

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.) yang diambil secara acak dalam keadaan segar, dan bebas dari hama penyakit.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama yang digunakan dalam penelitian adalah kombinasi sediaan oral dan topikal salep ekstrak etanol daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.) dengan konsentrasi tertentu. Variabel utama yang kedua adalah efektivitas penyembuhan luka sayat pada kelinci putih model diabetes, yang dinilai melalui parameter kecepatan penutupan luka, pembentukan jaringan granulasi, dan tingkat epitelisasi. Variabel utama yang ketiga adalah kelinci putih (*Oryctolagus cuniculus*) sebagai hewan uji yang diinduksi diabetes menggunakan aloksan dengan kontrol terhadap ukuran dan lokasi luka, durasi pengamatan, serta kondisi lingkungan selama penelitian.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi sediaan oral dan topikal salep ekstrak etanol daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.) dengan variasi konsentrasi tertentu. Variabel tergantung adalah efektivitas penyembuhan luka sayat pada kelinci putih model diabetes, yang dinilai berdasarkan parameter kecepatan penutupan luka, pembentukan jaringan granulasi, dan tingkat epitelisasi setelah pemberian sediaan tersebut. Adapun variabel terkontrol meliputi peneliti, kondisi laboratorium, jenis hewan uji (kelinci putih), serta karakteristik fisik hewan uji seperti berat badan, usia, jenis kelamin, dan galur. Selain itu, metode induksi diabetes menggunakan aloksan, ukuran dan lokasi luka, durasi pengamatan, serta kondisi lingkungan selama penelitian juga dikendalikan untuk menjaga validitas hasil.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari wilayah Karanganyar, Jawa Tengah. Daun tersebut kemudian dikeringkan dan dimanfaatkan sebagai bahan baku utama penelitian.

Kedua, serbuk daun kitolod diperoleh dari proses pengeringan, penggilingan, dan pengayakan menggunakan ayakan nomor 40. Serbuk inilah yang selanjutnya digunakan dalam proses ekstraksi.

Ketiga, ekstrak etanol daun kitolod diperoleh melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% selama lima hari. Hasil maserasi kemudian diuapkan menggunakan vakum evaporator hingga diperoleh ekstrak kental yang siap diformulasikan ke dalam bentuk sediaan oral dan salep topikal.

Keempat, ekstrak kental yang dihasilkan selanjutnya diformulasikan menjadi sediaan topikal (salep) dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30%. Setiap konsentrasi salep tersebut dikombinasikan dengan pemberian sediaan oral ekstrak etanol daun kitolod, yang diberikan secara peroral kepada hewan uji. Kombinasi ini bertujuan untuk mengevaluasi sinergi antara rute topikal dan sistemik dalam mempercepat proses penyembuhan luka pada model diabetes.

Kelima, induksi diabetes dilakukan dengan menyuntikkan aloksan pada dosis 175 mg/kg berat badan melalui vena telinga marginal pada kelinci putih. Prosedur ini bertujuan untuk merusak sel beta pankreas sehingga menciptakan kondisi hiperglikemia sebagai model hewan diabetes.

Keenam, penyembuhan luka sayat merujuk pada proses regenerasi jaringan kulit, yang dievaluasi melalui parameter kecepatan penutupan luka, pembentukan jaringan granulasi, dan tingkat epitelisasi. Luka dibuat secara standar pada bagian punggung kelinci putih.

Ketujuh, efektivitas penyembuhan luka dinilai berdasarkan perbaikan parameter-parameter penyembuhan luka yang telah disebutkan, sebagai respons terhadap pemberian kombinasi sediaan oral dan topikal ekstrak etanol daun kitolod pada kelinci model diabetes.

C. Alat Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bejana maserasi, timbangan digital, blender, ayakan mesh nomor 40, batang pengaduk, kertas saring, kain flanel, *beaker glass*, nampan, oven, lap, *stopwatch*,

sendok, pisau, penangas air, tabung reaksi, rak tabung, *vacuum rotary evaporator*, *glucose strip test*, corong, gelas ukur, botol amber/wadah tertutup, *hot plate*, label, pipet tetes, pH meter digital, viscometer Brookfield, moisture balance, lempeng extensometer, spuit injeksi, oral sonde, timbangan analitik, kandang kelinci, timbangan hewan uji, glucometer, alat pencukur bulu, gunting, penggaris atau jangka sorong, *cotton bud* dan peralatan untuk anastesi.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kitolod, etanol 70%, aloksan monohidrat, *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC), Larutan NaCl, aquadest, serbuk Mg stearate, FeCl₃, HCl pekat, NaOH, alcohol 96%, pakan dan minum hewan uji, hewan uji kelinci, salep *povidone iodine* 10%, vaselin album, nipagin, nipasol, oleum rosae, tween 80, veet.

3. Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan 5 ekor kelinci putih New Zealand berusia 3-4 bulan dengan berat badan berkisar 2-3 kilogram. Semua hewan uji dipelihara dalam kondisi yang terkontrol untuk memastikan keakuratan hasil penelitian.

D. Formulasi Salep Ekstrak Daun Kitolod

Formulasi sediaan topikal dalam bentuk salep bertujuan untuk mengantarkan zat aktif secara lokal pada permukaan kulit, memperpanjang waktu kontak dengan kulit, serta melindungi luka dari lingkungan eksternal yang dapat memperparah kondisi luka (Murtaza *et al.*, 2014). Dalam penelitian ini, dipilih bentuk sediaan salep karena sifatnya yang oklusif, sehingga dapat menjaga kelembapan kulit serta mempercepat proses penyembuhan luka, khususnya pada luka diabetes yang cenderung lambat mengalami regenerasi jaringan.

Ekstrak etanol daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.) dipilih sebagai bahan aktif karena mengandung senyawa aktif seperti flavonoid, saponin, dan tanin yang memiliki aktivitas antiinflamasi, antibakteri, dan antioksidan yang mendukung proses penyembuhan luka (Resmi *et al.*, 2020). Dalam proses formulasi, digunakan basis salep hidrokarbon sederhana dan tambahan bahan pembantu lain seperti emulgator, humektan, dan pengawet untuk menjaga stabilitas sediaan.

Konsentrasi ekstrak dalam sediaan salep dibuat dalam beberapa variasi, yaitu 10%, 20%, dan 30% untuk melihat pengaruh dosis terhadap

efektivitas penyembuhan luka. Pemilihan konsentrasi ini didasarkan pada studi pendahuluan serta referensi dari penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak tanaman antara 10–30% masih dalam rentang aman dan efektif untuk aplikasi topikal (Wulandari *et al.*, 2021). Selain itu, perbedaan konsentrasi juga berguna dalam menentukan dosis optimal yang memberikan hasil terbaik.

Dalam formulasi ini, digunakan Tween 80 sebagai pengemulsi non-ionik untuk membantu proses pencampuran antara bahan aktif yang bersifat larut air dengan basis salep yang bersifat minyak, sehingga menghasilkan sediaan yang homogen. Penambahan nipagin (methylparaben) dan nipasol (propylparaben) sebagai bahan pengawet bertujuan untuk mencegah kontaminasi mikroba dan menjaga stabilitas mikrobiologis selama penyimpanan (Ansel, 2013). Oleum rosae (minyak mawar) ditambahkan dalam jumlah kecil untuk memperbaiki bau sediaan agar lebih nyaman digunakan, terutama pada luka terbuka.

Basis salep menggunakan vaselin putih (white petrolatum) yang bersifat oklusif untuk menjaga kelembapan area luka dan membantu proses epitelisasi. Vaseline juga memiliki stabilitas yang baik dan tidak mudah terdegradasi, sehingga cocok digunakan sebagai bahan dasar sediaan semi padat. Semua formula disesuaikan hingga mencapai total bobot 100 gram dengan menambahkan vaselin putih secukupnya (add 100 g), guna menjamin keseragaman bobot dan volume antar formula. Rancangan formulasi salep ekstrak daun kitolod disusun seperti pada Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Rancangan formulasi salep ekstrak etanol daun kitolod

| Nama Bahan | Kegunaan | Formulasi | | | |
|----------------------|-----------------|-----------|---------|---------|---------|
| | | F1 (g) | F2 (g) | F3 (g) | F4 (g) |
| Ekstrak Daun Kitolod | Bahan Aktif | 10,0 | 20,0 | 30,0 | - |
| Tween 80 | Pengemulsi | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Nipagin | Pengawet | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Nipasol | Pengawet | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Oleum rosae | Memperbaiki bau | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Vaseline putih | Basis salep | Add 100 | Add 100 | Add 100 | Add 100 |
| Total Sediaan (g) | | 100 | 100 | 100 | 100 |

Keterangan :

F1 : sediaan salep dengan konsentrasi ekstrak etanol daun kitolod 10%

F2 : sediaan salep dengan konsentrasi ekstrak etanol daun kitolod 20%

F3 : sediaan salep dengan konsentrasi ekstrak etanol daun kitolod 30%

F4 : sediaan salep tanpa ekstrak etanol daun kitolod (basis salep)

