

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi dalam penelitian ini adalah Emulgel ekstrak daun kedondong (*Spondias dulcis* Parkinson) dengan variasi basis HPMC. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah emulgel ekstrak daun kedondong (*Spondias dulcis* Parkinson) konsentrasi 7,5% dengan 3 variasi konsentrasi HPMC 2%, 3%, dan 4%.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kedondong (*Spondias dulcis* Parkinson) yang diperoleh dengan etanol 96% sebagai pelarut dan menggunakan metode maserasi.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah emulgel ekstrak etanol daun kedondong (*Spondias dulcis* Parkinson) dengan berbagai konsentrasi HPMC 2%, 3, dan 4%.

Proses pembuatan ekstrak, alat yang digunakan, luas luka bakar yang dibuat, kedalaman pencabutan bulu, umur, lingkungan tempat tinggal, kondisi fisik hewan uji termasuk berat badan, lingkungan tempat tinggal, dan lokasi penelitian yaitu laboratorium menjadi tiga variabel utama dalam penelitian ini.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat dikelompokkan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi HPMC sebesar 2%, 3%, 4%.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah mutu fisik sediaan pengaruh ekstrak etanol kedondong (*Spondias dulcis* Parkinson) emulgel yang baik, dan sebagai penyembuhan luka bakar derajat II pada punggung kelinci *New Zealand*.

Faktor yang dikendalikan adalah faktor yang mempengaruhi variabel dependen, sehingga kemampuannya harus diatasi agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulangi secara tepat oleh

ilmuwan yang berbeda. Proses pembuatan ekstrak kental menjadi variabel kontrol dalam penelitian ini. Peralatan yang digunakan, iklim, area konsumsi, kedalaman kerontokan bulu, kondisi hewan guinea pig, yang meliputi berat hewan, umur, ras dan iklim.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Daun kedondong adalah daun yang didapatkan dari tanaman kedondong dan berasal dari B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Penyembuhan luka bakar dimana keadaan kulit menjadi normal kembali setelah terbentuknya jaringan kulit baru yang dipengaruhi oleh kolagen.

Susunan fiksasi merupakan suatu organisasi yang secara gamblang menyatakan perbandingan berapa banyak zat terlarut terhadap zat terlarut. Kelarutan bisa kecil atau sangat besar, zat akan terdorong pada bagian bawah susunan dengan asumsi berapa banyak zat yang hancur melewati titik pencelupan. Susunan dapat mengandung lebih banyak zat terlarut dibandingkan dalam keadaan direndam dalam keadaan tertentu (Adha, 2015).

Dalam gel dan salep topikal, HPMC, juga dikenal sebagai *Hypromellose*, digunakan sebagai pengemulsi, suspender, dan penstabil. Hal ini dapat mencegah tetesan dan partikel menyatu atau menggumpal sebagai koloid pelindung, sehingga mencegah pembentukan sedimen (Rowe *et al.*, 2009).

Stabilitas sediaan adalah kemampuan sediaan untuk mempertahankan mutu fisik sediaan sebelum dan setelah melewati *cycling test* meliputi pengujian pH, pengujian viskositas, pengujian organoleptis, pengujian homogenitas, pengujian daya sebar, pengujian daya proteksi, dan pengujian daya lekat.

Pengujian kekuatan adalah pengujian yang berharga untuk menentukan keunggulan suatu produk sesuai dengan sifat dan kualitasnya sehingga tidak berubah dari yang dimilikinya ketika dibuat di dalam sejauh mungkin sepanjang kapasitas dan masa penggunaan.

## **C. Alat dan bahan**

### **1. Alat**

Alat yang digunakan antara lain adalah timbangan analitik, blender, ayakan dengan nomor mesh 40, botol maserasi, gunting, alat pencukur bulu, cawan porselin, oven, *rotary evaporator*, logam dengan diameter 2 cm, gelas beaker, isolasi tebal, korek api, lampu bunsen,

mortir, stemper, gelas ukur, pot emulgel, *viscometer cup and bob*, *object glass*, alat uji daya lekat, *stopwatch*, pH meter tipe F 72, dan *water bath*.

