

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan dan Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Universitas An Nuur pada bulan Februari-Mei 2022. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhamadiyah Surakarta.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan cara pengujian aktivitas gel ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) terhadap penyembuhan luka bakar pada kelinci. Ekstrak etanol daun kelor didapatkan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, dimana ekstrak kental yang didapatkan diuji kandungan senyawa kimianya. Pembuatan gel formula 1, 2 dan 3 mengandung ekstrak etanol daun kelor dengan basis HPMC 8 gr, 9 gr dan 10 gr kemudian dilakukan pengujian sifat fisik gel dan stabilitas gel. Selanjutnya diujikan dengan hewan uji, sebelum bulu punggung dicukur, dianestesi dengan etil klorida yang disemprotkan pada kulit yang akan dibuat luka bakar. Luka bakar dibuat dengan menginduksi kulit punggung kelinci menggunakan alat berupa lempeng logam berdiameter 2 cm bersuhu 800°C, selama 3 menit. Jarak antara luka lebih dari 5 cm. Tempelkan logam yang sudah panas pada punggung kelinci sehingga terjadi pelepuhan dan kulinya terkelupas, kemudian ditutup dengan kain kasa steril untuk mengurangi kontaminasi bakteri. Penyembuhan luka bakar dilakukan dengan mengatur diameter luka bakar pada punggung kelinci. Kelinci yang dimulai hari ke-2, dengan menggunakan mistar. Pengukuran dilakukan dengan setiap hari pagi dan sore jam 09.00 dan 15.00. Pemberian masing-masing gel ekstrak daun kelor dilakukan sehari setelah pembuatan luka sampai hari ke 15 dan di berikan 2 kali sehari setiap pagi dan sore dengan cara dioleskan rata pada punggung kelinci yang telah dibuat luka.

C. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan unit atau individu dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi dalam penelitian ini adalah 28 ekor yang berasal dari tanaman kelor yang ditanam PT. MOI di Desa Ngawenombo, Kecamatan Kunduran, Kabupaten Blora, Provinsi Jawa tengah.

Sampel yang digunakan penelitian ini adalah daun kelor yang diambil secara acak dengan memilih daun yang segar, berwarna hijau dan bebas dari penyakit.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.
2. Klasifikasi variabel utama Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.
 - a. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% daun kelor dengan dosis.
 - b. Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel dalam penelitian ini adalah aktivitas penyembuhan luka bakar dalam parameter presentase penyembuhan luka bakar setelah kelinci diberi ekstrak etanol daun kelor dengan varian dosis.
 - c. Variabel terkendali merupakan variabel terkendali yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara cepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah pembuatan ekstrak, peralatan yang digunakan, lingkungan, luas luka yang dibuat, kedalaman pencungkuran bulu, kondisi fisik hewan uji, yang meliputi berat badan, usia, galur, lingkungan tempat tinggal dan laboratorium.

E. Definisi Operasional Variabel Utama

1. Daun kelor yang diperoleh dari tanaman kelor PT. MOI yang berasal dari Desa Ngawenombo, Kecamatan Kunduran, Kabupaten Blora, Jawa Tengah dengan kondisi segar, berwarna hijau dan dipetik dalam keadaan bebas dari penyakit.
2. Serbuk daun kelor adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan penggilingan dan pengayakan daun kelor.

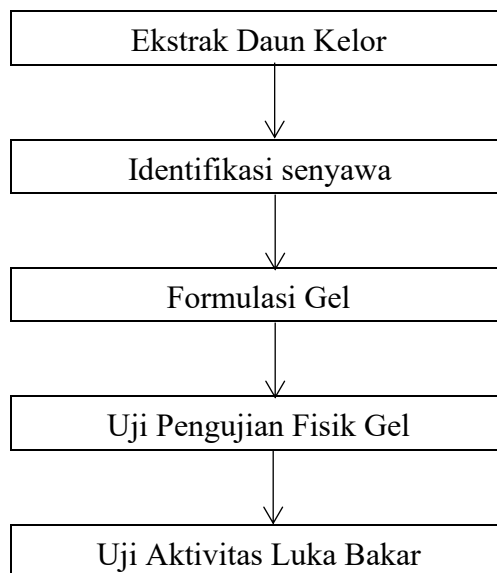
3. Ekstrak etanol daun kelor adalah ekstrak yang dihasilkan penyarian dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% kemudian dipekatkan dengan suhu 40°C.
4. Pembuatan sediaan gel ekstrak daun kelor dengan konsentrasi HPMC 8 gr, 9 gr dan 10 gr.
5. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci *New Zealand*.
6. Uji aktivitas gel ekstrak daun kelor adalah untuk mengetahui aktivitas dari ekstrak daun kelor terhadap diameter luka bakar.
7. Luka bakar adalah luka yang dibuat dengan pemanasan logam berdiameter 2 cm untuk dipanaskan dan di letakkan pada punggung hewan uji.
8. Luka bakar derajat dua adalah luka bagian dermal superfisial sampai dalam meliputi seluruh epidermis dan bagian dermis.

F. Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas, maka disusun hipotesis penelitian ini, yaitu

1. Sediaan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L.) mampu membuat sediaan gel dengan mutu fisik yang baik.
2. Sediaan gel ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L.) memiliki efektivitas penyembuhan luka bakar.
3. Sediaan gel ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L.) memiliki kandungan senyawa yang dapat menyembuhkan luka bakar.

G. Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Struktur Kerangka Konsep

H. Alat dan Bahan

1. Alat

Bejana maserasi, corong *buchner*, kertas saring, batang pengaduk, *rotary evaporator*, pencukur bulu kelinci, lempeng koin logam seng berdiameter 2 cm dengan suhu 800°C selama 3 menit., mistar, timbangan analitik, *stopwatch*, motir dan stemper, pH stick, *viscometer*, *beaker glass*, blender, *chamber*, ayakan, tabung reaksi, pipet tetes, gelas ukur, lampu spiritus, aluminium foil, tabung reaksi.

2. Bahan

Daun kelor yang segar berwarna hijau yang diperoleh dari PT. MOI di Desa Ngawenombo, Kecamatan Kunduran, Kabupaten Blora, Provinsi Jawa Tengah. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci jenis *New Zealand* yang dikondisikan selama satu minggu yang kemudian dengan sengaja dibuat luka bakar dengan diameter yang diinginkan. Etanol 70%, etil klorida sebagai anestesi lokal, bioplasenton (Kalbe) sebagai *control positive*, HPMC sebagai basis gel, gliserin teknis sebagai humektan dan penahan lembab, trietanolamin sebagai bahan tambahan, nipagin sebagai bahan pengawet dan aquades. pereaksi wagner, pereaksi mayer, pereaksi NaOH 10%, pereaksi wilstater, pereaksi smith-metacalve, pereaksi FeCl₃ 1%, asetat anhidrid dan asetat anhidrat.

I. Jalannya Penelitian

Penelitian dilakukan sebagai berikut:

1. Pengambilan Bahan

Daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang diperoleh PT. MOI di Desa Ngawenombo, Kecamatan Kunduran, Kabupaten Blora, Provinsi Jawa Tengah. Daun kelor yang sudah diambil lalu ditimbang sebagai bobot kering, setelah itu dilakukan perhitungan presentase bobot kering.

2. Determinasi Tanaman

Tahap awal dalam penelitian ini adalah determinasi tanaman daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhamadiyah Surakarta. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta kemungkinan tercampurnya bahan dengan tanaman lain.

3. Pembuatan Serbuk Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.)

Pengambilan tanaman dan pembuatan serbuk daun kelor di PT. MOI Desa Ngawenombo, Kecamatan Kunduran, Kabupaten Blora diperoleh pada bulan April 2022.

4. Penetapan Kadar Lembab Serbuk Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.)

Penentuan kadar air dilakukan 3 kali replikasi dengan cara menimbang serbuk daun kelor 3 gr, serbuk daun kelor kemudian alat ditutup. Kemudian alat diaktifkan dan ditunggu sampai layar menunjukkan angka penurunan berat sampel. Pengukuran berhenti ditandai dengan munculnya bunyi tertentu. Kemudian ditekan (%) untuk mengetahui persentase kandungan lembab (Sediarso, 2018).

5. Identifikasi Serbuk

Organoleptis serbuk, daun kelor diperoleh berdasarkan bentuk, warna dan bau dari serbuk daun kelor.

6. Pembuatan Ekstraksi

Ekstrak diperoleh melalui metode maserasi yaitu merendam 1000 gr serbuk dengan 10000 ml pelarut 70% dalam botol kaca gelap dan ditutup rapat pada suhu kamar. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan

penguap vakum atau penguap tekanan rendah dapat juga menggunakan “rotavapor” hingga diperoleh ekstrak kental.

Hitung rendemen yang diperoleh yaitu presentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak (Kemenkes RI, 2017).

