

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium, plester *film* dibuat dengan variasi konsentrasi zat aktif F0 (0%), F1 (6,25%), F2 (12,5%) dan F3 (25%), dilanjutkan uji secara *in vivo* yang membandingkan kelompok uji dengan produk komersil yaitu Octadin Gel 0,1% sebagai kontrol positif. Penelitian ini meliputi penyiapan sampel, determinasi sampel, pembuatan simplisia, ekstraksi, fraksinasi, skrining fitokimia, pembuatan formulasi sediaan, evaluasi fisik dan uji efektivitas penyembuhan luka sayat pada hewan uji coba dengan pengukuran penurunan panjang luka selama 16 hari.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan sebanyak 25 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok (n=5) dengan jenis tikus putih jantan galur *Sprague dawley* dengan umur $\pm$ 2-3 bulan dengan berat sekitar 150-250 g (Angreani *et al.*, 2020). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun lidah mertua (*Sanseivieria trifasciata* Prain).

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Berikut ini merupakan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu Fraksi Etil Asetat Lidah Mertua (*Sanseivieria trifasciata* Prain), Kitosan (Sigma-Aldrich), Natrium Alginat (Gibco), Aquadest (PT. Brataco), Krim Anestesi (Dolones krim), Octadin Gel 0,1%, Etanol 96% (PT. Brataco), N-Heksana (PT. Brataco), Etil Asetat (PT. Brataco), Reagen mayer, Reagen dragendorff, Reagen Libermann-Buchard (Lab Farmasi UBP), Serbuk Mg (PT. Merck), FeCl₃ (PT. Merck), HCl pekat (PT. Merck), TCA 20% (Supelco), Tripsin (Sigma-Aldrich), PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (PT. Muda Berkah), kertas saring, kertas perkamen, dan pakan tikus.

3.3.2 Alat

Berikut merupakan alat-alat yang digunakan dalam penelitian yaitu sarung tangan, timbangan analitik (Shimadzu ATY214R), *beaker glass* 500 ml; 100 ml; 50 ml (IWAKI), gelas ukur 100 ml; 50 ml; 10 ml (Pyrex), pipet tetes, *waterbath* (Memmert), *rotary evaporator* (RE-100 HN), cawan porselen (Pyrex), kaca arloji (Pyrex), corong kaca (Pyrex), corong pisah (Pyrex), botol kaca, spatula, batang pengaduk, *mixer* (Hoping Mixer), kotak propilena, oven (BIOBASE), alat *Textechno Favigraph* (Textechno H. Stein 41066 Moenchengladbach) spektrofotometer FT-IR (Shimadzu Corporation Serial No.A24406000516), mikrometer sekrup, desikator (Duran), *climatic chamber* (Memmert), *biopsy punch* (RIBBEL), bisturi no. 11 (General Care), alkohol swab (Onemed), jangka sorong (Vernier Caliper), alat cukur rambut (KIMEI), dan kandang tikus.

3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi, dan Laboratorium Farmakologi Universitas Buana Perjuangan Karawang, serta Balai Besar Standarisasi dan Pelayanan Jasa Industri Tekstil, Bandung, Jawa Barat. Penelitian dilakukan selama 5 bulan terhitung dari bulan Januari s/d Mei 2025.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu tiga formulasi plester *film* fraksi etil asetat lidah mertua dengan konsentrasi F16,25%, F2=12,5%, F3=25%, kontrol negatif (plester *film* tanpa fraksi), dan kontrol positif yaitu Octadin Gel 0,1%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini meliputi skrining fitokimia, uji organoleptik, keseragaman bobot, uji ketebalan, uji kuat tarik dan perpanjangan putus, uji daya serap kelembapan, uji *swelling*, uji *degradability*, uji FTIR, dan uji efektivitas penyembuhan luka.

