

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 berbagai formulasi salep ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.).

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah salep ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) yang diformulasikan dalam tiga formula yaitu kombinasi basis vaselin putih dan parafin cair 50 : 50, 70 : 30, dan 90 : 10. Konsentrasi ekstrak etanol daun cocor bebek yang ditambahkan pada masing-masing formula adalah 5%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah salep ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) yang diformulasikan dengan variasi konsentrasi dari vaselin putih dan parafin cair sebagai basis salep.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja di ubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi basis salep vaselin putih dan parafin cair.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penilaian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kriteria dari sediaan salep dan aktivitas penyembuh luka bakar formula salep ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.).

Variabel terkendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil

yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah proses pembuatan ekstrak, proses pembuatan sediaan, peralatan yang digunakan, kondisi hewan uji, lingkungan tempat tinggal, proses pembuatan luka bakar, laboratorium, dan lingkungan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun cocor bebek adalah bagian dari tanaman cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) dan diambil dari tanaman cocor bebek yang ditanam di daerah Tawangmangu.

Kedua, serbuk daun cocor bebek adalah daun cocor bebek yang telah mengalami proses sortasi, pengeringan, dan pengecilan ukuran dengan mesin penyerbuk sehingga diperoleh serbuk daun cocor bebek kemudian diayak dengan ayakan mesh 40.

Ketiga, ekstrak kental daun cocor bebek adalah ekstrak dari hasil maserasi serbuk daun cocor bebek menggunakan etanol 96% selama lima hari setelah itu diremaserasi kembali, disaring, dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C sehingga diperoleh ekstrak pekat dan dibuat menjadi ekstrak kental menggunakan *water bath*.

Keempat, formulasi salep obat luka bakar ekstrak etanol daun cocor bebek adalah membuat beberapa formula salep dengan variasi campuran basis vaselin putih dan parafin cair kemudian ditambahkan ekstrak etanol daun cocor bebek dengan konsentrasi yang sama untuk setiap formula.

Kelima, sifat fisik salep adalah sifat-sifat dari salep ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) yang akan diuji meliputi organoleptis, homogenitas, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan pengujian pH.

Keenam, Uji aktivitas penyembuhan luka bakar salep ekstrak etanol adalah pengujian salep ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) yang telah dibuat pada kelinci yang diinduksi luka bakar kemudian diukur diameter penyusutan luka.

Ketujuh, luka bakar adalah luka yang disebabkan oleh panas, arus listrik, bahan kimia, dan petir yang mengenai kulit, mukosa dan jaringan yang lebih dalam.

C. Alat Dan Bahan

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cocor bebek (*Kalancoe pinnata*) yang masih segar, yang diperoleh dari daerah Tawangmangu. Bahan lain yang digunakan adalah etanol 96% sebagai larutan penyari untuk pembuatan ekstrak dan salep Mebo[®] sebagai kontrol positif, dan Vaseline putih dan Paraffin cair sebagai basis salep sekaligus kontrol negatif dengan pengawet nipasol. Bahan-bahan yang digunakan untuk identifikasi kandungan kimia antara lain serbuk magnesium, asam hidroklorida pekat, amil alkohol, KOH, dan FeCl₃.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain oven *Memmert Universal Oven UN110*, alat penyerbuk, botol maserasi, penangas uap *Memmert Basic Water Bath Wnb*, rotary evaporator *Heidolph[®]*, dan *Moisture Balance Memmert*. Alat lain yang digunakan antara lain tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, cawan penguap, stamper & mortir, viskometer *Rion Viscometer VTO6*, alat pengukur daya sebar, alat pengukur daya lekat, timbangan gram *OHAUS[®]*, logam diameter 1,5 cm, gunting, dan wadah salep.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan bahan

Daun cocor bebek (*Kalancoe pinnata* Pers.) diambil dari daerah Tawangmangu kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Pengambilan dilakukan dengan cara memetik daun yang masih segar.

2. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman cocor bebek (*Kalancoe pinnata* Pers.) dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Setia Budi, Surakarta. Determinasi tanaman ini dilakukan dengan tujuan mendapatkan informasi tentang kebenaran tanaman yang akan digunakan. Determinasi dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi tanaman dengan kunci determinasi hingga diperoleh kategori spesies.

