

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

#### **1. Populasi**

Pada penelitian yang akan dilakukan, peneliti menggunakan populasi yakni daun pangi (*Pangium edule*) dalam keadaan segar dan kondisi yang baik. Daun didapatkan dari wilayah Sumberpucung, Malang, Jawa Timur.

#### **2. Sampel**

Sampel merupakan bagian dari populasi, dalam hal ini berasal dari daun pangi, yang dianggap dapat merepresentasikan keseluruhan populasi. Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah daun pangi yang diformulasikan ke dalam sediaan emulgel dengan kandungan ekstrak tetap serta variasi konsentrasi HPMC sebesar 1,5%, 2%, dan 2,5%. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci putih *New Zealand*, yang dibagi ke dalam lima kelompok perlakuan, masing-masing terdiri dari 5 ekor kelinci.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama dalam penelitian ini merupakan ekstrak etanol pangi (*Pangium edule*) yang diperoleh melalui metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.

#### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel utama yang sudah diidentifikasi dapat dikategorikan kedalam 3 jenis variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang dengan sengaja dilakukan perubahan terus menerus untuk dijadikan pelajaran mengenai pengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi HPMC emulgel ekstrak etanol daun pangi.

Variabel tergantung adalah titik utama yang menjadi persoalan yang sekaligus menjadi kriteria penilaian. Peneliti menggunakan variabel tergantung mutu fisik emulgel, aktivitas pemulihan luka bakar dengan parameter diameter luka setelah kelinci diberi emulgel ekstrak etanol daun pangi.

Variabel terkontrol adalah variabel yang memiliki pengaruh pada variabel terikat, yang menjadikan hal ini perlu ditentukan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat direplikasi secara tepat dan akurat oleh peneliti lain. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah laboratorium, meliputi proses pembuatan ekstrak kental daun pangi, peralatan yang digunakan, luas luka yang dibuat, bobot, umur, tempat tinggal, serta dalamnya pencukuran bulu.

### **3. Definisi Operasional Variabel Utama**

Pertama, daun pangi adalah daun yang diperoleh dari daerah Sumberpucung, Malang, Jawa Timur yaitu daun berwarna hijau tua, utuh, segar dan bersih.

Kedua, serbuk daun pangi merupakan Serbuk daun pangi diperoleh melalui proses pengeringan daun pangi, yang kemudian digiling hingga halus dan disaring menggunakan ayakan berukuran mesh 60.

Ketiga, Ekstrak kental etanol daun pangi diperoleh melalui proses maserasi serbuk daun pangi menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian dilanjutkan dengan proses pemekatan menggunakan alat *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat.

Keempat, hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini menggunakan kelinci putih jenis *New Zealand* yang berumur 2–3 bulan dan memiliki berat badan sekitar 2–3 kg, yang diberikan perlakuan berupa induksi luka bakar.

Kelima, emulgel ekstrak etanol daun pangi ialah emulgel yang dibuat dengan beberapa campuran zat aktif ekstrak etanol daun pangi dan variasi *gelling agent* pada konsentrasi HPMC yaitu 1,5%, 2%, dan 2,5%.

Keenam, uji mutu fisik sediaan emulgel adalah uji dengan melihat organoleptis, viskositas, homogenitas, tipe emulgel, daya lekat, daya sebar, pH serta stabilitas.

Ketujuh, luka bakar adalah perlukaan pada kelinci dengan cara dibakar menggunakan lempeng panas berdiameter 2 cm di atas api selama 5 menit dan ditempelkan pada punggung kelinci selama 5 detik.

Kedelapan, aktifitas penyembuhan luka adalah melihat diameter kesembuhan luka bakar pada kelinci dengan pengukuran presentase sesudah perlakuan.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian meliputi ekstrak etanol daun pangi (*Pangium edule*) yang diperoleh dari Sumberpucung, Malang, Jawa Timur. Bahan formula emulgel seperti HPMC, span 80, Nipagin, paraffin cair, tween 80, gliserin, propilenglikol, Nipasol, etanol 96%, FeCl<sub>3</sub>, amil alkohol, HCl 2N, dan aquadest.