## 2. Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan sebagai berikut: Ekstrak daun kedondong, HPMC, etanol 96%, tween 80, span 80, paraffin cair, propilen glikol, propilparaben, metil paraben, kelinci *New Zealand*, *aquadest*.

### D. Formulasi ekstrak

**Tabel 1. Rancangan formula emulgel ekstrak daun kedondong (*Spondias dulcis* Parkinson)**

Bahan	F 1(%)	F 2(%)	F 3(%)	K-(F3) (%)
Ekstrak daun kedondong	7,5	7,5	7,5	-
HPMC	2	3	4	4
Parafin cair	5	5	5	5
Methyl paraben	0,18	0,18	0,18	0,18
Propyl paraben	0,02	0,02	0,02	0,02
Tween 80	1,08	1,08	1,08	1,08
Span 80	0,42	0,42	0,42	0,42
Propilen glicol	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
<i>Aquadest</i>	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Keterangan:

F1 : Emulgel dengan konsentrasi HPMC 2%

F2 : Emulgel dengan konsentrasi HPMC 3%

F3 : Emulgel dengan konsentrasi HPMC 4%

K- : Emulgel tanpa ekstrak (kontrol negatif)

### E. Jalannya Penelitian

#### 1. Pengumpulan bahan

Sampel daun kedondong segar diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu Karanganyar Jawa Tengah, daun utuh berwarna hijau muda dan aroma khas daun kedondong.

Pengumpulan daun kedondong diselesaikan dengan cara menyisihkan daun dari dahan pohon daun baru.

#### 2. Identifikasi simplisia tanaman daun kedondong

Dengan mencocokkan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis tumbuhan yang akan diteliti, identifikasi tumbuhan pada tahap ini dapat menunjukkan kebenaran tumbuhan daun kedondong dan mencegah kesalahan pada simplisia tumbuhan yang akan digunakan untuk tahap penelitian. Di B2P2TOOT Tawangmangu di Karanganyar, Jawa Tengah, tanaman diidentifikasi.

### 3. Pembuatan serbuk daun kedondong

Daun kedondong baru yang telah dikumpulkan kemudian ditata basah dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa tanah dan sisa sisa, kemudian memperkecil ukuran dengan cara dipotong menjadi lebih kecil, dioven hingga kering, selanjutnya dilakukan pembuatan serbuk dengan memasukan potongan daun kedalam blender. Lalu diayak dengan ayakan mesh 40, dilanjutkan dengan proses pembuatan ekstrak.

### 4. Pembuatan ekstrak daun kedondong

Dengan menggunakan etanol 96 persen sebagai pelarut, 800 gram bubuk daun kedondong dilarutkan hingga lapisan cairan filter menutupi permukaan atas sampel. Simplisia dimaserasi selama 6 jam sambil diaduk sesekali, kemudian disimpan di tempat yang terlindung dari sinar matahari, diulang berkali-kali. Rotary evaporator digunakan untuk menguapkan seluruh maserat yang diperoleh ke dalam satu wadah hingga menjadi kental.

### 5. Uji kandungan senyawa kimia

Bukti nyata adanya bahan sintesis sangat berharga untuk mewujudkan senyawa senyawa dalam daun kedondong terpisah.

**5.1 Identifikasi senyawa saponin.** Ekstrak daun kedondong dengan bobot 0,05 gram diletakkan dalam tabung reaksi. Menambahkan air panas dan kemudian dikocok. Positif saponin dapat dilihat dengan busa yang stabil selama 30menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2N (Amalia *et al.*, 2021).

**5.2 Identifikasi senyawa flavonoid.** Ekstrak daun kedondong dengan bobot 0,05 gram ditambahkan serbuk Mg sebanyak 0,2 gram, ditambahkan 5 tetes HCl 2N. Berwarna jingga atau merah jika hasil uji dinyatakan positif (Amalia *et al.*, 2021).

**5.3 Identifikasi senyawa tanin.** Ekstrak daun kedondong sebanyak 0,05 gram diseduh dengan air panas yang telah dididihkan selama 3 menit ditambahkan FeCl<sub>3</sub> 1% sebanyak 2 tetes. Berwarna biru tua/hijau kehitaman jika hasil ulji dinyatakan positif (Amalia *et al.*, 2021).

