

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Analisis Universitas An Nuur. Penelitian akan dilakukan pada Februari – Juli 2023. Determinasi dilakukan pada Februari 2023 yang berlokasi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat Tradisional (B2P2TOOT), Jl. Raya Lawu No. 11, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan cara pengujian kandungan senyawa zat aktif yang terdapat pada ekstrak daun alpukat, serta pengujian aktivitas sediaan krim dari ekstrak daun alpukat (*Persea americana mill*) terhadap luka pada kelinci (Sentat dkk, 2015).

C. Populasi, Sampel, Teknik Sampling

1. Populasi

Populasi dapat diartikan sebagai keseluruhan elemen dalam penelitian meliputi objek dan subjek dengan ciri-ciri dan karakteristik tertentu (Nur dkk, 2023). Populasi dalam penelitian ini adalah daun alpukat didapatkan dari Desa Lorog, RT 04 RW 01 Lerep, Kecamatan Ungaran Barata, Kabupaten Semarang, Provinsi Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian atau wakil yang memiliki karakteristik representasi dari populasi (Nur dkk, 2023), sehingga sampel dalam penelitian ini adalah tanaman alpukat (*Persea americana mill*) diambil daunnya yang masih segar dan berwarna hijau.

3. Teknik Sampling

Teknik sampling adalah sebuah metode atau cara yang dilakukan untuk menentukan jumlah dan anggota sampel. Setiap anggota tentu saja wakil dari populasi yang dipilih setelah dikelompokkan berdasarkan kesamaan karakter. Teknik sampling yang digunakan juga harus disesuaikan dengan tujuan dari penelitian (Karlingger, 1987).

Teknik yang digunakan dalam pengambilan sampel adalah purposive sampling merupakan pengambilan anggota sampel dari populasi dengan melakukannya kriteria-kriteria tertentu.

D. Identifikasi Variabel Penelitian

Marhaendro (2015), menyebut variable sebagai sebuah konsep misalnya perempuan dalam konsep jenis kelamin, pemalas dalam konsep sifat. Sedangkan Sutrisno Hadi mendefinisikan variabel sebagai gejala yang bervariasi

Variabel utama penelitian ini adalah sediaan krim ekstrak daun alpukat (*Persea americana mill.*) dengan pengujian mutu sediaan berupa uji homogenitas, uji pH, uji viskositas, uji organoleptik, uji daya lekat, daya sebar dan uji stabilitas. Klasifikasi variabel utama:

1. Variabel utama pada penelitian ini diklasifikasikan menjadi beberapa variabel, seperti variabel bebas, variabel terkendali, dan juga variabel tergantung.
2. Variabel bebas merupakan variabel yang dapat memberikan dampak pada variabel yang lain. Variabel bebas yang ada pada penelitian ini adalah variasi konsentarsi 20%, 35% dan 50% dalam krim ekstrak daun alpukat.
3. Variabel terkendali merupakan variabel yang dikendalikan agar tidak bisa berpengaruh terhadap variabel lain. Variabel terkendali yang ada pada penelitian ini adalah alat bahan yang dipakai, cara pembuatan sediaan lulur krim, dan kondisi laboratorium yang digunakan saat penelitian.

4. Variabel tergantung merupakan variabel yang bisa berubah dikarenakan pengaruh dari variabel bebas. Variabel tergantung yang ada pada penelitian ini adalah yaitu keefektifan dari ekstrak daun alpukat (*Persea americana mill.*) yang mampu sebagai antioksidan dengan variasi konsentrasi trietanolamin dan uji stabilitas fisik sediaan krim yaitu uji organoleptik, uji homogenitas, uji pH, uji viskositas, uji daya lekat, dan uji daya sebar.

E. Definisi Operasional Variabel

Definisi Operasional Variabel adalah seperangkat petunjuk yang lengkap tentang apa yang harus diamati dan mengukur suatu variabel atau konsep untuk menguji kesempurnaan. Definisi operasional variabel ditemukan item-item yang dituangkan dalam instrumen penelitian (Edie, 2016).

