

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan bertempat pada Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dan Laboratorium Biologi Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Penelitian akan dilakukan pada bulan September 2021 sampai Februari 2022.

3.2 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan berbentuk eksperimental laboratorium dengan jenis "*true experimental design*". Rancangan penelitian yang dilakukan menggunakan rancangan *Post Test Only Control Group Design*.

3.3 Sampel

Kriteria penelitian sebagai berikut :

3.3.1 Kriteria Inklusi

Sampel hewan coba yang digunakan adalah kelinci jantan yang sehat berwarna putih dengan berat 1,5 kg - 2 kg berumur 4 bulan. Sampel tanamannya menggunakan tanaman meniran yang segar dan berwarna hijau. Tanaman meniran ini yang digunakan untuk penelitian adalah semua bagian

dari tanaman meniran mulai dari daun, akar, batang, dan buahnya. Tanaman meniran ini dipetik pada pukul 09.00 – 12.00 WIB.

3.3.2 Kriteria Eksklusi

Sampel kelinci mendadak mati dan sakit. Sampel tanaman yang tidak utuh.

3.3.3 Cara Sampling

Penelitian ini menggunakan randomisasi sederhana yang pengelompokannya antara kelompok kontrol dan kelompok eksperimen dilakukan secara acak. Dalam rancangan ini memungkinkan untuk mengukur pengamatan kelompok kontrol dan uji²³.

3.3.4 Besar Sampel

Sampel akan dihitung berdasarkan rumus Federer¹⁷, yaitu :

$$(T - 1) (N - 1) \geq 15$$

Keterangan:

T : Jumlah perlakuan

N : Jumlah sampel

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan yaitu 1 sebagai kontrol positif, 1 sebagai kontrol negatif, dan 3 konsentrasi yang berbeda dari ekstrak kental herba meniran sehingga sampel hewan coba yang akan dibutuhkan yaitu:

$$(5 - 1) (N - 1) \geq 15$$

$$(4) (N-1) \geq 15$$

$$(N - 1) \geq 15/4$$

$$N \geq 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

Berdasarkan rumus penelitian ini sampel yang digunakan adalah 5 ekor kelinci. Setiap kelinci mendapatkan 5 perlakuan untuk kontrol positif, kontrol negatif, dan 3 kontrol uji.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yang digunakan adalah perbedaan pemberian kadar ekstrak etanol 96% herba meniran ke hewan uji yaitu kadar 3%, 6%, dan 9%.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian yang dilakukan yaitu waktu penyembuhan luka dan total skor dari pengamatan kriteria nagaoka.

3.5 Definisi Operasional

Tabel I.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Unit	Skala	Rentang nilai variabel
1.	Kadar Ekstrak (Banyaknya ekstrak yang akan digunakan untuk sampel uji)	ml/gram (%)	Numerik	-
2.	Waktu penyembuhan luka (Durasi lamanya proses penyembuhan luka)	Hari	Numerik	-
3.	Skor Kriteria Nagaoka (Kriteria penilaian penyembuhan luka sayat secara makroskopis)	-	Numerik	1 - 3

3.6 Cara Pengumpulan Data

Pengumpulan data diperoleh dengan data primer yaitu:

3.6.1 Bahan

Bahan dalam penelitian ini yang digunakan adalah :

- a. Bahan tanaman, tanaman yang digunakan adalah herba meniran yang diperoleh dari budidaya tanaman meniran dari Desa Gotputuk, Kecamatan Ngawen, Kabupaten Blora, Jawa Tengah.
- b. Hewan coba, penelitian ini menggunakan hewan coba berupa kelinci jantan yang sehat memiliki berat 1,5 kg - 2 kg umur 4 bulan.

c. Bahan kimia, penelitian ini menggunakan CMC Na 0,5%, etanol 96%, betadine, alkohol 70%, CHCl₃, H₂SO₄, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, HCl pekat, HCl 1%, NH₃, FeCl₃ 1%, asetat anhidrat, asam sulfat pekat, etil asetat, asam sulfat 10%, dan aquades.