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman adalah proses identifikasi atau penentuan jenis dan nama ilmiah suatu tanaman berdasarkan ciri-ciri morfologi yang dimilikinya, seperti bentuk daun, bunga, batang, dan struktur lainnya. Proses ini bertujuan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian benar-benar sesuai dengan spesies yang diinginkan. Dalam penelitian ini, determinasi tanaman kitolod (*Isotoma longiflora* L.) dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, dengan membandingkan sampel tanaman terhadap spesimen referensi yang tersedia. Proses identifikasi ini penting untuk menjamin keakuratan penggunaan bahan alam dalam penelitian, serta sebagai dasar validitas ilmiah dari hasil yang diperoleh. Menurut Sutrisno (2010), determinasi tanaman merupakan langkah awal yang esensial dalam studi botani dan fitokimia guna menghindari kesalahan dalam penggunaan spesies yang mirip secara morfologi namun berbeda secara taksonomi.

2. Pengumpulan dan pembuatan serbuk

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.) yang diperoleh dari daerah Karanganyar, Jawa Tengah. Tanaman segar yang diperoleh terlebih dahulu disortasi basah kemudian dicuci dengan air bersih mengalir dan baru setelah itu ditiriskan. Kitolod yang sudah dibersihkan kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan menggunakan oven. Setelah kering sampel dihaluskan dengan mesin penggiling lalu diayak menggunakan ayakan nomor 40.

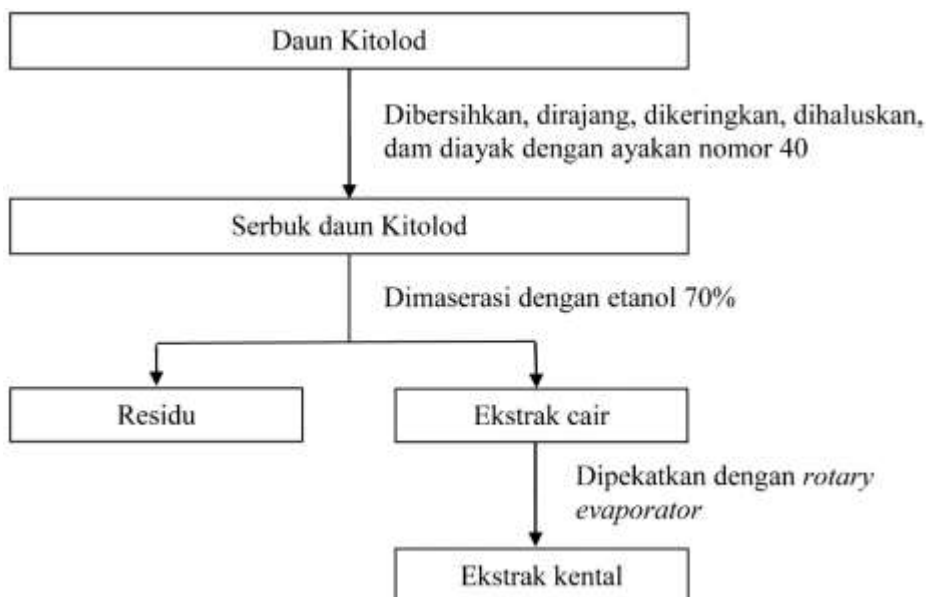
3. Penentuan susut pengeringan serbuk daun kitolod

Penentuan susut pengeringan serbuk daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.) dilakukan untuk mengetahui kandungan air dan zat lain yang mudah menguap pada proses pengeringan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Prinsip kerjanya adalah mengukur jumlah air yang hilang dengan pemanasan dengan rentang suhu 100°C - 105°C. Serbuk daun kitolod sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam alat *moisture balance* kemudian dinyalakan dan ditunggu sampai alat bunyi, angka yang muncul dalam satuan persen pada alat *moisture balance* dicatat sebagai kadar susut pengeringan, pengujian ini dilakukan sebanyak 3 replikasi.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun kitolod

Proses pembuatan ekstrak etanol daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.) dilakukan dengan cara maserasi yaitu menimbang 900 gram serbuk simplisia kering, kemudian mengekstraksi menggunakan 5.250 ml etanol 70%. Proses maserasi dilakukan dengan menggunakan botol kaca berwarna gelap dengan tujuan untuk menghindari paparan langsung sinar matahari serta dilakukan dalam keadaan wadah tertutup rapat sehingga etanol tidak mudah menguap pada suhu kamar. Metode maserasi juga memberikan kesempatan untuk pelarut berinteraksi dengan bahan secara lebih optimal, sehingga senyawa aktif dapat terekstraksi secara maksimal.

Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan selalu dilakukan pengocokan minimal 3 kali sehari. Setelah 5 hari hasil maserasi disaring menggunakan kain flannel dan dilanjutkan dengan menggunakan kertas saring. Ampas atau residu yang tersisa kemudian dibiarkan selama 2 hari. Setelah itu hasil maserasi disaring kembali menggunakan kain flannel dan dilanjutkan dengan menggunakan kertas saring sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *vakum rotary evaporator* dan dilanjutkan pada penangas suhu 40°C sehingga menjadi ekstrak kental etanol daun kitolod. Tujuan dari alat *rotary evaporator* yaitu untuk menguapkan atau menghilangkan pelarut yang terdapat dalam filtrat sehingga diperoleh ekstrak kental dari daun kitolod.



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak daun kitolod.

5. Penentuan susut pengeringan ekstrak daun kitolod

Susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kandungan air dan zat lain yang mudah menguap pada proses pengeringan, dengan cara menggunakan satu sampai dua gram ekstrak yang dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang telah ditara dan telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit. Ekstrak yang akan ditimbang pada botol timbang digoyang-goyangkan terlebih dahulu dengan tujuan untuk meratakan ekstrak, kemudian ekstrak dimasukkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam dengan posisi tutupnya dibuka, sebelum setiap pengeringan, botol timbang terlebih dahulu didinginkan dengan posisi botol ditutup dan dimasukkan ke dalam eksikator (Pendingin) hingga mencapai suhu ruang. Proses pengeringan dilanjutkan dan timbang kembali selama 1 jam hingga perbedaan antara penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%. (Depkes RI, 2000). Pengujian ini dilakukan 3 replikasi.

6. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun kitolod

6.1 Uji Flavonoid. Sebanyak 1 gram ekstrak ditambahkan ke dalam 10 ml etanol 70%. Setelah larut ekstrak yang terdapat pada tabung reaksi tersebut direaksikan dengan 0,1 gram serbuk magnesium dan HCl pekat sebanyak 2-4 tetes. Selanjutnya campuran tersebut dikocok hingga homogen, lalu dibiarkan hingga terbentuk dua lapisan. Kehadiran flavonoid ditandai dengan adanya warna merah atau jingga pada lapisan amil alkohol. (Karlina *et al.*, 2022).

6.2 Uji Saponin. Sebanyak 1 g ekstrak ditambahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquadest dengan perbandingan 1:1. Larutan dikocok selama ± 1 menit dengan dikocok secara vertikal. Ekstrak dikatakan mengandung saponin jika terbentuk buih setinggi 1–10 cm yang berlangsung lebih dari 10 menit, dan buih tersebut tetap stabil meskipun ditambahkan 1 tetes HCl 2 N (Purwanti *et al.*, 2024).

6.3 Uji Tanin. Ekstrak sebanyak 1 g ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan FeCl₃, dimana terbentuknya warna hijau atau biru kehitaman menandakan adanya tannin. (Purwanti *et al.*, 2024).

7. Pembuatan larutan uji

7.1 Larutan aloksan monohidrat. Larutan aloksan monohidrat dengan konsentrasi 1% dibuat dengan cara menimbang 1 gram aloksan monohidrat dilarutkan dalam larutan garam atau larutan natrium klorida pada volume 100 ml.

7.2 Larutan Na CMC 0,5%. Menimbang sebanyak 500 mg CMC Na ditaburkan di atas mortar yang berisi 10 ml air suling yang telah dipanaskan sambil diaduk konstan dengan tujuan mencegah penggumpalan. Setelah semua larut merata dan tidak ada serbuk yang mengapung kemudian ditambahkan hingga volume total 100 ml air suling hingga diperoleh massa yang jernih. Larutan didinginkan pada suhu ruang kemudian disimpan dalam botol tertutup rapat.

7.3 Suspensi ekstrak daun kitolod. Pembuatan suspensi ekstrak daun kitolod yang akan digunakan dihitung berdasarkan berat dari masing-masing hewan uji kelinci. Ekstrak etanol daun kitolod ditimbang sesuai kebutuhan kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur bersih. Menambahkan larutan Na CMC 0,5% secukupnya sambil diaduk hingga terbentuk suspensi homogen kemudian ditambahkan lagi hingga mencapai volume akhir yang diinginkan. Hasil suspensi yang telah homogen dimasukkan dalam botol amber tertutup rapat dan disimpan.

