

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan keseluruhan objek penelitian yang menjadi fokus studi. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun Kenikir (*Cosmos caudatus* kunth) yang didapat dari Desa Grumbul, Dusun Pengkol, Kecamatan Tanon, Kabupaten Sragen, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel merupakan bagian representatif yang diambil dari suatu populasi. Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kenikir berwarna hijau tetapi tidak terlalu tua maupun muda, segar dan tidak terserang hama yang didapat dari Desa Grumbul, Dusun Pengkol, Tanon Kabupaten Sragen, Jawa Tengah yang diambil pada bulan Juli 2025.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama sangat penting untuk memahami fenomena yang akan diteliti serta menentukan metode pengumpulan data yang sesuai. Variabel utama dalam penelitian ini adalah fraksi daun kenikir untuk penyembuhan luka sayat.

2. Klasifikasi Variabel Utama

2.1 Variabel Bebas. Variabel bebas merupakan variabel yang dirancang untuk mengamati pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak dan fraksinasi yaitu ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dengan konsentrasi tertentu.

2.2 Variabel Tergantung. Variabel ini digunakan untuk menentukan pengaruh dari variabel bebas, yang menjadi topik dari penelitian ini atau hasil dari penelitian. Variabel terikat dari penelitian ini yaitu lama waktu penyembuhan luka dan panjang luka dan pengamatan makroskopis yang meliputi hiperemia, granulasi, keropeng dan produksi nanah pada area luka.

2.3 Variabel Terkendali. Variabel terkontrol bertujuan untuk menjaga agar hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat tetap konsisten tanpa adanya pengaruh dari faktor lain. Variabel terkontrol penelitian ini adalah ukuran luka sayat, alat dan bahan serta serbuk simplisia daun kenikir yang digunakan selama penelitian.

C. Definisi Operasional

Pertama, daun kenikir yang digunakan adalah daun yang masih segar dan masih muda yang tumbuh di daerah Sragen, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun kenikir adalah serbuk daun kenikir yang berasal dari proses pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, penggilingan, pengayakan menggunakan mesh 40.

Ketiga, ekstrak daun kenikir adalah hasil dari ekstraksi yang menggunakan metode maserasi dimana proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah fraksi yang diperoleh dari ekstrak etanol 96% daun kenikir ditambah dengan air yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan sebagai pelarut nonpolar.

Kelima, fraksi etil asetat merupakan residu dari fraksi *n*-heksan yang difraksinasi menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar.

Keenam, fraksi air merupakan hasil fraksinasi pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar.

Ketujuh, luka sayat adalah luka terbuka yang dilakukan dengan disayat menggunakan pisau pada punggung kelinci jantan dengan panjang sayatan 2 cm dan kedalaman luka 0,2 mm.

Kedelapan, aktivitas penyembuhan luka adalah kemampuan daun kenikir dalam menyembuhkan luka sayat pada punggung kelinci jantan dengan parameter penurunan panjang luka dan kemerahan yang diukur selama 14 hari.

Kesembilan, penurunan panjang luka adalah parameter yang digunakan dalam penentuan penyembuhan luka sayat pada punggung kelinci jantan yang diukur dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan cm, dan pengamatan makroskopis meliputi adanya hiperemia, granulasi, keropeng, serta adanya nanah pada luka.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, blender, mesh no 40, *sterling bidwell*, botol maserasi, kertas saring, kain flannel, *moisture balance*, pot cream, corong pisah, tabung reaksi, pipet tetes, pH meter, bunsen, rotary evaporator, pipet tetes, labu takar, pipet volume, gelas ukur, batang pengaduk, sudip, jangka sorong, bisturi/pisau bedah, gunting, timbangan analitik, waterbath, tempat pemeliharaan kelinci.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk simplisia daun Kenikir yang berasal dari pengeringan daun kenikir segar yang diperoleh dari Desa Grumbul Dusun Pengkol Tanon Kab. Sragen,

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci *New Zealand white* jantan sebanyak 5 ekor yang sudah diaklimatisasi selama 1 minggu kemudian dibuat luka sayat menggunakan pisau bedah dengan Panjang 2 cm. Vaseline album, aquades, etanol 96%, *n*-heksan, etil asetat, HgCl_2 , HCL, FeCl_3 5%.