3.6.2 Alat

Beberapa peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

- a. Alat utama yang digunakan dalam proses ekstraksi yaitu neraca analitik, perangkat gelas, blender, rotary evaporator, hot plate, corong, labu erlenmeyer, toples, batang pengaduk, kertas saring, dan aluminium foil, *moisture analyzer*.
- b. Alat yang akan digunakan untuk menyayat hewan uji penggaris, sarung tangan, masker, alat cukur bulu, spuit injeksi, dan *handscoon*.
- c. Alat untuk keperluan pada hewan coba yaitu terdiri dari kandang peliharaan, tempat makan dan minum.
- d. Alat untuk standarisasi dan skrining fitokimia adalah botol timbang, krus porselin, labu ukur, botol kaca, desikator, cawan porselen, tabung reaksi.

3.7 Cara Kerja

3.7.1 Determinasi Tanaman

Penelitian sebelum dilakukan tanaman meniran dideterminasi di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika, Program Studi Biologi, Fakultas

Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro. Determinasi dilakukan dengan cara membandingkan ciri dan sifat sampel yang dilakukan oleh determinator.

3.7.2 Jenis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini menggunakan data primer yang dikumpulkan melalui uji eksperimental oleh peneliti.

3.7.3 Pembuatan Simplisia Herba Meniran

Tanaman meniran yang telah diambil semua bagian mulai dari bagian daun sampai akarnya termasuk buah meniran. Dipetik pada pukul 09.00 – 12.00 WIB, kemudian dilakukan pemisahan pengotor padat simplisia bagian-bagian yang tidak diperlukan sebelum proses pengeringan. Hal ini dilakukan agar mendapatkan herba yang layak dan bagus serta kegiatan semuanya dilakukan secara manual¹⁹.

Dilakukan pencucian simplisia yang berfungsi untuk menghilangkan tanah atau benda asing yang melekat pada simplisia herba meniran. Pencucian ini dilakukan dengan air mengalir¹⁹.

Setelah itu herba meniran dikeringkan dengan cara diangin-anginkan terlindung dari cahaya matahari langsung bertujuan menghindari rusaknya senyawa aktif yang tidak tahan pada temperatur tinggi. Ciri-ciri simplisia kering ketika diremas dengan tangan berbunyi kres dan kadar air kurang dari 10%. Selanjutnya dilakukan pengecekan kadar air menggunakan *moisture analyzer*. Setelah itu, sortasi kering dengan memisahkan pengotor yang terdapat pada sampel kering. Lalu, simplisia kering ditimbang terlebih dahulu

sebelum dibuat menjadi simplisia serbuk. Simplisia serbuk herba meniran dibuat dengan cara simplisia kering dihaluskan menjadi serbuk menggunakan alat grinder. Lalu dilakukan ayakan dengan no ayakan mesh40, setelahnya disimpan dalam kantong yang kedap udara serta diberikan silika gel untuk tetap kering tidak lembab¹⁷.

3.7.4 Pembuatan Ekstrak Herba Meniran dengan Etanol 96%

Simplisia serbuk herba meniran kering dilakukan penimbangan, lalu setelah ditimbang simplisia dimasukkan kedalam toples kaca untuk dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi. Metode maserasi ini dilakukan dengan merendam simplisia serbuk dengan pelarut etanol 96% selama semalaman dan sesekali diaduk. Perbandingan simplisia serbuk dengan pelarut yaitu 1:10. Setelah dilakukan maserasi, dilakukan pengulangan maserasi (remaserasi) pada hari berikutnya dimana dilakukan pengulangan selama 5 hari. Remaserasi dilakukan dengan menambahkan larutan etanol 96% selama 1 malam sambil diaduk sesekali, lalu disaring. Filtrat hasil maserasi dan remaserasi dikumpulkan menjadi satu lalu dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 50°C⁷. Persen rendemen dihitung berdasarkan presentase bobot per bobot antara rendemen yang didapatkan dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan lalu rendemen dicatat¹⁷. Perhitungannya dapat dilihat rumus berikut¹⁹.

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$$

3.7.5 Standarisasi

3.7.4.1 Standarisasi Simplisia dan Ekstrak Spesifik

A. Pengamatan Makroskopik

Pengamatan makroskopik memiliki tujuan untuk menentukan kriteria yang khas dari simplisia dan ekstrak yang diobservasi secara langsung berdasarkan bentuknya dari masing-masing bagian simplisia dan bentuk ekstraknya.

