

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan unit atau individu dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi dalam penelitian ini adalah daun pegagan yang berasal dari daerah Tawangmangu dipanen pada bulan ke tiga setelah penanaman.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun pegagan yang berasal dari daerah Tawangmangu dan diambil secara acak dengan memilih yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau dari pangkal daun sampai ujung daun, masih segar, dan bebas dari penyakit dipanen pada bulan ke tiga setelah penanaman.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica* Urb), diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96 %.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah ditentukan dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variable yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi basis.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian. Dalam penelitian ini variabel tergantung adalah aktivitas penyembuhan luka bakar yang dapat dilihat dari diameter penyusutan luka pada kelinci setelah diberikan ekstrak etanol daun pegagan dengan konsentrasi basis yang berbeda-beda dan mutu fisik sediaan salep.

Variabel terkendali adalah variabel yang berpengaruh pada variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah pembuatan ekstrak kental, peralatan yang akan digunakan, lingkungan, luas luka yang dibuat, kedalaman pencukuran bulu, kondisi fisik hewan yang akan uji, meliputi berat badan hewan, usia hewan, serta galur dari hewan tersebut, lingkungan tempat tinggal, dan laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, pegagan adalah tanaman yang diperoleh dari daerah Tawangmangu.

Kedua, serbuk daun pegagan adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan, penggilingan, dan pengayakan daun pegagan.

Ketiga, ekstrak etanol daun pegagan adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian daun pegagan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96 % yang kemudian dilakukan pemekatan ekstrak diatas *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Keempat, uji aktivitas luka bakar adalah kemampuan dari salep ekstrak etanol daun pegagan dalam menyembuhkan luka bakar yang diukur dari diameter luka bakar dan mengamati ada atau tidaknya inflamasi (rubor, tumor, calor, dolor).

Kelima, rubor (kemerahan) adalah hal yang paling pertama dilihat pada daerah yang mengalami peradangan, tumor (pembengkakan) campuran dari cairan dan sel yang tertimun didaerah peradangan, calor (panas) timbul disaat yang bersamaan dengan kemerahan dari reaksi peradangan, terjadi pada permukaan tubuh, dolor (rasa sakit) terjadi karena tekanan yang meninggi akibat dari pembengkakan.

Keenam, luka bakar derajat dua adalah luka bakar derajat 2 dangkal yang terjadi kerusakan sepertiga bagian dermis superfisial dengan ciri-ciri bula dan nyeri.

Ketujuh, salep adalah sediaan topikal yang dibuat dari campuran zat aktif dengan basis vaselin album, paraffin cair, dan nipasol yang berfungsi sebagai antimikroba pada sediaan salep.

Kedelapan, anti luka bakar adalah obat atau zat yang digunakan untuk mempercepat proses penyembuhan luka bakar.

Kesembilan, variasi konsentrasi basis efektif adalah variasi konsentrasi basis dengan persentase kesembuhan yang tidak berbeda bermakna terhadap kontrol positif dan memiliki persentase kesembuhan paling besar.

C. Alat dan Bahan

4. Alat

Alat – alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain blender, aluminium foil, perangkat ekstraksi, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, alat uji viskositas, alat uji pH, ayakan no 40, botol maserasi, corong pisah, gelas ukur, beker glass, cawan porselin, timbangan analitik, lempengan logam dengan diameter 2 cm, alat pencukur bulu, gunting, jangka sorong.

5. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun pegagan (*Centella asiatica* Urb), kelinci *New Zealand*, etanol 96%, etanol 70%, vaselin album, paraffin cair dan nipasol.

D. Formulasi Ekstrak Daun Pegagan

Formula standar dasar salep yang digunakan menurut Agoes (2008) adalah: minyak mineral 10%, vaselin album 90% dan dibuat dalam sediaan salep sebanyak 100 gram. Formulasi salep ekstrak daun pegagan yang digunakan pada penelitian ini memiliki 3 formula dengan konsentrasi basis salep yang berbeda-beda.