1. Konsentrasi ekstrak daun alpukat (*Persea americana mill*) yang didapatkan menggunakan cara ekstraksi.
2. Pembuatan ekstrak dan alpukat serbuk dimaserasi dengan pelarut etanol 70%.
3. Pengujian luka bakar terhadap kelinci
Analisis pengujian luka bakar terhadap kelinci dilakukan dengan cara melihat perubahan serta pemulihan pada kelinci, serta melihat formulasi yang memiliki aktivitas pengobatan luka bakar yang paling baik.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu alat-alat gelas standar laboratorium, Corong, pH meter universal, Timbangan digital (timbangan analitik), Blender, Pipet tetes, Cawan Porselin, Batang pengaduk, Pinset, Kertas saring, Kertas kassa, hot plate

2. Bahan

Bahan - bahan yang di gunakan dalam penelitian ini yaitu daun alpukat (*Persea americana mill*), Asam stearat, Trietanolamin, Gliserin, Setil Alkohol, Metil Paraben, Propil Paraben, Aqua destilata.

G. Jalannya Penelitian

1. Determinasi

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun alpukat (*Persea americana mill.*) yaitu dengan cara mencocokkan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman salam terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu.

2. Pengumpulan Simplisia

- b. Bahan yang digunakan dalam metode ini adalah daun alpukat muda dari jenis hijau bundar muda dengan kriteria warna yang berwarna hijau muda.
- c. Daun muda diambil 3-5 daun dibawah pucuk, waktu pemetikan dilakukan pada pagi hari saat tanaman mengalami fotosintesis.
- d. Penyortiran daun alpukat dilakukan sortasi basah untuk memisahkan cemaran (kotoran dan bahan asing lain) (Sentat dkk, 2015).

3. Pengeringan Simplisia

- a. Persiapan sampel meliputi persiapan bahan, pelaksanaan pengeringan, pembuatan serbuk daun alpukat dan persiapan ekstraksi.
- b. Daun alpukat dicuci hingga bersih lalu disimpan pada tempat yang bersih dan kering.
- c. Untuk pengeringan menggunakan panas matahari dengan cara menjemur daun alpukat hingga daun alpukat kering.
- d. Daun alpukat yang sudah kering disortir kembali, kemudian diblender sampai halus, kemudian diayak menggunakan ayakan no 40.

- e. Serbuk daun alpukat diuji organoleptiknya dengan mengamati, warna, bentuk, rasa, bau (Sentat dkk, 2015).

4. Ekstraksi

Pembuatan ekstrak daun alpukat (*Persea americana mill*) dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Simplisia yang telah kering ditimbang dan diblender sampai halus, lalu diayak dengan ayakan no 40. Ekstraksi simplisia daun alpukat dilakukan dengan metode maserasi.

5. Maserasi

Pembuatan ekstrak dari serbuk simplisia dengan cara menggunakan pelarut yang sesuai, pelarut yang dapat menyari sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia. Pelarut yang digunakan yaitu etanol 70%. Simplisia daun alpukat yang telah halus timbang sebanyak 400 gram lalu dimasukkan kedalam toples kemudian ditambah pelarut etanol 70% sebanyak 2 L. Simplisia direndam selama 3 hari dan dilakukan pengadukan sesering mungkin dan hasil ekstrak cair yang disaring dengan menggunakan kertas saring serta ditampung dalam sebuah wadah kaca. Kemudian sisa ampasnya dilakukan reaserasi sebanyak 2 kali dengan masing-masing pelarut sebanyak 1 L. Setelah semua ekstrak cair yang didapat kemudian diuapkan di penangas air dan diperoleh ekstrak kental. (Sentat dkk, 2015).

