

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium murni.

2. Perlakuan

Perlakuan yang diberikan sebanyak 5 perlakuan dengan jumlah tikus yang digunakan minimal sebanyak 25 tikus yang masing-masing tikus dibuat luka sayatan pada punggung dengan panjang luka yang dibuat 2 cm (Zuhdan & Nugroho, 2014).

Pembagian perlakuan sebagai berikut:

Perlakuan A : Luka diberi basis salep (kontrol negatif)

Perlakuan B : Luka diberi Povidone Iodine Salep (kontrol positif)

Perlakuan C : Luka diberi salep ekstrak daun Kitolod 5%
b/b

Perlakuan D : Luka diberi salep ekstrak daun Kitolod 10%
b/b

Perlakuan E : Luka diberi salep ekstrak daun Kitolod 20%
b/b

Pengamatan dilakukan selama 14 hari dengan Indikator yang diamati berupa panjang luka (Zuhdan & Nugroho, 2014).

B. Lokasi Penelitian, Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

- a) Penelitian ini akan dilaksanakan di laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- b) Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi Universitas Diponegoro Semarang.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan September – November 2019.

C. Populasi Dan Sampel

Kriteria Inklusi dalam penelitian ini adalah jenis tikus pada penelitian ini adalah tikus putih dari galur wistar, berat badan tikus merupakan berat badan rata-rata dari tikus yang akan digunakan dalam penelitian yaitu berat badan rata-rata adalah 200-300 gram, umur tikus merupakan umur rata-rata dari tikus yang akan digunakan dalam penelitian yaitu tikus berumur rata-rata 2-3 bulan, jenis kelamin tikus adalah jantan.

Kriteria Eksklusi dalam penelitian ini adalah tikus dengan kondisi sakit, tikus dengan kelainan anatomis, tikus dengan kondisi terserang penyakit berbahaya dan menular, dan tikus dengan gangguan pembekuan darah.

Besarnya sampel dihitung berdasarkan rumus federer (Mahmudah, 2013), yaitu:

$$(T - 1) (n - 1) \geq 15$$

Keterangan T = Jumlah perlakuan n = Jumlah sampel

Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan, sehingga sampel yang dibutuhkan yaitu :

$$(T - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$4 (n - 1) \geq 15$$

$$n - 1 \geq 15/4$$

$$n - 1 \geq 3.75$$

$$n \geq 4.75 \text{ Dibulatkan menjadi } 5$$

Berdasarkan perhitungan tersebut sampel yang digunakan tiap perlakuan adalah minimal 6 ekor, sehingga jumlah keseluruhan sampel sebanyak 30 ekor tikus.

D. Variable penelitian

1. Variabel bebas

Sesuai dengan tujuan penelitian yang akan dicapai, maka variabel yang akan dipelajari dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi (5% b/b, 10% b/b, dan 20% b/b) ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl) terhadap penyembuhan luka sayat pada tikus.

2. Variabel terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi, akibat dari adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah penyembuhan luka sayat pada tikus dengan indikator panjang penyembuhan luka sayat.

3. Variabel kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah jenis kelamin, umur, jenis pakan dan pembuatan luka.

E. Prosedur Penelitian

1. Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah alat gelas, erlenmeer, batang pengauk, blender, mortir dan stemper, sudip, waterbath, cawan porselen, kapas, kain flannel, kater (silet), pencukur bulu, kandang, penggaris, timbangan digital, rotary evaporator, wadah salep, cuttonbud, pinset, dan sarung tangan

Bahan yang digunakan untuk membuat salep dari ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl) adalah ekstrak etanol daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl), etanol 70%, adeps lanae, vaselin album, povidone iodine topikal, tikus, butanol, asam asetat, kloroform, methanol, air.

2. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi Universitas Diponegoro Semarang untuk mengetahui kebenaran

dari daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl) dengan tujuan untuk menghindari kasalahan pengumpulan bahan utama penelitian.

3. Penyiapan bahan

Daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl) yang telah dikumpulkan dicuci dengan air mengalir sampai bersih, kemudian ditiriskan, lalu dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari secara tidak langsung dengan menutup dengan kain hitam. Daun yang sudah kering kemudian diblender sampai halus. Pada penelitian ini dilakukan pengayakan serbuk simplisia daun kitolod dengan menggunakan mesh nomor 40 (Maulida dan Guntarti, 2015).

4. Ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl)

Ekstrak daun kitolod dibuat dengan menyari simplisia sebanyak kurang lebih 1000 gram dimaserasi dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1 : 7.5 atau sekitar 7500 ml digunakan untuk maserasi 3x24 jam, sesekali rendaman diaduk. Kemudian ekstrak yang didapat disaring menggunakan kain flanel, ampas hasil maserasi yang pertama kemudian diremaserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1 : 2.5 atau sekitar 2500 ml selama 1x24 jam dan sesekali diaduk, ekstrak yang didapat disaring dengan kain flanel. Kemudian maserat I dan maserat II digabungkan untuk diuapkan di rotary

evaporator pada suhu kurang dari 70°C. Kemudian ekstrak dipanaskan diatas water batchehingga diperoleh ekstrak kental daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl). Kemudian randemen ekstrak dihitung dengan rumus:

$$Rendemen = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$$

5. Penapisan kimia ekstrak daun Kitolod

a) Uji flavonoid

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi etanol 96%, HCl 2N serta HCl pekat hasil positif ditunjukkan dengan warna merah kecoklatan (Depkes RI, 1995).

b) Uji saponin

Identifikasi saponin dilakukan dengan menambahkan sedikit air kedalam ekstrak daun kitolod, kemudian kocok vertikal dan tambahkan HCl 2N hasil positif ditunjukkan dengan terdapat busa yang tetap setelah penambahan HCl 2N (Depkes RI, 1995).

6. Pembuatan salep dengan ekstrak daun kitolod

a) Basis salep

Basis yang digunakan adalah basis berlemak yaitu adeps lanae dan vaselin album. Sebelum dibuat basis salep, dipanaskan mortir dan steamper dengan cara menuangkan air panas kedalam mortir, setelah mortir dan steamper panas, air

dalam mortir dibuang kemudian masukkan adeps lanae terlebih dahulu dan diaduk hingga lebur, kemudian dilanjutkan dengan memasukan vaselin album dan diaduk dengan kecepatan konstan hingga homogen dengan membentuk basis salep (Paju *et al*, 2013).

b) Salep ekstrak daun Kitolod

Basis salep yang telah dibuat, ditambahkan dengan ekstrak daun kitolod dan diaduk hingga homogen. Formula standar dasar salep yang digunakan menurut (Agus, 2006) adalah:

R/	Adeps Lanae	15g
	Vaselin Album	85g
	m. f salep	100g

sediaan salep yang akan digunakan pada penelitian ini memiliki masing-masing konsentrasi ekstrak daun Kitolod yaitu 5% b/b, 10% b/b, dan 20% b/b dibuat sebanyak 100 gram.

a) Formulasi salep ekstrak daun Kitolod 5% b/b

R/	Ekstrak daun Kitolod	5g
	Adeps Lanae	14,25g
	Vaselin Album	80,75g
	m. f salep	100g

b) Formulasi salep ekstrak daun Kitolod 10% b/b

R/	Ekstrak daun Kitolod	10g
	Adeps Lanae	13,5g
	Vaselin Album	76,5g
	m. f salep	100g

c) Formulasi salep ekstrak daun Kitolod 20% b/b

R/	Ekstrak daun Kitolod	20g
	Adeps Lanae	12g
	Vaselin Album	68g
	m. f salep	100g

7. Evaluasi sediaan salep

a) Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati perubahan-perubahan bentuk, warna, dan bau sediaan (Septiani *et al.*, 2011)

b) Uji Homogenitas

Pemeriksaan uji homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan salep pada object glass kemudian dilihat homogen atau tidak dilakukan dengan pengamatan secara visual yaitu pada bagian atas, tengah dan bawah sediaan terdapat penyebaran partikel secara merata (Santanu *et al.*, 2012).

c) Uji Daya Sebar

Sebanyak 0,5 gram salep diletakkan diatas kaca bulat, kaca lainnya diletakkan diatasnya dan dibiarkan selama satu menit. Diameter sebar salep diukur. Kemudian ditambahkan beban 50 gram dan diamkan selama satu menit lalu diukur diameter yang konstan. Setiap kali ditambahnkan dengan beban tambahan 50 gram ditunggu selama satu menit dan dicatat diameter sebaran salep. Penambahan dihentikan bila diameter sebaran salep sudah konstan (Santanu *et al.*, 2012). Persyaratan daya sebar untuk sediaan topikal yaitu sekitar 5-7 cm (Garg *et al.*, 2002).