E. Jalannya Penelitian

1. Ethical Clearance (EC)

Sesuai Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2016 tentang Komisi Etik Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Nasional, setiap penelitian dan pengembangan kesehatan yang menggunakan manusia dan hewan percobaan wajib menjunjung tinggi prinsip etika. Penelitian ini bertujuan mendukung pelayanan kesehatan demi mengoptimalkan kualitas kesehatan masyarakat. *Ethical Clearance* (EC) untuk penelitian ini dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

2. Determinasi Daun Kenikir

Daun Kenikir yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Sragen, Jawa Tengah dan di determinasi. Tujuan determinasi untuk menetapkan kebenaran sampel yang berhubungan dengan ciri morfologi pada daun kenikir yang dilaksanakan di Universitas Setia Budi, Surakarta.

3. Persiapan Bahan

Daun kenikir diperoleh dari Desa Grumbul, Dusun Pengkol, Kecamatan Tanon, Kabupaten Sragen, Jawa Tengah. Bahan yang digunakan berupa daun kenikir segar dengan warna hijau dan bebas dari serangan hama. Daun tersebut dicuci hingga bersih untuk membersihkan kotoran yang melekat, selanjutnya dilakukan pengeringan dengan penjemuran secara tidak langsung di bawah sinar matahari.

4. Pembuatan Serbuk Daun Kenikir

Pembuatan serbuk simplisia merupakan tahap awal dalam proses ekstraksi. Daun Kenikir dikeringkan kemudian di blender untuk dihaluskan. Untuk mendapatkan serbuk daun kenikir dengan tingkat kehalusan yang konsisten, maka daun kenikir yang dihasilkan diayak menggunakan nomor ayakan 40 (Kemenkes RI, 2022).

5. Pengujian Organoleptis Serbuk Daun Kenikir

Serbuk daun kenikir diidentifikasi secara organoleptis menggunakan panca indra. Pengujian organoleptis meliputi warna, aroma dan bentuk, pengujian ini dilakukan untuk memastikan karakteristik serbuk sesuai dengan standar atau spesifikasi mutu yang diharapkan.

6. Susut Pengeringan Serbuk Daun Kenikir

Penetapan susut pengeringan pada serbuk daun kenikir dilakukan dengan menimbang sebanyak 2 gram sampel. Alat *moisture balance* dinyalakan dan dipanaskan terlebih dahulu selama 10 menit. Setelah itu, pengaturan alat diatur melalui menu yang tersedia. Sampel serbuk daun kenikir kemudian dimasukkan ke dalam wadah sampel *moisture balance* dan diratakan secara merata. Proses pengukuran berlangsung hingga alat berbunyi dan menampilkan hasil susut pengeringan dalam bentuk persentase (%). Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk memastikan validitas dan konsistensi hasil yang diperoleh (Kemenkes RI, 2022).

7. Pembuatan Ekstrak Daun Kenikir

Sebanyak 1700 gram serbuk simplisia daun kenikir diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 17000 mL, rendam selama 6 jam dengan pengadukan sesekali, kemudian didiamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat melalui proses penyaringan dengan kain flanel, dan residu diekstrakai kembali dengan penambahan etanol 96% sebanyak 8500 mL. Seluruh maserat dikumpulkan, kemudian di uapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Kemenkes RI, 2022). Hitung rendemen yang didapat dengan rumus:

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot Serbuk}} \times 100$$

8. Pembuatan Fraksi Daun Kenikir

Fraksinasi dilakukan dengan cara melarutkan 10 gram ekstrak etanol 96% dari daun kenikir dalam 75 mL air. Kemudian dimasukkan kedalam corong pisah dan ditambahkan 75 mL *n*-heksana dan dikocok secara perlahan sampai membentuk 2 lapisan yaitu fraksi *n*-heksan dan fraksi air, kemudian pisahkan dan tampung fraksi *n*-heksan, lakukan replikasi selama 3 kali kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Sisa fraksi air ditambahkan dengan 75 mL etil asetat kemudian dikocok dan di diamkan hingga membentuk 2 lapisan yaitu lapisan fraksi etil asetat dan fraksi air, tampung fraksi etil asetat dan lakukan replikasi

sebanyak 3 kali, kemudian hasil fraksi etil asetat dipekatkan di *rotary evaporator*, selanjutnya fraksi air ditampung pada water bath sampai mengental. Kemudian timbang masing-masing fraksi untuk mengetahui persen rendemen (Nurfiana *et al.*, 2018).

9. Penetapan Kadar Air Ekstrak Daun Kenikir

Penetapan kadar air ekstrak daun kenikir dengan metode destilasi. Pertama, ekstrak daun kenikir seberat 20 gram dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan toluen yang sudah dijenuhkan hingga seluruh simplisia terendam. Pemanasan kemudian dilakukan hingga tidak ada lagi tetesan air. Untuk mengukur kadar air, digunakan skala volume dari alat sterling bidwell. Volume air yang terkumpul selanjutnya dinyatakan dalam persen sebagai kadar air dari sampel (Kemenkes RI, 2022).

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{Volume air}}{\text{Bobot Sampel}} \times 100\%$$

10. Pengujian Kandungan Kimia Ekstrak dan Fraksi daun Kenikir

10.1 Alkaloid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi ditambahkan dengan pereaksi mayer, pereaksi mayer dapat dibuat dengan cara melarutkan 1,3 gram HgCl_2 kedalam 60 mL air. Positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih kekuningan (Budiana, 2023).

10.2 Flavonoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi ditambahkan dengan lima tetes HCl pekat dan serbuk Magnesium, menggunakan pereaksi Shibata, pereaksi Shibata dapat dibuat dengan cara 5 mL air panas ditambahkan dengan 2 mL amilalkohol, selanjutnya ditambahkan satu mL HCl pekat dan logam magnesium kemudian dihomogenkan. Positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga (Budiana, 2023).

10.3 Tanin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi ditambahkan dengan 2 mL FeCl_3 5%. Positif tanin ditandai dengan perubahan warna menjadi hitam kehijauan atau biru tua (Yusriadi *et al.*, 2024).

10.4 Saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi ditempatkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquades sampai semua benar-benar terendam, tabung reaksi kemudian direbus selama 2 hingga 3 menit, kemudian didinginkan dan kocok dengan keras, pembentukan busa yang stabil menunjukkan hasil positif saponin (Ngajow *et al.*, 2013).

10.5 Triterpenoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi diarsikan dengan pereaksi Lieberman-buchardat yang terbuat dari asam asetat glasial, kloroform dan asam klorida (HCL) pekat. Senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan adanya cincin berwarna merah kecoklatan atau violet pada larutan (Anggraeny *et al.*,2020).