3. Pembuatan simplisia daun cocor bebek

Daun cocor bebek yang telah dikumpulkan kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan bahan asing lainnya kemudian dicuci. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan debu yang melekat pada bahan simplisia dan menggunakan air bersih dan mengalir. Pengeringan daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) dilakukan dengan cara dioven pada suhu 50°C.

4. Pembuatan serbuk daun cocor bebek

Daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) yang telah dikeringkan kemudian dibuat serbuk menggunakan mesin penyerbuk. Pembuatan serbuk dilakukan di Universitas Setia Budi. Serbuk daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) yang sudah jadi kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 40 dan disimpan dalam kantong berbahan plastik sehingga terlindung dari kelembaban.

5. Pengukuran kadar kelembaban

Pengukuran kadar kelembaban serbuk daun cocor bebek menggunakan alat *Moisture Balance*. Penetapan kadar kelembaban dilakukan dengan cara menimbang 2 gram serbuk dalam wadah alumunium yang telah ditara kemudian diukur kadar kelembabannya pada suhu 105° C hingga alat dengan sendirinya berbunyi dan muncul % MC pada *display*, maka didapat persen kadar kelembaban.

6. Pembuatan ekstrak etanol daun cocor bebek

Daun cocor bebek yang telah diserbuk dan diayak, ditimbang dan dimasukkan ke dalam bejana maserasi, ditambah dengan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 10, kemudian ditutup, dibiarkan selama 5 hari di tempat yang sejuk dan terlindung dari cahaya sambil sesekali gojog. Selanjutnya disaring, ampas diekstraksi kembali hingga terekstraksi sempurna. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C dan diuapkan menggunakan *water bath* hingga diperoleh ekstrak kental.

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun cocor bebek

7.1 Flavonoid. Sebanyak 500 mg ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) dilarutkan ke dalam 5 ml air kemudian dipanaskan selama 5 menit setelah itu disaring. Filtrat ditambahkan serbuk magnesium serta

HCl: etanol (1:1) dan amil alkohol. Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk warna jingga hingga merah ungu (Sumiati dkk 2017).

7.2 Saponin. Sebanyak 500 mg ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) ditambahkan 5 ml akuades dalam tabung reaksi kemudian dikocok kuat-kuat, adanya saponin ditandai terbentuk busa yang stabil (Sumiati dkk 2017).

7.3 Tanin. Sebanyak 500 mg ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) direbus dengan 10 ml akuades dalam tabung reaksi selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian ditetesi FeCl_3 1%. Uji positif ditandai dengan munculnya warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman (Sumiati dkk 2017).

8. Uji bebas alkohol ekstrak etanol daun cocor bebek

Uji bebas alkohol dilakukan untuk mengetahui keberadaan alkohol pada ekstrak kental yang telah dibuat. Pengujian ini dilakukan dengan cara ekstrak etanol daun cocor bebek dimasukan ke dalam tabung reaksi, tambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol jika tidak ada bau ester pada hasil uji.

9. Formulasi salep ekstrak etanol daun cocor bebek

Tabel 1. Formula salep

Bahan	Formula		
	Formula I (g)	Formula II (g)	Formula III (g)
Ekstrak daun cocor bebek	5	5	5
Nipasol	0,01	0,01	0,01
Vaselin Putih	50	70	90
Paraffin cair	50	30	10
Bobot toal	100	100	100

Pembuatan salep ekstrak etanol daun cocor bebek dilakukan dengan metode peleburan. Semua bahan ditimbang sesuai formula kemudian mortir dan stamper dihangatkan menggunakan air panas. Vaselin putih dan parafin cair serta nipasol dilelehkan di atas *water bath* pada suhu 85°C hingga meleleh sempurna. Basis dituang ke dalam mortir hangat kemudian campur hingga homogen dan dibiarkan hingga dingin. Ekstrak kental daun cocor bebek dimasukan ke dalam basis salep dan diaduk hingga homogen. Salep kemudian dimasukan dalam wadah salep (Widyantoro dan Sugihartini 2015).