Tabel 1. Rancangan Formulasi Salep Ekstrak Pegagan

Bahan	Berat bahan (g)		
	F I	F II	F III
Ekstrak pegagan	25	25	25
Nipasol	0,01	0,01	0,01
Vaseline album	37,495	52,493	67,491
Parafin cair	37,495	29,996	7,499
Berat total	100	100	100

Keterangan:

Sediaan salep ekstrak etanol daun pegagan dibuat dalam 3 formula:

FI : mengandung basis salep hidrokarbon vaselin album dan parafin cair 50% : 50%

FII : mengandung basis salep hidrokarbon vaselin album dan parafin cair 80% : 30%

FIII : mengandung basis salep hidrokarbon vaselin album dan parafin cair 90% : 10%

E. Jalannya Penelitian

6. Pengambilan daun pegagan

Sampel daun pegagan (*Centella asiatica* Urb) segar, didapat dari kebun daerah Tawangmangu. Pengambilan pegagan dilakukan dengan memetik bagian yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau dari pangkal daun sampai ujung daun, masih segar, dan bebas dari penyakit.

7. Pengeringan daun pegagan

Daun pegagan yang telah diambil, dicuci kemudian dikeringkan dengan cara diletakan dibawah sinar matahari kemudian ditutup menggunakan kain bewarna hitam. Pengeringan daun pegagan dilakukan di Tawangmangu.

8. Pembuatan serbuk daun pegagan

Daun pegagan (*Centella asiatica* Urb) yang telah dikeringkan kemudian dilakukan penyerbukan dengan menggunakan alat penyerbuk mesh.40 yang berada di Universitas Setia Budi Surakarta. Hasil dari serbuk kering pegagan kemudian disimpan dalam plastik yang sudah disediakan sebagai wadah penyimpanan.

9. Analisis serbuk daun pegagan

Analisis serbuk daun pegagan dilakukan secara organoleptis. Analisis secara organoleptis meliputi bentuk, warna, dan bau dari serbuk pegagan yang diuji.

10. Pembuatan ekstrak daun pegagan

Serbuk daun pegagan sebanyak 600g diekstraksi menggunakan metode maserasi. Serbuk simplisia dilarutkan dengan larutan penyari etanol 96% sebanyak 4,5 liter dengan perbandingan 1 : 9, maserasi selama 3 hari dan diaduk setiap 6 jam sekali selanjutnya disaring. Filtrat 1 dipakai kembali untuk maserasi ke-2, kemudian hasil ekstraksi digabungkan. Hasil ekstraksi kemudian dipekatkan menggunakan alat evaporator pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental dengan bobot yang tetap. Timbang ekstrak kental pegagan (Kurnianto 2017).

11. Identifikasi ekstrak kental daun pegagan

Identifikasi ekstrak daun pegagan dilakukan secara organoleptis. Identifikasi dilakukan dengan melihat secara organoleptis meliputi bentuk, warna, dan bau dari serbuk pegagan yang diuji.

12. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak daun pegagan

7.1 Triterpenoid. Sebanyak 2 gram serbuk daun pegagan dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam dan disaring. Sebanyak 5 ml filtrat diuapkan hingga kering dan tambahkan dengan preaksi Liberman-Burchard yaitu 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat. Hasil positif terjadi perubahan warna merah (Lukman 2016).

7.2 Flavonoid. Sejumlah sampel tambahkan serbuk magnesium 0,1 mg dan 0,4 ml amil alkohol dan 4 ml alkohol campuran dikocok. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Nova 2016).

7.3 Saponin. Sejumlah sampel ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan dan dikocok kuat selama 10 detik, kemudian didiamkan selama 10 menit, terbentuk buih setinggi 1 hingga 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2 N buih tidak hilang (positif saponin) (Lukman 2016).

13. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun pegagan

Penetapan susut pengeringan dilakukan menggunakan alat *moisture balance* dengan suhu 105°C, timbang 2 gram, masukan kedalam alat dan ditunggu 4-5 menit sampai hasil keluar untuk setiap pengukuran. Hasil susut pengeringan yang baik tidak lebih dari 10%.