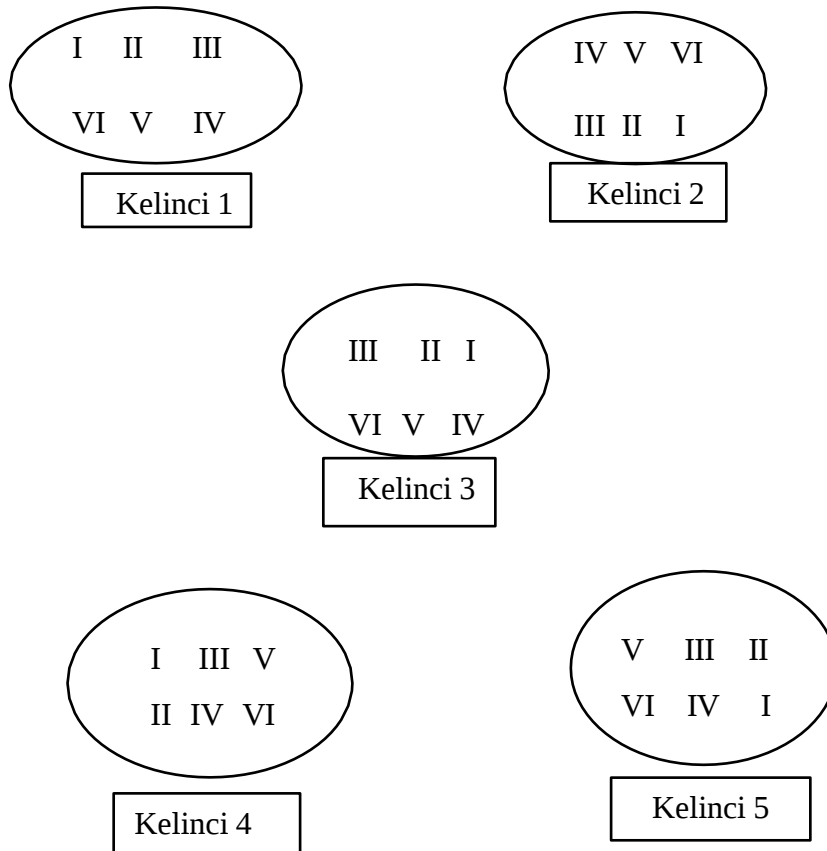
11. Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan 5 hewan uji yang di daptasi selama 7 hari dan diberikan makan serta minum. Kemudian, bulu pada punggung kelinci dicukur dan diberi tanda sebagai tanda perlakuan yang akan digunakan untuk pembuatan luka. Penyayatan luka dibuat dengan panjang sayatan 2mm dan kedalaman luka 0,2cm. Setelah pembuatan luka pada hewan uji, kemudian hewan uji diberi perlakuan dengan pengolesan pada punggung kelinci sebanyak 2 kali sehari pada pagi dan sore hari, kemudian dilakukan pengukuran panjang luka dalam waktu 24 jam sekali selama 14 hari.

12. Pengelompokan Hewan Uji

Satu kelinci dimasukkan ke dalam masing-masing dari lima kelompok perlakuan:

- a. Kelompok I : Kontrol positif (Salep Mebo)
- b. Kelompok 2 : Kontrol negatif (Vaselin album)
- c. Kelompok 3 : Dioleskan ekstrak daun kenikir 15%
- d. Kelompok 4 : Dioleskan fraksi *n*-heksana
- e. Kelompok 5 : Dioleskan fraksi etil asetat daun
- f. Kelompok 6 : Dioleskan fraksi air daun kenikir



Gambar 6. Pengelompokan hewan uji

13. Presentase Penyembuhan Luka Sayat

Pengamatan luka sayat pada hewan uji dilakukan selama 14 hari, dengan mencatat waktu penyembuhan dan mengukur luas luka menggunakan jangka sorong sebagai alat ukur. Kecepatan penyembuhan luka dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Penyembuhan luka} = \frac{\text{Panjang luka awal} - \text{Panjang luka akhir}}{\text{Panjang luka awal}} \times 100\%$$