### 6. Pembuatan sediaan emulgel

Pembuatan emulgel dilakukan dengan persamaan yang tercatat pada tabel 1. Semua bahan pembuat emulgel ditimbang dengan susah payah terlebih dahulu,

**6.1. Pembuatan *Gelling Agent*.** HPMC yang merupakan *gelling agent* dikembangkan menggunakan mortir dengan cara memasukan sebagian *aquades* ke dalam mortir kemudian HPMC ditaburkan sedikit demi sedikit secara merata sampai menutupi seluruh permukaan *aquades*, dan tunggu hingga 15 menit sampai *gelling agent* mengembang, diaduk hingga homogen.

**6.2. Pembuatan Basis emulgel.** Mencampurkan span 80, propil paraben dan parafin cair dipanaskan diatas *water bath* (60°C-70°C) sebagai fase minyak sambil diaduk sampai tercampur rata. Mencampurkan tween 80, metil paraben, propilen glikol dengan sebagian air diatas *water bath* (60°C-70°C) sebagai fase air sambil diaduk sampai tercampur rata.

**6.3. Pembuatan Emulgel.** Memanaskan mortir dan stamper menggunakan air mendidih sampai panas, membuang air panas yang di dalam mortir, memasukkan fase air ke dalam mortir dan menambahkan fase minyak secara perlahan sambil diaduk. *Gelling agent* dicampur dengan metil paraben dan propil paraben yang sebelumnya dilarutkan dalam propilen glikol dicampurkan dengan fase minyak dan fase air diaduk hingga homogen kemudian tambahkan juga ekstrak daun kedondong, setelah homogen. Masukkan emulgel kedalam pot emulgel.

## **7. Uji mutu fisik sediaan emulgel**

**7.1. Uji organoleptis.** Pengujian organoleptis dilakukan dengan mengamati perubahan aroma, bentuk, konsistensi, dan warna. Pengujian dilakukan pengulangan 1 kali, pada hari pertamadan hari ke-21.

**7.2. Uji homogenitas.** Bagian atas, tengah, dan bawah sediaan emulgel digunakan untuk uji homogenitas. Setelah itu, emulgel yang telah diekstraksi diletakkan di atas kaca, digosok, dan diperiksa. Jika tidak ada pemisahan bagian-bagian penyusunnya, emulgel terbukti homogen. Tes diulang satu kali, langsung pada hari ke-21.

**7.3. Uji viskositas.** Dengan menggunakan viskometer, sediaan emulgel dituangkan ke dalam cangkir, dan viskositas diukur dengan melihat hasil yang menunjukkan bilangan konstan dalam satuan cP. Tes dilakukan pada hari utama setelah pembuatan emulgel, kemudian persepsi selesai pada hari ke 21.

**7.4. Uji daya lekat.** Setelah satu gram Emulgel ditimbang, sampel diletakkan pada benda kaca yang diketahui luasnya. Satu benda kaca lagi diletakkan di atas kesiapan, kemudian selama 5 menit dikenakan beban seberat 1 kg. Setelah itu, keluarkan muatannya dan

cari tahu berapa lama waktu yang dibutuhkan hingga pecahan kaca tersebut terpisah satu sama lain. Tes diulang satu kali, langsung pada hari ke-21.

**7.5. Uji daya sebar.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun kedondong ditimbang dan diletakkan pada alat uji daya sebar, selanjutnya ditutup menggunakan penutup yang berbahan dari kacang telah ditimbang, dan dilakukan pengukuran kemudian dicatat. Dilakukan kembali dengan menambah beban dengan kelipatan 50 gram dengan 3 kali replikasi dan diukur daya sebar. Replikasi dilakukan dengan pengulangan 1 kali, pada hari pertama dan hari ke-21.