### 2. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian meliputi timbangan, jangka sorong, batang pengaduk, oven, blender, cawan porselen, pipet tetes, kertas saring, lempeng logam, kain flannel, alat-alat gelas standar laboratorium, penangas air, *rotary evaporator*, pH meter, pot plastik, viskometer *Brokfield*, mortir dan stamper, sudip, kertas perkamen, beaker glass, gelas ukur.

### 3. Hewan Uji

Pada penelitian ini menggunakan hewan uji kelinci putih *New Zealand (Oryctolagus cuniculus)* dengan kelamin jantan berumur sekitar 2-3 bulan, dan memiliki berat antara 2-3kg.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman pangi dilakukan sebagai langkah untuk memastikan bahwa bahan simplisia yang digunakan sesuai dengan jenis dan spesies yang benar, serta menghindari kesalahan dalam proses pengumpulan maupun risiko kontaminasi dengan tanaman lain, dilakukan proses identifikasi di Laboratorium Herbal Medica Batu UPT.

### 2. Pembuatan Serbuk Daun Pangi

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa daun pangi yang diperoleh dari wilayah Malang, Jawa Timur. Daun yang masih segar terlebih dahulu mengalami proses sortasi basah, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C. Setelah proses pengeringan, daun digiling hingga menjadi serbuk halus dan disaring menggunakan ayakannya berukuran mesh nomor 60.

### 3. Penetapan Susut Pengeringan Serbuk Daun Pangi

Prosedur penetapan susut pengeringan pada serbuk daun pangi dilakukan dengan menimbang serbuk daun pangi dalam sejumlah 2 gram, bahan dimasukkan dalam alat *moisture balance*, kemudian tunggu sampai alat berbunyi dan menunjukkan angka konstan % (Depkes RI,

2000). Simplisia dinyatakan memenuhi persyaratan kadar air apabila kandungan airnya tidak melebihi 10% (Depkes, 2013).

#### **4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pangi**

Serbuk daun pangi 600 gram direndam dalam 6 liter etanol 96% dalam botol kaca gelap, hindari matahari langsung dan biarkan selama tiga hari sambil diaduk setiap 6 jam sekali. Setelah tiga hari, rendaman disaring menggunakan kain flanel untuk saringan pertama dan penyaringan kedua dengan kertas saring, ulangi proses maserasi minimal sekali dengan menggunakan jenis pelarut yang sama, volume pelarut yang digunakan setengah dari volume pelarut ekstraksi pertama, apabila telah selesai lanjutkan proses penguapan dengan alat *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Setelah itu hitung rendemen yang didapatkan dengan presentase berat antara berat (b/b) dan berat serbuk simplisia yang dipakai. Rendemen setidaknya harus memenuhi syarat sesuai monografi (Depkes RI, 2017).

#### **5. Susut Pengeringan Ekstrak Daun Pangi**

Metode gravimetri digunakan untuk menentukan susut pengeringan ekstrak, dengan cara menimbang 1–2 gram ekstrak daun pangi ke dalam botol timbang dangkal yang telah ditutup dan ditara, setelah sebelumnya dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit. Sebelum proses penimbangan, ekstrak diratakan di dalam botol dengan cara menggoyangkan botol hingga membentuk lapisan setebal kurang dari 5 mm hingga 10 mm, kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengering. Tutup botol dibuka, dan keringkan pada suhu 105°C hingga bobot stabil. Setiap kali sebelum proses pengeringan dilanjutkan, botol timbang ditutup dan didinginkan dalam eksikator hingga suhu kamar tercapai. Pengeringan diulang sampai diperoleh bobot konstan, yakni ketika selisih dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 2000).