3.5.2 Definisi Operasional Variabel

Berdasarkan klasifikasi variabel di atas, maka definisi operasional variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1.	Formulasi Plester Film Fraksi Etil Asetat Lidah Mertua	Formulasi Plester Film Fraksi Etil Asetat Lidah Mertua Untuk Penyembuhan luka sayat	Uji organoleptik, keseragaman bobot, ketebalan, kuat tarik dan perpanjangan putus, daya serap kelembapan, swelling, degradability, dan FTIR.	Nominal	F0=0%; F1=6,25%; F2=12,5%; F3=25%
Variabel Terikat					
1.	Skrining Fitokimia	Pengujian meliputi uji alkaloid, polifenol, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid	Tabung reaksi	Nominal	Warna yang dihasilkan
2.	Pengujian Organoleptik Warna	Pengujian warna plester fraksi etil	Pancaindra	Ordinal	1 : Bening 2 : Hijau

		asetat lidah mertua			3 : Hijau Kehitaman
	Bentuk	Pengujian bentuk plester <i>film</i> fraksi etil asetat lidah mertua	Pancaindra	Ordinal	1 : Padat 2 : Setengah Padat
	Bau	Pengujian bau plester <i>film</i> fraksi etil asetat lidah mertua	Pancaindra	Ordinal	1 : Bau khas fraksi 2 : Tidak berbau
	Tekstur	Pengujian tekstur plester <i>film</i> fraksi etil asetat lidah mertua	Pancaindra	Ordinal	1 : Halus 2 : Tidak Halus
3.	Uji Keseragaman Bobot	Pemeriksaan berat rata-rata plester <i>film</i> dan standar deviasinya.	Timbangan Analitik	Rasio	$\pm SD$ yang baik $\leq 0,05$ (Nitiariksa & Iskandar, 2021).
4.	Uji Ketebalan	Pengukuran ketebalan satu persatu dari tiap plester <i>film</i> .	Mikrometer sekrup	Rasio	Rata-rata ≤ 1 mm (Purwasih <i>et al.</i> , 2023).
5.	Uji Kuat Tarik dan Perpanjangan Putus	Penentuan nilai kuat tarik dan elastisitas plester <i>film</i> .	Alat <i>Tensile</i> <i>Strength</i>	Rasio	Kuat tarik $>$ 1 MPa dan perpanjangan putus $>10\%$

					(Sulastri <i>et al.</i> , 2021).
6.	Uji Daya Serap Kelembapan	Pemantauan kemampuan serap lembap pada plester <i>film</i>	Desikator dan <i>Climatic chamber</i>	Rasio	<10% (Purwasih <i>et al.</i> , 2023).
7.	Uji <i>Swelling</i>	Pemantauan kemampuan pengembangan plester <i>film</i> .	Timbangan Analitik	Rasio	200-500% (Fadiana & Haryanto, 2021).
7.	Uji <i>Degradability</i>	Evaluasi efek bahan kimia dan enzim dalam degradasi plester <i>film</i> .	Timbangan Analitik	Rasio	Persentase perubahan berat plester
8.	Uji FTIR	Mendeteksi gugus fungsi senyawa dari sampel yang dianalisis.	Spektrofotometer IR	Nominal	Gugus fungsi asam galat (-OH) dan (-COOH)
10.	Pengujian pengukuran efek penyembuhan luka.	Pemantauan efektivitas plester <i>film</i> fraksi lidah mertua dalam penyembuhan luka sayat	Jangka sorong	Rasio	Persentase Luas penutupan luka (Yuniarsih, <i>et al.</i> , 2023)

3.6 Formulasi Plester *Film*

Formulasi plester *film* ini mengacu pada penelitian Wathoni *et al.*, (2019) dan Aisha, (2024), sedangkan konsentrasi fraksi etil asetat lidah mertua dalam formula mengacu pada penelitian Yuniarsih *et al.*, (2023).

Tabel 3.2 Formulasi Plester *Film*

Nama Bahan		Fungsi	Formula (g/ml)				
			F1	F2	F3	Kontrol (-)	Kontrol (+)
Fraksi Asetat Mertua	Etil Lidah	Zat Aktif	3,125	6,25	12,5	-	Octadin Gel 0,1%
Kitosan		Agen pelapis	0,1	0,1	0,1	0,1	
Natrium Alginat		Agen penstabil	1	1	1	1	
Gliserin		Humektan	0,05	0,05	0,05	0,05	
Aquadest		Pelarut	Ad 50	Ad 50	Ad 50	Ad 50	

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Jatinangoriense, Laboratorium Biosistemika dan Molekuler, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjajaran. Determinasi tanaman adalah tahap awal yang dilakukan sebelum menuju tahap lebih lanjut pada proses penelitian. Tahap ini merupakan proses dalam menentukan nama/jenis tumbuhan secara spesifik. Tujuannya adalah untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman tersebut, apakah tanaman tersebut benar-benar tanaman yang diinginkan sehingga kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti dapat dihindari (Sani *et al.*, 2023).