**7.6. Uji stabilitas.** Pengujian kekuatan menggunakan metode cycling test, yaitu dengan menimbang 5 gram emulgel kemudian dimasukkan ke dalam pendingin dengan suhu 4°C selama 24 jam, dikeluarkan dan dimasukkan ke dalam pemanas dengan suhu 40°C selama 24 jam. 1 siklus dihitung jika sudah melewati 24 jam di dalam pendingin dengan suhu 4°C dan di dalam pemanas dengan suhu 40°C selama 24 jam. Enam siklus diulangi dan keadaan kesiapan dilihat apakah ada pembagian tahapan.

**7.7. Uji pH.** Dengan menggunakan pH meter, emulgel dilarutkan dalam air suling dengan perbandingan 1:9 untuk pengujian pH. Pengujian dilakukan pengulangan 1 kali, pada hari pertama dan hari ke-21.

**7.8. Uji tipe emulgel.** Pengujian tipe emulsi dilakukan dengan 3 metode yaitu pewarna, pengenceran, dan uji daya hantar listrik. Metode pewarnaan dilakukan dengan sedikit sediaan emulgel dimasukkan pada plat tetes dan ditambahkan pewarna *metilen blue* dan sudan III. Metode pengenceran dilakukan dengan sampel dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan air. Uji daya hantar listrik dilakukan dengan menggunakan *voltmeter*. Pengujian dilakukan pengulangan 1 kali pada hari pertama dan hari ke-21.

## **8. Pengelompokan hewan uji**

Lima ekor kelinci digunakan sebagai subjek uji, dan seperti terlihat pada gambar, setiap kelinci mendapat lima perlakuan berbeda pada punggungnya, masing-masing dengan lima lokasi luka bakar.

Keterangan :

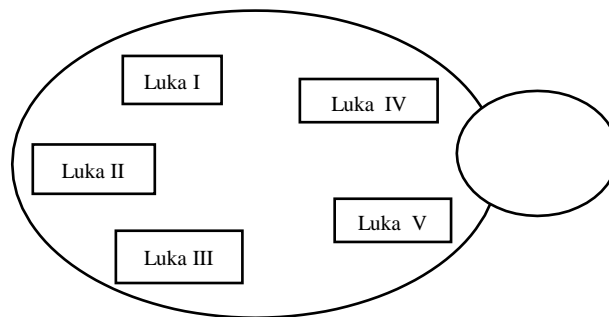
Luka I : Dioleskan emulgel formula I dengan konsentrasi HPMC3%

Luka II : Dioleskan emulgel formula II dengan konsentrasi HPMC5%

Luka III : Dioleskan emulgel formula III dengan konsentrasi HPMC5%

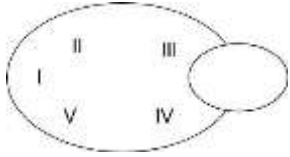
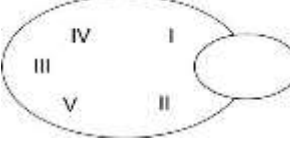
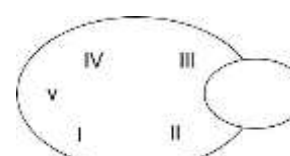
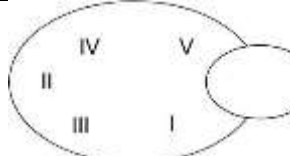
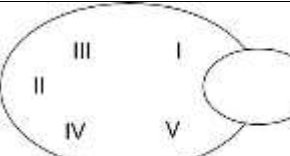
Luka IV : Dioleskan kontrol negatif (Formula 1 tanpa bahan aktif)

Luka V : Dioleskan kontrol positif (Bioplacenton)