10. Pengujian sifat fisik salep ekstrak etanol daun cocor bebek

10.1 Uji Organoleptis. Uji organoleptis meliputi pemeriksaan bentuk, warna, dan bau.

10.2 Uji Homogenitas. Uji homogenitas fisik dilakukan dengan cara sejumlah salep yang akan diamati dioleskan pada kaca objek yang bersih dan kering sehingga membentuk suatu lapisan tipis kemudian diamati. Salep dinyatakan homogen apabila pada pengamatan salep mempunyai tekstur yang tampak rata dan tidak menggumpal.

10.3 Uji viskositas. Uji viskositas salep dilakukan menggunakan alat *Rion Rotor* Viskotester VT-04. Cup diisi dengan sampel salep yang akan diuji setelah itu rotor ditempatkan tepat berada di tengah-tengah cup yang telah diisi sampel salep, kemudian alat dihidupkan. Nilai viskositas dibaca pada skala dari rotor yang digunakan. Pengujian viskositas diulangi sebanyak tiga kali untuk setiap formula.

10.4 Uji daya lekat. Uji ini dilakukan dengan alat-alat seperti alat penguji daya lekat, dua objek gelas, *stopwatch*, dan anak timbangan gram. Pengujian dilakukan dengan cara melekatkan salep secukupnya di atas objek gelas kemudian ditutup dengan objek gelas lain. Kedua objek gelas ditekan dengan beban 1000 gram selama 5 menit. Setelah 5 menit beban diangkat kemudian dicatat waktu saat kedua objek gelas tersebut lepas (Rahmawati *et al* 2010).

10.5 Uji daya sebar. Sebanyak 500 mg salep dan diletakan di atas kaca bulat yang berdiameter 15 cm, kemudian kaca lainnya yang telah ditimbang terlebih dahulu diletakan di atasnya dan dibiarkan selama 5 menit. Diameter sebar salep diukur dari empat sisi. Setelahnya, beban 50 gram kemudian 100 gram ditambahkan dan masing-masing didiamkan selama 5 menit lalu diukur diameter dari empat sisi (Astuti *et al* 2010).

10.6 Uji pH. Uji derajat keasaman dilakukan dengan menggunakan pH meter yang sebelumnya telah dikalibrasi pada pH 4 dan pH 7. Sampel sebanyak 1 gram salep ditimbang dan dilarutkan dengan 10 ml aquades, lalu ujung dari alat pH meter dicelupkan pada salep yang telah dilarutkan dan nilai pH akan tertera pada pH meter secara digital (Suryani 2015).

11. Perlakuan hewan uji

Jumlah kelinci yang digunakan adalah 5 ekor diadaptasikan selama 7 hari dan pembuatan luka bakar dilakukan pada hari ke-8. Hewan uji tetap diberi makan dan minum secukupnya.

Bulu di sekitar daerah punggung dicukur kemudian dianestesi menggunakan etil klorida dengan cara disemprotkan pada kulit yang akan dibuat luka bakar. Pembuatan luka bakar menggunakan lempeng logam berdiameter 1,5 cm yang dipanaskan selama 5 menit kemudian ditempelkan pada punggung kelinci selama 5 detik sampai terjadi pelepuhan. Luka yang dihasilkan dianggap berbentuk lingkaran.

12. Uji Aktivitas salep salep ekstrak etanol daun cocor bebek

Salep yang telah dibuat dioleskan tipis setiap hari sebanyak dua kali per hari pada punggung kelinci dan setiap kelinci mendapat perlakuan yang sama.

Luka I : dioleskan kontrol positif salep Mebo[®]

Luka II : dioleskan salep ekstrak etanol daun cocor bebek formula I

Luka III : dioleskan salep ekstrak etanol daun cocor bebek formula II

Luka IV : dioleskan salep ekstrak etanol daun cocor bebek formula III

Luka V : dioleskan kontrol negatif basis salep

13. Pengamatan hasil

Persentase penyembuhan luka bakar dihitung dengan mengukur diameter luka bakar setelah luka dioleskan sediaan salep yang telah diformulasi dan sediaan kontrol positif dan kontrol negatif sebanyak dua kali sehari sampai selama 30 hari. Diameter luka bakar dari hewan uji diukur dimulai pada hari ke-1 setelah pembuatan luka bakar dengan menggunakan penggaris dan dinyatakan sebagai dx_0 . Pengukuran dilakukan setiap hari pada masing-masing hewan uji, sampai hari ke 30. Perhitungan diameter rata-rata dapat dilakukan dengan menggunakan rumus:

