* untuk uji normalitas dan uji Levene untuk uji homogenitas. Apabila diperoleh hasil yang terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan analisis *Repeated Measure ANOVA*.

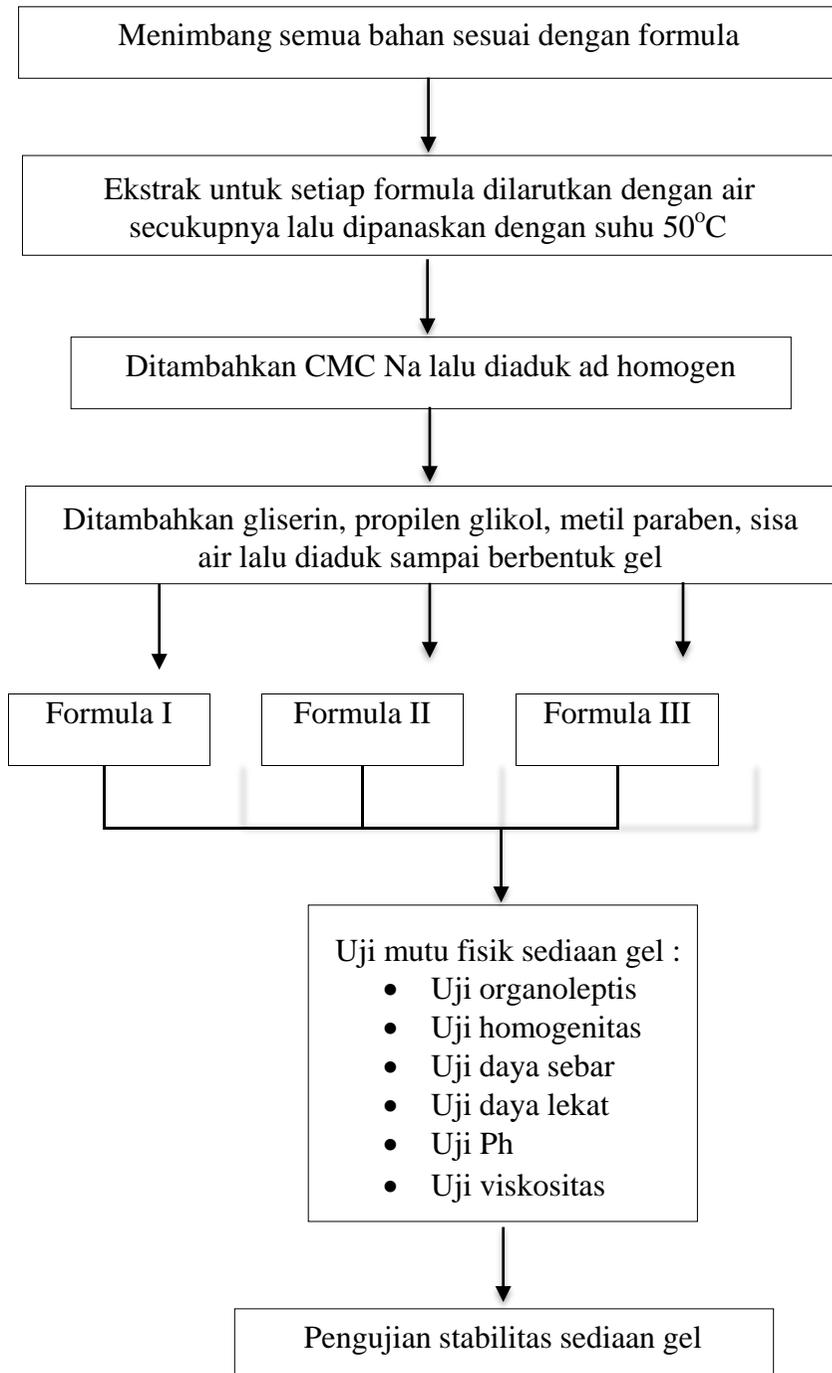
Data hasil pengujian stabilitas dianalisis menggunakan program komputer SPSS dengan metode *Shapiro-Wilk* untuk uji normalitas dan uji Levene untuk uji homogenitas. Apabila diperoleh hasil yang terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji t dimana membandingkan perubahan mutu fisik sediaan sebelum dan sesudah siklus cycling test berakhir.