d) Uji viskositas

Alat yang digunakan untuk uji viskositas adalah viskosimeter (VT-04E RION) dengan rotor yang sesuai (rotor nomor 2). Rotor ditempatkan di tengah-tengah bekker glass yang berisi salep sebanyak 75 gram, kemudian alat dihidupkan agar rotor mulai berputar. Jarum menunjukkan viskositas secara otomatis akan bergerak ke kanan. Setelah stabil, kemudian dibaca viskositas pada skala yang ada pada viskotester tersebut (Dewi, 2013). Nilai kisaran viskositas sediaan salep oleh (SNI, 1996) yaitu berada dalam kisaran nilai viskositas 2000-50.000 cP.

e) Uji daya lekat

Salep yang sudah ditimbang sebesar 0,25 g diletakkan di atas gelas obyek yang telah ditentukan luasnya, lalu diletakkan gelas obyek yang lain di atas salep tersebut dan ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Selanjutnya dipasang gelas obyek pada alat tes. Dilepas beban seberat 80 gram, dan dicatat waktunya hingga kedua gelas obyek tersebut terlepas (Naibaho *et al.*, 2013). Syarat untuk daya lekat pada sediaan topikal adalah lebih dari 1 detik (zats dan kushla, 1996).

f) Uji pH

Pengukuran pH menggunakan pH meter. Salep ditimbang sebanyak sebanyak 0,5 gram dan dilarutkan dalam 50 ml aquadest, kemudian pH-nya diukur (Aswal *et al.*, 2013). Persyaratan pH sediaan topikal yaitu antara 4,5 – 6,5 (Ulaen *et al.*, 2012).

8. Pembuatan luka

Sehari sebelum pembuatan luka, hewan uji dicukur bulunya didaerah punggung sampai licin. Pada saat dibuat luka, terlebih dahulu daerah punggung dan sekitarnya dibersihkan dengan alkohol. Selanjutnya dibuat luka sayatan dengan ukuran panjang 2 cm pada bagian punggung (Zuhdan & Nugroho, 2014). Luka sayat dibuat dengan cara mengangkat kulit punggung tikus secara

subkutan dengan pinset, kemudian dibuat luka dengan cutter (silet) yang sudah disterilkan dengan alkohol, dibuat luka sampai bagian subkutan kulit tikus (Hamzah *et al.*, 2013).

9. Uji efektifitas salep ekstrak daun kitolod

Pengujian efektivitas salep ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl) dilakukan pada tikus yang sudah dilukai dengan ukuran panjang 2 cm (Zuhdan & Nugroho, 2014), kemudian diolesi salep Povidone Iodine (kontrol positif), basis salep (kontrol negatif), dan salep ekstrak etanol daun kitolod 5% b/b, 10% b/b, dan 20% b/b. Masing-masing dioleskan \pm 0.3 gram 2×1 (Effendi *et al.*, 2016). Diamati luka yang sudah diolesi salep kemudian diamati selama 14 hari (Zuhdan & Nugroho, 2014).

F. Analisis Data

Pengukuran rata-rata panjang luka terbuka dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Dihitung dengan rumus:

$$dx = \frac{d1 + d2 + d3}{d} \quad \text{[2]}$$

Keterangan : d1, d2, dan d3 yaitu rata-rata panjang luka (cm) setiap kali pengulangan perlakuan, sedangkan d adalah banyaknya perlakuan. Kemudian hitung presentasi penyembuhan luka dengan rumus :

$$p\% = \frac{d0 - dx}{d0} \times 100\%$$

Keterangan:

