

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Universitas An Nuur di Purwodadi. Dimulai pada bulan April hingga Juni 2023. Pengujian ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Kecamatan Tawangmangu, Kota Karanganyar.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk kedalam penelitian eksperimen untuk menguji ekstrak etanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L.), dimana ekstrak tersebut diperoleh dari ekstrak maserasi, sedangkan ekstrak kental diperoleh dengan pengujian konsentrasi senyawa kimia. Dalam desain penelitian, subjek akan secara acak dikelompokkan sebagai acuan dalam keadaan fisiologis yang sama.

Hewan uji yang digunakan adalah tiga ekor kelinci *New Zealand*. Sebelum dilakukan uji, hewan di adaptasikan selama 5 hari untuk melatih hidup dan perlakuan di lingkungan yang baru. Sebelum penyayatan, punggung kelinci dipangkas bulunya hingga halus. Area yang dicukur dibersihkan dengan alkohol 70% dan dibiarkan semalam atau 24 jam. Keesokan harinya, setiap bagian yang ditandai disayat dengan pisau bedah sepanjang 3 cm dan kedalaman \pm 0,2 cm, dan pisau bedah yang diukur diberi tanda.

Pengujian aktivitas penyembuhan luka dari ekstrak etanol daun belimbing manis dengan konsentrasi (F1 : 25%, F2 : 50%, F3 : 75% F4 : Kontrol Negatif, F5 : Kontrol Positif) dilakukan dengan cara mengoleskan obat langsung pada setiap area luka dengan *cotton bud* setiap pagi dan sore hari. Kontrol negatif dilakukan, yaitu tidak

diberikan ekstrak daun belimbing pada kelinci, *sedangkan povidone-iodine* 10% digunakan sebagai kontrol positif. Penyembuhan luka diamati sekali sehari selama 2 minggu (14 hari). Pengamatan dilakukan sampai ditentukan luka sudah sembuh dalam waktu 2 minggu (14 hari) dengan pengamatan makroskopis yaitu: panjang luka dalam satuan (cm).

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang menjadi obyek penelitian ini adalah daun belimbing manis yang diperoleh dari wisata pertanian di Desa Tarub Kecamatan Tawangharjo Kabupaten Grobogan. Sampel yang dipakai dalam penelitian ini terdiri dari daun segar yang dipilih secara *purposive sampling*, tidak terlalu muda, tidak terlalu tua, hijau dan tidak berlubang.

D. Identifikasi Variable Penelitian

1. Variabel bebas adalah variable yang berpengaruh atau dapat menjadi sebab berubahnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak daun belimbing 25%, 50%, 75% *povidone-iodine* 10%.
2. Variabel terikat adalah titik pusat masalah yang menjadi kriteria penelitian. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah penyembuhan luka dan indikator panjang luka serta kondisi luka.
3. Variabel kontrol, variabel yang diatur yang dapat mempengaruhi variabel dependen. Maka dari itu agar hasil yang diperoleh tidak gagal mereka harus dinetralkan atau disempurnakan dan dengan cepat dapat diperbanyak oleh peneliti lain. Variabel kontrol pada penelitian ini adalah jenis kelamin, umur, jenis pakan, daya tahan tubuh kelinci dan ukuran kandang.

E. Definisi Operasional Variable

1. Daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L.) yang didapatkan dari Tarub, Kecamatan Tawangharjo, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah dalam keadaan segar, dalam keadaan bebas dari penyakit yang di ambil daunnya.
2. Serbuk daun belimbing manis yang diperoleh dari hasil pengeringan menggunakan oven dan pengayakan.
3. Ekstrak etanol dari daun belimbing manis diperoleh dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% yang dipekatkan pada suhu 60°C.
4. Pembuatan variasi ekstrak etanol daun belimbing manis konsentrasi 25%, 50%, 75% dan *Povidone Iodine* 10%.
5. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci *New Zealand*.
6. Uji aktivitas penyembuhan luka sayat pada ekstrak etanol daun belimbing manis untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun belimbing manis terhadap panjang luka sayat.
7. Luka sayat merupakan luka yang termasuk kedalam katogori luka yang sulit sembuh karena adanya gangguan pada pembekuan darah. Luka yang dijadikan sampel penelitian adalah luka sayat yang disayat dengan menggunakan alat pisau bisturi steril dengan panjang luka 2 cm dan kedalaman luka 0,2 cm pada kelinci *New Zealand*.