7. Pemeriksaan fitokimia ekstrak etanol daun kelor meliputi flavonoid, alkaloid, fenol, saponin dan tanin :

a. Pemeriksaan Flavonoid

Ambil ekstrak 2 gram masukkan tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 0,1 gr serbuk Mg, 1 ml larutan HCl pekat dan 5 ml amil alkohol. Perubahan warna larutan menjadi merah bata, kuning menandakan adanya flavanoid (Sopianti dkk, 2018).

b. Pemeriksaan Saponin

Positifnya saponin ditandai dengan terbentuknya busa dengan tinggi berkisar 1 hingga 10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit ketika ekstrak ditambahkan dengan 10ml aquadest panas, kemudian dikocok 10 detik secara vertikal. Busa tersebut tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCL 2N (Puspitasari *et al.*, 2013).

c. Pemeriksaan Alkaloid

Ambil ekstrak 2 gram tambahkan HCl 1% kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi tiga bagian dan dilakukan pengujian menggunakan beberapa tetes pereaksi mayer, wanger dan dragendrof. Reaksi positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan putih kekuningan dengan peraksi mayer. Terbentuk endapan coklat kemerahan dengan penambahan pereaksi wagner. Terbentuk endapan jingga pada penambahan pereaksi dragendorf menunjukkan positif mengandung alkaloida (Kumoro, 2015).

d. Pemeriksaan fenol

1 ml ekstrak ditambah FeCl_3 1%. Reaksi positif jika terbentuk warna kehitaman atau biru tua (Dwika, 2016).

e. Pemeriksaan tannin

Positifnya tanin ditandai dengan terbentuknya warna hijau gelap atau hijau kebiruan ketika ekstrak ditambahkan 2 ml aquades dan beberapa tetes larutan FeCl_3 (Kemenkes RI, 2016).

8. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase diam yang dipakai yaitu silika GF 254 ukuran 10 x 2 cm, kemudian diaktifkan dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 15 menit. Ekstrak etanol daun kelor ditotolkan pada fase diam dengan bantuan pipa kapiler. Untuk fase gerak pada setiap senyawa diidentifikasi berdasarkan golongan senyawa :

- a. Golongan flavonoid fase gerak : n-butanol yaitu asam asetat: air (4:1:5) Penampak noda yaitu pereaksi semprot sitroborat dalam etanol (Devi, 2020). Baku pembanding yaitu Kuarsetin. Jika timbul warna kuning setelah penyemprotan pereaksi sitroborat dalam etanol (Nirwana dkk, 2015) menunjukkan adanya uap amonia flavonoid dalam ekstrak.
- b. Golongan saponin fase gerak yaitu kloroform : methanol : air (13:7:2), penampak noda yaitu *Lieberman Bouchardat*, baku pembanding yaitu sapogenin. Jika timbul warna hijau setelah penyemprotan *Lieberman Bouchardat* menunjukkan adanya senyawa saponin jenis steroid dalam ekstrak (Pratama, dkk., 2012).
- c. Golongan tanin fase gerak: Metanol : Etil asetat (8:2) untuk pemeriksaan mengandung Tanin. Baku pembanding : asam galat Penampak Noda: Pereaksi FeCl_3 Jika tampak noda pada saat disinari dengan lampu UV $_{254}$ nm berwarna ungu menunjukkan adanya senyawa tanin (Devi, 2020).
- d. Golongan alkaloid fase gerak: Etil asetat:metanol-air (6:4:2) Baku pembanding: piperin Penampak noda: Pereaksi Dragendorff akan timbul warna coklat atau jingga setelah penyemprotan pereaksi Dragendorff menunjukkan adanya alkaloid dalam ekstrak (Devi, 2020).
- e. Golongan fenol fasa gerak yaitu n-heksan: etil asetat: metanol dengan perbandingan (2:7:2). Setelah terelusi lempeng diangkat dan dikeringkan, diamati bercak pada lampu UV $_{254}$ nm dan UV $_{366}$ nm dengan penampak bercak besi (III) klorida (FeCl_3). Hasil positif fenol jika noda berwarna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat. Analisis KLT menggunakan asam galat sebagai pembanding (Marliani dkk, 2016).

Setelah itu masing - masing dimasukkan ke dalam chamber dan dibiarkan sampai jenuh. Lalu chamber dijenuhkan dengan kertas saring setelah jenuh silika GF 254 yang sudah ditotol dimasukkan kedalam chamber, setelah noda sampai pada batas atas lempeng kemudian diambil dan diamati hasil bercak noda dibawah sinar UV $_{254}$ nm dan $_{366}$ nm. Lalu Nilai Rf dan HRf dihitung dari bercak yang didapat. Harga Rf dihitung dengan

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

$$R = \frac{\text{jarak yang ditempuh solut (cm)}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak (cm)}}$$

Kemudian fase gerak disemprot dengan menggunakan pereaksi semprot yaitu pereaksi amonia untuk golongan Flavonoid, pereaksi Lieberman burchard untuk deteksi golongan saponin, dan pereaksi besi (III) klorida untuk deteksi senyawa fenolik tanin.