#### **6. Identifikasi Ekstrak Kental Daun Pangi**

Identifikasi ekstrak kental daun pangi dilakukan secara organoleptis. Organoleptis ekstrak kental daun pangi didapatkan berdasarkan bentuk, warna, serta bau dari ekstrak kental daun pangi.

#### **7. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Daun Pangi**

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam tanaman pangi. Identifikasi yang dilakukan meliputi flavonoid, saponin, dan tanin.

**7.1 Flavonoid.** Sebanyak 1 gram ekstrak kental daun pangi dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl pekat. Campuran tersebut dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit. Adanya perubahan warna menjadi merah ataupun kuning menunjukkan hasil positif terhadap kandungan senyawa flavonoid (Muthmainnah, 2019).

**7.2 Saponin.** Sebanyak 1 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas. Campuran tersebut didinginkan terlebih dahulu, lalu dikocok kuat selama 10 detik. Adanya senyawa saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih setinggi 1–10 cm yang stabil dan tidak menghilang setidaknya selama 10 menit. Penambahan 1 tetes HCl 2 N tidak menyebabkan buih tersebut menghilang, yang semakin menguatkan indikasi positif terhadap keberadaan saponin (Muthmainnah, 2019).

**7.3 Tanin.** Sebanyak 1 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas dan dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit. Filtrat yang diperoleh kemudian ditambahkan sebanyak 3 hingga 4 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$ . Reaksi positif terhadap senyawa tanin ditunjukkan melalui perubahan warna; apabila larutan berubah menjadi hijau kebiruan atau hijau kehitaman, hal ini mengindikasikan adanya tanin golongan katekol, sedangkan warna biru kehitaman menunjukkan keberadaan tanin jenis pirogallol (Muthmainnah, 2019).

## 8. Rancangan Formulasi Sediaan Emulgel

Proses penelitian yang akan dilakukan ini menggunakan 3 variasi konsentrasi ekstrak etanol daun pangi. Ketiga konsentrasi dibuat dalam bentuk sediaan emulgel yang berbasis fase minyak dan air, serta Bioskin Gel yang digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini untuk membandingkan aktivitas penyembuhan luka dengan sediaan emulgel ekstrak daun pangi.

**Tabel 2. Rancangan formulasi emulgel daun pangi**

Nama bahan	Konsentrasi %				Fungsi
	F1	F2	F3	F4	
Ekstrak daun pangi	5	5	5	-	Zat aktif
HPMC	1,5	2	2,5	2,5	<i>gelling agent</i>
Paraffin cair	7,5	7,5	7,5	7,5	Pembawa minyak
Tween 80	1,8	1,8	1,8	1,8	Emulgator
Span 80	0,7	0,7	0,7	0,7	Emulgator
Propilenglikol	5	5	5	5	Peningkat penetrasi
Nipagin	0,18	0,18	0,18	0,18	Pengawet
Nipasol	0,02	0,02	0,02	0,02	Pengawet
Gliserin	3	3	3	3	Humektan (melembabkan)
<i>Aquadest ad</i>	100	100	100	100	Pelarut

**Keterangan :**

FI : Emulgel ekstrak daun pangi konsentrasi HPMC 1,5%

FII : Emulgel ekstrak daun pangi konsentrasi HPMC 2%

FIII : Emulgel ekstrak daun pangi konsentrasi HPMC 2,5%

K- : Kontrol negatif formula ekstrak daun pangi

K+ : Kontrol positif Bioskin Gel.

