

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan seluruh unit atau individu dalam suatu yang diminati. Populasi pada penelitian ini adalah daun tembelean yang berasal dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tembelean yang dipetik acak dengan memilih daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau segar, dan bebas penyakit.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama penelitian ini adalah ekstrak etanol daun tembelean (*Lantana camara* L.) yang diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi sebelumnya dapat diklasifikasikan ke dalam variabel yang berbeda, yaitu variabel bebas, tergantung dan terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dibuat dengan tujuan menguji pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak daun tembelean.

Variabel tergantung adalah variabel yang berada pada pusat masalah dan berfungsi sebagai kriteria evaluasi. Variabel tergantung penelitian ini adalah aktivitas penyembuhan luka bakar yang dilihat dari parameternya seperti kecepatan penyembuhan (diameter) dan kualitas mutu fisik pada sediaan krim ekstrak etanol daun tembelean pada kelinci.

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah status kesehatan pada hewan uji meliputi produksi ekstrak kental, peralatan yang digunakan, ukuran luka, kedalaman luka, berat badan, usia dan umur, lingkungan dan laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, tanaman tembelean diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, daun tanaman tembelekan dilakukan pengeringan, penggilingan, dan pengayakan. Hasil dari proses tersebut dilakukan maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, lalu dilakukan pemekatan dari ekstrak yang dihasilkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 40°C.

Ketiga, uji aktivitas anti luka bakar merupakan pengujian untuk mengetahui aktivitas dari krim ekstrak etanol daun tembelekan terhadap kecepatan penyembuhan (diameter) luka bakar.

Keempat, luka bakar derajat dua merupakan luka bakar ditandai dengan warna kemerahan, bengkak, dan melepuh yang berisi cairan eksudat. Perlakuan luka bakar dengan menggunakan lempeng logam yang sudah dipanaskan selama 5 menit, kemudian pemberian anestesi lokal (*ethyl chlorid*) pada punggung kelinci yang sudah dicukur, lalu tempelkan plat logam selama 5 detik. Luka bakar ditandai dengan tanda-tanda inflamasi seperti: merah, bengkak, dan melepuh yang berisi cairan eksudat.

Kelima, krim merupakan sediaan topikal yang dibuat dengan campuran zat aktif dan bahan tambahan, dengan menggunakan tiga variasi konsentrasi sediaan krim yaitu 2%, 4%, dan 8%.

Keenam, pengujian mutu fisik sediaan krim meliputi uji organoleptis, uji homogenitas, uji pH, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat, uji stabilitas, dan uji tipe krim.

Ketujuh, konsentrasi efektif merupakan konsentrasi terkecil yang terbukti efektif dalam memberikan penyembuhan luka bakar pada kelinci, dan memiliki persentase yang sebanding dengan kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah oven, blender, ayakan no 40, wadah maserasi, corong pisah, kompor, beaker glass, gelas ukur, cawan porselin, timbangan analitik, seperangkat alat ekstraksi, alat uji daya lekat, daya sebar, viskositas, dan uji pH. Alat yang digunakan untuk perlakuan luka bakar pada kelinci adalah lempeng besi dengan diameter 2 cm, gunting, alat pencukur bulu, jangka sorong.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tembelekan, kelinci, etanol 96%, etanol 70%, salep levertran, asam stearat, setil alkohol, TEA, gliserin, metil paraben (nipagin), propil

paraben (nipasol), aquades, $FeCl_3$ 1%, *ethyl chlorid*, asam klorida 2N, serbuk Mg, metilen blue.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tumbuhan

Tujuan dari determinasi ini adalah untuk memastikan sampel yang akan digunakan merupakan spesies yang spesifik, untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan bahan dan kemungkinan tercampurnya sampel dengan tanaman lain. Identifikasi tanaman akan dilakukan di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. *Ethical Clearence* hewan uji

Tujuan dari *Ethical Clearence* ini adalah untuk melindungi subyek penelitian dari bahaya secara fisik berupa ancaman, psikis, social, dan konsekuensi hukum sebagai akibat turut berpartisipasi dalam suatu penelitian. *Ethical Clearence* dilakukan di Dr. Moewardi General Hospital, RSUD Dr. Moewardi, Jawa Tengah.