9. Formulasi gel ekstrak daun kelor

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan Gel Ekstrak Daun Kelor

Sampel	Formulasi Gel		
	F1	F2	F3
Ekstrak (gr)	9	9	9
HPMC (gr)	8	9	10
Gliserin (%)	8	8	8
Tietanolamin(%)	3	3	3
Nipagin (%)	0,1	0,1	0,1
Aquades Ad	100 ml	100 ml	100 ml

Keterangan: Formula 1,2 dan 3 formula mengandung ekstrak etanol daun kelor 9 gr (Sudjono, 2012) dengan basic HPMC 8 gr, 9 gr dan gr (Ulya, 2020).

Cara pembuatan gel ekstrak etanol daun kelor dimulai dari pencampuran gliserin, nipogin dan aquades sebanyak 50 ml dicampur sampai nipagin larut semua. HPMC ditambahkan dalam campuran tersebut sambil terus diaduk cepat dan kuat. Trietonamin ditambahkan dengan pengaduk ringan dengan penambahan sisan air hingga 100%. Kemudian dimasukkan sedikit demi sedikit ekstrak daun kelor aduk hingga homogen.

10. Pengujian sifat fisik

Stabilitas sediaan gel, pengujian stabilitas sediaan gel dilakukan dengan mengamati keadaan fisik yang meliputi: warna, bau, homogenitas, daya sebar, daya lekat, vikostitas, setelah penyimpanan 1, 2 dan 3 minggu.

a. Uji organoleptik. Pada penelitian ini dilakukan dengan melakukan pengamatan langsung secara visual dan panca indra pada warna, bentuk dan bau sediaan yang telah dibuat (Kindangen *et al.*, 2018).

- b. Pengujian homogenitas dilakukan dengan mengoleskan zat yang akan diuji pada sekeping kaca atau bahan lain yang cocok, harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak menunjukkan butiran kasar (Warnida, 2016).
 - c. Pengukuran viskositas sebanyak 100 ml gel dimasukkan ke dalam cup 250 ml kemudian viskositasnya diukur dengan *Viscometer Brookfield* yang dilengkapi dengan *spindle* no.1 dengan kecepatan 50 (putaran per menit) kemudian data yang diperoleh dicatat dan dianalisis secara statistik (Warnida, 2016). Viskositas sediaan gel yang cocok untuk dikeluarkan dari kemasan tube, dan selanjutnya untuk memudahkan pemakaiannya adalah sekitar 5000-6000 cpas (Anggun & Pambudi, 2020).
 - d. Uji pengukuran pH menggunakan pH meter *Ohaus* yang direndam kedalam gel ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L.), kemudian ditunggu hingga angka pH meter berhenti dengan stabil. pH kulit sekitar 4,5-6,5 memenuhi standar untuk persiapan kulit (Kindangen *et al.*, 2018).
 - e. Uji daya sebar Pengujiannya meletakkan 0,5 gr gel ditengah alat (kaca bundar), mula-mula timbang bagian atas gelas dan meletakkan diatas massa gel, kemudian diamkan dalam waktu satu menit, lalu mengukur diameternya (catat rata-rata panjang diameter semua sisi). Menambahkan 50 gr, 100 gr dan diberikan bertahap tingkatkan beratnya. Pada beban tambahan yang akan didiamkan selama 1 menit. Konsistensi semi-padat yang nyaman untuk digunakan yaitu dengan daya sebar 5-7 cm (Kindangen *et al.*, 2018).
 - f. Uji daya lekat dilakukan dengan cara mengoleskan 0,5 gr gel pada kaca objek, menutupinya dengan kaca yang lain untuk menguji daya lekat gel. Kemudian berikan beban 1 kg ke objek kaca selama 5 menit, lalu pasang alat pada uji perekat dan lepaskan beban 80 gr. Mencatat waktu yang dibutuhkan benda kaca untuk terpisah satu sama lain (kindangen *et al.*, 2018). Syarat daya lekat yaitu lebih dari 1 detik (Irianto *et al.*, 2018).
 - g. Pengujian stabilitas formulasi gel adalah dengan uji siklus (*cycling test*). Tes siklus dilakukan selama enam siklus. Formulasi gel disimpan dengan suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (dingin) selama 24 jam, kemudian dikeluarkan dan diletakan dengan suhu ruang ($\pm 40^{\circ}\text{C}$). Dengan melakukan hal ini dapat disebut sebagai satu siklus (Suryani, 2017).
11. Uji Aktivitas Luka Bakar Ekstrak Daun Kelor
- a. Pembuatan luka bakar pada punggung kelinci

