

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah studi eksperimental menggunakan tikus putih jantan galur wistar sebagai hewan percobaan. Penelitian ini meliputi pengumpulan sampel, pengolahan sampel, pemeriksaan karakteristik simplisia, pembuatan ekstrak etanol daun jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), skrining fitokimia, dan pembuatan gel ekstrak etanol daun jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) terhadap penurunan panjang pada luka sayat selama 2 minggu hingga evaluasi pengujian organoleptik, pH, homogenitas, daya sebar dan juga viskositas.

Rancangan penelitian ini menggunakan analisis Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana jika dibandingkan dengan rancangan-rancangan percobaan lainnya. Dalam rancangan ini terdapat lokal kontrol, sehingga sumber keragaman yang diamati hanya perlakuan dan galat (Hanafiah, 2004). Dengan jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus Federer yaitu : $(K-1)(n-1) \geq 15$ (Smith & Mangkoewidjojo, 1988).

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan dengan demikian perhitungan rumus Federer untuk menentukan banyak sampel tiap kelompok adalah sebagai berikut :

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \sim 5$$

Keterangan :

k : jumlah kelompok perlakuan

n : banyak sampel tiap kelompok

Dari perhitungan rumus Federer didapatkan sampel tiap kelompok sebanyak 5 sampel. Dengan demikian jumlah sampel pada penelitian ini sebanyak 25 sampel.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah hewan uji coba tikus putih jantan galur wistar yang dikelompokkan secara acak dan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang diambil di kecamatan Klari, kabupaten Karawang, provinsi Jawa Barat.

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), tikus putih jantan galur wistar, Carbopol 940, propilenglikol, metilparaben, aquadest (PT. Bratacho), etanol 70%, NaOH, H₂SO₄ pekat, dan serbuk Mg-HCl pekat, FeCl₃, pereaksi Libermann-Buchard, HCl, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff serta povidone iodine 10%.

3.3.2 Alat

Dalam penelitian ini alat yang digunakan ialah sarung tangan, penimbang berat badan tikus, kandang tikus, tempat minum tikus, alat cukur, blade, scapel, rotary evaporator, waterbath, timbangan analitik, aluminium foil, kaca arloji, gelas ukur (pyrex), tabung reaksi (pyrex), corong (pyrex), spatula, mortar dan stamper, sudip, cawan, batang pengaduk, beaker glass (iwaki), pH meter, viscometer, alat uji daya sebar, alat uji homogenitas, wadah gel.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi variabel

1. Variabel Bebas

Dalam penelitian ini variabel bebas yang digunakan ialah menggunakan beberapa konsentrasi dari ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dalam bentuk sediaan gel yang diperoleh melalui orientasi.

2. Variabel Terikat

Dalam penelitian yang dilakukan ini menggunakan variabel terikat ialah, formulasi sifat fisik gel ekstrak etanol daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang paling baik dan konsentrasi yang paling cepat dalam waktu penyembuhan luka sayat.

3.4.2 Definisi operasional variabel

Berikut adalah tabel definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini, yaitu :

Tabel 3.1 Definisi operasional variabel

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Persyaratan Pengujian
Variabel bebas					
1.	Konsentrasi gel ekstrak daun jamblang (<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels)	Konsentrasi yang dapat mempengaruhi suatu organisme secara biologis.	-	-	-
Variabel terikat					
1.	Warna	Parameter fisik menggunakan indera penglihatan dalam pengujian sampel gel luka ekstrak daun Jamblang	Uji Organoleptik	Nominal	1. Warna hijau 2. Warna hijau pekat
2.	Bau	Parameter fisik menggunakan indera penciuman dalam pengujian sampel gel luka ekstrak daun Jamblang	Uji Organoleptik	Nominal	1. Bau lemah 2. Bau khas 3. Tidak berbau

3.	Homogenitas	Dilakukan dengan mengoleskan sampel pada objek glass dikatupkan cover glass untuk diamati homogenitas.	Uji homogenitas dengan kaca objek	Nominal	1. Homogen 2. Tidak Homogen
4.	pH	Nilai pada pH sampel ditunjukkan sesuai dengan pH kulit oleh pH meter.	pH meter	Rasio	Angka dalam pH meter
5.	Uji viskositas	Uji viskositas dilakukan dengan alat viscometer	Alat viscometer	Rasio	cP
6.	Uji Daya Sebar	Uji daya sebar dilakukan dengan dua lempeng kaca	Lempeng kaca	Rasio	cm

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi

Determinasi dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu untuk mengetahui identitas dari tanaman daun jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). Determinasi tanaman bertujuan untuk memastikan kebenaran tanaman jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi dari tanaman jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dengan menggunakan kunci determinasi.

3.5.2 Pengumpulan tanaman

Tanaman yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang didapatkan di Klari, Karawang, Jawa Barat.

3.5.3 Penyiapan simplisia

Daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang masih segar kemudian dilakukan pembuatan simplisia dengan cara daun yang masih segar dengan kondisi utuh dan baik dibersihkan dari kotoran yang melekat dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian daun dijemur dengan cara diangin-anginkan selama beberapa hari. Daun yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender hingga halus.

3.5.4 Ekstraksi

Sebelum dibuat ekstrak, daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) terlebih dahulu dilakukan determinasi untuk mendapatkan kebenaran identitas dengan jelas dari tanaman. Ambil sebanyak 500 gr sampel berupa serbuk halus daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dimaserasi dengan etanol 70% selama 3×24 jam, setiap 24 jam hingga filtrat tidak berwarna. Filtrat disaring dan diuapkan di *waterbath* dengan suhu 60–70 °C sambil diaduk kemudian dianginkan sehingga diperoleh ekstrak kental. Hitung randemen dari ekstrak kental daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels).

Randemen dihitung dengan menggunakan satuan persen (%). Semakin tinggi nilai randemen yang dihasilkan maka menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Randemen yang diperoleh dihitung dan dicatat :

$$\text{Redemen Ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

3.5.5 Uji skrining fitokimia

1. Uji identifikasi alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara 0,5 gr ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) ditambah 2 mL etanol 70% dan 5 mL HCl 2 N pekat dan dipanaskan selama 2 menit sambil diaduk. Disaring ekstrak dan dicampurkan HCl setelah dingin. Filtrat yang disaring digunakan untuk menganalisis senyawa alkaloid, masing-masing 0,5 mL ditempatkan dalam 3 tabung reaksi dengan pereaksi yang berbeda. Pada tabung 1, tambahkan pereaksi mayer, sampel terbentuk endapan putih atau kuning menunjukkan adanya alkaloid. Pada tabung 2, tambahkan pereaksi dragendorff, sampel terbentuk endapan coklat atau jingga menunjukkan adanya alkaloid. Pada tabung 3, digunakan sebagai blanko.

2. Uji Identifikasi Flavonoid

Ekstrak kental etanol sebanyak 0,1 gr dilarutkan dalam 10 mL etanol kemudian dibagi ke dalam empat tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai tabung kontrol, tabung kedua, ketiga, dan keempat berturut-turut ditambahkan NaOH, H₂SO₄ pekat, dan serbuk Mg-HCl pekat. Warna pada masing-masing tabung dibandingkan dengan tabung kontrol, jika terjadi perubahan warna maka positif mengandung flavonoid.

3. Uji Identifikasi Tanin

Uji Tanin dilakukan dengan cara ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) sebanyak 0,5 gr direbus dalam 20 mL air suling dalam tabung reaksi. Saring dan tambahkan beberapa tetes 0,1% FeCl₃ sampai berubah warna. Hasil positif dengan tanin menunjukkan dengan munculnya warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman.

4. Uji Identifikasi Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dicampur dengan 5 mL air suling dan di aduk kuat-kuat. Tes positif untuk keberadaan saponin dalam larutan ditunjukkan dengan berbusa.