6. Skrining Fitokimia

Menurut (Putri, Hamzah, & Rahman., 2013), identifikasi daun alpukat terdiri dari:

a. Flavonoid

10 tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan sebanyak 2 tetes HCl pekat, serbuk Magnesium, dan 2 tetes amil alkohol. Bila terbentuk warna kuning, jingga, atau merah pada lapisan amil alkohol memberikan indikasi adanya kandungan flavonoid (Putri dkk, 2013).

b. Tanin

10 tetes ekstrak daun alpukat ditambah dengan 10 ml air suling, disaring. Filtrat diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Diambil 2 ml filtrat lalu ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi FeCl_3 . Bila terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman memberikan indikasi adanya tanin (Putri dkk, 2013).

c. Alkaloid

Ambil ekstrak daun alpukat sebanyak 10 tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan sebanyak 2 tetes pereaksi *Mayer* dan terbentuk endapan putih/kuning. Selanjutnya, diambil sebanyak 10 tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan sebanyak 2 tetes pereaksi *Bourchardat* sehingga terbentuk endapan coklat sampai hitam. Kemudian siapkan sebanyak 10 tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan sebanyak 2 tetes pereaksi *Dragendroff* dan terbentuk endapan jingga sampai merah coklat. Bila sedikitnya 2 dari 3 pereaksi menghasilkan endapan yang sama maka positif mengandung alkaloid. (Putri dkk, 2013).

d. Saponin

10 tetes ekstrak daun alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan air panas secukupnya, dikocok selama 15 menit dan beri 2 tetes HCl_2N bila terbentuk buih permanen selama kurang lebih 10 menit maka memberikan indikasi adanya kandungan saponin. (Putri dkk, 2013).

7. Identifikasi KLT

Fase diam yang dipakai yaitu silika GF 254 ukuran 10x2 cm, kemudian diaktifkan dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 15 menit. Ekstrak etanol daun alpukat ditotolkan pada fase diam dengan bantuan pipa kapiler. Untuk fase gerak pada setiap senyawa:

a. Golongan Flavonoid

Fase gerak: n-butanol yaitu asam asetat: air (4:1:5). Penampak noda yaitu pereaksi semprot Alumunium (III) Klorida 5% dalam etanol (Andriyani, 2010). Baku pembanding yaitu Kuersetin. Jika tampak bercak noda kuning ke hijauan pada penyemprotan pereaksi Aluminium (III) Klorida 5% dalam etanol. Bila tanpa pereaksi kimia dibawah lampu UV 254 nm positif jika menghasilkan warna biru pucat dan 366 nm, flavonoid akan berfluoresens biru, kuning atau hijau tergantung dari strukturnya (Nirwana, 2015).

b. Golongan Tanin

Fase geraknya n-Butanol: asam stearat: air (4:1:5), penampak noda yaitu pereaksi FeCl_3 . Baku pembanding yaitu katekin. Jika tampak noda pada disinari dengan lampu UV 254 dan 366 nm berwarna ungu dan diperkuat oleh (Hayati, 2010) yang menyatakan bahwa noda hasil klt yang diduga senyawa tanin berwarna ungu violet (Astri, 2009).

c. Golongan Saponin

Fase gerak yaitu kloroform : methanol : air (13:7:2), penampak noda yaitu Liberman Bouchardat, baku pembanding yaitu sapogenin. Jika timbul warna hijau setelah penyemprotan *Liberman Bouchardat* menunjukkan adanya senyawa saponin jenis steroid dalam ekstrak (Hayati, 2010).

d. Golongan Alkaloid

Fase gerak yaitu etil asetat: metanol: air (6:4:2) penampak noda yaitu pereaksi *Dragendorff*, baku pembanding yaitu piperin. Jika timbul warna coklat atau jingga setelah penyemprotan pereaksi dragendroff menunjukkan adanya alkaloid (Harbone, 1996) bila tanpa pereaksi kimia dibawah lampu UV 254 positif jika menhasilkan noda berwarna kuling 366 nm alkaloid akan berfluoresesns biru-hijau atau ungu (Hayati., 2010).