**Gambar 10. Model lokasi pembuatan luka bakar pada kelinci**

**Tabel 2. Pemberian perlakuan luka bakar untuk setiap luka pada kelinci**

	<p>Luka I → Kelompok perlakuan I            Luka II → Kelompok perlakuan II            Luka III → Kelompok perlakuan III            Luka IV → Kelompok perlakuan IV            Luka V → kelompok perlakuan V</p>
	<p>Luka I → Kelompok perlakuan I            Luka II → Kelompok perlakuan II            Luka III → Kelompok perlakuan III            Luka IV → Kelompok perlakuan IV            Luka V → kelompok perlakuan V</p>
	<p>Luka I → Kelompok perlakuan I            Luka II → Kelompok perlakuan II            Luka III → Kelompok perlakuan III            Luka IV → Kelompok perlakuan IV            Luka V → kelompok perlakuan V</p>
	<p>Luka I → Kelompok perlakuan I            Luka II → Kelompok perlakuan II            Luka III → Kelompok perlakuan III            Luka IV → Kelompok perlakuan IV            Luka V → kelompok perlakuan V</p>
	<p>Luka I → Kelompok perlakuan I            Luka II → Kelompok perlakuan II            Luka III → Kelompok perlakuan III            Luka IV → Kelompok perlakuan IV            Luka V → kelompok perlakuan V</p>

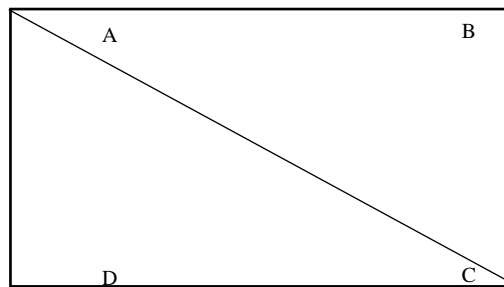
## 9. Perlakuan hewan uji penyembuhan luka bakar

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci dan dibagi menjadi 5 kelompok kelinci. 1 ekor kelinci putih dibagi pada setiap kelompok. Sebelum diberikan perlakuan, kelinci dibiarkan selama 2 hari untuk beradaptasi pada lingkungan tempat penelitian dan tetap diberikan makan

dan minum secukupnya. Pada hari ke- 3 sebelum dilakukannya perlakuan luka bakar, punggung kelinci digunting bulunya dan dicukur kira-kira dengan besar 2x2 cm kulit punggung terlihat. Sebelum dilakukan pemberian luka, diberikan obat penenang pada punggung kelinci dengan menggunakan lidokain 2%. Pelat logam berukuran 2x2 cm dipanaskan selama 5 menit dengan api biru untuk memberikan luka bakar. Plat logam tersebut kemudian ditempelkan pada punggung kelinci selama 5 detik hingga terbentuk luka bakar derajat II B yang ditandai dengan warna kemerahan dan terbentuknya bula (gelembung air) (Veterinaria *et al.*, 2011).

### 10. Pengukuran parameter penyembuhan luka

Dengan menggunakan penggaris, ukur diameter luka bakar pada hewan uji pada hari pertama. Pada hari ke-1 hingga ke-21, penilaian terhadap makhluk-makhluk ujian dilakukan secara konsisten, hingga luka bakar diumumkan telah diperbaiki. Persentase kesembuhan luka bakar pada hari pertama menjadi patokannya. Persepsi dilakukan satu kali sehari selama 21 hari pada pagi hari pertama. Sesuai penelitian yang dipimpin oleh (Moendajat, 2017), kerusakan jaringan kulit pada luka bakar dangkal yang parah, proses penyembuhannya dapat terjadi dengan cepat, umumnya membutuhkan waktu 7-21 hari (Haris *et al.*, 2022)



**Gambar 11. Pengukuran persentase penyembuhan luka bakar**

Keterangan:

dx1 : Pengukuran dilakukan secara horizontal (dari A ke D)

dx2 : Pengukuran dilakukan dari A ke C

dx3 : Pengukuran dilakukan secara vertical (dari B ke C)

Selama 21 hari, pengamatan luka dilakukan sehari sekali pada pagi hari. Luka dianggap sembuh bila diameternya mengecil menjadi nol sentimeter atau sudah menutup (Handayani *et al.*, 2016).



