

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah seluruh objek yang menjadi sasaran dalam penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah daun telang yang diperoleh dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah bagian terkecil dari populasi yang digunakan sebagai sumber informasi dalam penelitian. Sampel dalam penelitian ini adalah daun telang segar berwarna hijau dan belum tua yang dipetik di pagi hari dan belum memasuki fotosintesis, daun dibuat variasi konsentrasi ekstrak daun telang 15%, 30%, dan 45%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang digunakan adalah ekstrak daun telang yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah ditetapkan diklasifikasikan dalam beberapa variabel. Klasifikasi variabel utama meliputi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang dapat diubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak daun telang yaitu konsentrasi 15%, 30%, dan 45%.

Variabel tergantung adalah pusat permasalahan yang termasuk dalam kriteria penelitian. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah penyembuhan luka bakar yang dapat dilihat dari lamanya penyembuhan luka bakar berdasarkan peningkatan persentase penyembuhan luka bakar.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali memerlukan penetapan kualifikasi agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini meliputi pembuatan ekstrak kental daun telang, peralatan yang digunakan, lingkungan,

kedalaman pencukuran bulu, galur dari hewan uji, lingkungan tempat tinggal, dan laboratorium.

3. Definisi operasional

Pertama, daun telang adalah tumbuhan yang diperoleh dari daerah Tawangmangu.

Kedua, serbuk daun telang adalah serbuk yang diperoleh dengan cara pengeringan, penyerbukkan, dan pengayakan dengan ayakan no 40.

Ketiga, ekstrak daun telang adalah ekstrak kental hasil ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan dipisahkan menggunakan *rotary evaporator*.

Keempat, luka bakar *superficial dermal* adalah luka bakar derajat 2 dangkal yang mengalami kerusakan di sepertiga bagian dermis superfisial dengan terbentuknya bula dan sensasi nyeri. Lempengan logam berdiameter 2 cm dan tebal 1 mm dipanaskan di atas api selama 5 menit dan ditempelkan pada punggung kelinci yang sudah dicukur untuk pembentuk luka bakar *superficial dermal*.

Kelima, variasi konsentrasi ekstrak adalah konsentrasi ekstrak yang digunakan bermacam-macam meliputi konsentrasi 15%, konsentrasi 30%, dan konsentrasi 45%.

Keenam, kesembuhan luka bakar adalah luka bakar yang telah sembuh ditandai dengan meningkatnya persentase kesembuhan luka bakar dan luka telah mengering.

Ketujuh, konsentrasi efektif adalah konsentrasi terkecil yang memberikan kesembuhan yang setara dengan kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik Ohaus, blender, ayakan nomor 40, botol maserasi, beaker glass, gelas ukur, cawan porselin, oven Memmert, alat *moisture balance* Ohaus, alat pencukur bulu, *rotary evaporator* IKA® RV 10 digital, gunting, lempeng logam ukuran berdiameter 2 cm.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun telang, kelinci *New Zealand*, etanol 96%, Na-CMC, dan Salep Mebo.

D. Jalannya Penelitian

1. *Ethical clearance*

Ethical clearance atau kelaikan etik dilakukan untuk menyatakan suatu penelitian layak etik yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan sehingga penelitian dapat dilakukan. *Ethical clearance* dilakukan di Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Moewardi dengan mengajukan formulir pendaftaran yang tertera dilaman website komisi etik RS. Moewardi dan proposal yang telah ditanda tangani oleh penguji.

2. **Determinasi tanaman**

Determinasi tanaman daun telang dilakukan untuk mengetahui sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian telah sesuai dengan jenisnya dan spesiesnya dan untuk menghindari adanya kekeliruan dalam pengumpulan bahan dan tercampurnya sampel tanaman dengan tanaman lain. Determinasi daun telang dilakukan di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Jawa Tengah.

3. **Pengambilan daun telang**

Sampel daun telang segar diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Pengambilan daun telang dilakukan dengan memetik daun yang masih segar berwarna hijau dan belum tua di pagi hari sebelum memasuki fotosintesis, kemudian dilakukan sortasi basah dan pencucian menggunakan air mengalir untuk menghilangkan pengotornya seperti tanah.

4. **Pembuatan serbuk daun telang**

Sampel daun telang yang sudah dicuci, dikeringkan dibawah terik matahari dan ditutupi kain hitam, kemudian sampel yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan nomor 40 (Maharisti *et al.*, 2022).