3.7.2 Tahap Persiapan Sampel

Daun lidah mertua didapatkan dari Balai Penelitian Obat dan Aromatik (BALITRO), Bogor, Jawa Barat. Daun lidah mertua yang dipilih dalam kondisi segar, tidak kering, dan tidak rusak.

3.7.3 Pembuatan Simplisia

Pembuatan serbuk simplisia dengan cara daun lidah mertua dicuci bersih di bawah air mengalir, ditiriskan, dirajang kecil dan ditimbang berat. Potongan dari tanaman lidah mertua dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 45°C selama 48 jam, lalu ditimbang berat keringnya. Setelah itu dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan 100 mesh sehingga diperoleh serbuk simplisia yang lebih halus (Paramastri & Qurrohman, 2022).

3.7.4 Ekstraksi Lidah Mertua

Ekstraksi dilakukan pada serbuk kering simplisia daun lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* Prain) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, kemudian didiamkan selama 24 jam. Lakukan pengulangan proses ekstraksi sebanyak tiga kali. Filtrat yang didapatkan ditampung dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C sehingga dihasilkan ekstrak kental (Peratiwi *et al.*, 2023). Hasil ekstrak kental kemudian dihitung menggunakan rumus rendemen pada persamaan (1) :

$$\% \text{ Rendemen Esktrak} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

3.7.5 Fraksinasi Lidah Mertua

Fraksinasi awal dilakukan dengan cara Ekstraksi Cair-Cair (ECC). Ekstrak kental yang sudah diperoleh kemudian ditimbang, dilarutkan dengan aquadest. Setelah itu masukkan larutan ekstrak ke dalam corong pisah dan tambahkan pelarut n-heksana dengan perbandingan volume 1:1. Kemudian di fraksinasi dengan mengocok corong pisah, sambil sesekali membuka keran penutup untuk mengeluarkan gas. Fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana dilakukan sebanyak tiga kali hingga fraksi n-heksana berwarna bening. Setelah didapatkan dua fraksi yang berbeda yaitu fraksi n-heksana dan fraksi air, fraksi air di partisi kembali

menggunakan pelarut etil asetat dengan jumlah dan perbandingan yang sama yaitu 1:1. Fraksinasi dilakukan sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah. Kemudian fraksi etil asetat dan fraksi air dipisahkan. Selanjutnya fraksi etil asetat dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh fraksi kental (Peratiwi *et al.*, 2023). Hasil fraksi kental kemudian dihitung menggunakan rumus rendemen pada persamaan (2) :

$$\% \text{ Rendemen Fraksi} = \frac{\text{Berat Fraksi Kental}}{\text{Berat Ekstrak Kental}} \times 100\% \quad (2)$$

3.7.6 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam lidah mertua melalui beberapa uji sebagai berikut:

1. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menyiapkan sebanyak 0,5 g fraksi ditambahkan ke dalam campuran 1 mL HCl 2N dan 9 mL aquadest, campuran tersebut dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang disaring digunakan untuk menganalisis senyawa alkaloid, masing-masing 0,5 ml ditempatkan dalam 3 tabung reaksi dengan pereaksi yang berbeda (Nurfirzatulloh, 2024).

- a. Pada tabung pertama, ditambahkan pereaksi mayer, sampel akan terbentuk endapan putih atau kuning menunjukkan adanya alkaloid.
- b. Pada tabung kedua, ditambahkan pereaksi dragendorff, sampel akan terbentuk endapan kuning atau jingga kecoklatan menunjukkan adanya senyawa alkaloid.
- c. Pada tabung ketiga, digunakan sebagai blanko.

2. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 g fraksi dilarutkan dengan 5 mL aquadest, lalu dipanaskan selama 5 menit dan saring. Filtrat kemudian dicampur dengan 0,1 g serbuk mg, 1 mL HCl pekat, dan 2 ml amil alkohol, lalu dikocok. Apabila terdapat flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga (Barus *et al.*, 2021).