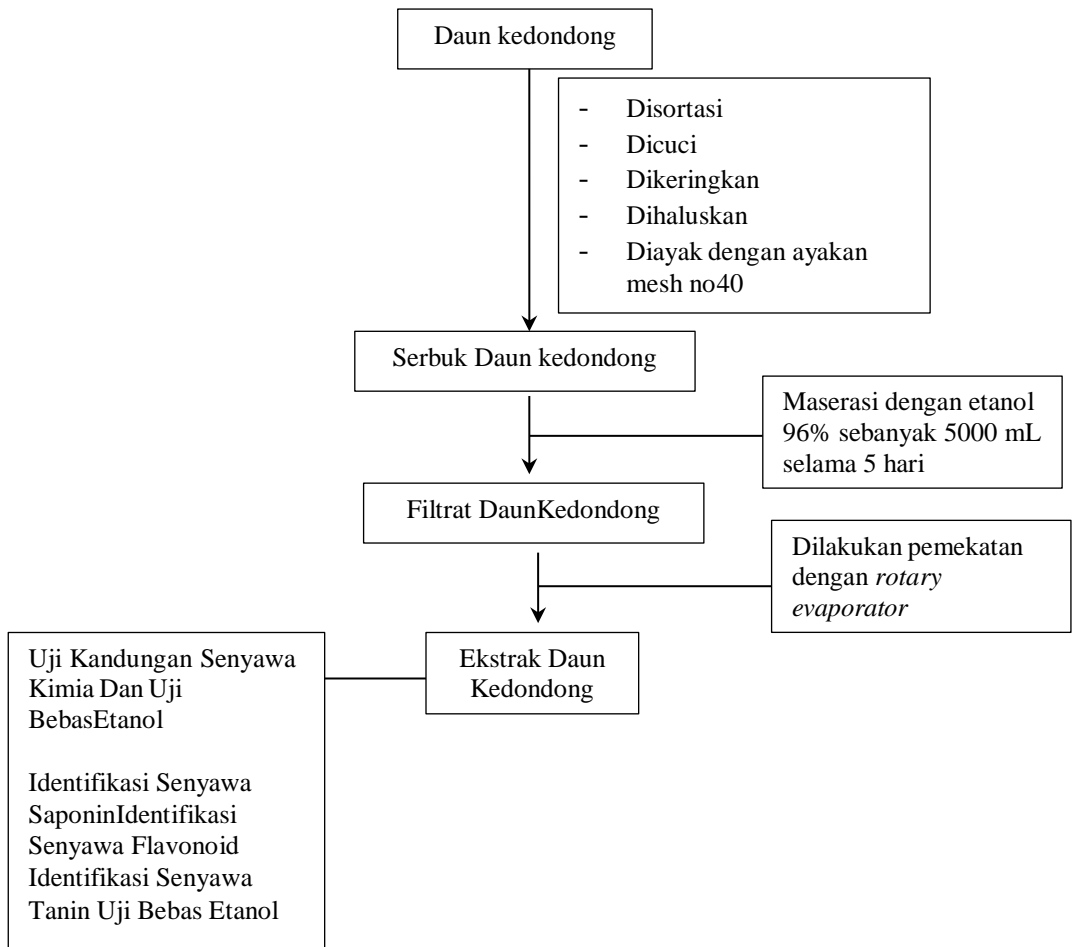
## F. Analisis Data

Dengan menganalisis data dan mengukur rata-rata diameter luka bakar, maka dapat ditentukan persentase penyembuhan luka. Rata-rata diameter luka bakar setiap pengulangan pengobatan diukur setiap hari sekali setelah pengobatan dengan dx (1,2,3). Jumlah obat ditentukan dengan menggunakan persamaan luas luka bakar rata-rata (cm) untuk setiap kelinci percobaan.