F. Alat dan Bahan

1) Alat

Alat penelitian yang digunakan pisau, blender, ayakan 40 mesh, botol dengan tutup gelap, kaca belakang, gelas ukur 10 mL, timbangan analitik, Erlemeyer, gelas ukur 100 mL, kertas saring, batang pengaduk, corong kaca, tabung reaksi, tempat tabung, penjepit tabung reaksi,

lampu UV-254, lampu UV-366 chamber, serbet, pipet, sendok, kain flanel, stopwatch, termometer, penangas air, toples kaca, batang pengaduk, timbangan rotary evaporator, gelas ukur, pipet, pisau bedah, pisau cukur, Pasteur, sangkar, pena, wadah makanan, kamera dan penggaris, pengering.

2) **Bahan**

Bahan penelitian yang digunakan adalah ekstrak daun belimbing 25%, etanol 50% 75%, etanol 70%, anestesi (eter), sarung tangan steril, *povidone iodine* 10%, tampon steril, kelinci *New Zealand*, air dan kelinci, HCl pekat, $FeCl_3$ 1%, etanol sulfat, metilsulfat, metilsulfat, metilsulfat, metilsulfat, $FeCl_3$ 1%. asam tic, amonia, HCl 2N, air panas, reagen *Lieberman-Burchard*, reagen *Mayer*, reagen *Wagner*, reagen *Dragendorf*, saponin, DMSO dan asam galat.

G. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tahap awal penelitian ini adalah penentuan daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L.) yang dilakukan di laboratorium Balai Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di Kecamatan Tawangmangu Kota Karanganyar. Tujuannya untuk mengetahui kebenaran tanaman dan menghindari kesalahan dalam pengambilan bahan. Hal ini berkaitan dengan ciri-ciri morfoligis yang ada pada tanaman tersebut.

2. Pengambilan Daun Belimbing Manis

Sampel daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L.) segar, didapat dari daerah Tarub Tawangharjo, Jawa Tengah. Pengambilan daun belimbing manis dilakukan dengan memetik bagian daun dewasa yaitu daun yang tidak muda dan tidak terlalu tua. Daun yang masih segar, tidak berlubang, diambil dan dipetik di waktu pagi hari.

3. Pengeringan Daun Belimbing Manis

Keringkan daun belimbing menggunakan oven dengan suhu 55°C hingga mengering. Pengovenan ini dilakukan di laboratorium Universitas An Nuur Purwodadi.

4. Pembuatan Serbuk Daun Belimbing

Daun belimbing manis yang sudah kering selanjutnya haluskan dengan blender yang berada di laboratorium Universitas An Nuur Purwodadi. Serbuk daun belimbing manis selanjutnya diayak dengan nomor pengayak 40. Simpan hasil serbuk daun belimbing manis kering dalam plastik berukuran besar.

5. Uji Susut Pengeringan

Alat *moisture balance* digunakan untuk penetapan susut pengeringan. Caranya, serbuk daun belimbing manis ditimbang sebanyak 2 gram, setelah itu dimasukkan kedalam alat. Aktifkan alat kemudian tunggu sampai layer menunjukan angka penurunan berat sampel. Munculnya bunyi tertentu menandakan bahwa pengukuran telah berhenti. Kemudian untuk mengetahui persentase kandungan lembab di tekan tombol (%) (DepKes RI, 2000).

6. Pembuatan Ekstrak Daun Belimbing

Ekstrak daun belimbing manis dengan metode ekstraksi dengan menimbang 500 gram serbuk daun belimbing, kemudian merendam serbuk tersebut dalam pelarut etanol 70% dengan perbandingan (1:10) yaitu hingga 5000 mL. Waktu perendaman berlangsung selama 24 jam, yaitu 6 jam pertama aduk sesekali, lalu diamkan selama 18 jam lalu saring. Filtrat pertama digunakan kembali untuk perendaman kedua dengan 2500 mL pelarut etanol 70%, setelah itu hasil ekstraksi ditampung. Hasil ekstraksi kemudian dipekatkan pada suhu 60°C dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental dengan berat tetap. Timbang ekstrak pekat daun belimbing (Kemenkes RI, 2017).

7. Uji Bebas Etanol

Masukan 2 tetes ekstrak kedalam tabung reaksi dan tambahkan 3 tetes H_2SO_4 pekat dan asam asetat (CH_3COOH) serta dipanaskan, perubahan yang perlu diamati adalah bau, jika berbau ester maka ekstrak masih mengandung etanol, tetapi jika baunya khas ekstrak maka ekstrak tidak mengandung etanol (Afikoh; Nurcahyo 2017).

8. Skrining Fitokimia

a. Uji Skrining Fitokimia Ekstrak

1) Uji Alkaloid

2 gram ekstrak diambil dan dimasukan kedalam tabung reaksi kemudian tambahkan HCl 1% lalu saring. Bagi filtrat menjadi tiga masing-masing pada tabung reaksi yang berbeda kemudian diuji dengan beberapa tetes pereaksi *Mayer*, *Wagner* dan *Dragendorff*. Reaksi positif alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan kuning sedangkan muncul warna putih dengan pereaksi *Mayer*. Penambahan pereaksi *Wagner* ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat kemerahan. Meskipun terdapat endapan jingga saat penambahan pereaksi *Dragendorff*, hasilnya positif mengandung alkaloid (Fatmawati, 2019).