3. Uji Polifenol

Uji polifenol dilakukan dengan cara 0,5 g fraksi dilarutkan dengan aquadest dan dididihkan selama 5 menit, lalu disaring. Filtrat ditambah FeCl_3 1%, jika terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan positif mengandung polifenol (Azzahrah *et al.*, 2019).

4. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan sebanyak 0,5 g fraksi dilarutkan dalam 10 mL aquadest lalu ditambahkan dengan 1 mL FeCl_3 10%. Apabila terbentuk warna biru tua, biru kehitaman, atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Nurfirzatulloh, 2024).

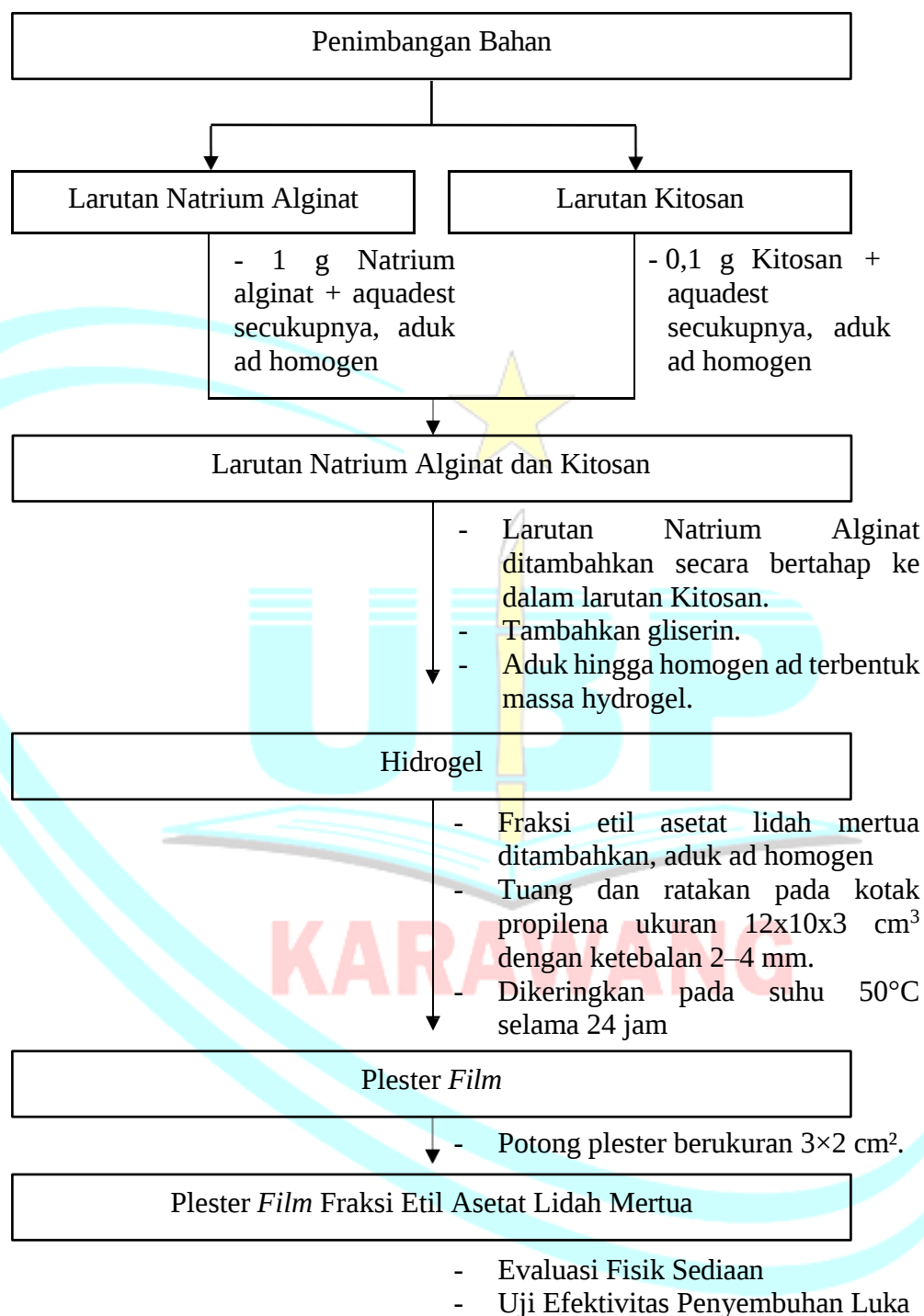
5. Uji Saponin

Pengujian dilakukan dengan mencampur 0,5 g fraksi lidah mertua dengan 5 mL aquadest, lalu dikocok sekitar 1 menit. Busa menunjukkan hasil positif (Firdaus, 2022). Apabila terdapat saponin jika terbentuk busa yang stabil setidaknya selama 10 menit dengan tinggi busa 1 - 10 cm (Nurfirzatulloh, 2024).