**9. Pembuatan Sediaan Emulgel Ekstrak Etanol Daun Pangi**

Pembuatan emulgel dilakukan sesuai dengan konsentrasi yang tercantum dalam formula pada tabel. Pertama-tama, setiap bahan dasar emulgel ditimbang. Pembuatan basis emulsi diawali dengan pencampuran Span 80 dan parafin cair sebagai fase minyak, yang dipanaskan hingga suhu 70°C. Pada saat yang sama, fase air disiapkan dengan mencampurkan Tween 80 dan sebagian aquadest, juga pada suhu 70°C. Setelah itu, fase minyak ditambahkan secara perlahan ke dalam fase air sambil diaduk terus-menerus hingga membentuk emulsi yang stabil. Untuk pembuatan basis gel, HPMC ditaburkan secara bertahap ke dalam aquadest panas bersuhu sekitar 80°C, kemudian dibiarkan selama 20–30 menit hingga mengembang, dan digerus hingga membentuk gel yang homogen. Metil paraben dan propil paraben dilarutkan dalam propilenglikol, kemudian ditambahkan gliserin dan dicampurkan ke dalam basis gel. Emulsi dan gel yang telah terbentuk dicampurkan secara perlahan sambil digerus hingga menghasilkan massa emulgel yang homogen. Terakhir, ekstrak daun pangi dan sisa aquadest ditambahkan ke dalam massa emulgel dan digerus hingga merata.

**10. Pengujian Mutu Fisik Sediaan Emulgel**

**10.1 Uji Organoleptis.** Sediaan emulgel yang dibuat diamati tampilannya secara visual dari warna, bau, dan tekstur (Kemenkes RI, 2020).

**10.2 Uji Homogenitas.** Pada uji ini ambil sediaan emulgel sebanyak 0,5 gram kemudian oleskan dan ratakan pada objek glass. Lalu peneliti mengamati permukaan yang rata tersebut secara visual. Emulgel yang homogen akan terasa halus pada permukaan kaca (Kemenkes RI, 2020).

**10.3 Uji pH.** Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi terlebih dahulu pada titik pH netral (pH 7). Elektroda pH kemudian dicelupkan ke dalam sediaan emulgel, dan nilai pH dicatat setelah pembacaan menunjukkan angka yang stabil (Fajar Ekowati *et al.*, 2024). Umumnya nilai yang baik 4,5-7,5 (Kemenkes RI, 2020).

**10.4 Uji Viskositas.** Pengujian viskositas dilakukan menggunakan viskometer tipe Brookfield pada suhu 25°C dan harus sesuai dengan karakteristik sediaan yang diinginkan (Kemenkes RI, 2023). Sediaan emulgel dimasukkan ke dalam wadah berkapasitas 100 mL, kemudian diukur menggunakan spindle nomor 7 pada kecepatan putar 100 rpm (Fajar Ekowati *et al.*, 2024).

**10.5 Uji Daya Lekat.** Pengujian daya lekat dilakukan dengan menempatkan emulgel di antara dua kaca objek dan membebani dengan 500 gram selama 5 menit. Setelah beban dilepas, waktu yang dibutuhkan hingga kedua kaca terlepas digunakan sebagai indikator daya lekat yang diukur menggunakan stopwatch (Fajar Ekowati *et al.*, 2024). Sediaan harus melekat  $\geq 4$ -6 detik (Badan Standarisasi Nasional, 1996).

**10.6 Uji Daya Sebar.** Pengujian daya sebar emulgel dilakukan dengan meletakkan sediaan di pusat permukaan alat uji, kemudian ditutup kaca penutup dibiarkan selama 5 menit. Diameter pada sebar awal diukur menggunakan penggaris. Uji dilanjutkan dengan pemberian beban bertingkat (20 g, 50 g, dan 100 g) masing-masing selama 5 menit, dan dilakukan pengukuran ulang terhadap luas sebarannya (Fajar Ekowati *et al.*, 2024). Beban standar pada diameter 0,5 g dan diameter sebaranya direntang 5-7 cm (Badan Standarisasi Nasional, 1996).

