

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *experimental* dengan menggunakan metode *pre-post test control group desain*, yaitu melakukan pengukuran atau observasi setelah diberi perlakuan.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Februari-April 2025 di Laboratorium Teknologi Farmasi dan *Animal House* Universitas Andalas Padang.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sejumlah tikus putih jantan yang diambil dari populasi yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan 200-300 gram dalam keadaan sehat yang akan dikelompokkan dan diberi perlakuan uji bakar dengan pemberian ekstrak etanol daun rambai (*Baccaurea motleyana*). Daun rambai diperoleh dari Kecamatan Harau, Kabupaten 50 Kota, Sumatera Barat yang pengambilan daunnya dilakukan secara random yang tidak memperhatikan ukuran.

3.3.3 Cara Sampling

Teknik sampling pada penelitian ini adalah *simple random - sampling*, yang merupakan pengambilan sampel (daun rambai) secara acak dan tidak memperhatikan ukuran.

3.3.4 Besar Sampel

Hewan uji yang dipilih sebanyak 25 ekor tikus putih jantan dan dibagi kedalam 5 kelompok secara acak. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Penentuan jumlah tikus putih jantan tiap kelompok dapat dihitung menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

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

Keterangan :

- n : jumlah tiap kelompok/pengulangan
t : jumlah perlakuan/kelompok

Sehingga :

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

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

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

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

$$(n-1) \geq 3,75$$

$$n \geq 3,75 + 1$$

$$n = 4,75 \text{ (dibulatkan)} = 5$$

Jumlah hewan percobaan yang digunakan adalah 5 ekor untuk masing-masing kelompok dan jumlah kelompok yang diuji adalah 5 kelompok, sehingga jumlah tikus yang digunakan untuk percobaan penelitian ini adalah 25 ekor.

3.4 Teknik Pengumpulan Data

3.4.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun rambai, etanol 70%, FeCl_3 , HCl 2N, HCl pekat, anhidrida asetat, asam sulfat pekat, serbuk magnesium,

aquadest, Na CMC, krim veet, bioplacenton gel, norit, ketamin, dan xylazine.

3.4.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelindung diri seperti masker, jas lab, dan sarung tangan (*handscoon*). Alat untuk membuat simplisia yaitu nampan, gunting, oven, dan grinder. Alat ekstraksi yang digunakan adalah botol vial, timbangan analitik, rotary evaporator, corong pisah, kertas saring, gelas beaker, aluminium foil, batang pengaduk. Alat untuk melakukan uji fitokimia adalah tabung reaksi, rak tabung, pipet tetes, gelas ukur. Alat untuk melakukan uji luka bakar adalah spiritus, logam, penjepit, pencukur bulu, jangka sorong, *cotton bud*, toples, serta alat tambahan yaitu kandang hewan coba, peralatan makan dan minum hewan dan sebagainya.

3.4.3 Jenis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer yang dilakukan oleh peneliti sendiri dengan skala numerik rasio.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun rambai (*Baccaurea motleyana*) yang diambil dari Kecamatan Harau, Kabupaten 50 kota, Sumatera Barat.

3.5.2 Identifikasi Sampel

Pengujian ini dilakukan untuk memastikan kebenaran spesies daun rambai (*Baccaurea motleyana*) kemudian diidentifikasi di Herbarium Universitas Andalas.

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Rambai (*Baccaurea motleyana*)

Ekstrak etanol daun rambai dibuat dengan menggunakan metode ekstraksi cara dingin yaitu menggunakan metode maserasi. Pada proses maserasi digunakan pelarut etanol 70%. Serbuk simplisia daun rambai diekstraksi dengan cara memasukkan serbuk simplisia ke dalam botol maserasi gelap dan ditambahkan pelarut etanol 70%. Selanjutnya direndam, selama 6 jam pertama sambil diaduk sesekali, lalu didiamkan selama 18 jam. Kemudian maserat disaring menggunakan kertas saring, lalu sisa serbuk simplisia dimaserasi kembali sebanyak 2 kali. Maserat yang didapat lalu dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C sehingga didapatkan ekstrak kental (Depkes RI, 2017).

3.5.4 Karakteristik Ekstrak

1. Penentuan Parameter Spesifik

a. Parameter Organoleptik

Parameter organoleptik dilakukan untuk mendeskripsikan bentuk ekstrak, warna, rasa, dan bau dari ekstrak menggunakan panca Indera (Depkes RI, 2008).

b. Skrining Fitokimia

Pemeriksaan terhadap kandungan metabolit sekunder dilakukan dengan metode Simes et al. (1995), yang dimodifikasi yaitu ekstrak kental etanol yang berasal dari $\pm$ 5g sampel basah ditambahkan air suling dan kloroform (CHCl_3) sama banyak, masing-masing 5-10 ml lalu dikocok kuat dan biarkan sampai terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan air dan kloroform, kemudian

dipisahkan. Lapisan air digunakan untuk uji senyawa flavonoid, fenolik, tanin dan saponin.

1) Uji Fenolik

Uji fenolik dilakukan dengan cara menambahkan ferri klorida (FeCl_3) pada fraksi air yang telah ditetaskan pada plat tetes. Hasil tes positif bila terjadi warna coklat kehijauan, biru hingga kehitaman.

2) Uji Flavonoid (Metode “Sianidin Test”)

Uji flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan asam klorida pekat dan logam Mg pada fraksi air yang telah ditetaskan pada plat tetes. Hasil tes positif bila terjadi warna jingga hingga merah.

3) Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan cara menambahkan FeCl_3 pada fraksi air yang telah ditetaskan pada plat tetes. Hasil positif bila terbentuk warna biru tua, biru kehitaman, atau hijau kehitaman.

4) Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara mengambil fraksi air, kocok kuat-kuat dalam tabung reaksi, terbentuknya busa yang permanen (± 15 menit) menunjukkan adanya saponin.

5) Uji Steroid/Terpenoid

Uji steroid dan terpenoid dilakukan dengan cara

mengambil fraksi kloroform dilarutkan ke norit, kemudian teteskan kedalam plat tetes dan tambahkan reagen Lieberman Burchard (dengan 1 tetes anhidrida asetat dan 2 tetes asam sulfat pekat (H_2SO_4) (p). Hasil positif steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan dan positif terpenoid ditandai terbentuknya, warna, jingga hingga merah..

3.5.5 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Rambai dengan Pencampuran Basis Gel

Tabel 3.1
Formulasi Gel Ekstrak Daun Rambai

Nama Bahan	Fungsi	F0(%)	F1(%)	F2(%)	F3(%)
Ekstrak Etanol Daun Rambai(<i>Baccaurea motleyana</i>)	Zat aktif	0	4	8	10
Na-CMC	Basis Gel (Gelling agent)	3,5	3,5	3,5	3,5
Aquadest	Pelarut	100	100	100	100

Keterangan: F0 : Gel ekstrak etanol yang tidak memakai zat aktif
 F1 : Gel ekstrak etanol daun rambai 4%
 F2 : Gel ekstrak etanol daun rambai 8%
 F3 : Gel ekstrak etanol daun rambai 10%

1. Pembuatan Gel Ekstrak Etanol Daun Rambai

a. Pembuatan Basis Gel

Siapkan semua alat dan timbang seluruh bahan yang digunakan untuk membuat basis gel. Pertama, panaskan air sebanyak yang dibutuhkan. Setelah air mendidih, pindahkan air panas kedalam lumpang dan dispersikan Na CMC yang telah disiapkan ke dalam lumpang yang berisikan air panas, tunggu hingga warna Na CMC bening dan aduk hingga homogen sampai terbentuk

massa gel/basis gel.

b. Pencampuran basis gel dengan ekstrak

Setelah terbentuk basis gel, masukkan ekstrak etanol daun rambai yang telah ditimbang ke dalam basis gel lalu aduk homogen dan tambahkan aquadest sampai mencapai 15 ml. Setelah itu masukkan gel ekstrak etanol daun rambai ke dalam pot gel yang telah disiapkan dan beri label sesuai dengan konsentrasi.

3.5.6 Uji Luka Bakar

1. Persiapan Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor tikus putih jantan dengan berat badan 200-300 gram. Sebelum percobaan dimulai, tikus-tikus tersebut diaklimatisasi selama 1 minggu agar dapat beradaptasi dengan lingkungan eksperimen. Mereka diberikan makanan dan minuman yang cukup untuk menjaga kesehatan. Hanya tikus yang sehat, tanpa perubahan berat badan lebih 10%, serta menunjukkan perilaku normal dan tanpa gejala penyakit yang digunakan dalam penelitian ini.

2. Pengelompokan Hewan

Hewan ditimbang dan dikelompokkan menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor sebagai berikut :

Kelompok 1(K-) :Tikus putih Jantan dengan luka bakar yang hanya diberikan basis gel.

Kelompok 2 (K+) :Tikus putih Jantan dengan luka bakar diberikan gel

bioplacenton

Kelompok 3 (P1) :Tikus putih Jantan dengan luka bakar yangdiberi
kan gel ekstrak etanol daun rambai 4%

Kelompok 4 (P2) : Tikus putih Jantan dengan luka bakar yang diberi
kan gel ekstrak etanol daun rambai 8%

Kelompok 5 (P3) :Tikus putih Jantan dengan luka bakar yang diberi
kan gel ekstrak etanol daun rambai 10%

3. Pembuatan Luka Bakar

Sebelum melakukan pembuatan luka pada tikus, menentukan area yang akan diberi luka bakar yaitu di punggung tikus. Cukur bulu punggung tikus dengan alat pencukur hingga tidak ada bulu yang tersisa di area yang akan dilukai. Setelah itu dilakukan tindakan antiseptik dengan pemberian kapas yang telah diberi alkohol 70%. Kemudian dilakukan tindakan anestesi dengan menggunakan ketamin (Ket-A-100) dan xylazine 2% (Xyla) dengan perbandingan 2:1 yang dilakukan secara intramuscular (IM) sebanyak 0,3 ml dalam spuit 1ml.

Sebelum diberi luka bakar, dilakukan tindakan antiseptik dengan pemberian kapas yang telah diberi alkohol 70% menggunakan sarung tangan yang steril dan buatlah luka bakar sekitar 1,5 cm menggunakan besi/logam yang telah dipanaskan dalam air mendidih (90-100°C) selama 5 menit, lalu ditempelkan pada punggung tikus selama 5-10 detik sampai terbentuk hiperemis dan bula (Mollie, 2023). Luka bakar yang dibuat merupakan luka bakar derajat dua yang

mengenai lapisan epidermis dan dermis.

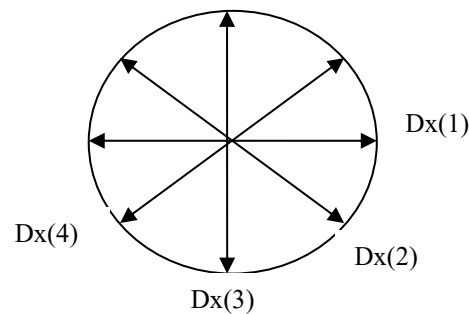
4. Pengujian Efektivitas Penyembuhan Luka

- a. Sediaan gel sebanyak ± 200 mg dioleskan ke punggung tikus yang telah dilukai, pemakaian gel dilakukan 2 kali sehari yaitu pada pagi dan sore hari.
- b. Sediaan diberikan sesuai dengan pengelompokannya yang telah diuraikan.
- c. Proses penyembuhan luka bakar diamati setiap hari yang berlangsung selama 14 hari.

3.5.7 Parameter yang Diukur pada Proses Penyembuhan Luka

1. Diameter Luka Bakar

Proses penyembuhan luka diamati dengan mengukur diameter zona luka bakar menggunakan jangka sorong digital yang memiliki skala 0,01 mm. Luka bakar dianggap sembuh jika sudah tertutup sepenuhnya. Pengamatan diameter luka bakar dilakukan pada hari ke 0, 3, 7, dan 14. Setelah 14 hari, pengukuran diameter luka bakar dilakukan, dan selanjutnya akan dihitung diameter rata-rata luka serta persentase kesembuhannya. Untuk menghitung diameter rata-rata zona luka bakar, digunakan rumus sebagai berikut (Kaihen *et al.*, 2021)



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

Keterangan :

dx = diameter luka hari ke x

dx1,2,3,4 = diameter luka yang diukur di berbagai arah (cm)

Perhitungan persentase luka menggunakan rumus sebagai berikut (Soekarno, 2021):

$$P\% = \frac{d1 - dx}{d1} \times 100\%$$

Keterangan :

P% = Persentase penyembuhan luka

d1 = Diameter luka awal

dx = Diameter luka pada hari pengamatan

3.6 Teknik Analisis Data

Dalam penelitian ini, Konsentrasi yang diuji bervariasi, sehingga digunakan analisis statistik menggunakan SPSS 26. Analisis yang diterapkan adalah ANOVA satu arah (*one way ANOVA*). Karena jumlah variabel bebas dan terikat yang dianalisis tidak lebih dari satu. Hasil uji ANOVA akan dianggap berbeda secara signifikan jika diperoleh berdasarkan analisis statistik ($P < 0.05$). Jika terdapat perbedaan kelompok dilanjutkan dengan uji Duncan.

3.7 Definisi Operasional

Tabel 3.2
Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Skala	Hasil
1.	Konsentrasi ekstrak etanol daun rambai (<i>Baccaurea motleyana</i>)	Daun rambai yang telah dikeringkan, dihaluskan menjadi simplisia dan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% dan dirotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental	Observasional	Rasio	Konsentrasi ekstrak etanol daun rambai (<i>Baccaurea motleyana</i>) 4%, 8%, dan 10%
2.	Diameter luka bakar	Ukuran lebar atau jarak yang mengukur seberapa besar area yang terpengaruh oleh luka bakar	Pengukuran diameter luka bakar menggunakan jangka sorong	Rasio	Diameter luka bakar terkecil (mm)