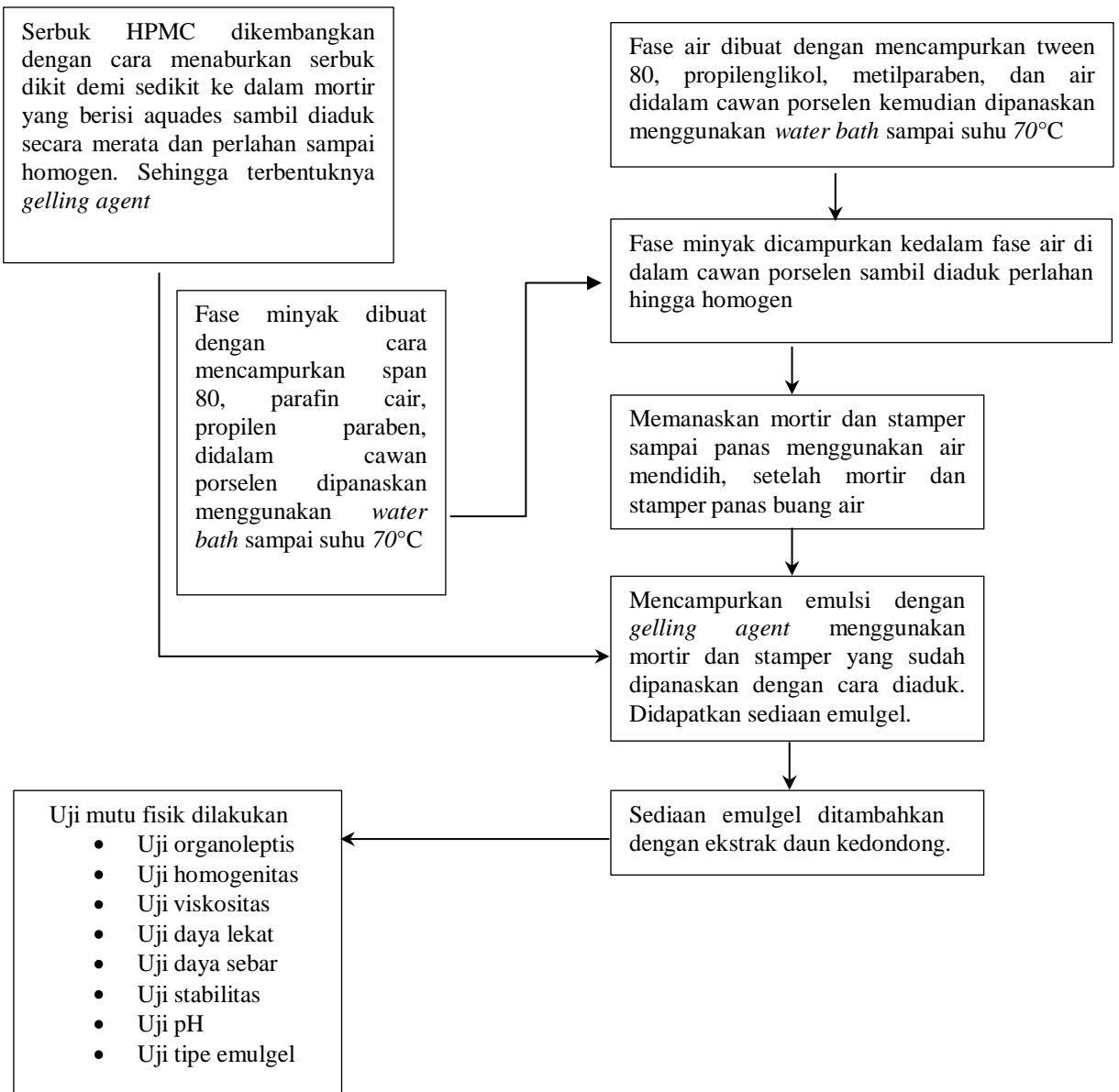
Metode *One Way Anova* kemudian digunakan untuk menganalisis data yang diperoleh secara statistik untuk menentukan apakah emulgel menghasilkan efek penyembuhan pada luka bakar. Nilai F hitung dan F tabel digunakan untuk melakukan penentuan ini. Apabila  $F \text{ hitung} < F \text{ tabel}$  maka emulgel daun kedondong setiap perlakuan berpengaruh nyata terhadap konsumsinya dan apabila  $F \text{ hitung} > F \text{ tabel}$  maka gel daun kedondong setiap perlakuan berpengaruh nyata terhadap kesembuhan konsumsinya. Karena hanya ada satu variabel bebas yang ingin diteliti yaitu persentase kesembuhan luka bakar, maka dipilih uji ANOVA satu arah.

Jika hasil uji Anova memiliki nilai probabilitas di bawah 0,05, maka terdapat perbedaan tingkat penyembuhan luka bakar setelah setiap perawatan.