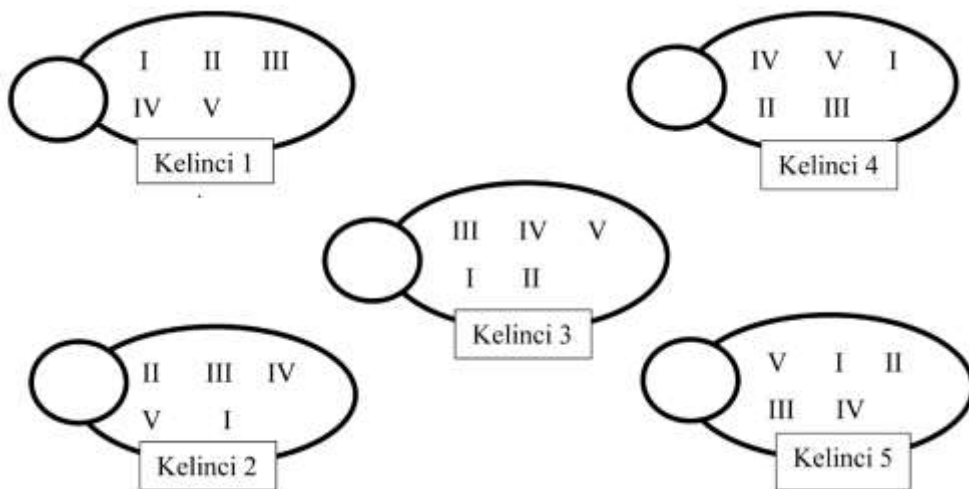
**10.7 Uji Tipe Emulsi.** Uji dilakukan dengan metode pewarnaan untuk mengidentifikasi tipe emulsi yang diinginkan, yakni emulsi minyak dalam air (M/A). Proses pewarnaan melibatkan penerapan zat warna yang larut dalam air, yaitu *Metylen Blue*. Metode pewarnaan dilakukan dengan 1 gram emulgel dalam *Drop plate* kemudian teteskan pewarna *Methylen Blue* campurkan dan amati untuk memastikan ada atau tidaknya pemisahan antara komponen air dan minyak dalam sediaan (Kemenkes RI, 2020).

**10.8 Uji Stabilitas.** Metode *cycling test* diterapkan dalam uji stabilitas sediaan berguna untuk mengevaluasi ketahanan produk terhadap perubahan suhu ekstrem. Sediaan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam, lalu dipindahkan ke oven dengan suhu 40°C selama 24 jam sebagai satu siklus pengujian. Uji stabilitas sediaan dilangsungkan sejumlah 3 siklus lalu amati hasil dan bandingkan pada kondisi sebelum dan sesudah pengujian. Pengujian ini dikerjakan pada setiap formula (Zulkarnain *et al.*, 2024).

## 11. Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan terdiri dari 5 kelinci dengan 5 perlakuan pada kulit punggung kelinci :

- Luka I : dioleskan formula 1 emulgel dengan konsentrasi HPMC 1,5%
- Luka II : dioleskan formula 2 emulgel dengan konsentrasi HPMC 2%
- Luka III : dioleskan formula 3 emulgel dengan konsentrasi HPMC 2,5%
- Luka IV : dioleskan formula emulgel tanpa ekstrak (kontrol negatif)
- Luka V : dioleskan Bioskin Gel (kontrol positif)



Gambar 6. Pengelompokan Hewan Uji

## 12. Perlakuan Hewan Uji Luka Bakar Pada Kelinci

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 5 ekor kelinci putih memiliki bobot 1-1,5 kg dan dipilih dalam keadaan sehat, bebas dari stres, rasa takut, memiliki rasa nyaman terhadap sekitar, bebas dari luka, bebas dari rasa lapar dan haus. Kelinci ditempatkan pada kandang secara individual sesuai kelompok perlakuan, diberi makan per hari dan minum secukupnya. Berikan ruang adaptasi terhadap lingkungan sekitarnya selama 5 hari (Mappa *et al.*, 2013). Pada hari ke 6 dibuat luka bakar, kemudian bulu di sekitar punggung kelinci yang dicukur dan di beri alkohol 70%, kelinci diberi bius menggunakan *ethyl chloride* 2 kali semprot selama 5 detik.