6. Uji Triterpenoid dan Steroid

Uji Triterpenoid dan Steroid dilakukan dengan cara pereaksi Libermann-Buchard ditambahkan ke dalam fraksi etil asetat lidah mertua. Terbentuknya warna merah atau ungu menunjukkan adanya kandungan triterpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau atau biru menunjukkan adanya steroid (Firdaus, 2022).

3.7.7 Prosedur Pembuatan Plester *Film* Fraksi Etil Asetat Lidah Mertua



Gambar 3. 1 Prosedur Pembuatan Plester *Film* Fraksi Etil Asetat Lidah Mertua

3.7.8 Uji Evaluasi Fisik

Uji evaluasi fisik sediaan yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan secara visual dan dilihat secara langsung menggunakan pancaindra, dengan melakukan pengamatan terhadap perubahan yang meliputi bentuk, warna, bau dan tekstur pada sediaan (Purwasih *et al.*, 2023).

2. Uji Keseragaman Bobot

Pengujian keseragaman bobot bertujuan untuk mengetahui apakah sediaan plester hidrogel yang dibuat memiliki bobot yang seragam atau tidak. Prosedur ini dilakukan dengan menimbang masing-masing tiga sampel dari setiap formula menggunakan timbangan analitik, kemudian menghitung nilai rata-rata dan standar deviasinya (Purwasih *et al.*, 2023). Hasil pengukuran keseragaman bobot setiap formula memenuhi syarat standar deviasi yang baik, yaitu $\leq 0,05$ (Nitiariksa & Iskandar, 2021).

3. Uji Ketebalan

Pengujian ketebalan bertujuan untuk mengukur tingkat ketebalan dari plester *film* pada tiap formula. Pengukuran tebal plester dilakukan pada 5 titik yang berbeda yaitu bagian atas, bawah, kanan, kiri dan tengah (Yousefa *et al.*, 2022). Pengukuran menggunakan alat mikrometer sekrup (ketelitian 0,01 mm) kemudian dirata-rata dan dicari standar deviasinya. Ketebalan sediaan dikatakan baik apabila ketebalannya kurang dari 1 mm (Purwasih *et al.*, 2023).

4. Uji Kuat Tarik dan Perpanjangan Putus

Uji kuat tarik dan perpanjangan putus bertujuan untuk mengetahui tarikan maksimum yang dicapai agar plester tetap bertahan sebelum putus atau robek (Parubak & Herawati, 2022). Pengujian ini dilakukan menggunakan alat uji *tensile strength* tipe *Textechno Favigraph*. Tahap awal meliputi pemotongan sampel dengan ukuran 30×3 mm, kemudian dilakukan pengaturan alat dengan kecepatan penarikan 5 mm/menit, jarak antar penjepit 10 mm, tegangan awal 0,10 cN/tex, dan densitas linear sebesar 1,00 den. Sampel dipasang pada alat uji dengan cara dijepit antara dua klip, lalu proses dimulai dengan menekan tombol

start. Sampel akan ditarik secara otomatis hingga terputus. Nilai kekuatan tarik dan perpanjangan putus pada saat plester mengalami kerusakan atau robek tercatat dan ditampilkan pada layar secara bertahap selama pengujian berlangsung. Setiap pengujian dilakukan sebanyak lima kali. Kemudian, hasilnya dihitung dengan rumus kuat tarik. Kekuatan tarik dihitung dengan menggunakan persamaan (3) :

$$\text{Kekuatan tarik (MPa)} = \frac{p}{(b \times d)} \quad (3)$$

Keterangan :

p = gaya putus (gaya yang diperlukan sampel untuk pecah),

b = lebar sampel

d = tebal sampel.