5. **Penetapan susut pengeringan serbuk**

Penetapan susut pengeringan serbuk menggunakan alat *moisture balance* dalam suhu 105°C. Serbuk ditimbang sebanyak 2 g, kemudian dimasukkan ke dalam alat yang sudah terdapat alumunium foil dan telah ditara. Serbuk diratakan sama rata hingga bagian alas alumunium foil tertutupi. Pengeringan dilakukan selama 15 menit hingga bobot tetap. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali dan dihitung persentasenya. Nilai susut pengeringan $\leq 10\%$ (Maharisti *et al.*, 2022).

6. Penetapan kadar air serbuk

Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan metode destilasi toluen. Pereaksi yang digunakan adalah toluen jenuh air yang dibuat dengan cara sejumlah toluen dikocok dengan sedikit air dan dibiarkan memisah kemudian buang lapisan air. Serbuk ditimbang sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1-4 ml air dan masukkan ke labu kering. Toluena jenuh air dimasukkan lebih kurang 200 ml ke dalam labu dan rangkaian alat dipasang. Toluena jenuh air dimasukkan ke dalam tabung penerima melalui pendinginan sampai leher alat penampung. Labu dipanaskan selama 15 menit.

Setelah toluen mendidih, kecepatan penyulingan diatur lebih kurang 2 tetes tiap detik hingga sebagian air tersuling. Kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Sebagian besar air yang telah tersuling kemudian bagian dalam pendingin dicuci dengan toluena jenuh air, sambil dibersihkan menggunakan sikat tabung yang telah dibasahi toluena jenuh air. Penyulingan dilanjutkan 5 menit. Tabung penerima didinginkan hingga suhu ruang. Jika terdapat tetesan air yang melekat, tabung pendingin dan penerima digosok dengan karet dan dibasahi dengan toluena jenuh air hingga tetesan airnya turun (Kemenkes RI, 2017).

7. Ekstraksi daun telang

Serbuk daun telang sebanyak 1 bagian sebanyak 500 g dan 10 bagian pelarut sebanyak 5 L dimasukkan dalam maserator. Serbuk direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk dan didiamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara filtrasi.

Proses penyarian diulangi sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dengan volume sebanyak setengah kali volume penyarian pertama. Maserat dikumpulkan dan diuapkan menggunakan penguap vakum atau penguap tekanan rendah menggunakan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental. Hitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara bobot ekstrak yang diperoleh dengan bobot serbuk yang digunakan (Kemenkes RI, 2017).

8. Identifikasi ekstrak kental daun telang

Identifikasi ekstrak kental daun telang dilakukan secara organoleptis meliputi bentuk, warna, dan aroma.

9. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun telang

Ekstrak ditimbang sebanyak 1-2 g dalam botol timbang dangkal tertutup yang sudah dipanaskan dalam suhu 105°C dan ditara, ekstrak

diratakan dengan menggoyangkan botol hingga ketebalan lapisannya lebih kurang 5-10 mm dan botol dimasukkan ke dalam ruang pengering dengan posisi tutupnya terbuka dan dikeringkan dalam suhu 105°C hingga diperoleh bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, botol didinginkan dengan dimasukkan ke dalam eksikator hingga suhu ruang (Kemenkes RI, 2017).

10. Penetapan kadar air ekstrak daun telang

Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan metode gravimetri. Sampel ditimbang lebih kurang 10 g dan dimasukkan ke wadah yang sudah ditara. Sampel dikeringkan dalam suhu 105°C selama 5 jam kemudian ditimbang, pengeringan dilanjutkan dan ditimbang pada selang waktu 1 jam hingga diperoleh perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

11. Identifikasi kandungan senyawa serbuk dan ekstrak daun telang

11.1 Identifikasi saponin. Uji kandungan saponin sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan air panas sebanyak 7 ml kemudian dikocok vertikal selama 10 detik lalu dibiarkan selama 10 detik. Pembentukan buih setinggi 1-10 cm dan dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Puspitasari *et al.*, 2022).

11.2 Identifikasi tanin. Sampel ditimbang sebanyak 50 mg dan ditambahkan 20 ml air kemudian dipanaskan selama 15 menit. Sampel didinginkan dan disaring, dimasukkan ke tabung reaksi ditambahkan reagen FeCl₃ 1%. Hasil positif ditandai dengan warna larutan menjadi biru tua atau hitam kehijauan (Fikayuniar *et al.*, 2022).