B. Penetapan Kadar Sari Larut dalam Etanol

5g simplisia dan ekstrak herba meniran dilakukan maserasi dengan menggunakan etanol 95% selama 24 jam dalam botol kaca. Pengocokan sesekali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam, lalu penyaringan filtrat. Penguapan filtrat sebanyak 20 mL sampai kering dalam cawan porselen yang sudah dipanaskan dan dikalibrasi. Residu dipanaskan pada suhu 105⁰C pada oven sampai bobot tetap. Lalu, dimasukkan kedalam desikator dan dibiarkan selama 10 menit dan ditimbang. Ulangi perlakuan sampai mendapatkan bobot yang konstan. Kadar dalam persen sari larut dalam etanol 95% dihitung terhadap bobot ekstrak awal²⁶.

3.7.4.2 Standarisasi Simplisia dan Ekstrak Non Spesifik

A. Penetapan Kadar Abu Total

Simplisia dan ekstrak ditimbang masing-masing sebanyak 2 gr, kemudian dimasukkan ke dalam krus porselin yang telah dikalibrasi pada suhu 600⁰C. Krus porselin berisi sampel dipanaskan pada suhu 800⁰C kemudian

dinginkan lalu ditimbang sampai memperoleh bobot yang konsisten²⁶.

Berikut rumus penetapan kadar abu total:

$$\text{Kadar Abu Total} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

B. Penetapan Kadar Sari Larut dalam Air

Simplisia dan ekstrak masing-masing ditimbang 5g, lalu dilakukan maserasi menggunakan air-kloroform 100mL selama 24 jam (2,5 ml kloroform dalam akuades sampai 100 ml pada labu ukur). Pengocokan sesekali selama 6 jam pertama, lalu biarkan selama 18 jam, setelahnya saring filtrat. 20 mL filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang telah dilakukan kalibrasi terlebih dahulu. Sisa dipanaskan pada suhu 105⁰C sampai bobot utuh²⁶.

3.7.6 Skrining Fitokimia

3.7.6.1 Uji Identifikasi Senyawa Flavonoid

Ekstrak herba meniran yang telah dilarutkan dalam etanol 96% diambil 5ml lalu diambil beberapa tetes dimasukkan ke dalam tabung kosong lalu ditambahkan serbuk Mg dan HCl pekat 4 tetes. Reaksi positif warna berubah menjadi merah atau jingga³⁷.

3.7.6.2 Uji Identifikasi Senyawa Saponin

Sebanyak 0,2 gram ekstrak herba meniran ditambahkan air panas 100 ml lalu didihkan selama 5 menit dan saring. Kemudian diambil 10mL larutan tadi dimasukkan kedalam tabung lalu dikocok secara vertikal selama

10 detik dibiarkan selama 10 menit. Hasil positif jika terbentuk adalah busa yang stabil dan setelah ditambahkan 1 tetes asam klorida 1% busa tetap stabil¹⁹.

3.7.6.3 Uji Identifikasi Senyawa Alkaloid

Sejumlah ekstrak dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 2ml, lalu ditambahkan 10 tetes HCl, kemudian ditambahkan dengan pereaksi Dragendrof. Hasil uji dikatakan positif jika dengan pereaksi Dragendorf dibuktikan dengan adanya endapan merah hingga jingga¹⁷.

3.7.6.4 Uji Identifikasi Senyawa Tanin

Ekstrak herba meniran ditambah dengan 100 ml air kemudian dilakukan pendidihkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat ditetesi dengan FeCl₃. 1%. Hasil positifnya dibuktikan dengan adanya warna hitam kebiruan.¹⁷

3.7.6.5 Uji Identifikasi Senyawa Steroid dan Terpenoid

Ekstrak herba meniran dilarutkan dengan 2 ml etanol 96%, lalu diambil beberapa untuk diletakan pada plat tetes bersih, kemudian ditambahkan pereaksi Liberman Burchad. Hasil positif dari uji ini adalah akan berubah warna menjadi biru atau hijau untuk steroid dan berubah warna menjadi ungu atau merah untuk triterpenoid¹⁷.

3.7.7 Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) terhadap Penyembuhan Luka Sayat Pada Kelinci Jantan

3.7.7.1 Persiapan Hewan Uji Coba

Disiapkan hewan uji kelinci jantan dengan berat sekitar 1,5 kg - 2 kg. Sebelum diberi perlakuan kelinci dibiarkan adaptasi terlebih dahulu selama 7 hari dalam suasana laboratorium. Hewan uji diberi makan dan minum yang cukup sehingga tidak ada perubahan berat badan dan tetap sehat. Hewan uji dicukur bulunya.