8. Formulasi Krim

Pada penelitian ini terdapat tiga formula krim ekstrak daun alpukat (*Persea americana mill*) komposisi bahan di formula ini dibuat berdasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Asma, 2016). Rancangan formula dapat dilihat pada tabel 3.1.

Table 3.1 Formulasi krim (gram)

Bahan	F1	F2	F3
Ekstrak daun alpukat	20	35	50
Setil alcohol	4	4	4
Gliserin	15	15	15
Trietanolamin	3	3	3
Asam Stearat	12	12	12
Metil Paraben	0,2	0,2	0,2
Propil Paraben	0,02	0,02	0,02
Aquades ad	100	100	100

a. Pembuatan Krim

- 1) Ditimbangan semua bahan masing-masing sesuai formulasi. Bahan-bahan fase minyak (asam stearat (pengemulsi), setil alkohol (pengemulsi dan pengental), dan propil paraben (pengawet)) dan fase air (Trietanolamin (pengemulsi), gliserin (humektan), metil paraben (pengawet), dan aqua destilata (pelarut)) dipisahkan.
- 2) Masing-masing fase minyak dan fase air dipanaskan hingga suhu 55°C sampai semuanya melebur.
- 3) Ekstrak daun alpukat dilarutkan dalam sebagian aqua destilata, lalu dimasukkan ke dalam fase air dan diaduk sampai homogen.
- 4) kemudian dimasukkan fase minyak sedikit demi sedikit ke dalam fase air, dicampur dan diaduk secara konstan sampai suhu kamar dan terbentuk basis krim.
- 5) Krim dimasukkan dalam wadah (Asma, 2016).

9. Pemeriksaan Fisik Sediaan

a. Uji Organoleptik

Pemeriksaan organoleptik dilakukan dengan cara mengamati perubahan dari sediaan krim ekstrak etanol daun alpukat secara visual seperti bentuk, warna dan bau.

b. Uji Homogenitas

Sebanyak 1 gram krim dioleskan pada sekeping kaca transparan. Kemudian diamati sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Ida dan Noer, 2012). Pengujian dilakukan dengan replikasi sebanyak tiga kali untuk masing-masing formula.

c. Uji Daya Sebar

Timbang 0,5 gram krim, lalu letakkan ditengah cawan petri dengan posisi terbalik, didiamkan selama 1 menit dan diberi beban 50 gram sampai 250 gram setiap 1 menit 5. Standar daya sebar krim yaitu 5 cm-7 cm (Ulaen, 2012; Parwanto, 2013; Edy, 2016). Pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing formula

d. Uji Daya Lekat

Timbang 0.5 gram krim dioleskan pada plat kaca dan diberi beban seberat 250 gram selama 5 menit. Beban diangkat dan dua plat kaca berlekatan dilepaskan sambil dicatat waktu sampai kedua plat saling lepas. Menurut Rachmalia et al., (2016), persyaratan daya lekat yang baik untuk sediaan topikal adalah lebih dari 4 detik.

e. Uji Viskositas

Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer VT-04. Spindel yang digunakan dicelupkan ke dalam krim yang akan diuji viskositasna hingga terbenam seluruhnya. Nilai viskositas yang diharapkan sebesar 50-200 dPa's (Langenbuchner dkk, 2007)

f. Uji pH

Uji pH bertujuan mengetahui keamanan sediaan krim saat digunakan sehingga tidak mengiritasi kulit. Ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak krim dan diencerkan dengan 10 ml aquades. pH sediaan yang baik sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5 – 6,5 (Tranggono dan Latifa, 2007; Parwanto, 2013; Edy, 2016). Pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing formula.

g. Uji Stabilitas

Uji stabilitas dilakukan dengan metode *cycling test*. Krim disimpan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam dan kemudian suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Pengujian dilakukan selama 6 siklus, dimana tiap siklus diamati perubahan fisik krim meliputi organoleptik, homogenitas, pH, daya sebar dan daya lekat (Suryani et al, 2017)