2) Uji Flavonoid

2 gram dimasukan tabung reaksi, selanjutnya penambahan serbuk Mg dan larutan HCl pekat. Perubahan warna larutan menjadi merah bata menunjukkan adanya kandungan flavanoid (Devi Novia; Agung Giri Samudra 2020).

3) Uji Saponin

Ekstrak 2 gram dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan 2 ml etanol 96%, diaduk dan tambah lagi dengan 20ml aquadest dan dikocok kuat kemudian amati selama 15-20 menit. Jika ada busa yang stabil pada ekstrak menunjukkan ekstrak tersebut mengandung sapoinin (Muryanto *et al.*, 2020).

4) Uji Tanin

Ekstrak sebanyak 2 gram dimasukan dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan 2 ml etanol 96% dan diaduk, ditambah FeCl_3 sebanyak 3 tetes. Adanya tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru karakteristik, biru–hitam, hijau atau hijau–hitam (Fadel *et al.*, 2021)

b. Uji Penegasan Menggunakan KLT (Devi Novia; Agung Giri Samudra 2020).

Dalam skrining ini silica gel GF254 6,5 x 3 cm digunakan sebagai fase diam dan penampak noda digunakan sebagai fase gerak adalah sebagai berikut:

1) Identifikasi Senyawa Golongan Alkaloid

Fase gerak : Etil asetat metanol-air (6:4:2).
 Pembanding : Piperin (Yanty *et al.*, 2019)
 Penampak noda : *Dragendorf*
 Hasil : Bercak berwarna kuning pada UV 254 dan hijau kekuningan pada UV 366 (Fajrin and Susila 2019). Bercak berwarna hijau setelah disemprot dengan pereaksi *dragendorf*.

2) Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid

Fase gerak : n-butanol: asam asetat: air (4:1:5)
 Pembanding : Kuersetin (Yuliani, 2021)
 Penampak noda : Amonia
 Hasil : Noda bercak berwarna hitam pada UV 254 (Zaki, 2013) dan berwarna biru pada UV 366 (La *et al.* 2021). Bercak berwarna biru

setelah di semprot dengan amonia.

3) Identifikasi Senyawa Golongan Saponin

Fase gerak : Kloroform : metanol : air (10:7:4)

Pembanding : Sapogenin

Penampak noda : *Lieberman Bouchard*

Hasil : Bercak berwarna hijau pada UV 255 (Devi Novia, Agung Giri Samudra 2020) dan berwarna hijau pada UV 366 (Zaini and Shofia 2020). Bercak berwarna kekuningan setelah disemprot *Lieberman Bouchard*.

4) Identifikasi Senyawa Golongan Tanin

Fase Gerak : Metanol : Etil asetat (6:4).

Baku pembanding : Katekin

Penampak noda : pereaksi FeCl_3

Hasil : Bercak berwarna hitam pada UV 254 & UV 366 (nandasari dewi, 2020). Bercak berwarna ungu atau hitam setelah disemprot FeCl_3 .

Setelah itu masing-masing di jenuhkan dalam chamber. Lalu chamber dijenuhkan dengan kertas saring setelah jenuh silika GF 254 yang sudah ditotol dimasukkan kedalam chamber, lalu noda ditunggu naik sampai pada batas atas yang sudah diberi garis kemudian plat diambil dan diamati hasil bercak noda dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Nilai Rf dan Harga Rf dihitung dari bercak yang didapat. Untuk menghitung harga

Rf caranya menggunakan perbandingan persamaan sebagai berikut (Gandjar dan Rohman, 2012).

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh zat yang diteliti}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Kemudian fase gerak disemprot menggunakan pereaksi semprot yaitu pereaksi amonia untuk golongan Flavonoid, penyemprotan pereaksi *Dragendorff* untuk golongan alkaloid, reaksi *Lieberman burchard* untuk deteksi golongan saponin, dan penyemprotan reaksi $FeCl_3$ untuk deteksi golongan tanin.

9. Pembuatan Variasi Kadar Ekstrak

Variasi konsentrasi ekstrak akan diturunkan dan ditingkatkan untuk mencapai perbandingan konsentrasi ekstrak yang paling efektif dalam penyembuhan luka. Kemudian, konsentrasi kadar ekstrak dilakukan dengan pengenceran dalam larutan menggunakan DMSO (20 mL) sebagai pelarut kemudian dibuat rangkaian kadar ekstrak 25% (5 gram/20 mL), 50% (10 gram/20 mL) dan 75% (15 gram/20 mL) dalam pelarut tersebut.