3.5.6 Pembuatan gel ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Pada penelitian ini formula yang digunakan dalam pembuatan gel sesuai dengan formula standard gel menurut (Noena R., 2020) ialah :

Carbopol 940	0,5%
TEA	1%
Metil paraben	0,2%
Propilenglikol	15%
Aquadest	Ad 100

Carbopol 940 dikembangkan dengan air suling 70°C dalam gelas kimia kemudian TEA dicampurkan ke dalam basis lalu dihomogenkan. Ditambahkan metilparaben yang sebelumnya telah dilarutkan dengan 3 mL air suling pada suhu 90°C, dihomogenkan. Dilarutkan ekstrak daun jamblang (*Syzygium cumini*

(L.) Skeels) kedalam propilenglikol, lalu dihomogenkan ke dalam basis sedikit demi sedikit.

Tabel 3.2 Formulasi Konsentrasi Gel

Formulasi Konsentrasi Gel				
Bahan	Kontrol (-)	Formula I	Formula II	Formula III
Ekstrak etanol daun Jamblang	-	2,5%	5%	7%
Carbopol 940	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
TEA	1%	1%	1%	1%
Metil paraben	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%
Propilenglikol	15%	15%	15%	15%
Aquadest	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

3.5.7 Uji aktivitas penyembuhan luka sayat

Sebelum dilakukan penyayatan, tandai pada bagian punggung tikus yang akan dibuat luka. Cukur bulu tikus pada bagian yang akan disayat dan dibuat luka. Kemudian bagian yang akan dibuat luka tersebut dibersihkan dengan kapas yang mengandung alkohol 70%. Buat luka dengan menyayat kulit tikus menggunakan scapel yang sudah steril (bilas dengan alkohol 70%) sampai sobek jaringan otot. Buat luka dengan panjang 2 cm dengan kedalaman 2 mm. Luka yang dibuat pada masing-masing tikus sebanyak 1 sayatan, yaitu pada punggung tikus, ditandai dengan spidol dan diukur menggunakan jangka sorong. Pada setiap kelompok diberikan perlakuan sebagai berikut :

- Kelompok 1 (Positif) : Luka sayat dioleskan povidone iodine 10%.
- Kelompok 2 (Negatif) : Luka sayat dioleskan basis gel.
- Kelompok 3 : Luka sayat dioleskan gel ekstrak etanol daun jamblang 2,5%.
- Kelompok 4 : Luka sayat dioleskan gel ekstrak etanol daun jamblang 5%.
- Kelompok 5 : Luka sayat dioleskan gel ekstrak etanol daun jamblang 7%.

Parameter yang dipakai dalam penentuan kesembuhan luka adalah penurunan panjang luka, eritema atau kemerahan, pembengkakan dan luka yang sudah menutup.

3.5.8 Uji Evaluasi Fisik

a. Uji organoleptik

Tujuannya untuk memperhatikan sampel dari warna, bau dan bentuknya. Uji organoleptik terhadap gel dilakukan secara subjektif meliputi: warna, bau dan penampilan (Ramane *et al.*, 2013).

b. Uji pH

Tujuannya untuk mengetahui nilai pH pada sampel. Pengukuran pH gel dilakukan dengan alat pengukur pH meter digital (*Oakton-eutech instruments*). Prosedur pengujiannya dengan cara mencelupkan secara sempurna kaca elektroda pH meter ke dalam sediaan gel. Nilai pH dari sediaan akan secara otomatis tertera pada layar indikator. Nilai pH normal sediaan yang memenuhi kriteria pH kulit dan tidak mengiritasi yaitu pada pH 4,5-6,5 (Nikam, 2017).

c. Uji homogenitas

Tujuannya untuk mengetahui apakah sampel secara visual formula yang tidak terdapat butiran-butiran selama penyimpanan dikatakan homogen, pernyataan ini sesuai dengan penelitian Wahyuni *et al.*, (2019), hal ini menunjukkan bahwa komposisi bahan dalam formula terlarut atau terdispersi homogen. Prosedur pengujiannya dilakukan dengan cara mengoleskan sampel pada kaca transparan dimana sediaan diambil secukupnya, lalu dijepit kembali dengan kaca transparan dan diamati. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar.