8. Pembuatan salep ekstrak daun kitolod

Sebelum melakukan pencampuran bahan-bahan yang akan digunakan ditimbang terlebih dahulu dengan seksama sesuai dengan formula masing-masing. Basis yang akan digunakan adalah basis hidrokarbon yaitu vaselin putih dan paraffin cair. Metode pembuatan salep ini digunakan metode peleburan (Miranti 2009). Sebelum dilakukan pencampuran, terlebih dahulu vaselin putih dileburkan diatas alat *waterbath* pada suhu 95°C sampai mencair, mortir dan stemper dipanaskan dengan cara direndam dengan air panas sekitar 3-5 menit sampai mortir panas kemudian dikeringkan. Memasukkan vaselin putih yang mencair terlebih dahulu kedalam mortir kemudian memasukkan paraffin cair dan nipasol sambil digerus dengan kecepatan konstan hingga homogen. Ekstrak daun kitolod digerus dalam mortir lain yang telah dipanaskan, kemudian memasukkan campuran vaselin, parafin dan nipasol sedikit demi sedikit digerus hingga homogen sampai membentuk salep. Salep yang telah homogen tersebut dimasukkan ke dalam pot salep.

9. Pengujian mutu fisik salep

9.1 Uji organoleptik. Sediaan salep diamati tampilan fisiknya dengan mata telanjang dimulai dari warna salep, tekstur salep, serta bau sediaan salep.

9.2 Uji homogenitas. Sebanyak 0,5 gram sediaan salep diambil dan diratakan diatas obyek gelas, kemudian diamati secara visual

permukaan yang rata. Sediaan salep diambil dari bagian atas, tengah dan bawah (Depkes RI 1979).

9.3 Uji pH. Sediaan salep diukur pH dengan menggunakan pH meter yang dicelupkan kedalam sediaan salep. Nilai pH dilihat pada skala dan dicatat setelah tercapai kestabilan. Pengulangan sebanyak 3 kali.

9.4 Uji viskositas. Sediaan salep diukur viskositasnya dengan alat uji viskositas viskometer Brookfield pada suhu 25°C. Salep dimasukkan kedalam wadah, kemudian *spindle* yang sesuai menggunakan spindle nomor 4 dimasukkan kedalam wadah yang berisi salep sampai tenggelam dengan kecepatan 20 rpm. Rotor dinyalakan hingga jarum hasil menunjukkan angka yang stabil. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali.

9.5 Uji daya lekat. Sediaan salep sebanyak 0,5 gram diletakkan diatas lempeng pada alat uji daya lekat. Lempeng yang lain diletakkan diatas sediaan salep, kemudian ditekan dengan beban seberat 1000 gram dan dibiarkan selama 5 menit. Setelah itu, beban diambil dan lempeng yang saling menempel dilepas dengan beban seberat 80 gram, dicatat waktu saat kedua lempeng tersebut lepas. Dilakukan 3 kali pengulangan (Dara, 2012).

9.6 Uji daya sebar. Sediaan salep ditimbang 0,5 gram, diletakkan pada pusat antara dua lempeng *extensometer*, dibiarkan selama 5 menit lalu diukur diameter salep yang menyebar. Timbangan seberat 50 gram ditambahkan pada lempeng sebelah atas, didiamkan 5 menit dan dicatat diameter salep yang menyebar. Kemudian beban seberat 100 gram ditambahkan lagi diatas lempeng, dan dibiarkan selama 5 menit, dicatat diameter salep yang menyebar. Untuk memperoleh hasil yang lebih akurat dilakukan 3 kali pengulangan (Naibaho *et al* 2013).

10. Pengelompokan hewan percobaan

Penelitian ini menggunakan 5 ekor hewan uji kelinci. Kriteria inklusi kelinci yang digunakan adalah berusia 3-4 bulan dan berat badan sebesar 2-3 kilogram. Sebelum perlakuan, hewan uji diaklimatisasi selama 7 hari untuk menyesuaikan diri dengan kondisi percobaan, sehingga mereka dapat beradaptasi dengan lingkungan yang berbeda dari tempat asalnya. Setiap kelinci mendapatkan 5 perlakuan berbeda pada punggungnya dengan 5 lokasi luka. Pembuatan luka pada masing-masing kelinci dapat dilihat pada lampiran.

- Kelompok perlakuan 1: Kontrol negatif. Kelinci dibuat luka sayat yang diberikan basis salep untuk terapi topical dan ekstrak etanol kitolod 100 mg/kg BB Kelinci untuk terapi oral.
- Kelompok perlakuan 2: Kontrol positif. Kelinci dibuat luka sayat yang diberikan salep povidone iodine untuk terapi topical dan ekstrak etanol kitolod 100 mg/kg BB Kelinci untuk terapi oral.
- Kelompok perlakuan 3: Kelinci dibuat luka sayat yang diberikan salep daun kitolod 10% untuk terapi topical dan ekstrak etanol kitolod 100 mg/kg BB Kelinci untuk terapi oral.
- Kelompok perlakuan 4: Kelinci dibuat luka sayat yang diberikan salep daun kitolod 20% untuk terapi topical dan ekstrak etanol kitolod 100 mg/kg BB Kelinci untuk terapi oral.
- Kelompok perlakuan 5: Kelinci dibuat luka sayat yang diberikan salep daun kitolod 30% untuk terapi topical dan ekstrak etanol kitolod 100 mg/kg BB Kelinci untuk terapi oral.

11. Perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 ekor kelinci yang dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 1 ekor kelinci. Sebelum perlakuan, kelinci terlebih dahulu diaklimatisasi selama 7 hari di lingkungan tempat penelitian dengan tetap diberikan pakan standar dan air minum secukupnya. Pada hari ke-8, bulu di daerah punggung kelinci digunting dan dicukur hingga kulit terlihat jelas. Kelinci kemudian dianestesi menggunakan etil klorida yang disemprotkan sebanyak 2–3 kali hingga kulit punggung tampak memucat. Setelah anestesi efektif, dilakukan pembuatan luka sayat pada punggung kelinci menggunakan pisau bedah steril dengan panjang dan kedalaman luka yang seragam. Diameter luka kemudian diukur menggunakan penggaris untuk mencatat kondisi awal luka pada hari pertama. Setelah luka dibuat, kelinci diberi perlakuan dengan mengoleskan salep yang mengandung ekstrak etanol daun kitolod secara topikal pada area luka dan diberikan sediaan oral ekstrak etanol daun kitolod melalui mulut menggunakan spuit tanpa jarum. Perlakuan ini dilakukan sebanyak dua kali sehari, yaitu pada pagi dan sore hari.

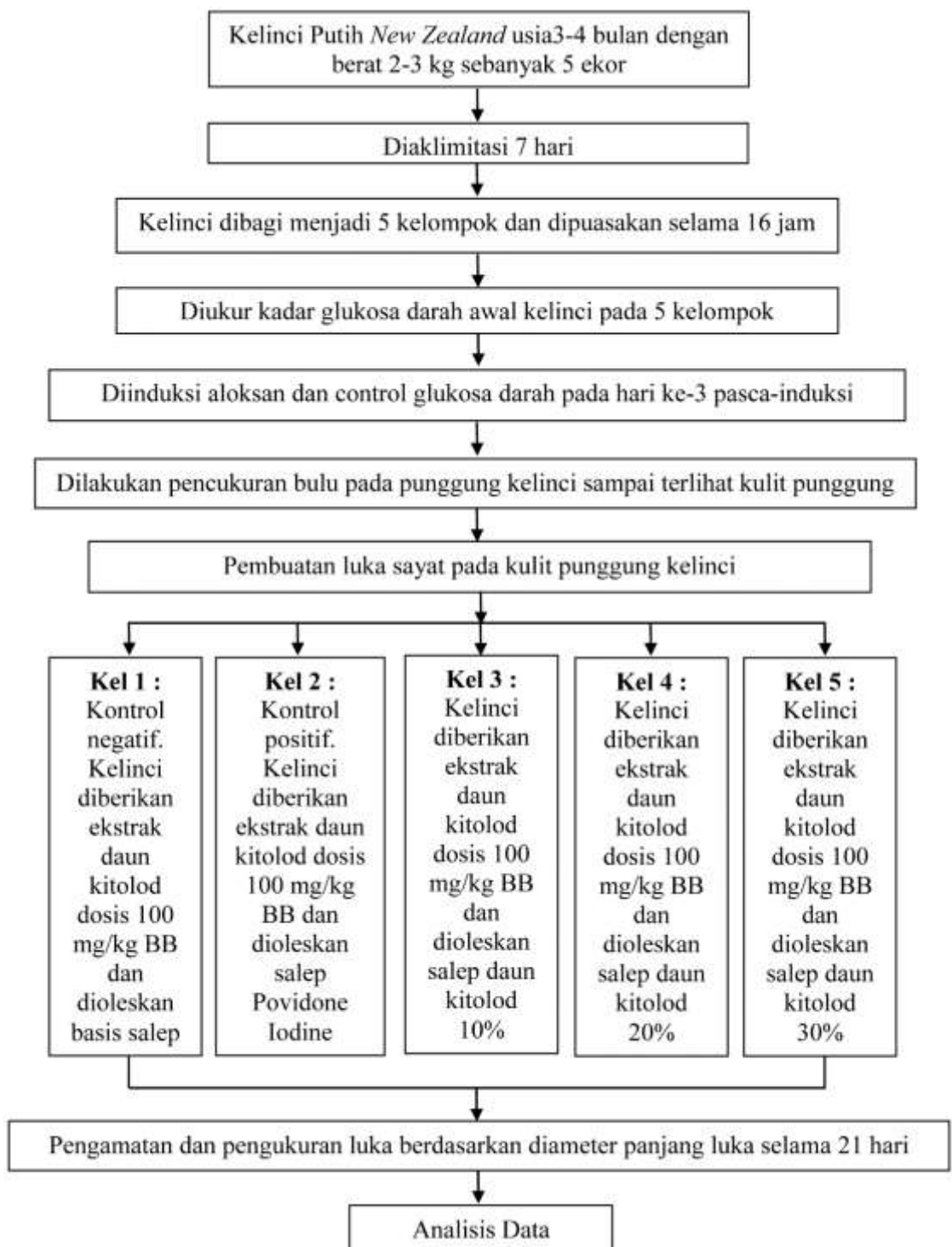
12. Pengukuran luka sayat

Pengukuran diameter luka dilakukan secara berkala menggunakan penggaris digital atau kaliper vernier dengan satuan milimeter. Pengamatan dilakukan pada hari ke-0 (hari pembuatan luka), kemudian dilanjutkan hingga luka menunjukkan penyembuhan sempurna atau selama periode 21 hari.