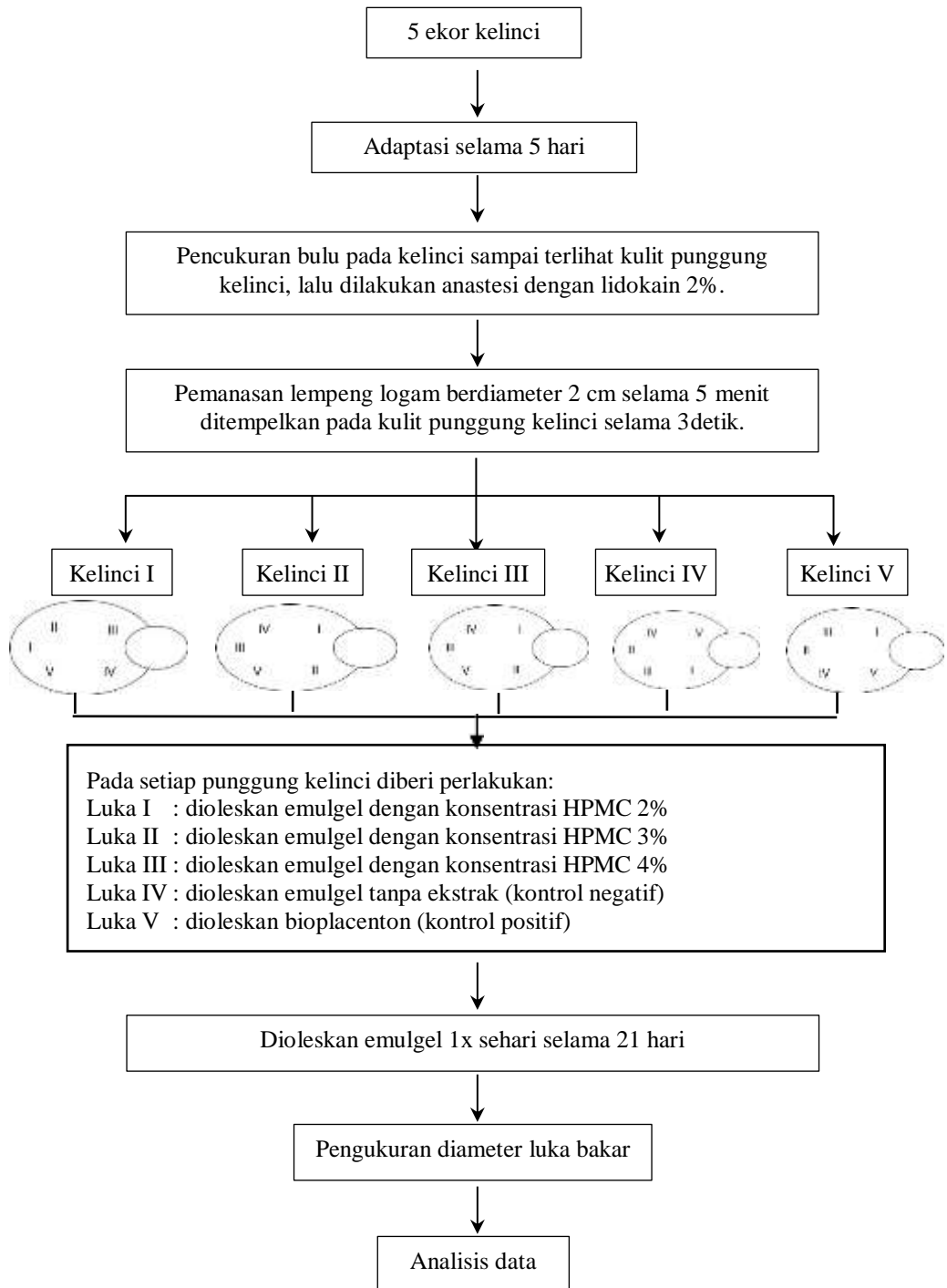
## G. Skema Penelitian



Gambar 12. Pembuatan ekstrak daun kedondong (*Spondias dulcis* Parkinson)



**Gambar 13. Pembuatan Sediaan Emulgel (*Spondias dulcis* Parkinson)**



**Gambar 14. Skema jalannya penelitian penyembuhan luka bakar pada kelinci**