14. Parameter Penyembuhan Luka Sayat

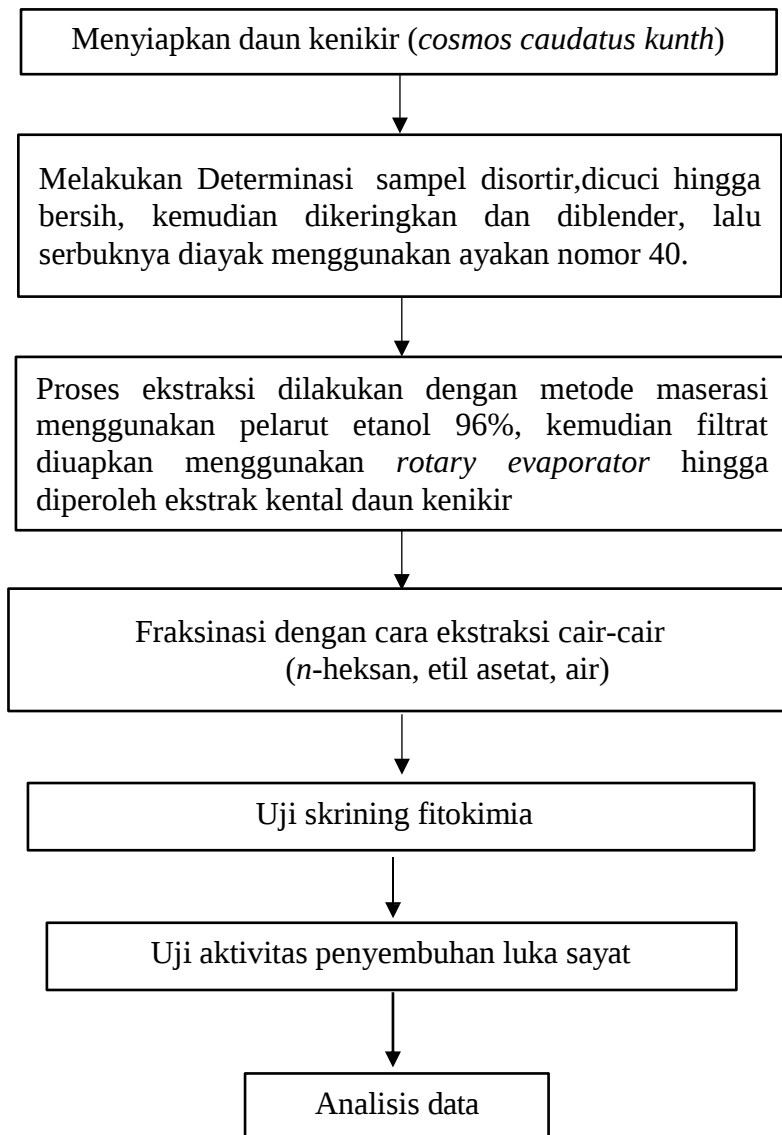
Luka yang dianggap sembuh ditandai dengan terbentuknya jaringan baru yang menutupi atau membungkus luka tersebut. Proses penyembuhan luka sayat diamati melalui tahap inflamasi, proliferasi, remodeling dan pengukuran panjang luka. Pengamatan makroskopis dilakukan setiap hari selama 14 hari dengan melihat adanya hiperemia, krusta, serta produksi pus di daerah luka. Hiperemi ditandai dengan munculnya warna kemerahan pada area luka sebagai penanda awal inflamasi, diberi nilai (+) jika terlihat dan (-) jika tidak terlihat, krusta

dilihat dengan terbentuknya lapisan kering akibat eksudat, diberi nilai (+) jika ada dan nilai (-) jika tidak ada. Produksi pus dilihat pada permukaan luka sebagai tanda adanya infeksi, diberi nilai (+) jika ada dan nilai (-) jika tidak terdapat pus (Yunanda dan Rinanda, 2017).