14. Penentuan konsentrasi basis salep ekstrak kental daun pegagan

Salep dibuat dalam tiga formula dengan konsentrasi variasi basis yang berbeda, penentuan konsentrasi variasi basis dilakukan dengan cara melakukan orientasi terlebih dahulu pada setiap konsentrasi basis salep sehingga didapatkan konsentrasi basis yang baik.

15. Pembuatan salep ekstrak daun pegagan

Pembuatan salep ekstrak daun pegagan dengan metode peleburan dimulai dengan pembuatan basis salep, ditimbang vaselin album dan parafin cair sesuai dengan dosis yang ada pada formula. Vaselin album dimasukan kedalam cawan porselin kemudian diletakan diatas *water bath* sampai meleleh tambahkan nipasol sampai meleleh. Pembuatan salep ekstrak pegagan dilakukan dengan cara leburan vaselin album dan nipasol dimasukan kedalam mortar yang sudah dipanaskan dan ditambahkan parafin cair aduk hingga homogen tambahkan ekstrak pegagan sedikit demi sedikit aduk hingga basis dan ekstrak tercampur homogen dan terbentuk massa salep, masukan dalam wadah yang sudah disediakan.

16. Uji mutu fisik sediaan salep

Uji mutu fisik sediaan salep meliputi, organoleptis, pH, viskositas, daya lekat, daya sebar dan uji homogenitas.

11.1 Uji Organoleptis. Mengamati sediaan salep meliputi bentuk, bau, dan warna sediaan (Arif 2016).

11.2 Uji pH. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter dengan cara 0,5 gram salep diencerkan ke dalam 5 ml aquadest, pH meter dicelupkan selama 1 menit, dilihat hasil angka pada pH meter menunjukkan pH salap. Replikasi sebanyak tiga kali (Arif 2016).

11.3 Uji viskositas. Sediaan salep sebanyak 100 gram, dimasukkan dalam cawan pengukur lalu diukur viskositasnya menggunakan alat *Rion Rotor Viskotester VT-04*. Viskositas dilihat pada skala dalam alat setelah tercapai kestabilan. Replikasi sebanyak tiga kali (Arif 2016).

11.4 Uji daya lekat. Uji daya lekat dilakukan dengan menimbang salep 0,5 gram di atas obyek glass kemudian letakan lagi obyek glass lain berfungsi untuk menutupi bagian atas, diletakkan beban dengan berat 1 kg di atasnya selama 5 menit. Dipasang obyek glass pada alat uji daya lekat salep dan dilepaskan beban seberat 80 gram dan dicatat waktunya hingga kedua obyek glass tersebut terlepas. Replikasi sebanyak tiga kali (Arif 2016).