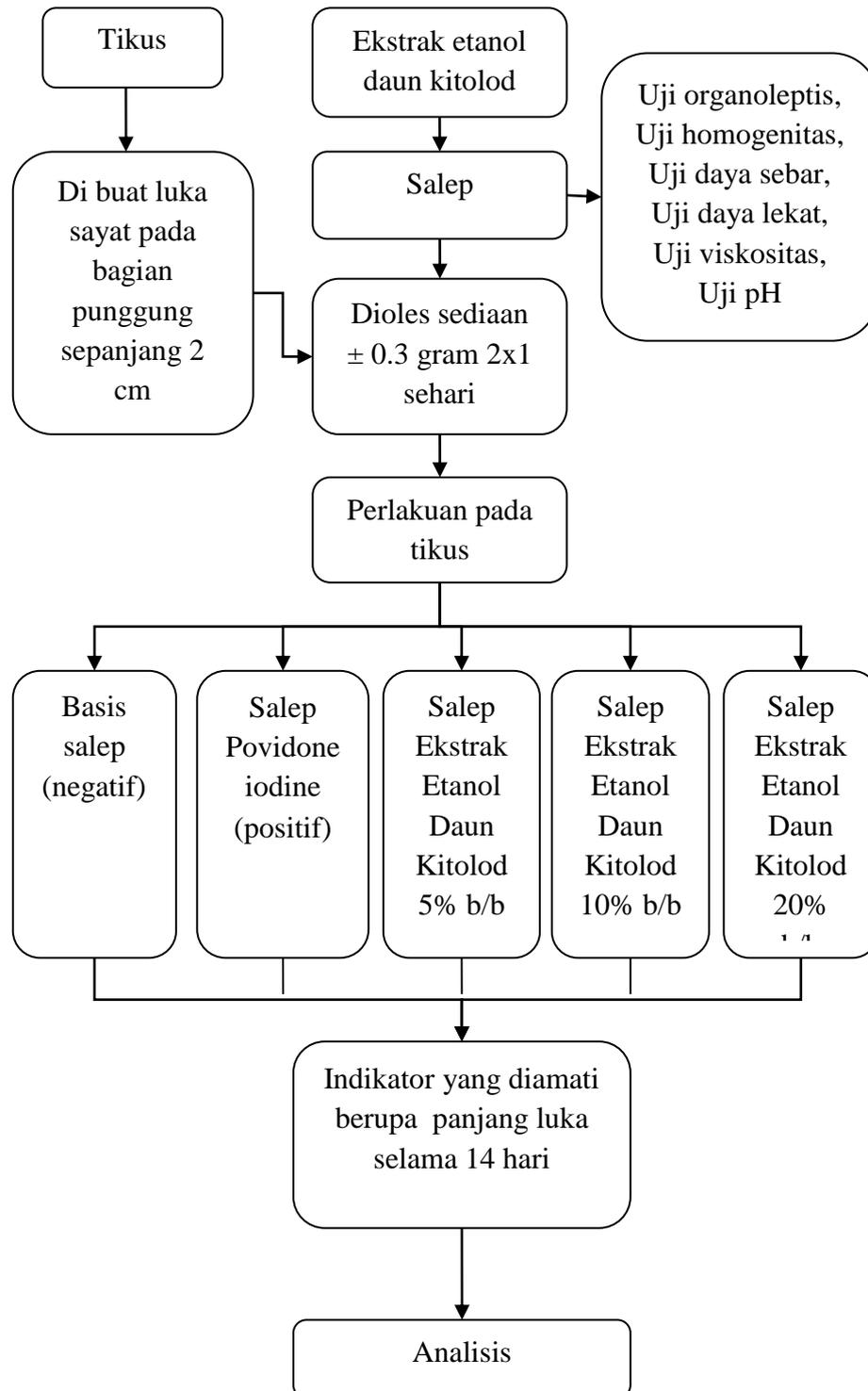
P% : Persen kesembuhan luka

d0 : Panjang ukuran luka awal

dx : Panjang ukuran luka pada hari pengamatan (Effendi, et al., 2016)

Data presentase penyembuhan luka yang diperoleh kemudian dianalisis normalitas data menggunakan uji *Shapiro wilk* karena sampel kurang dari 50 (Ningtyas, 2017). Data terdistribusi normal jika $P \geq 0,05$ dan data dikatakan tidak terdistribusi normal jika $P \leq 0,05$. Kemudian dilanjut uji *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas data. Jika $P \geq 0,05$ maka data dikatakan homogen dan jika $P \leq 0,05$ maka data tidak homogen. Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji parametric analisis varian satu arah. Jika terdapat perbedaan dilakukan uji LSD. Namun, jika data tidak terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan analisis non parametric *Kruskal-Wallis* untuk melihat adanya perbedaan, jika terdapat perbedaan bermakna maka dilanjutkan dengan analisis non parametric *Mann Whitney*.

G. Alur penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian