

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmasi dan Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Cenderawasih, Kota Jayapura yang dilakukan pada bulan November 2023 – Januari 2024.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu alat-alat gelas laboratorium, cawan porselen, blender, toples kaca, timbangan analitik, *mesh* no. 100, *rotary evaporator*, *waterbath*, jangka sorong, alat cukur, mortar dan stemper, *handscoon*, alumunium foil, *disposable syringe* 3 cc, lempeng besi diameter 2.2 cm dengan ketebalan 1 mm, pot salep, dan kandang hewan kelinci.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tegari (*Dianella nemorosa* Lam.), etanol 96%, vaselin album, aquadest, lidokain HCl 2%, $K_2Cr_2O_7$, H_2SO_4 , HCl, $FeCl_3$, $C_4H_6O_3$, amil alkohol, serbuk Magnesium, pereaksi mayer, pereaksi dragendroff, gel konvensional, kertas saring, dan pakan kelinci.

3.2.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu kelinci jantan (*Oryctolagus cuniculus*) sebanyak 5 ekor dengan berat 1,5 kg, 1,6 kg, 1,9 kg, 2 kg, dan 2,1 kg.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Persetujuan Kode Etik

Etika hewan atau dikenal dengan *animal ethics* yaitu pemberitaan yang penting di dalam dunia penelitian. Pada dasarnya aturan etika hewan berprinsip untuk mengatur peneliti agar bertanggung jawab terhadap semua penggunaan hewan uji, baik mulai dari pemeliharaan sebelum digunakan sebagai percobaan hingga dikorbankan sebagai sampel penelitian. Termasuk juga cara transportasi dari

tempat asal hewan uji, hingga ke tempat penelitian akan berlangsung. Sebelum melakukan penelitian, peneliti hewan uji harus terbebas dari penyakit, bebas dari rasa lapar, haus, ketakutan dan stres jangka panjang, hewan uji harus aktif dalam pergerakannya dan diberikan ruang serta fasilitas yang ditandai dengan mendapatkan surat keterangan kesehatan hewan dari balai klinik hewan Jayapura. Daftar kode etik hewan uji di Komisi Etik Penelitian Kesehatan Universitas Muhammadiyah Banjarmasin surat keterangan kelayakan penelitian dengan nomor KEPK: 0128226371 telah diterima, gambar terlampir pada lampiran. Membuat proposal penelitian dan menyerahkan pada Komisi Etik Penelitian untuk mendapatkan *ethical clearance*. Kemudian memohon izin (birokrasi) dari institusi yang terkait dengan ruang lingkup penelitian. Pada penelitian ini hewan uji dapat dinilai sehat apabila sudah medapati *ethical clearance* atau kode etik.

3.3.2 Pengambilan dan Preparasi Daun Tegari

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan tegari yang diambil di Tablanusu, Sentani, Kabupaten Jayapura, Papua. Sampel daun tegari dibersihkan terlebih dahulu kemudian dilakukan pencucian dengan air mengalir. Setelah itu sampel dipotong hingga menjadi bagian kecil dan ditiriskan, kemudian sampel dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 50°C hingga kering. Setelah kering tumbuhan tegari diblender, lalu diayak dengan ayakan *mesh no. 100* sehingga didapatkan serbuk halus daun tegari dan disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

3.3.3 Ekstraksi Daun Tegari

Simplisia daun tegari sebanyak 200 g diekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode ekstraksi maserasi. Sampel direndam dalam 1000 mL etanol dengan perbandingan (1:5). Simplisia halus kemudian diekstraksi dengan metode maserasi selama 3 hari dengan remaserasi menggunakan pelarut baru tiap 1 x 24 jam. Hasil ekstraksi kemudian difiltrasi untuk dipisahkan filtrat dan maserat menggunakan kertas saring dan corong. Hasil maserat kemudian dipekatkan dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan selanjutnya dihitung % rendemennya terhadap bobot simplisia dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Berat serbuk simplisia yang diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

3.3.4 Pengujian Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara memasukkan 2 tetes H_2SO_4 pekat dan 1 mL $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ditambahkan ke dalam sampel ekstrak, jika terjadi perubahan warna jingga menjadi warna hijau kebiruan maka sampel dinyatakan mengandung etanol (Kurniawati, 2015).

3.3.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak meliputi pemeriksaan terhadap golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan terpenoid :

1. Pemeriksaan Senyawa Alkaloid

Ekstrak daun tegari ditetaskan pada tiga plat tetes. Pada bagian pertama dijadikan sebagai kontrol dan dua bagian di tetesi dengan pereaksi mayer dan pereaksi dragendorf, sehingga ekstrak berwarna jingga atau coklat dan terbentuk endapan putih menunjukkan hasil positif adanya alkaloid (Harborne, 2006).

2. Pemeriksaan Senyawa Flavonoid

Ekstrak daun tegari sebanyak 5 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk Magnesium 0.1 g dan 1 mL HCl :etanol (1:1), kemudian dikocok dengan 2 mL amil alkohol. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga, kuning atau merah yang tertarik pada lapisan amil alkohol (Dirjen POM, 1995).

3. Pemeriksaan Senyawa Saponin

Ekstrak daun tegari sebanyak 5 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dikocok selama 10 detik secara vertikal. Terbentuknya busa selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1-10 cm yang tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Dirjen POM, 1995).

4. Pemeriksaan Senyawa Tanin

Ekstrak daun tegari ditetaskan pada 2 plat tetes. Bagian pertama dijadikan sebagai tempat kontrol dan bagian lainnya ekstrak daun tegari direaksikan dengan larutan FeCl_3 kemudian jika terdapat warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin (Jones & Kinghorn, 2006).

5. Pemeriksaan senyawa Steroid atau Terpenoid

Diletakan sebanyak 1 mg ekstrak kental ekstrak daun tegari pada plat tetes lalu ditambahkan 6 tetes $C_4H_6O_3$ kemudian diaduk menggunakan spatula hingga larut lalu ditambahkan 1 tetes H_2SO_4 pada pengujian steroid (*Liebermann Burchard's Test*). Pada pemeriksaan terpenoid (*Salkowski Test*) digunakan beberapa tetes H_2SO_4 kemudian diaduk perlahan (Karthiyayini & Vardini, 2020). Sampel yang mengandung senyawa golongan terpenoid akan berubah warna membentuk cincin coklat atau violet. Hasil positif ekstrak yang mengandung senyawa golongan steroid akan berubah warna menjadi hijau kebiruan (Harborne, 2006).

3.3.6 Penyiapan Hewan Uji

Pada penelitian ini hewan uji yang digunakan adalah kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) strain New Zealand yang berumur 3-5 bulan sebanyak 5 ekor dengan berat badan 1.5-2.5kg. Strain kelinci ini banyak dipakai pada penelitian karena strain ini kurang agresif di alam dan memiliki masalah kesehatan lebih sedikit dibandingkan dengan jenis lainnya (Brahmantiyo et al ., 2017).

Hewan uji kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) diaklimatisasi terlebih dahulu, hal ini dilakukan agar kelinci mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang akan ditempati selama penelitian berlangsung. Hewan uji sebanyak 5 ekor diadaptasikan dengan cara ditempatkan di dalam ruangan selama 5 hari pada suhu ruang dengan diberi makan standar dan minum secukupnya. Hewan uji kelinci dapat dikatakan sehat apabila selama aklimatisasi kelinci tidak mengalami perubahan berat badan dan dilihat secara fisik kelinci tidak terdapat gejala penyakit.

3.3.7 Pengelompokkan Hewan Uji

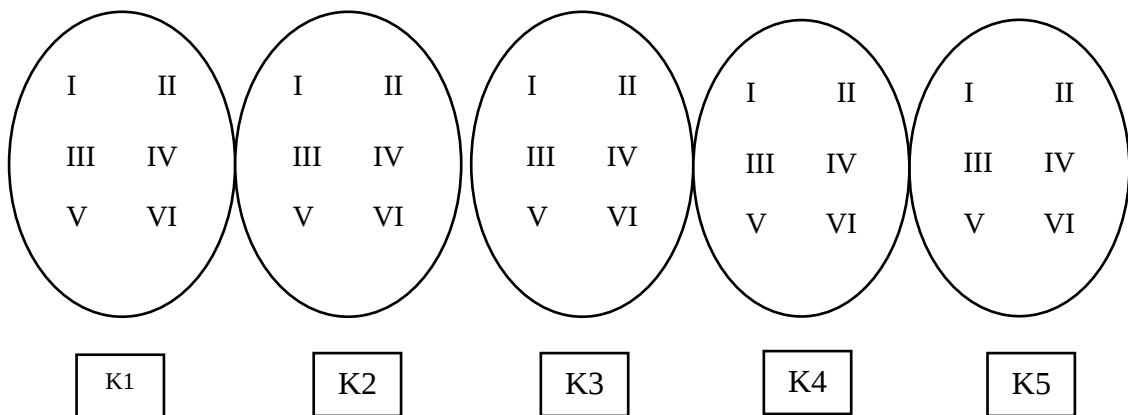
Masing-masing kelinci terdiri atas 6 perlakuan luka. Semua pemberian dilakukan secara topikal yaitu sebanyak 0,3 g, 2 kali sehari pagi dan sore selama 21 hari. Kelinci dikelompokkan berdasarkan kelompok kontrol, masing-masing kelompok diberi perlakuan yaitu pada kelompok perlakuan pertama merupakan kontrol normal dengan tidak diberikan perlakuan, kelompok kedua yaitu kontrol negatif diberikan vaselin album, kelompok ketiga yaitu kontrol positif diberikan gel luka bakar konvensional untuk luka bakar, kelompok empat hingga kelompok enam diberikan ekstrak daun tegari (*Dianella nemorosa* Lam.) dengan konsentrasi 0,1%, 0,5%, dan 1%.