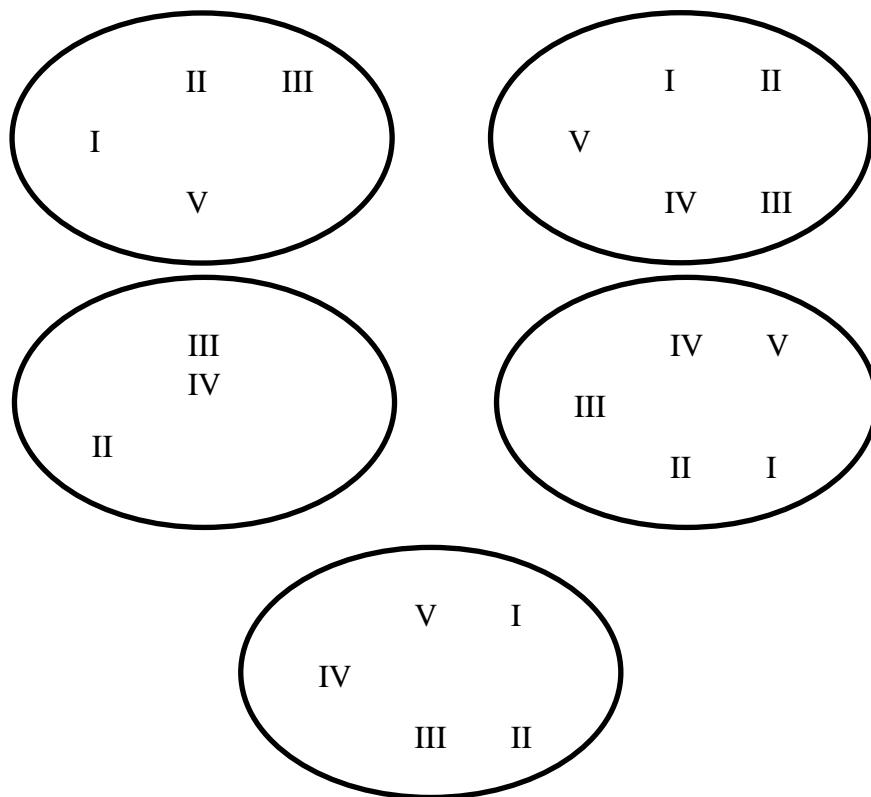
11.5 Uji daya sebar. Sediaan salep diuji secara langsung daya sebaranya menggunakan alat exstensometer. Sediaan salep ditimbang 0,5 gram, diletakkan pada pusat antara dua lempeng kaca *exstensometer*, dibiarkan selama 1 menit lalu diukur diameter salep yang menyebar. Selanjutnya diberi beban 50 g dan kembali diukur diameter penyebaran. Penyebaran diteruskan dan tetap ditambah beban sebanyak 50 g hingga mendapatkan penyebaran yang stabil dan dicatat diameter penyebarannya. Semakin luas diameter salep, maka salep semakin baik. Replikasi sebanyak tiga kali (Arif 2016).

11.6 Uji homogenitas. Sebanyak 50 mg sediaan dioleskan pada objek gelas yang bersih. Sediaan salep kemudian digosok dan diraba untuk mengetahui homogenitasnya. Replikasi sebanyak tiga kali (Putra 2014)

17. Pengelompokan hewan uji

Terdapat 5 kelompok perlakuan dengan 1 ekor kelinci untuk setiap kelompok perlakuan:

- a. Kelompok I : kontrol positif (dioleskan salep Mebo®)
- b. Kelompok II : dioleskan salep ekstrak daun pegagan F I
- c. Kelompok III : dioleskan salep ekstrak daun pegagan F II
- d. Kelompok IV : dioleskan salep ekstrak daun pegagan F III
- e. Kelompok V : kontrol negatif (dioleskan basis salep)



Gambar 1. Model lokasi pembuatan luka bakar pada kelinci

18. Perlakuan hewan uji

Sebanyak 5 kelinci putih, dilakukan randomisasi terlebih dahulu kemudian ditempatkan dalam kandang yang sudah disediakan menurut kelompok perlakuan. Kelinci diadaptasikan selama 7 hari dan pada hari ke-8 dilakukan perlakuan luka bakar. Kelinci diberi pakan standar dan minum secukupnya. Bulu disekitar punggung digunting kemudian dicukur dan diberikan alkohol 70% kemudian kelinci dianastesi menggunakan ethyl chloride 2-3 kali semprot.

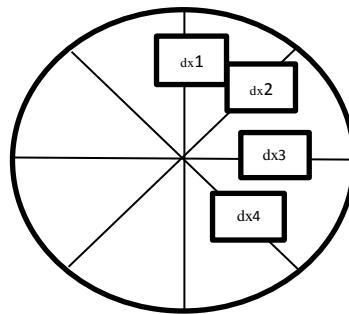
Luka bakar dibuat menggunakan lempeng logam berdiameter 2 cm yang dipanaskan selama 5 menit dengan suhu 90°C kemudian ditempelkan pada kulit punggung kelinci selama 5 detik sampai terbentuk luka bakar derajad II dangkal yang ditandai oleh terjadinya pelepuhan dan kulit terkelupas (Hasyim *et al* 2012). Setelah pembuatan luka bakar dilakukan pengukuran diameter pada luka bakar kemudian dioleskan salep, sediaan salep dioleskan 2 kali sehari pagi dan sore,

pada pagi hari dilakukan pengukuran diameter luka bakar serta melihat kemerahan pada punggung kelinci.