11.3 Identifikasi flavonoid. Sampel ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan dengan 0,5 g serbuk Mg dan dimasukkan 5 ml HCl pekat ke dalamnya. Hasil positif flavonoid yaitu ditandai dengan terjadinya warna merah, orange atau kuning dalam 2-5 menit (Puspitasari *et al.*, 2022).

11.4 Identifikasi alkaloid. Sampel sebanyak 1 g ditambahkan 3 ml HCl 2N kemudian dipanaskan 2 menit dan diaduk terus. Sampel didinginkan kemudian disaring dan dibagi menjadi 3 bagian dalam tabung reaksi. Bagian pertama (tabung 1) ditambahkan pereaksi mayer 6 tetes menghasilkan hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih atau kuning. Bagian kedua (tabung 2) ditambahkan pereaksi dragendorff sebanyak 3 tetes yang menghasilkan hasil positif

ditandai dengan endapan jingga kecoklatan atau coklat. Bagian ketiga (tabung 3) digunakan sebagai blanko (Fikayuniar *et al.*, 2022).

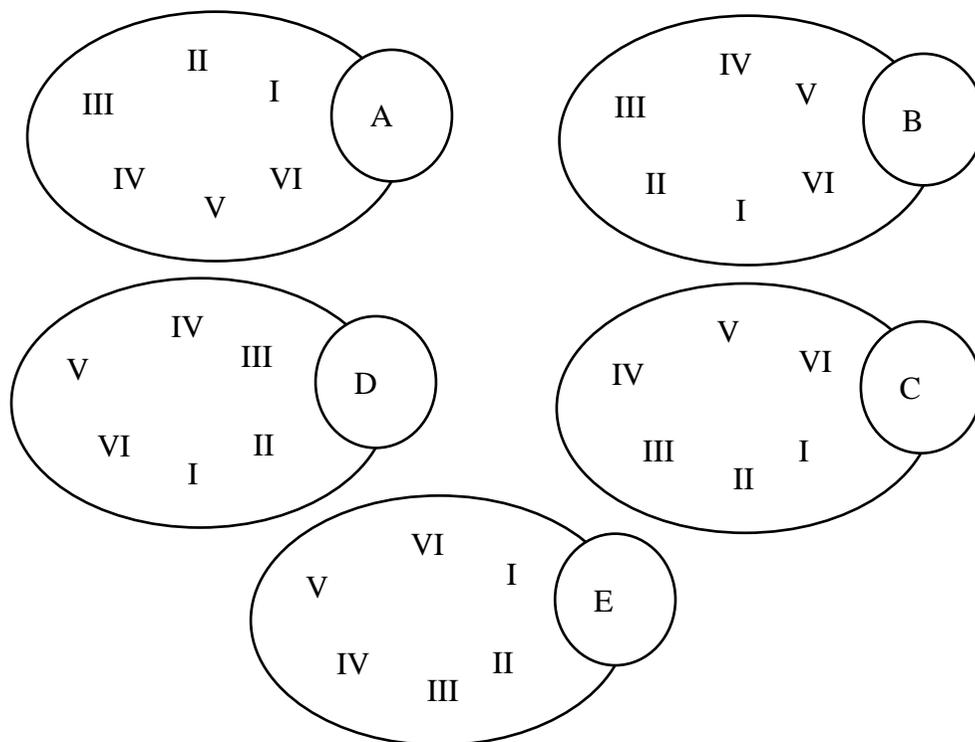
10.5 Identifikasi triterpenoid dan steroid. Sampel sebanyak 1 ml ditambahkan dengan asam asetat (CH_3COOH) glasial 1 ml dan diaduk, kemudian ditambahkan dengan asam sulfat (H_2SO_4) pekat sebanyak 5 tetes. Hasil positif ditandai terbentuknya warna merah atau merah keunguan yang menandakan positif triterpenoid, dan warna hijau atau hijau kebiruan yang menandakan positif steroid (Abriyani, 2022).

12. Prosedur uji aktivitas luka bakar

Prosedur uji aktivitas luka bakar diawali dengan pengelompokkan hewan uji, pembuatan konsentrasi ekstrak daun telang, pengujian luka bakar pada kelinci selama 14 hari. Pengelompokkan hewan uji sejumlah 5 ekor kelinci diacak dan ditempatkan dalam kandang yang telah disediakan berdasarkan kelompok perlakuan. Kelinci diberi minum dan pakan standar secukupnya dan diadaptasi selama 7 hari. Pengelompokkan hewan uji untuk 1 ekor kelinci *New Zealand* memiliki 6 kelompok perlakuan luka bakar dengan model luka bakar yang dapat dilihat pada gambar 6.