3. Pengambilan daun tembelean

Sampel yang digunakan adalah daun tembelean yang berasal dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun tembelean diambil dalam keadaan segar, dengan daun berwarna hijau, dan memiliki mahkota berwarna *orange* kekuningan, kemudian cuci dengan air mengalir.

4. Pengeringan daun tembelean

Daun tembelean yang telah dicuci bersih, kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu $40^{\circ}C$ hingga kering. Tujuan dari pengeringan ini adalah untuk mengurangi kadar air, mencegah tumbuhnya jamur penyebab kebusukan dan perubahan kimiawi yang akan mempengaruhi mutu simplisia.

5. Pembuatan serbuk daun tembelean

Setelah kering, dilakukan penyerbukan di Universitas Setia Budi Surakarta menggunakan mesin penyerbuk. Saring serbuk dari daun tembelean, kemudian diayak dengan pengayak no. 40 dan simpan dalam kantong plastik besar.

6. Identifikasi serbuk daun tembelean

Identifikasi organoleptis pada serbuk daun tembelean meliputi bentuk, warna, bau dari serbuk daun tembelean.

7. Penetapan kadar air serbuk

Kadar air ditentukan dengan cara destilasi metode Sterling-bidwell dengan pelarut toluene jenuh air (1:10). Penetapan kadar air serbuk daun tembelean, ditimbang 20 g serbuk kering kemudian tambahkan pelarut kedalam labu alat bulat untuk penjuhan. Penjuhan dilakukan dengan menggunakan aquades 10 ml dan toluene 100 ml, panaskan hingga tidak terdapat tetesan air, kemudian ukur kadar airnya. Dilihat volume skala alat dan dihitung % air dari berat sampel.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume air}}{\text{bobot bahan sampel}} \times 100 \%$$

8. Penetapan susut pengeringan serbuk

Susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* dengan suhu 105°C, timbang serbuk sebanyak 2 g kemudian masukkan ke dalam alat, tunggu 15 menit hingga nilai setiap pengukuran yang muncul ditandai dengan 3 kali berat konstan.

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100 \%$$

9. Pembuatan ekstrak daun tembelean

Sebanyak 600 g serbuk daun tembelean diekstraksi dengan metode maserasi. *Simplisia* direndam dalam 6000 ml menggunakan pelarut etanol 96%, perendaman dilakukan selama 6 jam sambil sesekali diaduk dan disaring. Hasil filtrat 1 dan sisanya di ekstraksi kembali dalam 3000 ml etanol 96%, kemudian hasil ekstraksi (filtrat 2) digabungkan, dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* suhu 40°C sampai mendapatkan ekstrak kental, kemudian hitung ekstrak kental yang sudah didapatkan.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat}}{\text{berat simplisia yang diekstrak}} \times 100 \%$$

10. Identifikasi ekstrak kental daun tembelean

Identifikasi dilakukan secara organoleptis pada ekstrak kental daun tembelean yang meliputi bentuk, warna, dan bau.

11. Penetapan susut pengeringan ekstrak

Ekstrak ditimbang sebanyak 2 g dalam botol tertutup yang sudah dipanaskan dalam suhu 105°C dan ditara, kemudian ekstrak diratakan dengan cara menggoyangkan botol hingga ketebalan lapisannya lebih kurang 5-10 mm dan botol dimasukkan ke dalam ruang pengering dengan posisi tutupnya terbuka, kemudian dikeringkan

dalam suhu 105°C hingga diperoleh bobot tetap, sebelum pengeringan, botol didinginkan dengan dimasukkan ke dalam desikator hingga suhu ruang (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100 \%$$

12. Identifikasi senyawa

12.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 200 mg sampel daun tembelean ditambahkan 5 ml etanol dan dipanaskan dalam tabung reaksi selama 5 menit, kemudian tambahkan beberapa tetes HCl pekat, lalu tambahkan 0,2 g serbuk Mg. Hasil positif ditandai dengan munculnya warna jingga, merah, merah tua dalam waktu 3 menit (Sangi *et al.*, 2008).