Data hasil pengujian persentase penyembuhan luka dianalisis menggunakan program komputer SPSS dengan metode *Shapiro-Wilk* untuk uji normalitas dan uji Levene untuk uji homogenitas. Apabila diperoleh hasil yang terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan analisis *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey*.

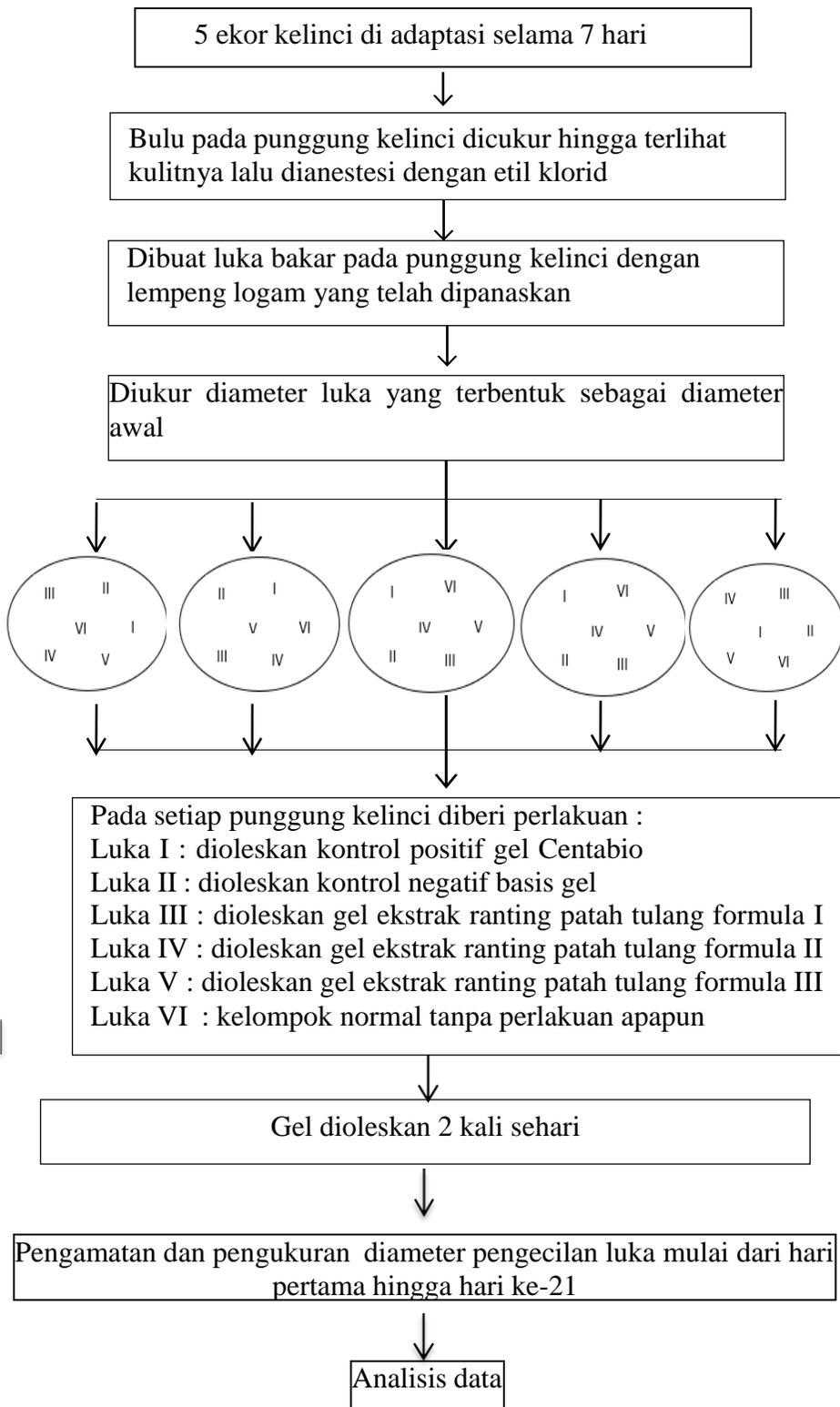
F. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak ranting patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L).



Gambar 6. Skema pembuatan gel dan uji mutu fisik gel ekstrak ranting patah tulang



Gambar 7. Skema perlakuan terhadap hewan uji