3.7.7.2 Preparasi Sampel Ekstrak Kental Etanol 96% Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn)

Perhitungan banyaknya ekstrak herba meniran yang akan dibuat menjadi 3 variasi kadar yaitu 3%, 6%, dan 9% masing-masing sebanyak 10 ml. Lalu 3 variasi kadar tersebut akan diberikan secara tetes menggunakan untuk ekstrak kental yang akan diberikan kepada kelinci dikonversikan sebagai berikut:

- Ekstrak herba meniran dengan kadar 3%

$$= \frac{3}{100} \times 10 \text{ ml} = 0,3 \text{ gram}$$

- Ekstrak herba meniran dengan kadar 6%

$$= \frac{6}{100} \times 10 \text{ ml} = 0,6 \text{ gram}$$

- Ekstrak herba meniran dengan kadar 9%

$$= \frac{9}{100} \times 10 \text{ ml} = 0,9 \text{ gram}$$

Tabel III.2 Persiapan Sampel

Bahan	Preparasi sampel disuspensikan dengan CMC Na 0,5%		
	Kadar 3% (^{b/v})	Kadar 6% (^{b/v})	Kadar 9% (^{b/v})
Ekstrak Kental Herba Meniran	0,3 gram	0,6 gram	0,9 gram
Suspensi CMC Na 0,5%	Ditambah sampai 10ml	Ditambah sampai 10ml	Ditambah sampai 10ml

Pembuatan suspensi CMC Na 0,5% yaitu dengan meleburkan 0,5 g CMC kedalam mortir yang telah terisi 10mL aquades yang panas, lalu di campur dan di homogenkan. Kemudian, suspense CMC Na 0,5% dimasukkan kedalam labu ukur 100mL. Lalu ditambahkan aquades hingga volume 100 mL³⁰.

Ekstrak kental herba meniran diberikan dengan cara diteteskan, ketika ingin meneteskan sekitar 2 tetes dimisalkan 20 tetes sama dengan 1 ml sehingga:

$$1 \text{ ml} = 20 \text{ tetes}$$

$$x \text{ ml} = 2 \text{ tetes}$$

$$= 2/20 \text{ (ml)}$$

$$x = 0,1 \text{ ml}$$

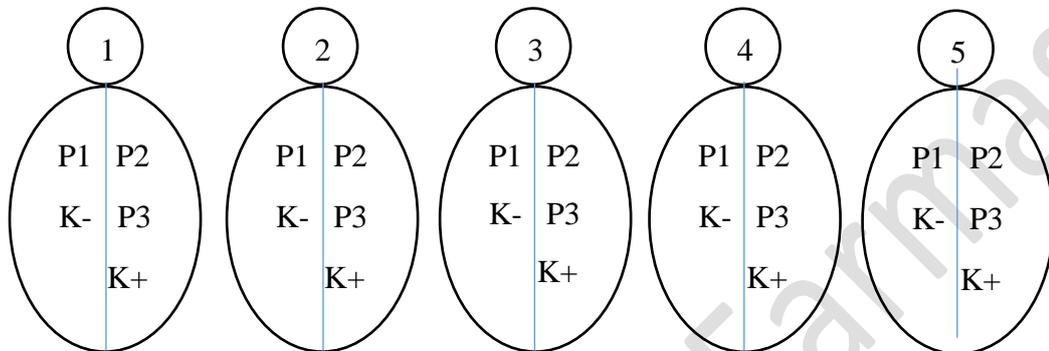
Jadi, 0,1 ml larutan ekstrak herba meniran setara dengan 2 tetes injeksi syringe tanpa jarum.

3.7.7.3 Perlakuan pada Hewan Uji Coba

Kelinci-kelinci yang akan digunakan untuk dilakukan penyayatan, diberi 1 tanda pada punggung masing-masing kelinci. Jadi 1 ekor kelinci mendapatkan 1 perlakuan sayat. Untuk punggung kanan diberi 2 tanda dengan jarak 2 cm sejajar, dengan keterangan untuk kontrol positif dan negatif. Kemudian untuk punggung kiri diberi 3 tanda dengan jarak masing-masing 2 cm sejajar dengan keterangan untuk ekstrak herba meniran kadar 3%, 6% dan 9%. Sebelum dilakukan perlakuan kelinci dibius menggunakan campuran ketamine dan xylazine yang disuntikkan secara intra muscular (0,1ml/100grBB). Lalu, diberi tanda menggunakan spidol hitam pada daerah punggung. Daerah yang telah diberi tanda dicukur bulunya pada bagian tersebut hingga bersih. Setelah dilakukan pencukuran, dibuat luka pada kelinci yang mana sebelumnya diberi alkohol 70% terlebih dahulu untuk sterilisasi atau pembersihan dari mikroorganisme agar pada saat membuat luka tidak menyebabkan infeksi. Luka dibuat dengan ukuran panjang ± 2 cm dengan kedalaman hingga 0,2 cm. Perlakuan ini dilakukan dibuat luka dengan menggunakan pisau bisturi yang sudah disterilkan dengan alkohol 70%. Setelahnya, masing-masing luka tersebut ditetaskan larutan ekstrak kental etanol 96% herba meniran dengan masing-masing kadar 3%, 6%, dan 9% sebagai kontrol