12.2 Identifikasi saponin. Timbang sampel sebanyak 0,5 g, masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml aquades, kemudian kocok dan tambahkan setetes larutan asam klorida 2N. Biarkan tabung reaksi berdiri dan amati apakah ada busa yang stabil atau tidak. Sampel mengandung saponin ditandai dengan terbentuknya busa stabil setinggi 1-3 cm selama 30 detik (Suharto *et al.*, 2012).

12.3 Identifikasi tanin. Timbang sampel sebanyak 20 mg, tambahkan etanol sampai sampel terendam seluruhnya. Kemudian ambil sampel sebanyak 1 ml pindahkan ke dalam tabung reaksi, dan tambahkan 2-3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditandai dengan munculnya warna hijau kehitaman (Sangi *et al.*, 2008).

13. Pembuatan krim ekstrak etanol daun tembelean

Formulasi ekstrak etanol daun tembelean dengan berat total 100 g, dengan tiga variasi konsentrasi yaitu 2%, 4%, dan 8%.

Tabel 1. Formulasi krim ekstrak etanol daun tembelean

Bahan	F0	F1	F2	F4	Fungsi
Ekstrak daun tembelean	-	2 g	4 g	8 g	Zat aktif
Setil alkohol	4 g	4 g	4 g	4 g	Emulgator
Gliserin	10 g	10 g	10 g	10 g	Humektan
TEA (Trietanolamin)	1 g	1 g	1 g	1 g	Alkalizing agent
Asam stearat	10 g	10 g	10 g	10 g	Emulgator
Metil paraben	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g	Pengawet
Propil parabel	0,02 g	0,02 g	0,02 g	0,02 g	Pengawet
Aquades ad	100 g	100 g	100 g	100 g	Pelarut

Keterangan :

- F0 = Formulasi krim ekstrak etanol daun tembelean (basis)
- F1 = Formulasi krim ekstrak daun tembelean konsentrasi 2%
- F2 = Formulasi krim ekstrak daun tembelean konsentrasi 4%
- F3 = Formulasi krim ekstrak daun tembelean konsentrasi 8%

Komponen fase minyak (asam stearat, setil alkohol, propil paraben) dan fase air (TEA, gliserol, metil paraben, air suling) dipisahkan. Fase minyak dan air dipanaskan sampai 70°C sampai semuanya larut. Krim dibuat dengan menambahkan fase minyak ke fase air. Ketika suhu krim telah mencapai $\pm 45^{\circ}\text{C}$, tambahkan ekstrak daun tembelean yang diencerkan dengan air suling dan lanjutkan pengadukan hingga rata. Pada proses pengadukan dilakukan pelan-pelan menggunakan mortir yang sudah dipanaskan, kemudian tuangkan krim ke dalam wadah (Waehama, 2016).

14. Pengujian mutu fisik krim ekstrak etanol daun tembelean

14.1 Uji Organoleptik. Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati perubahan bentuk, warna dan bau dari sediaan krim ekstrak etanol daun tembelean.

14.2 Uji Homogenitas. Sediaan krim diambil lalu dioleskan di atas kaca transparan. Amati apakah partikel kasar masih ada dan terjadi pemisahan fase.

14.3 Uji pH. Pengukuran pH dilakukan dengan indikator pH yang dicelupkan ke dalam formulasi selamakurang lebih 3 detik. Tes ini mengukur tingkat pH normal kulit, yang sesuai dengan nilai 4,5 hingga 6,5. Nilai pH yang terlalu basa membuat kulit sedikit kering, sedangkan nilai pH yang terlalu asam mengiritasi kulit (Swastika *et. al.*, 2013).

14.4 Uji Daya sebar. Bentuk krim ditimbang hingga 0,5g terdekat, kemudian di letakkan ditengah piring kaca dan didiamkan selama 1 menit. Setelah itu, beban bertambah setiap menit dari 50 g menjadi 250 g. Pengukuran diameter sebaran sediaan secara melintang dan membujur. Pengujian dilakukan dengan tiga ulangan untuk setiap formula. Persyaratan untuk uji difusi formulasi topikal adalah sekitar 5-7cm (Yusuf, 2017).