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

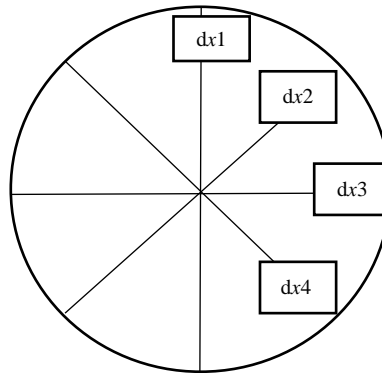
Keterangan:

dx_1 : Pengukuran diameter luka bakar dari sudut 0°

dx_2 : Pengukuran diameter luka bakar dari sudut 45°

dx_3 : Pengukuran diameter luka bakar dari sudut 90°

dx_4 : Pengukuran diameter luka bakar dari sudut 135°



Gambar 9. Pengukuran diameter luka bakar

Perhitungan persentase penyusutan luka bakar dihitung dengan rumus:

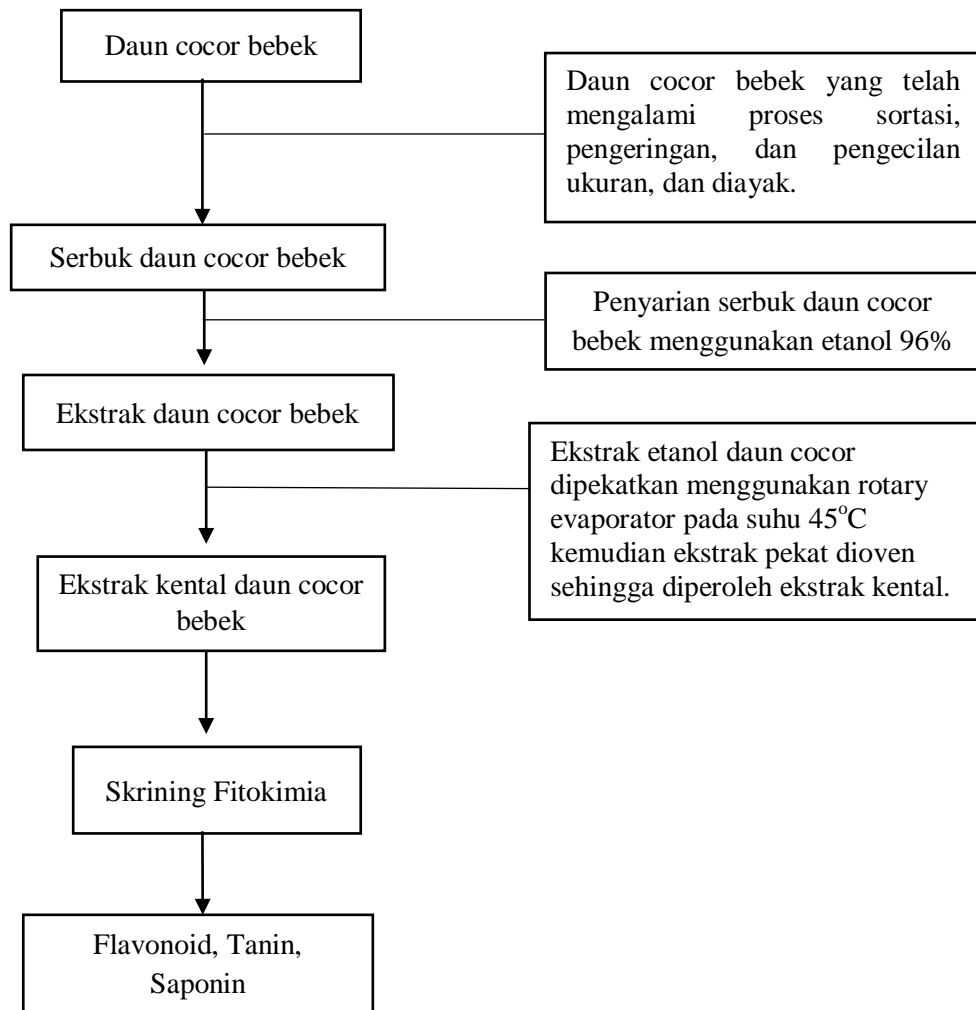
$$Pt_n = \frac{(dt_0)^2 - (dt_n)^2}{(dt_0)^2}$$