3.3.8 Pembuatan Luka Bakar Pada Hewan Uji

Bulu pada bagian punggung kelinci akan dicukur seluas 240 cm² atau (12×20 cm) diukur dengan menggunakan penggaris dan pada daerah punggung dibagi menjadi 6 area luka. Sebelum dilakukan perlakuan, cuci tangan terlebih dahulu kemudian menggunakan sarung tangan steril dan melakukan tindakan aseptik di area kulit yang telah dicukur dengan menggunakan alkohol 70% lalu melakukan anestesi pada kulit kelinci dengan lidokain ampul 2%. Kemudian pembuatan luka bakar pada punggung kelinci dengan menggunakan alat modifikasi dari lempeng besi dengan diameter 2.2 cm dan ketebalan 1 mm yang dipanaskan di api biru selama 3 menit lalu ditempelkan pada punggung kelinci selama 5 detik hingga terbentuk luka bakar derajat II (*deep*) (Haris et al ., 2022).

3.3.9 Uji Efektivitas Penyembuhan Luka Bakar

Setiap kelinci dengan 6 area luka yang akan diberi perlakuan berbeda seperti yang tertera pada gambar 3.1. Luka bakar dioleskan dengan ekstrak daun tegari (*Dianella nemorosa* Lam.) yang berbeda konsentrasi dalam pembawa vaselin album, gel konvensional sebagai kontrol positif, dan vaselin album sebagai kontrol negatif dua kali sehari pagi dan sore sebanyak 0.3 g diulangi selama 21 hari.



Gambar 3.1 Model Perlakuan Terhadap Kelinci

Keterangan :

- I : Tanpa perlakuan (kontrol normal)
- II : Diberikan vaselin album (kontrol negatif)
- III : Diberikan gel luka bakar konvensional (kontrol positif)
- IV : Diberikan ekstrak daun tegari (*Dianella nemorosa* Lam.) konsentrasi 0,1% dalam vaselin
- V : Diberikan ekstrak daun tegari (*Dianella nemorosa* Lam.) konsentrasi 0,5% dalam vaselin
- VI : Diberikan ekstrak daun tegari (*Dianella nemorosa* Lam.) konsentrasi 1% dalam vaselin
- K1 : Hewan uji kelinci pertama
- K2 : Hewan uji kelinci kedua
- K3 : Hewan uji kelinci ketiga
- K4 : Hewan uji kelinci keempat
- K5 : Hewan uji kelinci kelima

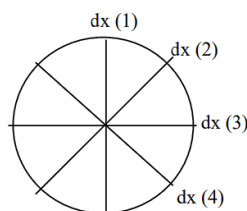
3.4 Analisa Data

Pengukuran diameter luka menggunakan alat jangka sorong menggunakan metode *morton* yaitu dengan cara mengukur empat diameter luka secara tetap sampai didapatkan diameter luka nol, kemudian diambil rata-rata diameter per harinya. Pengamatan terhadap luka bakar pada hewan uji dilakukan setiap hari, sedangkan pengukuran diameter dilakukan setiap 3 hari sekali yaitu pada hari ke 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, dan 21. Rata-rata diameter luka bakar dihitung dengan rumus:

$$dx = \frac{d1 + d2 + d3 + d4}{4}$$

Keterangan :

- dx : rata-rata diameter luka bakar setiap ulangan perlakuan
- $d_{(1,2,3,4)}$: diameter tiap bagian



Gambar 3.2 Pengukuran Rata-Rata Diameter Luka Bakar (Ervianingsih & Razak, 2017)

Rumus persentase kesembuhan :

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

Keterangan :

- P% : Persentase kesembuhan luka (%)
dx : Rata-rata diameter luka bakar (mm)
do : Diameter luka awal (mm)

Sebelum melakukan pengujian *one way* Anova terlebih dahulu melakukan uji normalitas dan homogenitas, karena untuk melakukan pengujian Anova satu arah dimana data harus terdistribusi normal sudah homogen. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan SPSS metode Anova satu arah (*One Way Anova*) untuk melihat apakah ekstrak daun tegari (*Dianella nemorosa* Lam.) memiliki efek penyembuhan terhadap luka bakar yang pengambilan keputusan dilakukan berdasarkan pada nilai F hitung dan F tabel. Jika F hitung < F tabel maka ekstrak daun tegari (*Dianella nemorosa* Lam.) tiap perlakuan tidak memiliki efek penyembuhan terhadap luka bakar dan jika F hitung > F tabel maka ekstrak daun tegari (*Dianella nemorosa* Lam.) pada tiap perlakuannya memiliki efek penyembuhan terhadap luka bakar. Uji anova satu arah dipilih karena hanya terdapat satu variabel independen yang akan diteliti yaitu pada proses persentase penyembuhan luka bakar.

Jika hasil uji Anova menunjukkan *probability* <0,05 maka terdapat perbedaan efek penyembuhan luka bakar antar tap perlakuan. Uji statistik kemudian dilanjutkan menggunakan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) untuk melihat apakah terdapat perbedaan bermakna atau tidak bermakna antar tiap perlakuan.