Nilai kekuatan tarik pada pembalut luka (*wound dressing*) yang direkomendasikan adalah >1 MPa dan perpanjangan putus >10% (Sulastri *et al.*, 2021). Standar mekanik kulit untuk tendon memiliki nilai kuat tarik antara 5-15 MPa, sedangkan standar mekanik kulit untuk tumit memiliki nilai kuat tarik antara 0,3-25 MPa (Parubak & Herawati, 2022).

5. Uji Daya Serap Kelembaban

Daya serap kelembaban merupakan salah satu parameter untuk menentukan kemampuan sebuah plester *film* dalam menyerap lembab dari lingkungan. Plester *film* yang telah disimpan pada suhu ruang dalam desikator selama 24 jam ditimbang terlebih dahulu sebagai berat awal, selanjutnya dipaparkan pada suhu 40°C di dalam *climatic chamber* selama 24 jam dan ditimbang kembali sebagai berat akhir. Persen daya serap kelembaban dihitung menggunakan persamaan (4) :

$$\% \text{ Kelembapan} = \frac{\text{Bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{Bobot awal}} \times 100\% \quad (4)$$

Adapun daya serap kelembaban yang baik pada plester *film* sebaiknya memenuhi persyaratan yaitu <10% (Purwasih *et al.*, 2023).

6. Uji Swelling

Uji *swelling* bertujuan untuk menentukan kemampuan penyerapan cairan pada sediaan plester *film* dengan cara ditimbang dan direndam dalam PBS

(*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4 hingga benar-benar mengembang, dan timbang sebagai berat awal. Plester *film* kemudian dikeringkan hingga keadaan konstan sebagai berat akhir (Wathoni *et al.*, 2019). Uji ini dihitung menggunakan persamaan (5) :

$$\text{Uji Swelling} = \frac{\text{Berat akhir} - \text{Berat awal}}{\text{Berat awal}} \times 100\% \quad (5)$$

Menurut Fadiana & Haryanto (2021), nilai *swelling* yang dapat digunakan untuk aplikasi pembalut luka antara 200-500%.

7. Uji *Degradability*

Menurut Wathoni *et al.*, (2019), pengujian *degradability* bertujuan untuk mengevaluasi kemampuan urai atau degradasi suatu sediaan setelah dipengaruhi oleh bahan kimia maupun enzim. Uji dilakukan dengan cara plester *film* ditimbang sebagai berat awal, lalu direndam dalam 2 mL larutan TCA 20% yang didiamkan selama 24 jam. Setelah itu, larutan TCA 20% dibuang dan plester *film* ditimbang lagi hingga berat konstan (berat akhir). Uji *degradability* dengan larutan tripsin juga dilakukan dengan prosedur yang sama. Persentase perubahan berat dihitung menggunakan persamaan (6) :

$$\% \text{ Perubahan Berat} = 100 - \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\% \quad (6)$$

Dalam penelitian (Wathoni *et al.*, 2019) diketahui bahwa standar *degradability* yang baik yaitu terlihat dari kemampuan sediaan yang dapat terurai secara efektif dalam kondisi yang diuji.

8. Uji *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR)

Pengujian FTIR bertujuan untuk mengidentifikasi gugus fungsi spesifik pada suatu senyawa (Sanjiwani *et al.*, 2020). Pengujian dilakukan tanpa perlu mencampurkan sampel dengan KBr, sampel dapat langsung diletakkan di atas pelat sampling pada jendela optik, lalu ditekan menggunakan penjepit bertekanan yang dikontrol dengan mikrometer guna memastikan kontak optimal pada sampel (Sulistyani, 2018). Karakterisasi terhadap kepingan sampel disinari dan dianalisis menggunakan Spektrofotometer FT-IR dengan resolusi 4 cm^{-1} pada rentang Panjang gelombang $400\text{--}4.000 \text{ cm}^{-1}$ hingga diperoleh spektra tiap sampel (Alkandahri *et al.*, 2024).

3.7.9 Uji Efek Penyembuhan Luka Sayat menggunakan Plester *Film Fraksi Etil Asetat Lidah Mertua*

1. Pengajuan Kode Etik

Pengajuan kode etik penelitian akan dilakukan melalui Komisi Etik Penelitian Kesehatan Institut Kesehatan Immanuel (IKI) Bandung, Jawa Barat. Pengajuan kode etik penting dilakukan untuk menjaga integritas profesi peneliti, meningkatkan kualitas penelitian, serta menjadi bentuk tanggung jawab peneliti dalam menghormati prinsip-prinsip dasar etika penelitian (Lestari *et al.*, 2021).

2. Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* dengan umur $\pm$ 2-3 bulan, sehat dan memiliki berat badan sekitar 150-250 g (Angreani *et al.*, 2020). Tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok perlakuan F1, F2, F3, kontrol positif, dan kontrol negatif (Ervianingsih *et al.*, 2020). Populasi tersebut ditentukan berdasarkan rumus Federer. Rumus federer adalah rumus yang digunakan dalam jenis penelitian eksperimental yang digunakan untuk mengetahui jumlah subjek penelitian, perhitungan menggunakan persamaan (7) :

$$\text{Rumus Federer} = (n-1) (t-1) \geq 15 \quad (7)$$

Keterangan :

n : banyak populasi setiap kelompok

t : jumlah kelompok

Maka banyaknya populasi yang diperlukan yaitu :

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

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

$$(n-1) \geq \frac{15}{4}$$

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

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

$$n \geq 5$$

Maka, pada penelitian ini akan menggunakan 5 ekor hewan uji pada masing-masing kelompok. Sehingga jumlah populasi yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 25 ekor tikus putih jantan galur *Sprague Dawley*.

3. Pengujian Terhadap Hewan Uji

Tikus digunakan untuk menguji proses penyembuhan luka sayat dengan cara mencukur bulu tikus pada daerah punggung menggunakan alat cukur rambut sampai didapat kulit bersih halus dan bebas rambut. Sebelum dilukai tikus dianastesi terlebih dahulu, menggunakan lidocaine krim (Dolones® krim) secara topikal untuk anastesi lokal, kemudian pada bagian punggung yang berjarak 5 cm dari telinga, dibuat sayatan sebesar 1 cm dengan kedalaman menembus otot sejajar dengan tulang belakang menggunakan *biopsy punch* (Yuniarsih *et al.*, 2023). Adapun digunakan 25 ekor tikus yang dibagi menjadi beberapa kelompok dan dilakukan pengujian sebagai berikut:

Kelompok 1: luka ditempelkan plester *film* fraksi etil asetat lidah mertua 6,25%

Kelompok 2: luka ditempelkan plester *film* fraksi etil asetat lidah mertua 12,5%

Kelompok 3: luka ditempelkan plester *film* fraksi etil asetat lidah mertua 25%

Kelompok 4: luka ditempelkan plester *film* tanpa fraksi etil asetat lidah mertua.

Kelompok 5 : luka ditempelkan plester kontrol positif (Octadin Gel 0,1%)

Perlakuan dari semua kelompok dilakukan setiap hari selama 16 hari (Yuniarsih *et al.*, 2023).