Keterangan:

- Pt_n : Persentasi penyembuhan luka pada hari ke n
- dt_0 : Diameter luka bakar hari pertama
- dt_n : Diameter luka bakar hari ke – n

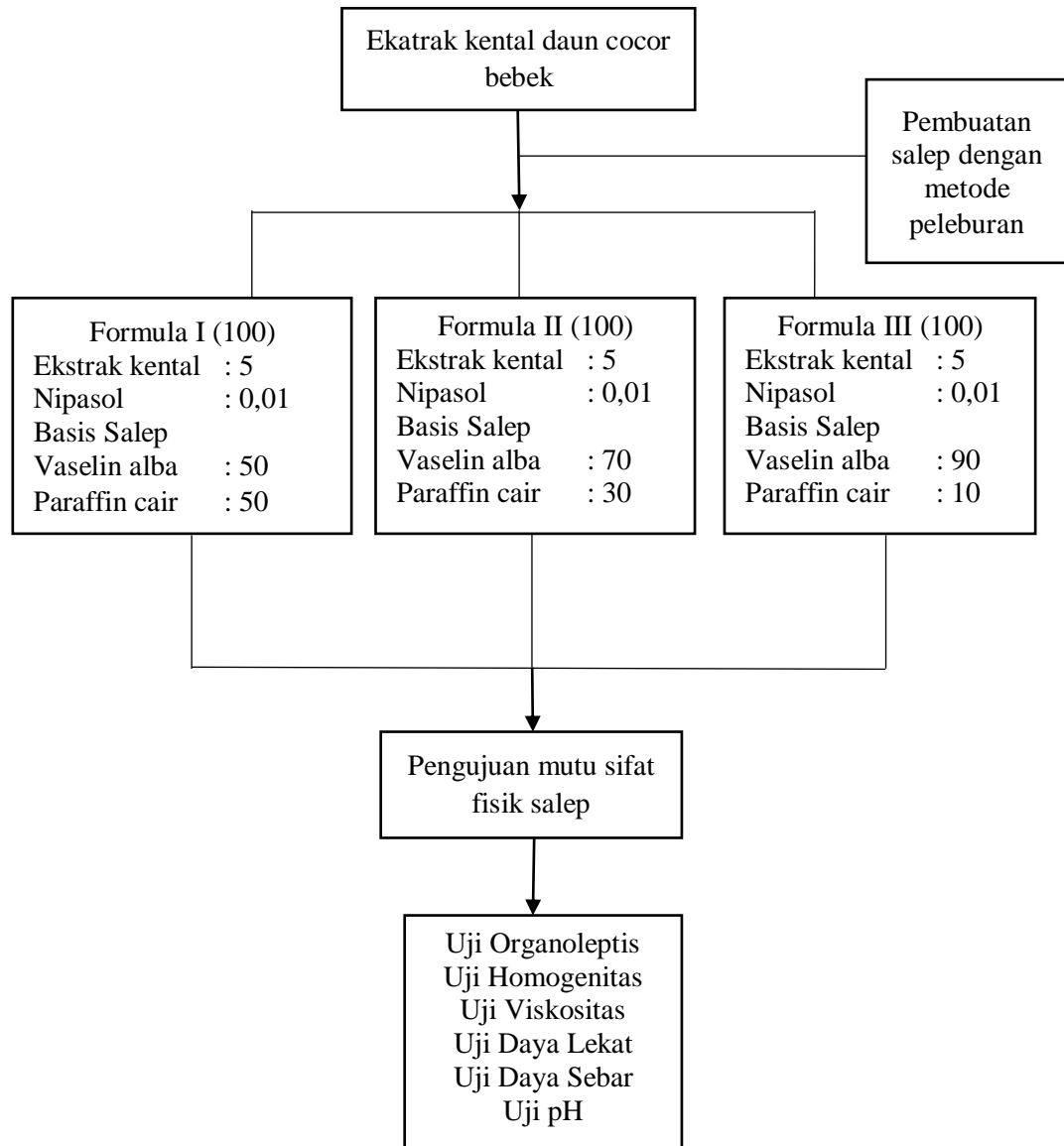