19. Pengukuran persentase penyembuhan luka bakar

Parameter yang diukur dalam penelitian ini ialah

14.1 Persentase penyembuhan luka bakar. Persentase penembuhan luka bakar berdasarkan diameter luka dimana setelah diberi perlakuan dengan mengoleskan salep ekstrak etanol daun pegagan 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 33 hari. Pengukuran persentase penyembuhan luka bakar luka bakar dilakukan dengan rumus sebagai berikut



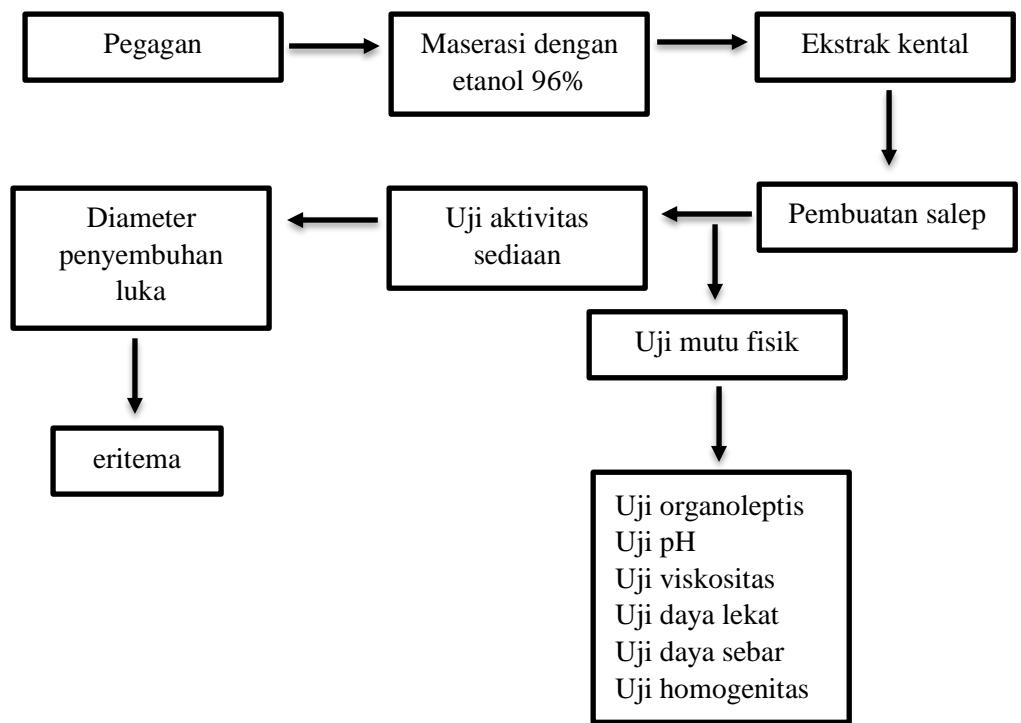
Gambar 2.Pengukuran persentase penyembuhan luka bakar (Arif 2016)