14.5 Uji Daya lekat. Sediaan krim ditimbang menjadi 0,5 gram, letakkan di atas piring kaca, kemudian jepit hingga kedua pelat kaca menyatu. Terapkan beban 1 kg selama 5 menit. Pengujian dilakukan dengan tiga kali ulangan untuk setiap formulasi. Persyaratan waktu tambalan yang baik untuk formulasi topikal adalah >1detik (Ansel, 2008).

14.6 Uji Viskositas. Pengukuran viskositas menggunakan alat *Viskomter Brookfield*. Sediaan krim dimasukkan ke dalam beaker glass, kemudian pasang spindle no 7 dan jalankan dengan menggunakan 30

rpm. Setelah itu catat hasil jika sudah menunjukkan nilai yang stabil (Alrosyidi, 2021). Persyaratan viskositas krim yang baik yaitu berkisar antara 2000-50000 cPs (Martin *et al.*, 2012).

14.7 Uji Stabilitas. Pengujian stabilitas dilakukan menggunakan metode *cycling test* yaitu sebelum dan sesudah penyimpanan. Pengujian dilakukan dengan suhu rendah yaitu 4°C menggunakan lemari pendingin selama 6 siklus, kemudian pengujian dengan suhu panas yaitu 40°C menggunakan oven selama 6 siklus, dimana tiap siklusnya meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, daya lekat, daya sebar, viskositas (Nurjanah *et al.*, 2019).

14.8 Uji tipe krim. Pada pengujian tipe krim dilakukan menggunakan metode pewarnaan. Krim dioleskan pada kaca objek kemudian ditetesi metilen blue. Hasil positif ditandai saat metilen blue menyebar secara merata, maka termasuk dalam tipe m/a (minyak dalam air). Sedangkan jika hasil metilen blue memisah maka tipe krimnya adalah a/m (minyak dalam air) (Arifin, 2010).

15. Perlakuan hewan uji

Sebanyak 5 ekor kelinci diacak dan ditempatkan terpisah pada masing-masing kelompok perlakuan. Kelinci diaklimatisasi selama 7 hari dan diberi perlakuan luka bakar derajat II pada hari ke 8. Kelinci diberi makan dan minum yang cukup, kemudian cukur bulu punggung bagian belakang sebelum diberikan perlakuan. Luka bakar dibuat dengan plat logam berdiameter 2 cm, dipanaskan selama 5 menit kemudian berikan anestesi lokal (*ethyl chlorid*) dengan cara semprot pada kulit punggung kelinci (Ghofroh, 2017), kemudian tempelkan plat logam selama 5 detik pada punggung kulit kelinci hingga terbentuk luka bakar derajat dua yang ditandai dengan munculnya lepuhan. Ada 6 luka bakar di punggung. Masing – masing luka mendapatkan pengolesan sebanyak 0,5 g dengan menimbang masing-masing sediaan. Luka 1 mendapat kontrol negatif (basis krim), luka 2 mendapat kontrol positif (salep levertran), luka 3 mendapat formula 1 (2%), luka 4 mendapat formula 2 (4%), luka 5 mendapat formula 3 (8%), luka 6 tanpa perlakuan. Pengobatan dilakukan dua kali sehari selama 21 hari.

Terdapat 6 perlakuan dengan komposisi 5 ekor kelinci. Setiap kelinci mendapatkan perlakuan sebagai berikut :

Luka I : dioleskan basis krim(kontrol negatif)