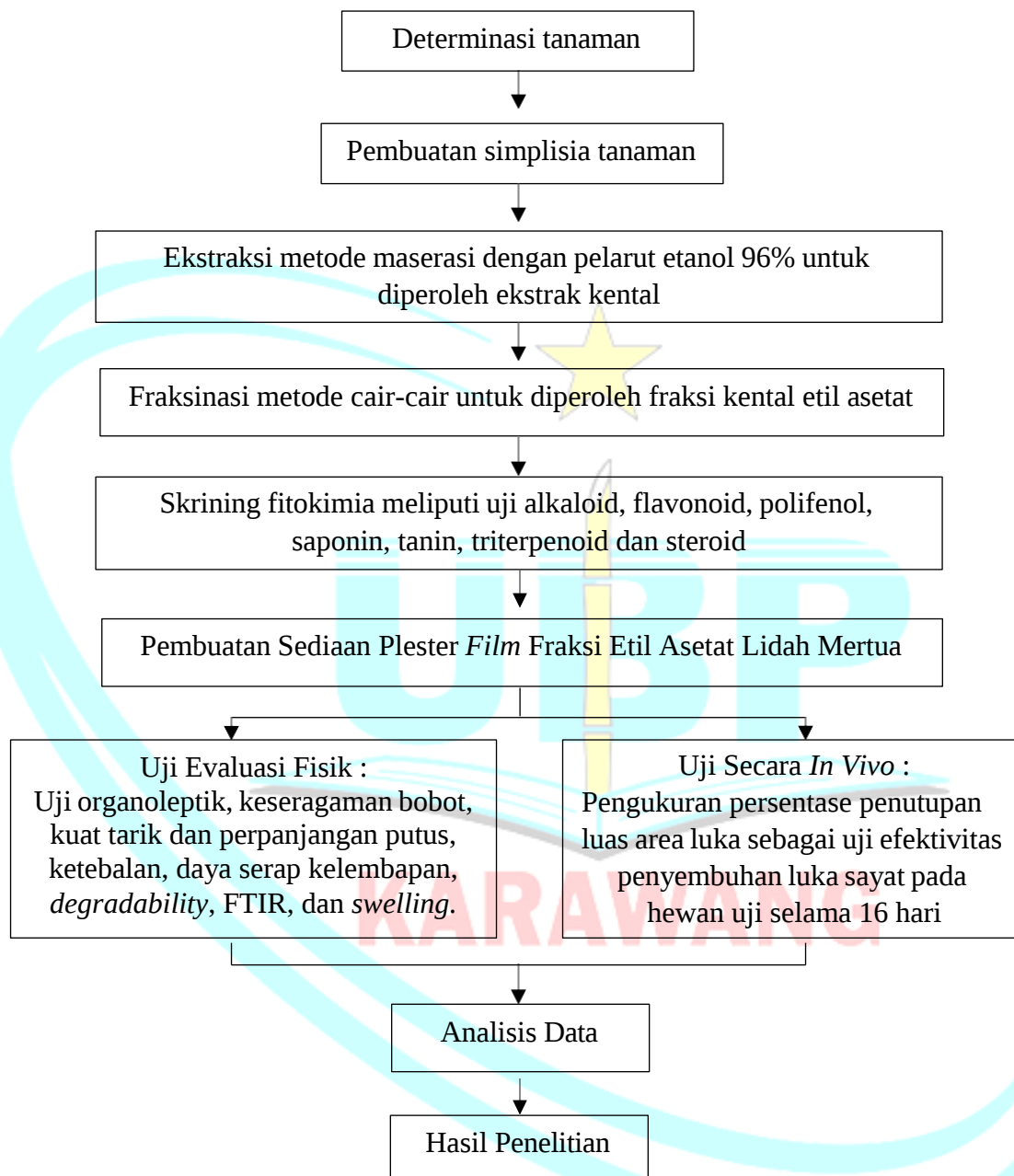
4. Pengukuran Efek Penyembuhan Luka

Pengukuran efek penyembuhan luka ditentukan berdasarkan penutupan luas area luka selama periode pengamatan penutupan luka. Pengamatan diameter luka dilakukan pada setiap kelompok perlakuan pada hari ke- 0, 2, 4, 8, dan 16. Persentase penutupan luas area luka ditentukan dengan mengukur diameter rata-rata pada arah vertikal, horizontal, dan diagonal menggunakan jangka sorong (Yuniarsih *et al.*, 2023). Hasil yang diperoleh kemudian dihitung dengan persamaan (8) :

$$\% \text{ Luas penutupan luka} = \frac{\text{Luas luka hari ke 0} - \text{Luas luka hari ke (n)}}{\text{luas luka hari ke 0}} \times 100\% \quad (8)$$

3.8 Diagram Alir Penelitian

Adapun diagram alir penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :



Gambar 3. 2 Diagram Alir Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data statistik ditujukan untuk evaluasi fisik sediaan dan efektivitas penyembuhan luka secara *in vivo*. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan program *GraphPad Prism* versi 10.4.2.633 dengan metode *One-way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok. Jika ditemukan perbedaan signifikan, dilanjutkan dengan uji *Dunnett's Multiple Comparisons*, dengan kelompok F0 (kontrol negatif) sebagai pembanding, guna menentukan kelompok mana yang menunjukkan perbedaan bermakna. Data yang sudah diolah, kemudian diinterpretasikan dalam bentuk tabel dan grafik.

3.10 Jadwal Kegiatan

Berikut merupakan jadwal kegiatan penelitian yang dilakukan :

Tabel 3.3 Jadwal Kegiatan Penelitian

Kegiatan	Bulan Ke-				
	1	2	3	4	5
Studi Literatur					
Penulisan Proposal					
Seminar Proposal					
Pelaksanaan Penelitian					
Pengolahan dan Analisis Data					
Penulisan Laporan atau Publikasi					