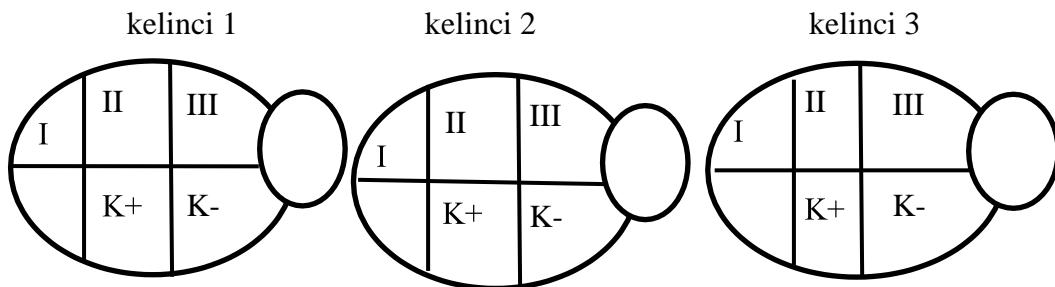
10. Perlukaan Pada Kelinci

Kelinci *New Zealand* sebanyak 3 ekor diacak kemudian ditempatkan di kandang terpisah berdasarkan kelompok perlakuan. 1 hari disesuaikan dan pada hari kedua perawatan dilakukan. Cukur rambut di sekitar area yang terluka dan bersihkan dengan kapas alkohol 70%.

Setelah kelinci dibius, dibuat 5 sayatan di bagian punggung dengan menggunakan lapisan subkubik dengan panjang 2 cm dan dalam 0,2 cm, meregangkan kulit dengan telunjuk jari dan ibu jari pada bagian tangan kiri sebagai ekstender dan di bawah tekanan. Luka ini menimbulkan luka derajat tiga, dimana kulit mulai dari dermis bagian bawah hingga jaringan subkutan menimbulkan kerusakan jaringan kulit (Fernandes, 2014).

Kelompok perlakuan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu:

- a. Kelompok kontrol negatif terdiri dari kelinci yang tidak diberi ekstrak daun belimbing
- b. Kelompok kontrol positif yaitu kelinci diberikan *povidone iodine* 10%
- c. Kelompok perlakuan I yaitu kelinci diberikan ekstrak daun belimbing 25%
- d. Kelompok perlakuan II yaitu kelinci diberikan ekstrak daun belimbing 50%
- e. Kelompok perlakuan III yaitu kelinci diberikan ekstrak daun belimbing 75%



Gabar 3. 1 Perlakuan Pada Kelinci

11. Pemberian Obat Luka Standar dan Ekstrak Daun Belimbing

Ekstrak daun belimbing manis dan *Povidone Iodine* 10% diberikan pada kelinci selama 14 hari setiap pagi dan sore. *Povidone Iodine* dan ekstrak daun belimbing manis di oleskan menggunakan *cotton bud* langsung pada luka sejak terjadinya luka yang dihitung sebagai hari ke-0 sampai hari ke-14.

12. Pengamatan Pada Luka

Pengamatan penyembuhan luka secara makroskopik yaitu: panjang luka dalam satuan cm. Diamati setiap harinya pada waktu pagi dan sore selama 2 minggu (14 hari).

H. Metode Analisis Data

Data pemantauan panjang luka sayat pada penelitian ini ditabulasikan dan disajikan secara deskriptif. Dalam memastikan hasil yang akurat, data dianalisis secara statistik menggunakan analisis SPSS, yaitu ANOVA. *Analysis of variance* (ANOVA) adalah teknik analisis statistik yang berguna untuk memisahkan rata-rata dari tiga atau lebih kelompok data dengan cara membandingkan varians. Analisis variasi masuk dalam kelas statistik parametrik. Untuk menggunakan rumus ANOVA sebagai alat statistik parametrik, asumsi seperti normalitas, heteroskedastisitas dan random sampling harus diuji terlebih dahulu (Ghozali, 2009). Uji normalitas dan uji homogenitas untuk melihat apakah data lolos uji Anova satu arah (*Analysis of Variance*). Jika $p>0.05$ maka data dinyatakan terdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya, data akan dianalisis *One-Way Anova* (*Analysis of Variance*) dan uji *post Hoc*. Dalam uji ANOVA jika nilai signifikansinya yang dihasilkan $p>0.05$, maka menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok (Harlan 2018). Apabila data tersebut tidak dapat terdistribusi normal maka akan dilanjutkan dengan non parametrik menggunakan uji *Man Withney*. Kemudian apabila $p<0,05$ maka terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan. Kemudian untuk melihat perbedaan kelompoknya maka dilanjutkan dengan uji *kruskal wallis*.

I. Skema Kerja