uji. Untuk kontrol negatif menggunakan CMC Na 0,5% dan kontrol positif menggunakan betadine²¹.

Berikut rencana perlakuan pada kelinci :



Gambar 3.1 Rencana Perlakuan pada Kelinci

Keterangan :

P1 = Kelompok kelinci yang sudah disayat untuk diberi ekstrak kental herba meniran dengan konsentrasi 3% setiap 2x sehari.

P2 = Kelompok kelinci yang yang sudah disayat untuk diberi ekstrak kental herba meniran dengan konsentrasi 6% setiap 2x sehari.

P3 = Kelompok kelinci yang yang sudah disayat untuk diberi ekstrak kental herba meniran dengan konsentrasi 9% setiap 2x sehari.

K- = Kelompok kelinci yang yang sudah disayat untuk diberi suspensi CMC Na 0,5% setiap 2x sehari.

K+= Kelompok kelinci yang yang sudah disayat untuk diberi betadine setiap 2x sehari.

Perlakuan pemberian ekstrak kental, kontrol negatif, dan kontrol positif dilakukan setiap 2 x 1 sehari dengan cara diteteskan sebanyak 0,1 ml menggunakan spuit injeksi tanpa jarum 0,1ml pada pagi dan sore hari¹⁷.

3.7.7.4 Pengamatan Penyembuhan Luka

Proses pengamatan luka dilakukan selama luka sembuh. Pengukuran panjang luka yang sembuh diukur menggunakan penggaris¹⁷. Kecepatan penyembuhan luka dapat dihitung menggunakan rumus²⁹:

$$\% \text{ Penyembuhan luka} = \frac{\text{Area Penyembuhan}}{\text{Panjang Luka Awal}} \times 100\%$$

Area Penyembuhan = Panjang Luka Awal – Panjang Luka Akhir

Kemudian dilakukan pengamatan proses penyembuhan luka secara makroskopis selama luka sembuh dengan observasi menggunakan kriteria Nagaoka. Waktu pengamatan selama 14 hari jika luka belum sembuh sampai hari ke 14 langsung dikategorikan kriteria Nagaoka dengan waktu penyembuhan lebih dari 14 hari. Setelah pengamatan luka, didapatkan data penyembuhan luka lalu diuji secara statistik.