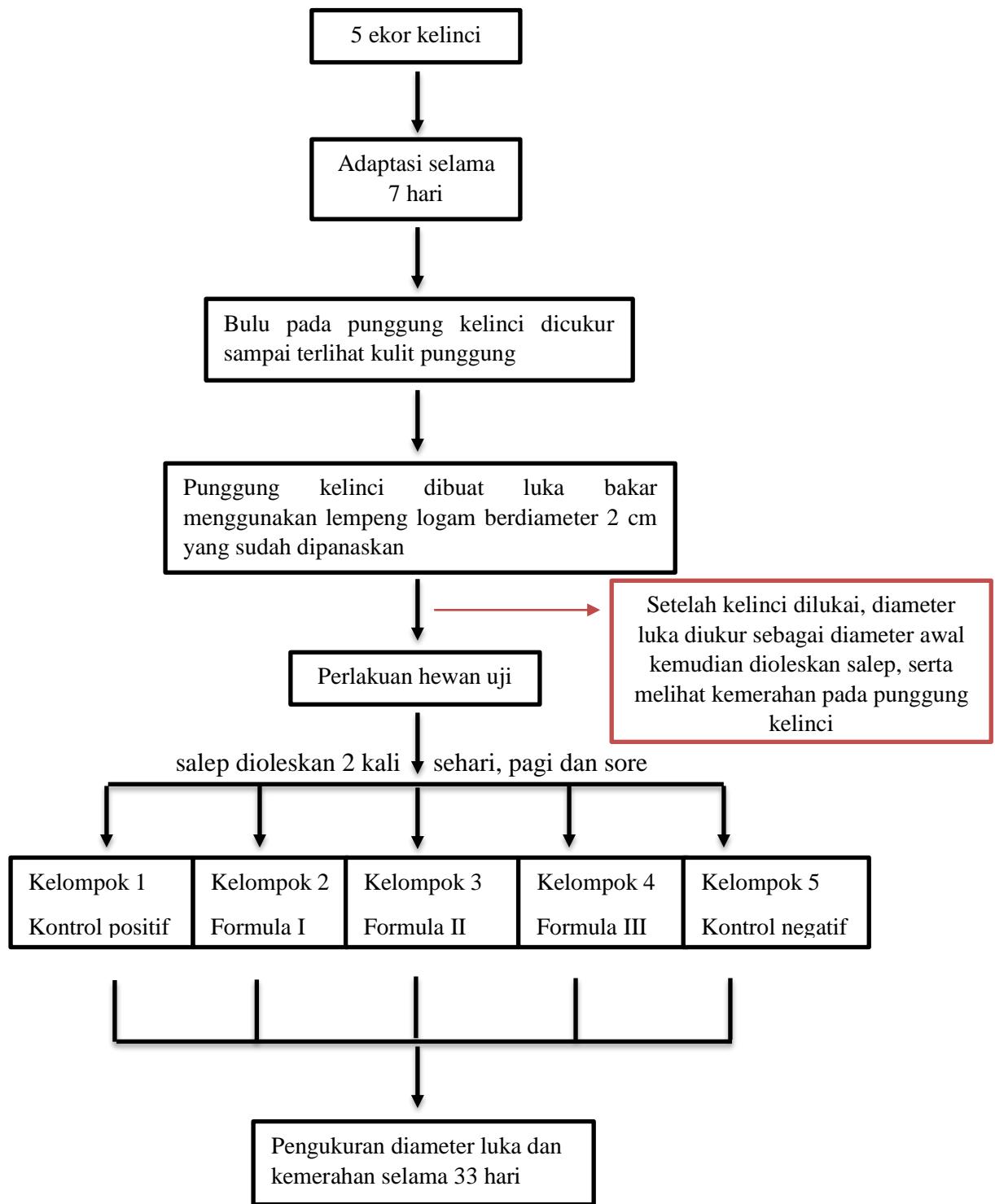
Keterangan:

- 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 135°

Keterangan:

- Ptn : persentasi penyembuhan luka pada hari ke-x
 dto : diameter luka bakar hari pertama
 dtn : diameter luka bakar hari ke-n

F. Diagram Alir**Gambar 3. Skema pembuatan sediaan salep**



Gambar 4. Skema uji anti luka bakar

G. Analisis Data

Data pengukuran persentase kesembuhan luka bakar pada kelinci. Analisis data menggunakan analisis statistik uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk memperoleh data normalitas dan uji *Levene* untuk melihat homogenitas. Jika data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan analisis statistik parametrik yaitu *two way ANOVA (Analysis of Variant)* dengan perbedaan signifikan $< 0,05$ atau 5% sebagai tingkat kepercayaan. Jika data yang diperoleh menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan analisis dengan *post hoc test* uji *Tukey*. Apabila data terdistribusi tidak normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan statistik non parametrik uji *kruskal wallis*.