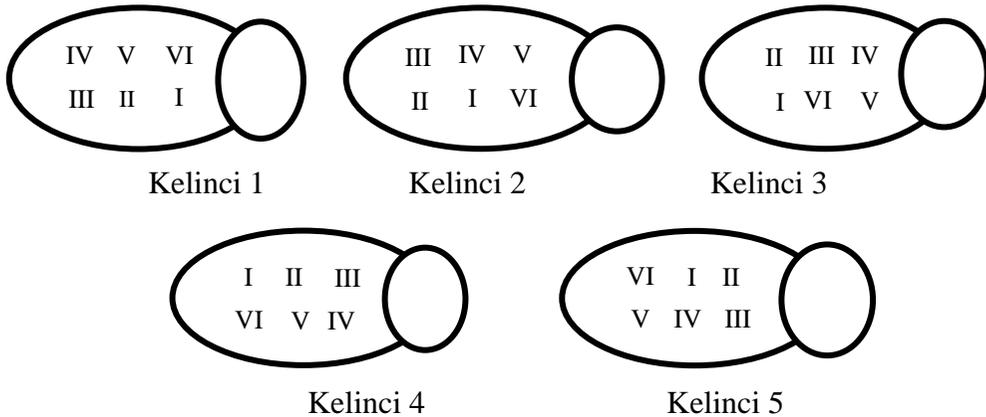
Luka II : dioleskan salep levertran (kontrol positif)

Luka III : dioleskan krim ekstrak daun tembelekan 2%

Luka IV : dioleskan krim ekstrak daun tembelean 4%

Luka V : dioleskan krim ekstrak daun tembelean 8%

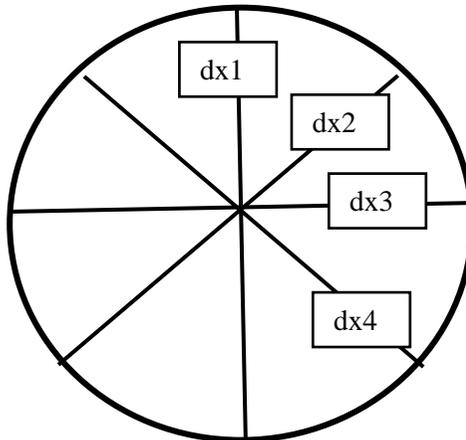
Luka VI : tanpa perlakuan (kontrol normal)



Gambar 6. Perlakuan luka pada kelinci

16. Pengukuran persentase penyembuhan luka

Pengukuran diameter luka bakar dilakukan pada hari kedua dengan menggunakan jangka sorong, sebelum dilakukan pengukuran luka pada punggung kelinci diberi plastik mika pada bagian atas luka dengan pola seperti pada gambar 7. Pemberian plastik mika dimaksudkan agar pada saat pengukuran akan lebih mudah dan cepat. Pengukuran dilakukan setiap hari selama 21 hari untuk setiap hewan uji.



Gambar 7. Pengukuran persentase penyembuhan luka

$$dxn = \frac{dx1+dx2+dx3+dx4}{4}$$

Keterangan :

- dx1 : pengukuran secara horizontal (atas ke bawah)
 dx2 : pengukuran dengan kemiringan sudut 45°C
 dx3 : pengukuran secara vertikal (kanan ke kiri)
 dx4 : pengukuran dengan kemiringan sudut 135°C