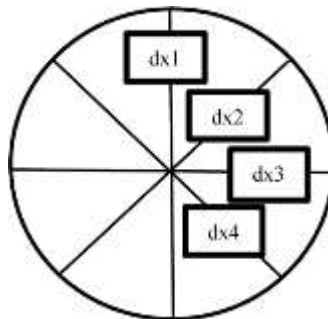
Luka bakar dibuat dengan cara menempelkan lempeng logam berdiameter 2 cm yang sebelumnya telah dipanaskan di api biru selama 3 menit ke punggung kelinci selama 5 detik. Perlakuan selanjutnya diberikan dengan mengoleskan sediaan sebanyak 0,1 gram pada masing-masing kelompok, yang terdiri dari 5 kelompok perlakuan (Mappa *et al.*,



2013). Pengolesan pada pagi dan sore setiap 2 kali sehari dioles tipis-tipis selama 21 hari.

### 13. Pengukuran Persentase Penyembuhan Luka Bakar Kelinci

Persentase penyembuhan dihitung berdasarkan pengukuran diameter luka bakar pada kelinci yang telah diinduksi luka, dimulai pada hari ke-2 menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan setiap pagi pada masing-masing hewan uji selama periode 21 hari. Luka dianggap sembuh bila diameternya mengecil menjadi nol sentimeter atau sudah menutup (Handayani *et al.*, 2016).



Gambar 7. Cara Mengukur Diameter Luka Bakar

$$dxn = \frac{dx1 + dx2 + dx3 + dx4}{4}$$

Keterangan :

dx1 = Pengukuran dilakukan secara horizontal dari atas ke bawah

dx2 = Pengukuran dilakukan dari kemiringan sudut 45°

dx3 = Pengukuran dilakukan secara vertikal dari kanan ke kiri

dx4 = Pengukuran dilakukan dari kemiringan 135°

parameter yang diamati dalam pengukuran adalah tingkat penyembuhan luka bakar pada hari ke-x. Persentase penyembuhan luka dihitung menggunakan rumus berikut :