Luka bakar dibuat dengan menginduksi kulit punggung kelinci menggunakan alat penginduksi panas berupa lempeng logam bersuhu 800⁰C, selama 3 menit. Jarak antara luka lebih dari 5 cm. tempelkan logam yang sudah panas pada punggung kulit kelinci sehingga terjadi pelepuhan dan kulitnya terkelupas (Haysim *et al.* 2012). Sebelum bulu punggung kelinci dicukur, di anestesi dengan etil klorida yang disemprotkan pada kulit yang akan di buat luka bakar (Sudjono, 2012).

Pemberian masing-masing gel ekstrak daun kelor dilakukan sehari setelah pembuatan luka sampai hari ke 14 dan di berikan 2 kali sehari setiap pagi dan sore dengan cara dioleskan rata pada punggung kelinci yang telah dibuat luka.

b. Pemberian gel ekstrak daun kelor

Untuk penyembuhan efek luka bakar, digunakan kelinci, masing-masing kelinci akan dibuat 6 luka bakar dengan 5 bagian perlakuan sebagai berikut :

Bagian I : *control negativ* (tanpa perlakuan)

Bagian II : formula I ekstrak etanol daun kelor 9%

Bagian III : formulasi II ekstrak etanol daun kelor 9%

Bagian IV : formulasi III ekstrak etanol daun kelor 9%

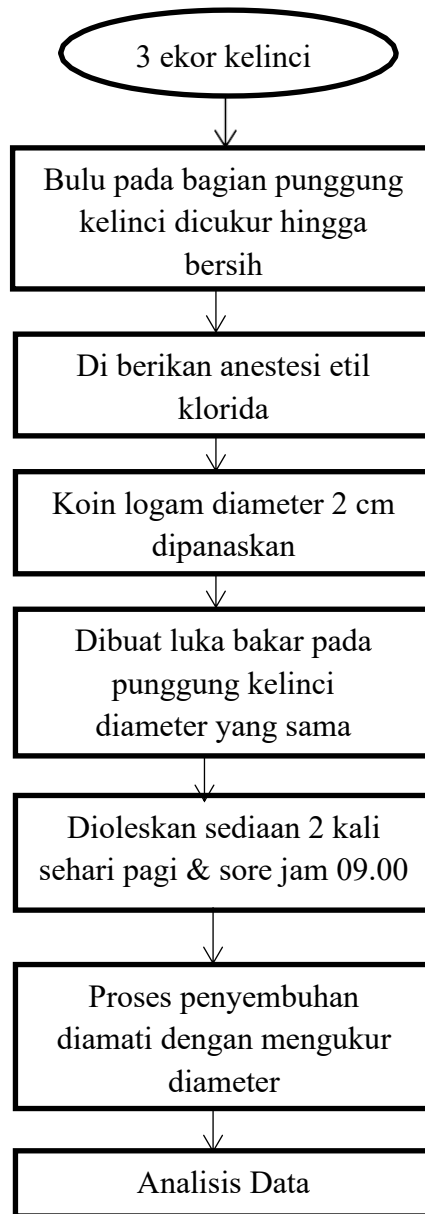
Bagian V : *control positiv* Bioplacenton (gel pembanding)

Bagian VI : ekstrak daun kelor 9%

Luka yang telah dibuat dioles dengan sediaan uji dua kali sehari kurang lebih 0,3 gr. Kemudian ditutupi dengan kain kasa steril dan plester untuk mengurangi kontaminasi bakteri.

c. Analisis data

Konsentrasi ekstrak kental daun kelor dengan 3 variasi, kelompok II dengan sediaan gel ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.)9 %, kelompok III dengan sediaan gel ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) 9 %, kelompok IV dengan sediaan gel ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.)9 %. Data penyembuhan luka bakar dianalisis secara statistik dengan uji *Saphiro wilk*, dilanjutkan dengan uji parametrik analisis varian (ANAVA) satu jalan, dilanjutkan dengan uji Tukey dengan taraf kepercayaan 95%. Pengujian menggunakan progam SPSS versi 25.



Gambar 3. Struktur Analisis Data