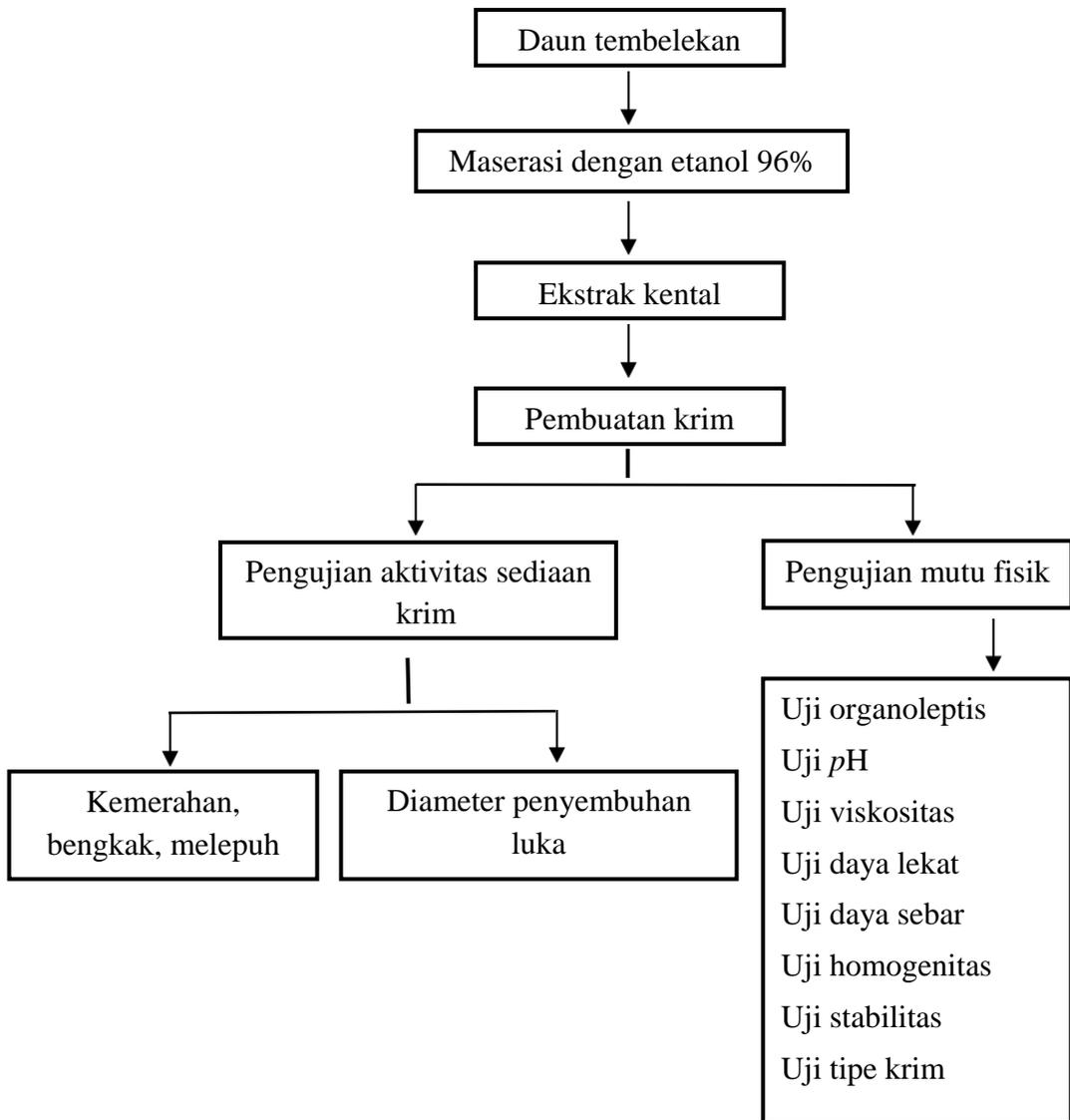
Persentase penyembuhan luka pada hari ke-x digunakan sebagai parameter. Perhitungan persentase penyembuhan luka dilakukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$P_x = \frac{(dx1)^2 - (dx2)^2}{(dx1)^2} \times 100\%$$