E. Alur Penelitian

1. Pembuatan ekstrak etanol daun cocor bebek



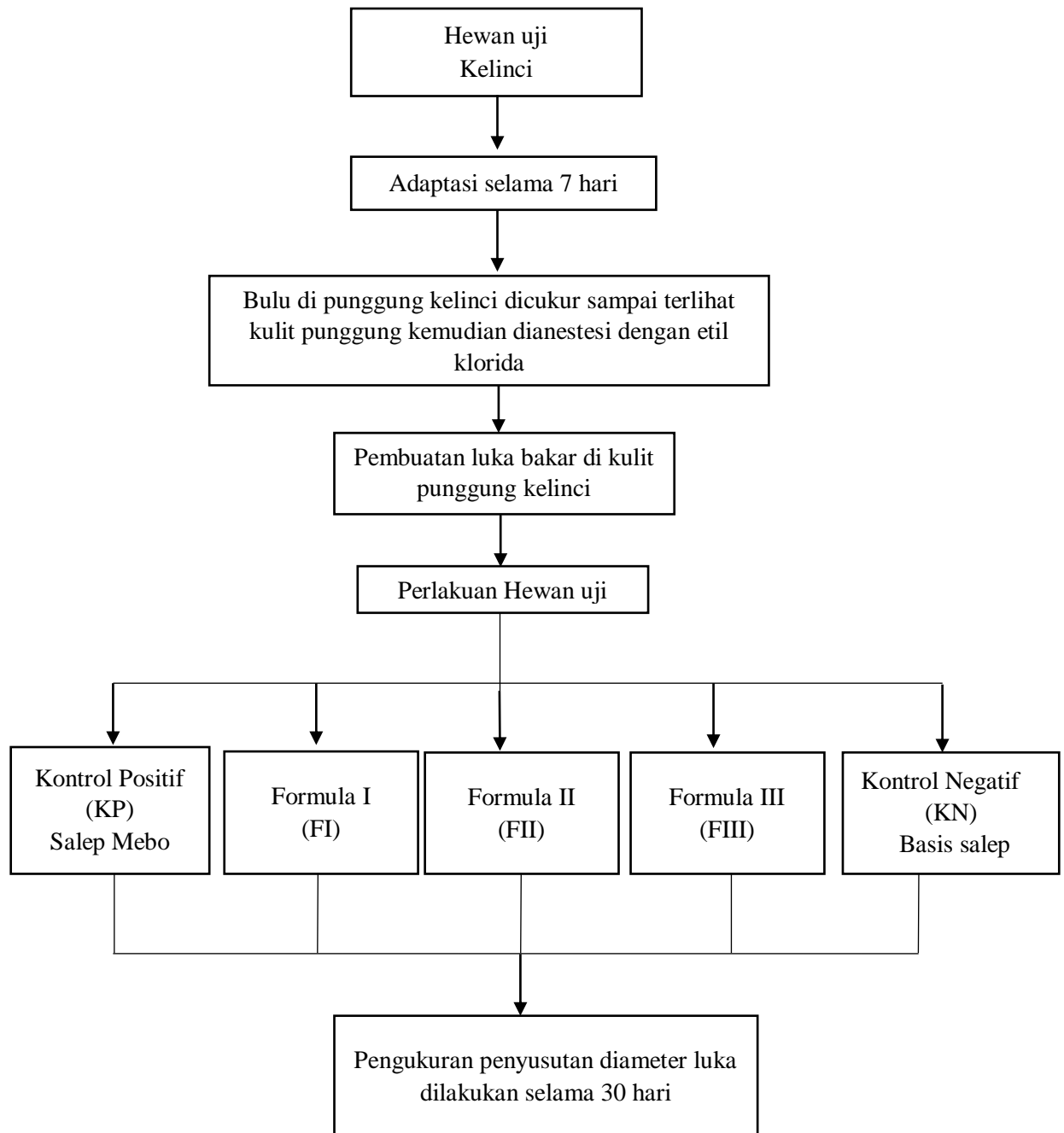
Gambar 10. Proses pembuatan ekstrak dan skrining fitokimia.