$$Px = \frac{(dx1)^2 - (dxn)^2}{(dx1)^2} \times 100\%$$

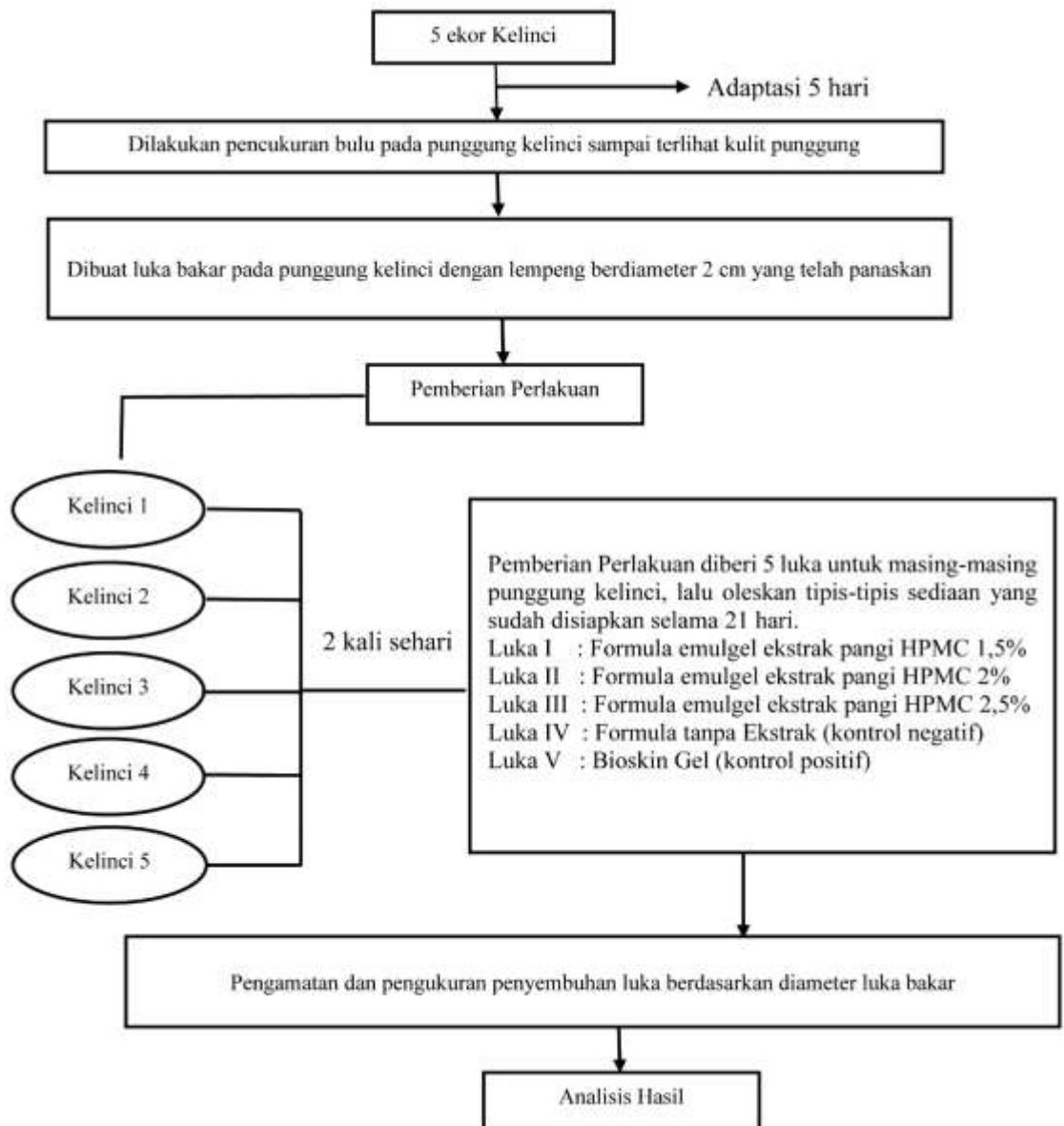
Keterangan :

Px = Presentase penyembuhan luka pada hari ke x

dx1 = Diameter luka bakar hari pertama

dxn = Diameter luka bakar hari ke-n

### E. Skema Penelitian



Gambar 8. Skema Jalannya Penelitian

## F. Analisis Data

Berdasarkan dari data hasil pengujian mutu fisik sediaan emulgel ekstrak etanol daun pangi dengan variasi konsentrasi HPMC sebesar 1,5%, 2%, dan 2,5%, masing-masing formula dievaluasi melalui uji karakteristik fisik, meliputi organoleptik, homogenitas, pH, viskositas, daya lekat, daya sebar, serta stabilitas emulgel. Setiap parameter dianalisis sebelum dan sesudah uji stabilitas untuk mengetahui adanya perubahan mutu sediaan. Selain itu, aktivitas penyembuhan luka bakar oleh ekstrak etanol daun pangi dievaluasi atau diamati selama 21 hari melalui pengukuran rata-rata diameter luka pada setiap kelompok hewan uji. Persentase penyembuhan dihitung berdasarkan penurunan ukuran diameter luka seiring waktu. Seluruh data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik menggunakan perangkat lunak SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Uji normalitas dilakukan terlebih dahulu dengan metode *Shapiro-Wilk* jika data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ), maka dilanjutkan dengan analisis *One Way ANOVA* pada tingkat kepercayaan 95%. Untuk mengetahui perbedaan signifikan antar formula, dilakukan uji lanjut menggunakan metode *Post-Hoc Tukey*. Apabila ditemukan data yang tidak signifikan (sig) kurang dari 0,05, digunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Uji Stabilitas menggunakan *Paired Test*.