Kelompok perlakuan luka bakar meliputi :

- a. Kelompok I : Kontrol positif (Salep Mebo)
- b. Kelompok II : Kelompok ekstrak daun telang 15%
- c. Kelompok III : Kelompok ekstrak daun telang 30%
- d. Kelompok IV : Kelompok ekstrak daun telang 45%
- e. Kelompok V : Kontrol negatif (suspensi Na-CMC 1%)
- f. Kelompok VI : Kontrol normal (tidak diberi perlakuan)



Gambar 6. Model luka bakar

Pembuatan konsentrasi ekstrak daun telang dilakukan dengan melarutkan ekstrak daun telang dalam suspensi Na-CMC 1% sebanyak 10 ml dan suspensi yang didapatkan kental. Menurut Maitimu (2018) pembuatan konsentrasi ekstrak dilakukan dengan berat ekstrak yang digunakan dibagi dengan volume pelarut yang digunakan dikalikan dengan 100% dan dapat dilihat dalam lampiran 13. Pembuatan suspensi Na-CMC 1% dilakukan dengan Na-CMC ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dalam aquadest panas 100 ml.

Pembuatan ekstrak daun telang konsentrasi 15% dengan menimbang ekstrak daun telang sebanyak 1,5 g dan dilarutkan dalam suspensi Na-CMC 1% hingga volume 10 ml.

Pembuatan ekstrak daun telang konsentrasi 30% dengan menimbang ekstrak daun telang sebanyak 3 g dan dilarutkan dalam suspensi Na-CMC 1% hingga volume 10 ml.

Pembuatan ekstrak daun telang konsentrasi 45% dengan menimbang ekstrak daun telang sebanyak 4,5 g dan dilarutkan dalam suspensi Na-CMC 1% hingga volume 10 ml.

Hari ke-8 dilakukan pembuatan luka bakar di punggung kelinci. Bulu yang hendak dicukur digunting terlebih dahulu, kemudian diberi

alkohol 70% dan kelinci dibius menggunakan ethyl chloride 2-3 kali semprot. Pembuatan luka bakar menggunakan lempengan besi yang memiliki diameter 2 cm dan dipanaskan 5 menit kemudian ditempelkan di punggung kelinci hingga terbentuk luka bakar *superficial dermal* atau derajat 2 dangkal yang ditandai dengan warna kemerahan dan adanya bula atau gelembung.

Luka bakar dioleskan dengan kontrol positif Salep Mebo, konsentrasi ekstrak daun telang dalam suspensi Na-CMC yang meliputi konsentrasi 15%, konsentrasi 30%, konsentrasi 45%, dan kontrol negatif suspensi Na-CMC di area luka 2 kali sehari yaitu dioleskan pagi hari dan sore hari selama 14 hari. Pengolesan kelompok perlakuan tersebut diberikan sebanyak 0,1 g (Rinawati *et al.*, 2022).

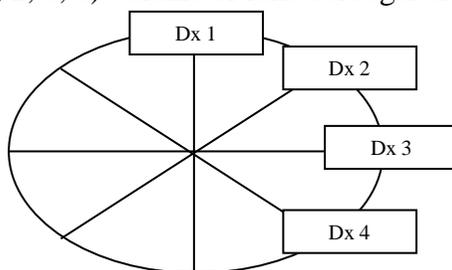
Luka bakar diukur dengan menggunakan jangka sorong secara vertikal, horizontal maupun kedua diagonal (Zahra *et al.*, 2017) yang dapat dilihat dalam gambar 7. Pengukuran dilakukan setelah perlakuan hingga luka bakar dinyatakan sembuh. Pengukuran luka bakar dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

dx : diameter luka pada hari ke-x (cm)

dx (1, 2, 3, 4) : diameter luka berbagai arah



Gambar 7. Diameter luka bakar

Persentase penyembuhan luka bakar pada hari ke-x diukur dengan :

$$Px = \frac{(d1)^2 + dx (2)^2}{(d1)^2} \times 100\%$$

Keterangan :

Px = persentase penyembuhan luka hari ke-X (%)