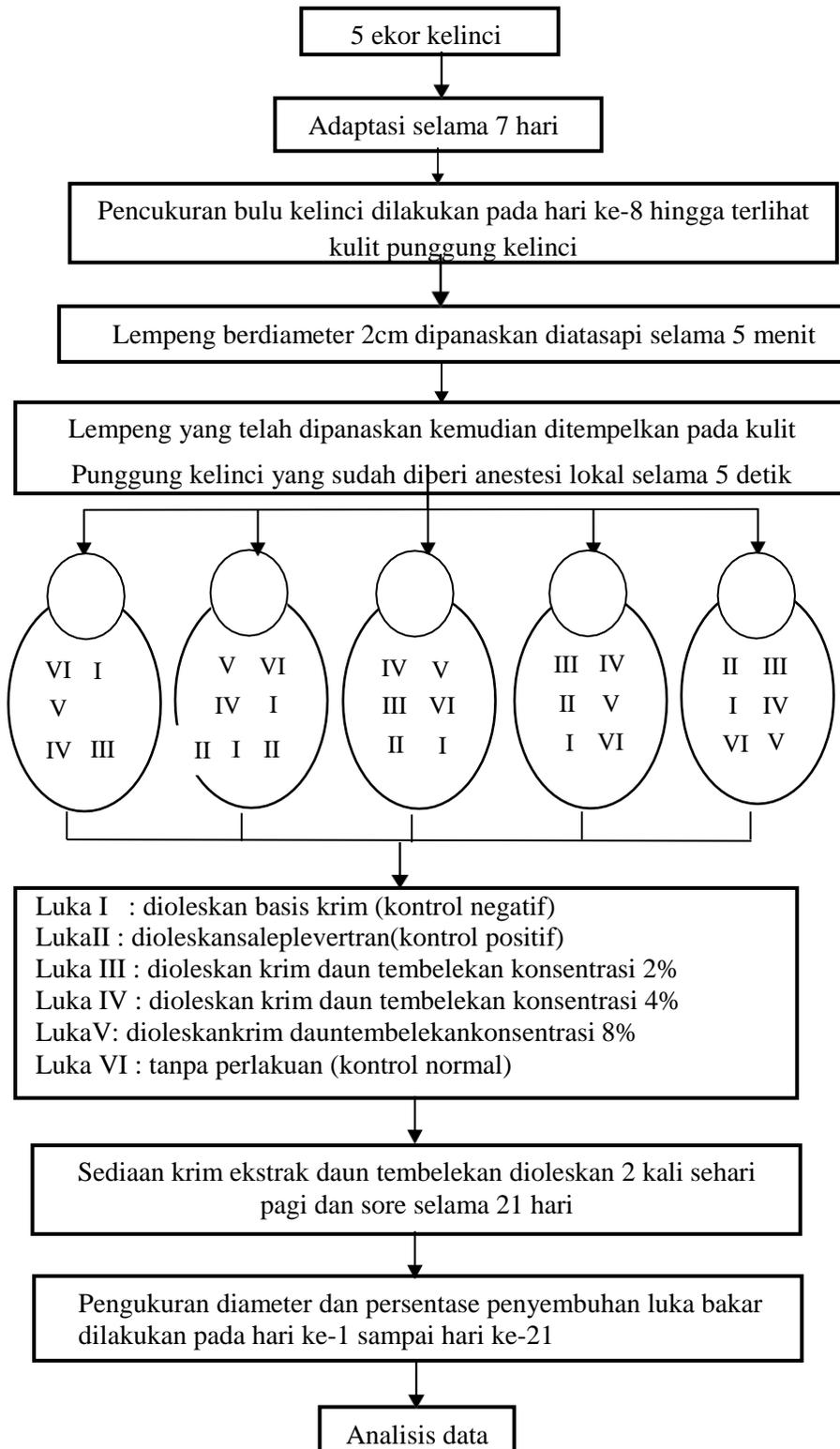
Keterangan :

- Px : penyembuhan luka hari ke-x
 dx₁ : diameter luka hari-1
 dx_n : diameter luka hari ke-n

E. Alur Penelitian



Gambar 8. Proses pembuatan simplisia dan ekstraksi daun tembelean (*Lantana camara* L.)



Gambar 9. Skema Uji Aktivitas Anti Luka Bakar

F. Analisis Data

Berdasarkan data hasil pengujian mutu fisik sediaan krim ekstrak etanol daun tembelean dengan tiga variasi konsentrasi yaitu 2%, 4%, dan 8%, seperti uji organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, dan daya lekat, selanjutnya dilakukan analisis dengan pendekatan statistik menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) metode *Shapiro-wilk*, jika data yang diperoleh berdistribusi normal, maka dilanjutkan menggunakan *one way* ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95%.

Pada setiap pengujian, dicari perbedaan pada hari ke 1 dan 21, setelah pemberian sediaan krim. Hasil persentase (diameter) luka bakar sampai hari ke-21, kemudian dianalisis secara statistik menggunakan metode *Shapiro-Wilk*. Jika data yang diperoleh berdistribusi normal ($p > 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan *One-way* Anova dengan membandingkan kelompok dengan waktu penyembuhan luka bakar, kemudian dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc* dengan uji *Tukey* untuk menentukan konsentrasi mana yang memiliki efek yang sama atau berbeda satu sama lain. Jika datanya tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan analisis non parametrik *Kruskal-Wallis*.