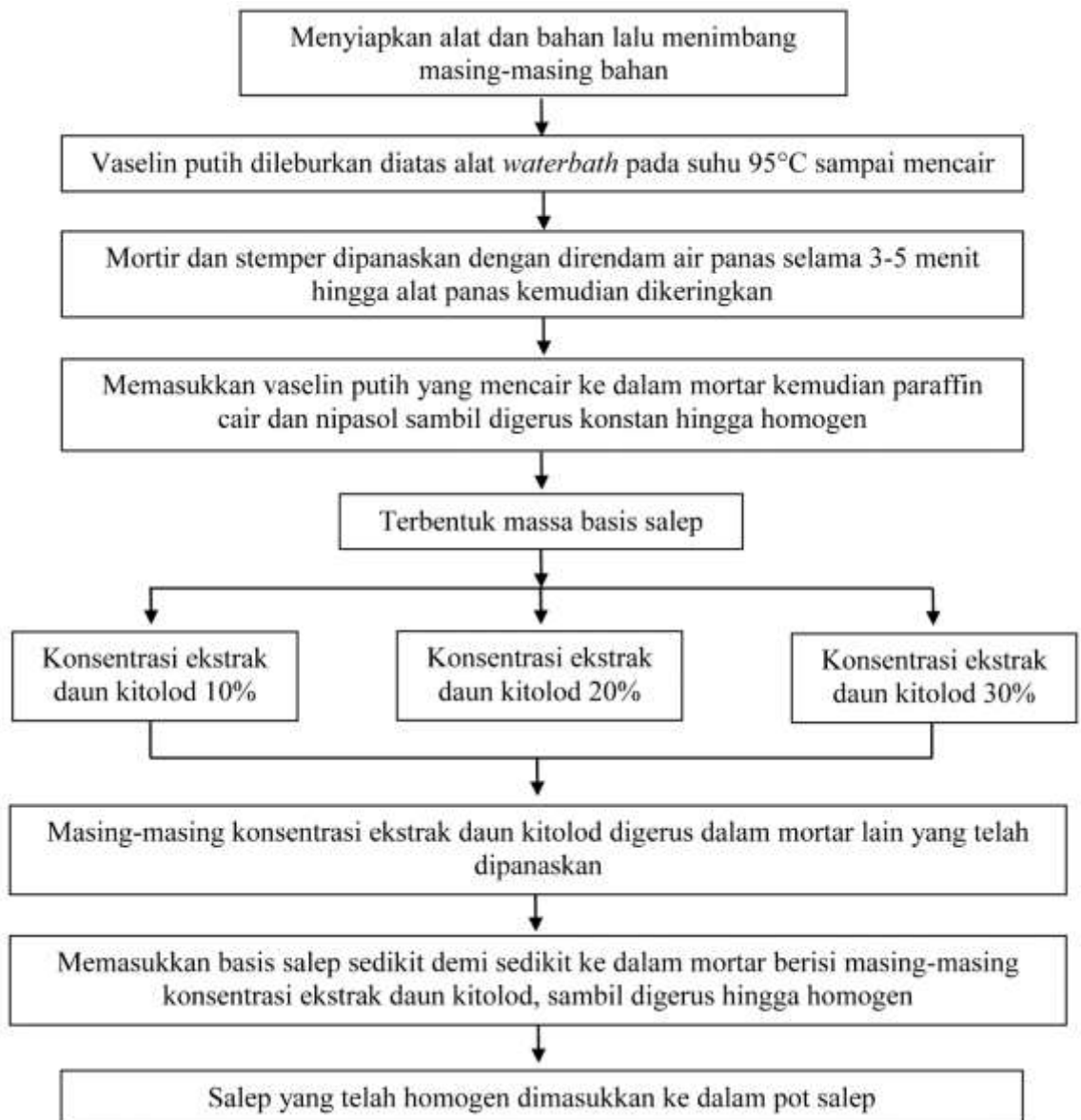
F. Analisis Hasil

Uji normalitas dilakukan untuk menentukan apakah pengujian hipotesis menggunakan metode parametrik atau non-parametrik. Uji normalitas data dilakukan dengan metode *Shapiro-Wilk*. Uji ini digunakan karena jumlah sampel per kelompok relative kecil ($n < 50$). Data dianggap terdistribusi normal jika nilai signifikansi $p < \alpha$ ($\alpha = 0,05$). Jika data terdistribusi normal, pengujian hipotesis dilakukan menggunakan metode parametrik *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% untuk menganalisis perbedaan rata-rata signifikan antara semua kelompok perlakuan terhadap penurunan diameter luka, diikuti uji lanjut parametrik menggunakan metode *Tukey* untuk mengetahui pasangan kelompok mana yang bermakna secara statistic.

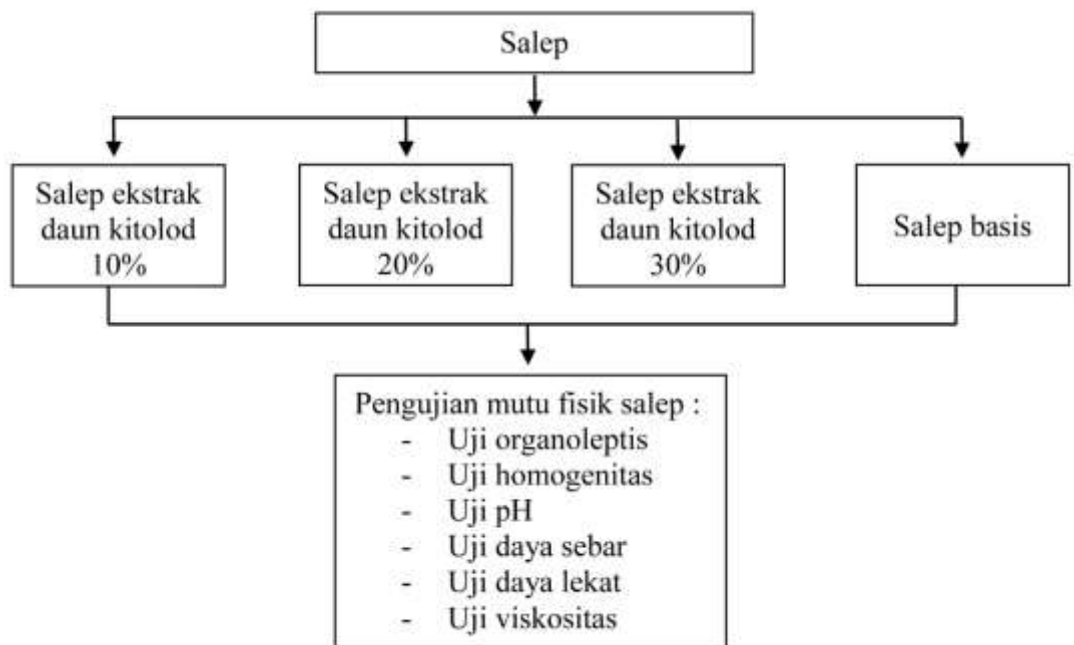
G. Skema Penelitian



Gambar 6. Skema Perlakuan Hewan Uji



Gambar 7. Skema Pembuatan Salep Ekstrak Etanol Daun Kitolod



Gambar 8. Skema Pengujian Mutu Fisik Salep