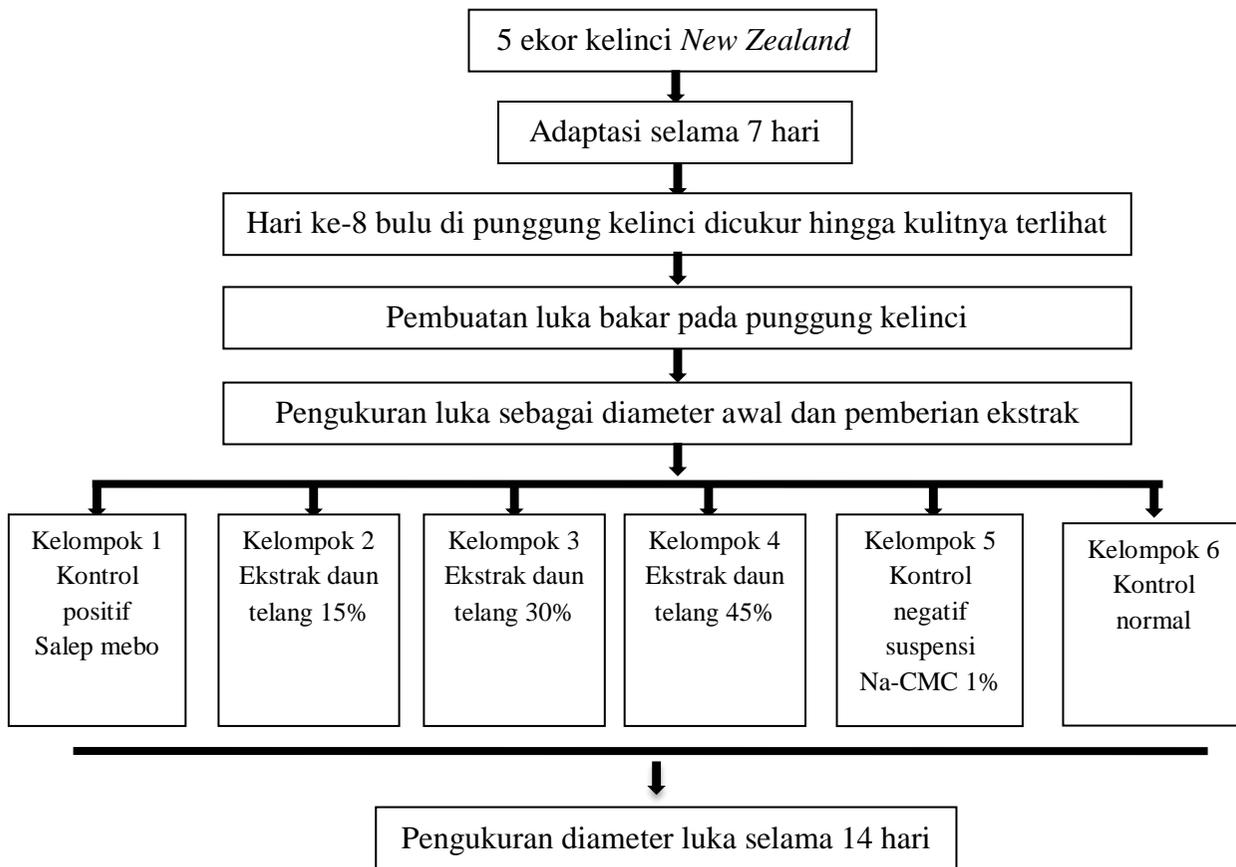
d1 = diameter luka bakar hari ke-1(cm)

dx = diameter luka bakar hari ke-x (cm)

E. Diagram Alir



Gambar 8. Skema pengujian penelitian



Gambar 9. Skema uji aktivitas ekstrak daun telang (*Clitoria ternatea* L.) sebagai penyembuh luka bakar

F. Analisis Hasil

Data pengamatan yang diperoleh dari proses penyembuhan luka bakar adalah persentase penyembuhan luka bakar yang diuji statistik menggunakan *SPSS* versi 25. Hasil data yang diperoleh terdistribusi normal dengan uji *Shapiro wilk* dengan nilai $\text{sig} > 0,05$ dan terdistribusi homogen dengan nilai $\text{sig} > 0,05$ dilanjutkan dengan uji *One way ANOVA* yaitu uji *post hoc* menggunakan *tukey*.