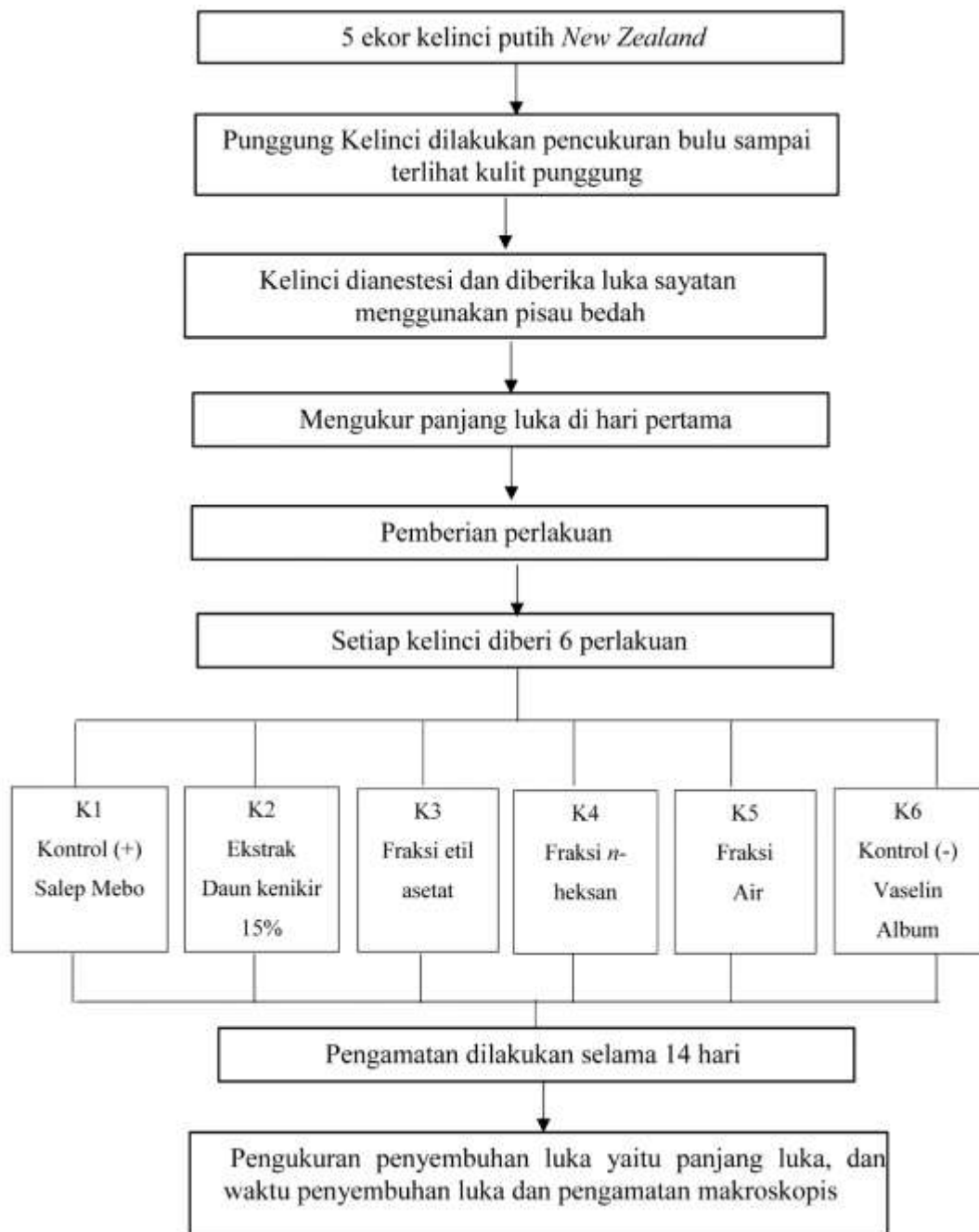
F. Analisis Data

Untuk mengetahui efektivitas antara ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun kenikir maka dilakukan analisis data. Data hasil pengukuran luka sayat yang dilakukan setiap hari selama 14 hari berupa data kuantitatif yang dianalisis menggunakan software IBM SPSS Statistic. Data tersebut dianalisis menggunakan metode *Shapiro-Wilk* untuk menentukan homogenitas dan normalitasnya. Jika data normal dilanjutkan analisis dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rata-rata antar kelompok, apabila hasil *One Way ANOVA* terjadi perbedaan maka dilanjutkan dengan menggunakan uji Post Hoc *Tukey HSD* untuk melihat perbedaan nyata antar perlakuan. Namun jika data tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* sebagai gantinya dan diikuti dengan uji *Mann-Whitney* apabila terjadi perbedaan.

G. Skema Penelitian



Gambar 7. Skema penelitian



Gambar 8. Skema pengukuran penyembuhan luka.