d. Uji daya sebar

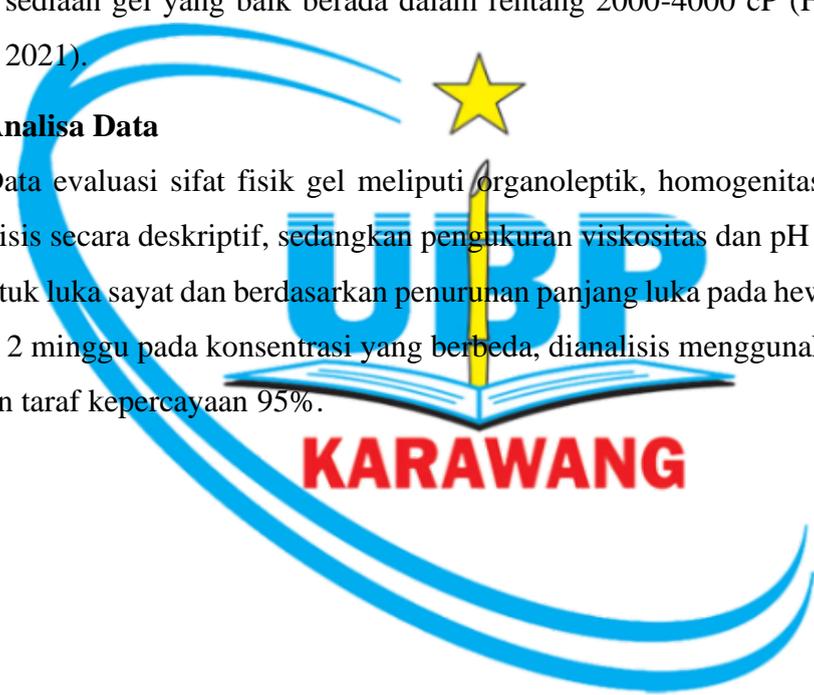
Tujuan uji daya sebar dilakukan untuk mengetahui seberapa menyebar sediaan pada saat dioleskan ke kulit. Prosedur pengujiannya dengan cara sampel sebanyak 1 gr diletakkan diatas kaca bulat, yang pertama tidak diberi beban, selanjutnya diberi beban sebesar 50 gr ditunggu 1 menit dan ukur diameter daya sebar. Begitu seterusnya sampai beban sebesar 250 gr (Mursyid, 2017). Rentang daya sebar standar formulasi gel yang baik antara 5-7 cm (Edy *et al.*, 2017; Kumesan *et al.*, 2013).