2. Formulasi salep ekstrak etanol daun cocor bebek

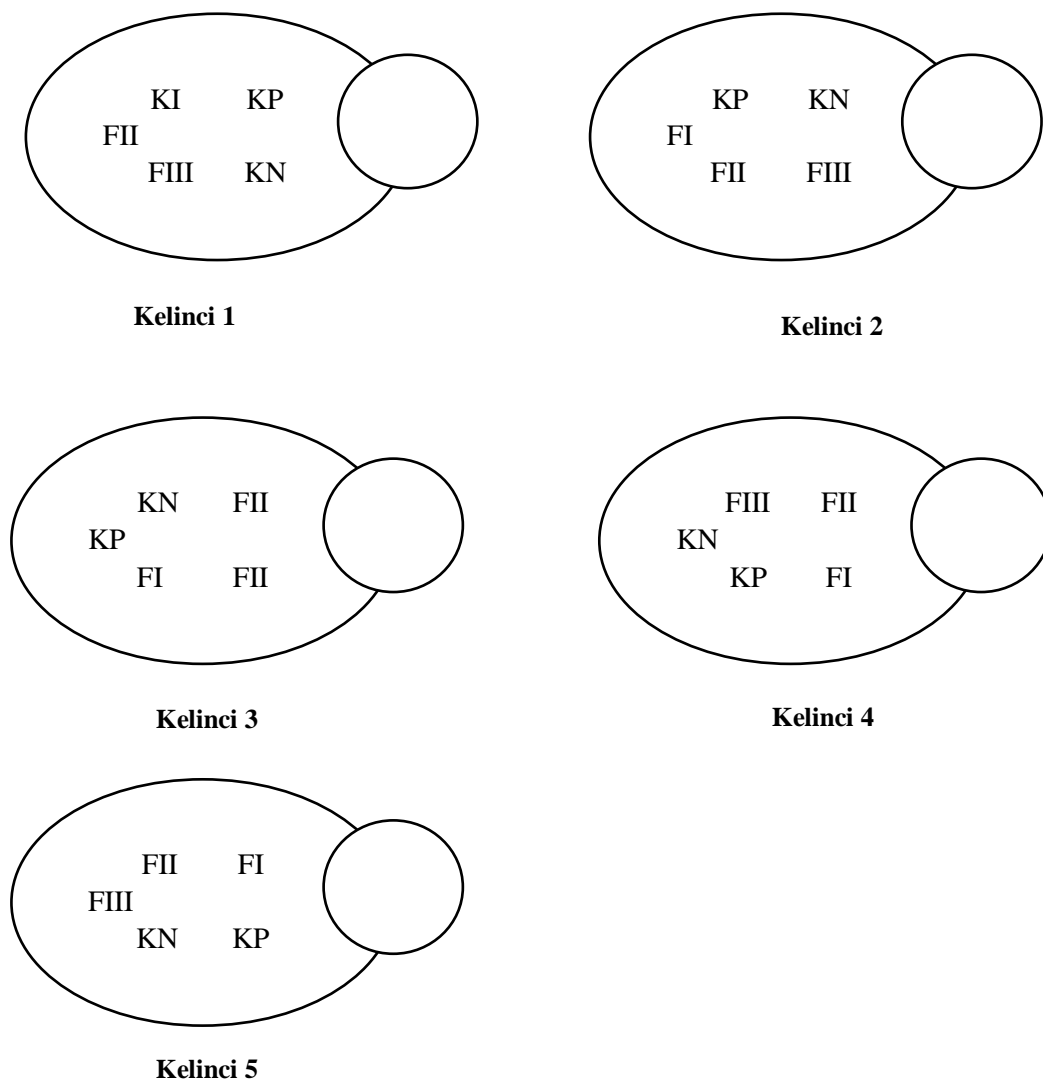


Gambar 11. Proses formulasi salep dan uji mutu fisik.

3. Pengujian aktivitas salep ekstrak etanol daun cocor bebek



Gambar 12. Proses pengujian salep.



Gambar 13. Posisi luka bakar pada kelinci.

F. Analisis Data

Data persentase penyusutan diameter luka bakar dianalisis menggunakan SPSS 21 *for windows* dengan uji *Kolmogorov-Sminorv* untuk melihat normalitasnya dan uji *Levene* untuk melihat homogenitasnya. Apabila diperoleh data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan metode analisis *Two Way ANOVA (Analysis of Varian)* dengan *Post hoc tukey* dengan tingkat signifikansi 5% atau 0,05.