10. Penyiapan Hewan Uji

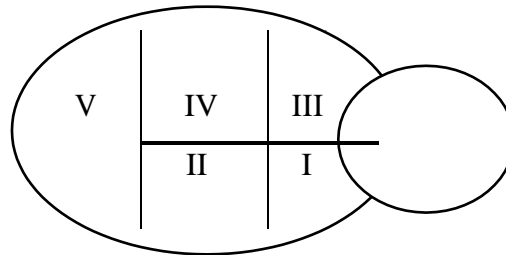
Sebelum penelitian dilaksanakan, hewan uji diadaptasikan pada lingkungan penelitian selama tujuh hari. Kelinci *New Zealand White* jantan lepas sapih pada umur 56 hari memiliki bobot badan mencapai 1,5 kg – 2 kg sebanyak 3 ekor dengan cara memberi 5 luka pad setiap kelinci. Selama masa adaptasi, hewan uji diberi makan dengan pakan standar (Surya dkk, 2015).

11. Pengujian Terhadap Hewan Uji

Pengujian efek krim diujikan pada 3 kelinci. Tiap ekor kelinci dibagi menjadi 5 sisi perlakuan: sisi kanan atas (formulasi 1 dengan krim ekstrak daun alpukat 20%), sisi kanan bawah (formulasi 2 dengan krim ekstrak daun alpukat 35%), sisi kiri atas (formulasi 3 dengan krim ekstrak daun alpukat 50%), sisi kiri tengah (kontrol positif menggunakan krim burnazin), sisi kiri bawah (kontrol negatif menggunakan basis krim tanpa ekstrak) (Surya dkk, 2015).

Pada penelitian ini menggunakan 2 dangkal luka bakar pada kelinci dilakukan dengan menempelkan soldier dengan panjang ± 1 cm. Pada kulit yang mengalami luka bakar tersebut dioleskan formula krim 3 kali sehari

sebanyak 0,1 gram untuk masing-masing formula kemudian dilakukan pengamatan setiap hari untuk melihat efek yang terjadi. Parameter yang diamati adalah berkurang hingga hilangnya luka pada kelinci selama 14 hari.



Gambar 3.1 Model Lokasi Luka Bakar Pada Kelinci.

a. Kelompok 1 (FI)

Kelompok 1 kelinci yang dilukai menggunakan soldier pada sisi kanan atas, dan diberi krim ekstrak etanol daun alpukat dengan krim ekstrak daun alpukat 20% diberi sebanyak 0,1 gram.

b. Kelompok 2 (FII)

Kelompok 2 kelinci yang dilukai menggunakan soldier sisi kanan bawah, dan diberi krim ekstrak etanol daun alpukat dengan krim ekstrak daun alpukat 35% diberi sebanyak 0,1 gram.

c. Kelompok 3 (FIII)

Kelompok 3 kelinci yang dilukai menggunakan soldier sisi kiri atas, dan diberi krim ekstrak daun alpukat 50% diberi sebanyak 0,1 gram.

d. Kelompok 4 (kontrol positif)

Kelompok 4 kelinci yang dilukai menggunakan soldier sisi kiri tengah, dan diberi krim Burnazin sebagai sediaan kontrol positif diberi sebanyak 0,1 gram.

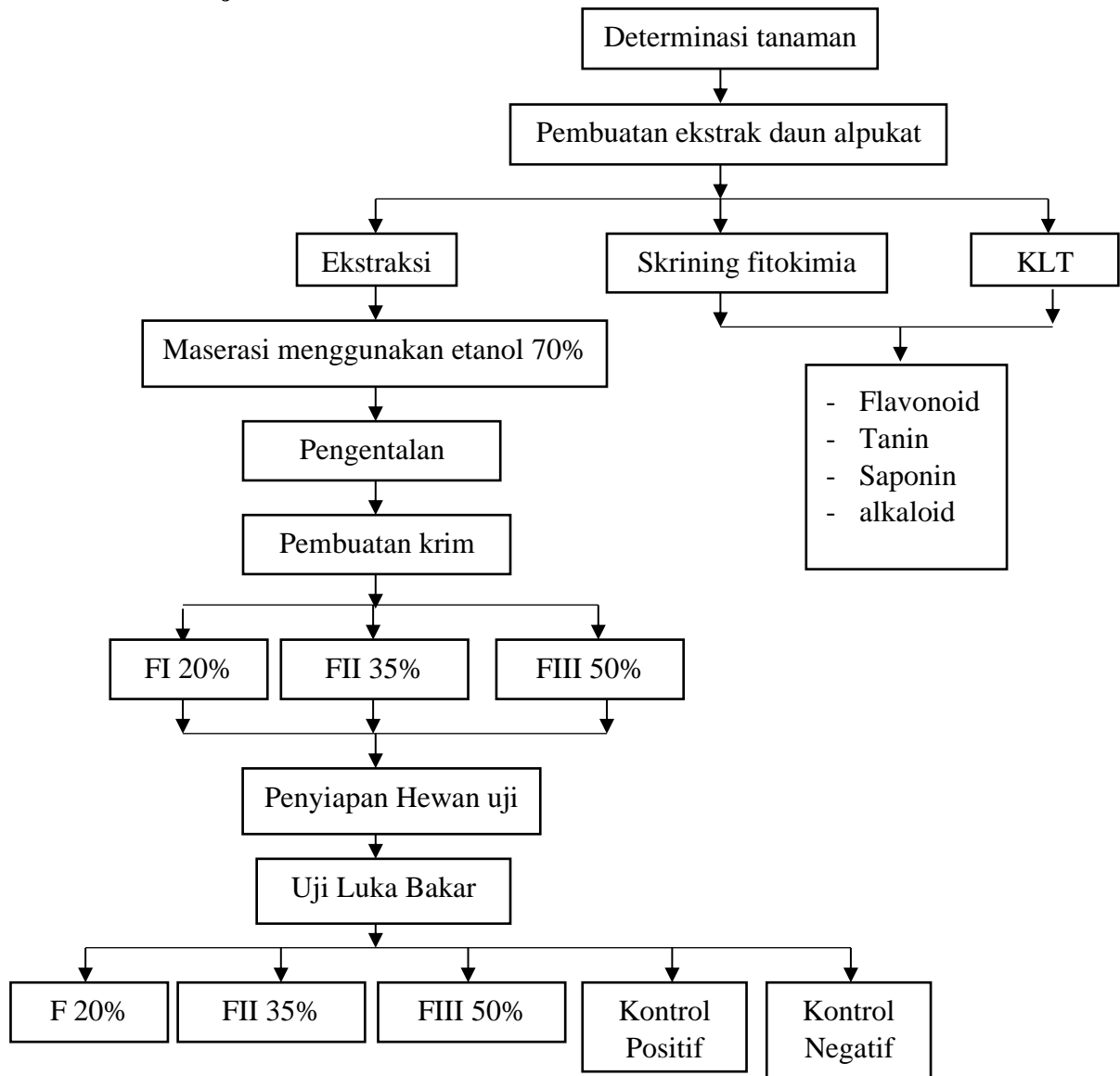
e. Kelompok 5 (kontrol negatif)

Kelompok 5 kelinci yang dilukai menggunakan soldier sisi kiri bawah, dan diberikan basis krim (tanpa ekstrak) sebagai kontrol negative diberi sebanyak 0,1 gram.

H. Analisis Data

Analisis secara statistik dengan menggunakan software SPSS versi 25.0. Uji Shapiro-Wilk dilakukan untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal. Jika data berdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji statistik one way ANOVA. Namun, jika ada data/kelompok data yang tidak terdistribusi normal atau homogen, maka uji non parametrik Kruskal-Wallis akan digunakan. Signifikansi dalam penelitian ini jika variabel analitik memiliki $p < 0,05$. Sedangkan untuk melihat rata-rata dan standar deviasi dilakukan Descriptive Statistics Frequencies.

I. Skema Kerja



Gambar 3.2 Skema Kerja