e. Uji viskositas

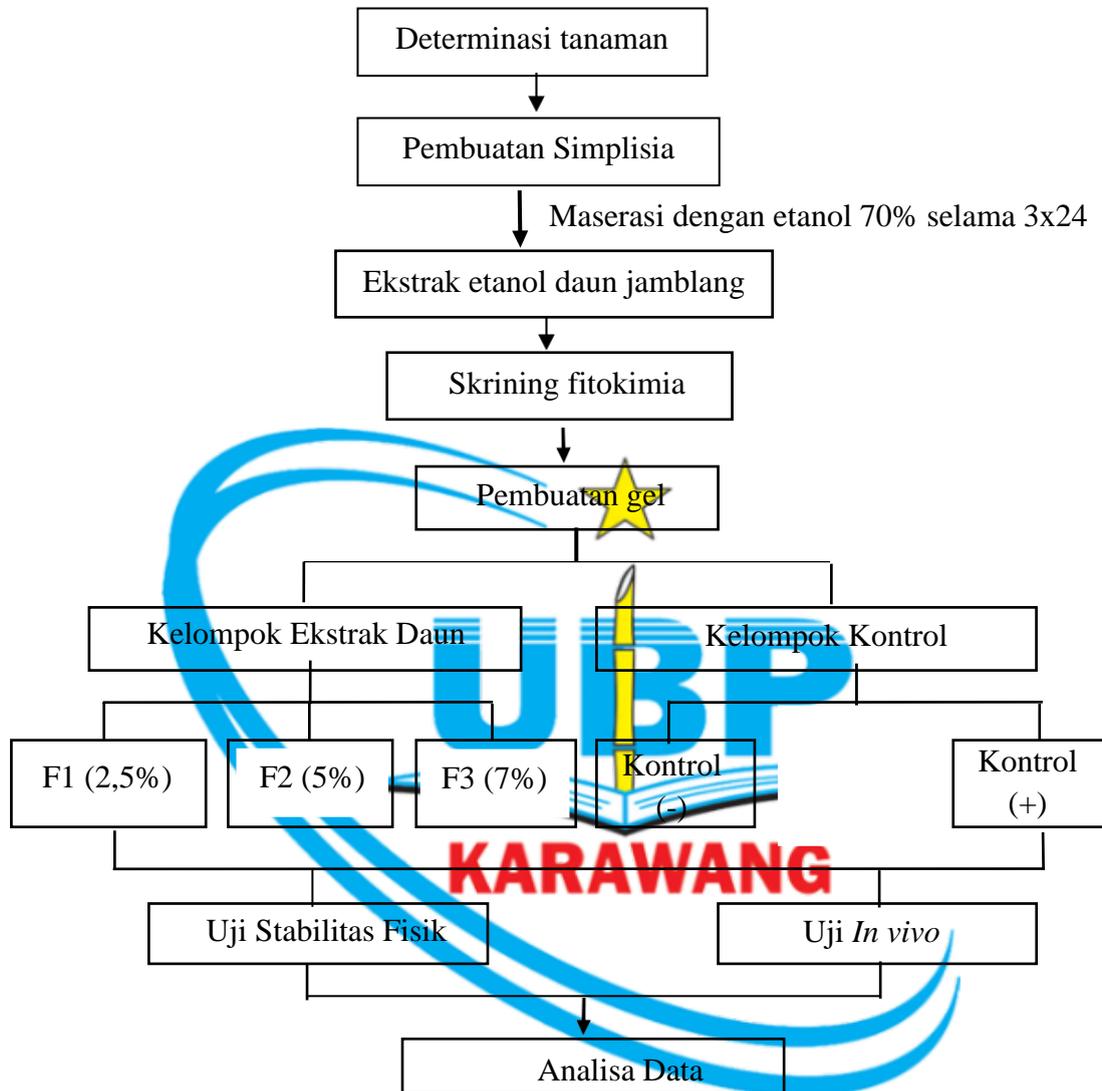
Tujuan uji viskositas untuk mengetahui kekentalan dari sediaan gel. Pengukuran nilai viskositas pada sampel menggunakan alat viskometer (Rion viscotester VT-04F). Prosedur pengujian viskositas gel dengan cara sebanyak 50-100 gr gel dimasukkan dalam baker glass kemudian dimasukkan spindle nomor 2 yang telah terpasang pada viskometer ke dalam gel sampai terendam sempurna. Nyalakan viskometer dan pembacaan nilai viskositas dimulai ketika jarum penunjuk telah stabil. Syarat viskositas sediaan gel yang baik berada dalam rentang 2000-4000 cP (Fahrezi *et al.*, 2021).

3.6 Analisa Data

Data evaluasi sifat fisik gel meliputi organoleptik, homogenitas, daya sebar dianalisis secara deskriptif, sedangkan pengukuran viskositas dan pH pada sediaan gel untuk luka sayat dan berdasarkan penurunan panjang luka pada hewan uji dalam waktu 2 minggu pada konsentrasi yang berbeda, dianalisis menggunakan ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%.



3.7 Alur Prosedur Penelitian



Gambar 3 1. Diagram Alir Penelitian