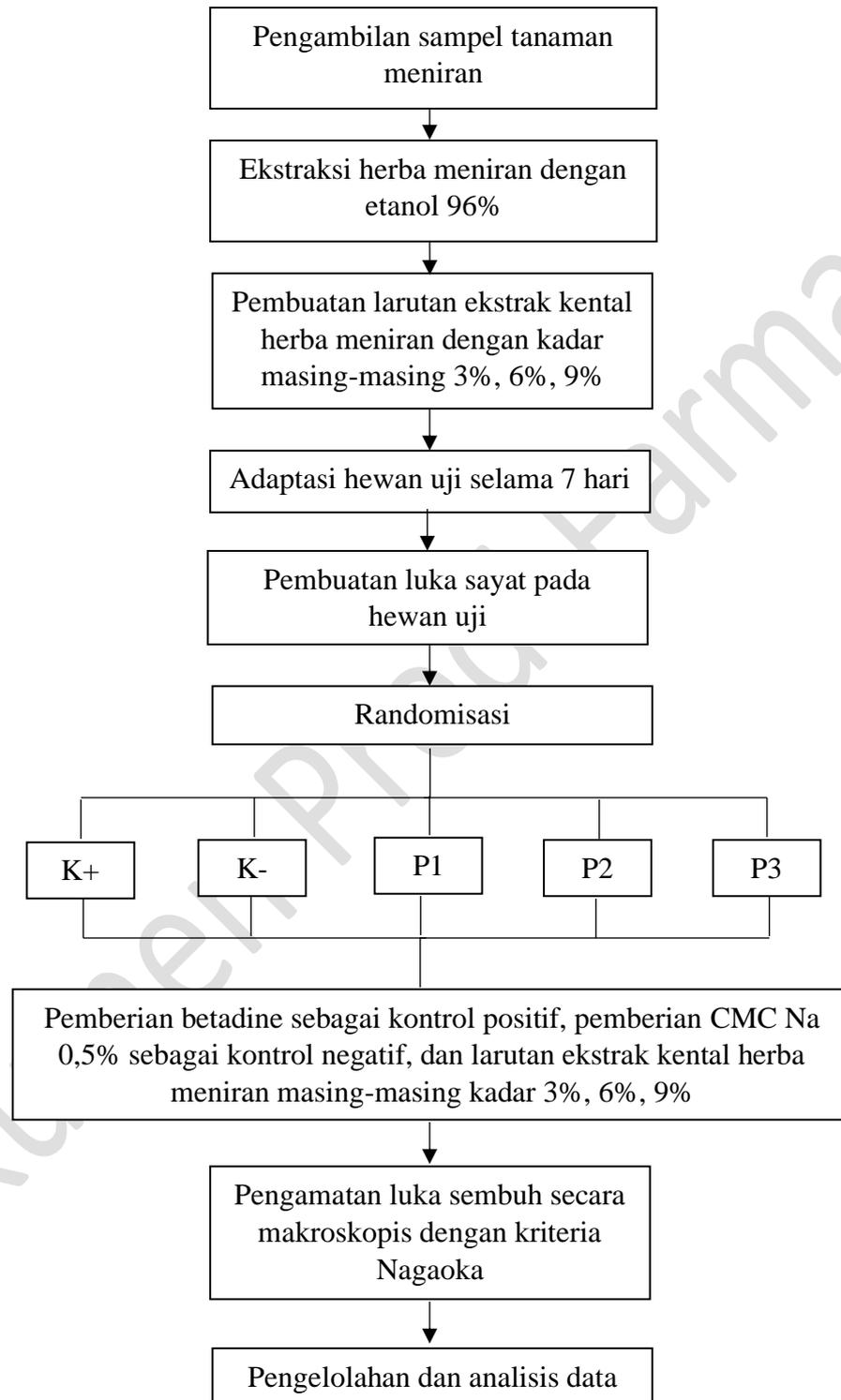
Tabel III.3 Kriteria Nagaoka Modifikasi⁴⁶

Parameter dan Deskripsi	Skor
1. Waktu Penyembuhan Luka	3
- Di bawah 7 hari	2
- Antara 7 -14 hari	2
- Di atas 14 hari	
2. Infeksi lokal	
- Tidak ada infeksi	3
- Infeksi lokal disertai pus	2
- Infeksi lokal tanpa pus	1
3. Reaksi Alergi	
- Tidak ada alergi	3
- Reaksi alergi bintik merah di area sekitar luka	1

Interpretasi dari nilai skor kriteria makroskopis Nagaoka dimana semakin tinggi nilainya maka semakin baik dikarenakan waktu penyembuhan cepat dan tidak terdapat infeksi lokal serta tidak terdapat reaksi alergi.

Dokumen Prodi Farmasi

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data penelitian ini diperoleh berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data analisis kualitatif dilakukan secara deskriptif dan untuk data analisis kuantitatif yaitu menggunakan uji normalitas menggunakan *Saphiro Wils*, kemudian untuk uji homogenitas menggunakan *Leneve*, dan uji normalitas dan homogenitas menggunakan *ANOVA* satu arah yang diolah menggunakan software *IBM SPSS Statistic ver.26*, dengan nilai kepercayaan 95%. Hal ini mengakibatkan apakah perbedaan yang diperoleh bermakna atau tidak dengan nilai signifikan ($p < 0,05$)¹⁵. Jika nilai uji homogenitas tidak terdistribusi normal maka dapat dilanjutkan menggunakan metode non parametik yaitu *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan dengan sig. $p < 0,05$ ²². Dilanjutkan dengan uji *Pos Hoc* untuk melihat adanya perbedaan yang signifikan dari kelima kelompok perlakuan.

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini mendapatkan *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang.