

## **BAB II**

### **METODE PENELITIAN**

#### **2.1 Obyek Penelitian**

Obyek pada penelitian ini adalah pengujian formulasi hydrogel berbasis pva dan pengujian penyembuhan luka (*wound healing*) terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*)

#### **2.2 Definisi Operasional**

Adapun beberapa definisi operasional ialah berikut. (i) luka sayat adalah luka yang berupa garis lurus beraturan yang ditandai dengan tepi luka, biasanya terjadi karena adanya trauma atau kontak dengan benda tajam yang langsung mengenai kulit (Arief, 2020). (ii) Ekstrak daun kelor adalah sediaan kental yang diperoleh melalui proses ekstraksi senyawa aktif dari simplisia daun kelor menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang sudah ditetapkan (A. Saputra dkk., 2020). (iii) Penyembuhan luka adalah serangkaian fase yang melibatkan respon seluler dan biokimia melibatkan proses dinamis dan kompleks dari koordinasi serial termasuk hemostasis, koagulasim inisiasi, respon inflamasi, regenerasi, proliferasi, dan remodeling parenkim (Primadina dkk., 2019). (iv) Granulasi adalah jaringan granul yang tumbuh pada fase proliferasi yang kaya akan jaringan pembuluh darah baru, fibroblast, dan makrofag (Primadina dkk., 2019b). (v) Hydrogel berbasis PVA merupakan penutup luka polimer yang memiliki karakteristik transparan, fleksibel, tidak mengiritasi, sifat pelepasan senyawa sehingga dapat diterapkan dalam manajemen penyembuhan luka (S. Saputra dkk., 2020)

#### **2.3 Instrumen Penelitian**

##### **2.3.1. Alat**

Beberapa alat dalam membantu proses penelitian ini diantaranya ialah: Batang pengaduk, cawan porselin, pH meter, gelas ukur, pisau bedah steril, labu ukur, lumpang dan stamper, penangas air, neraca, wadah maserasi, kandang hewan, timbangan analitik, pH meter, *cottonbud*, pencukur bulu, kaca arloji, beaker glass, Spuit 1 mL, batang pengaduk.

##### **2.3.2. Bahan**

Dalam penelitian ini. Komponen bahan yang digunakan yaitu: ekstrak daun Kelor (*Moringa oleifera* L), etanol 70%, *bioplacenton gel 15 gr*, *Lidocain ampoule*, HPMC (*Hydroxy propil methyl selulose*), *propilenglikol*, *metil paraben*, *propil paraben*, *polivinil Alkohol* (PVA), aquadest, dan Alkohol swab.

#### **2.4 Prosedur Penelitian**

##### **2.4.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan November 2023 hingga Januari 2024, dimulai dengan ekstraksi daun kelor di Laboratorium Fitokimia Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur, Pembuatan gel akan dilakukan di Laboratorium Teknologi, pengujian dan Tindakan terhadap hewan uji dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur.

##### **2.4.2 Determinasi Tumbuhan**

Proses identifikasi daun kelor sebagai konfirmasi keabsahan bahan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Konservasi Biodiversitas Hutan Tropis, yang merupakan bagian dari Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman.

##### **2.4.3 Penyiapan Sampel**

Sampel daun Kelor (*Moringa oleifera* L) yang menjadi objek penelitian ini diperoleh di Samarinda, Kalimantan Timur. Pengambilan sampel dilaksanakan pada pagi hari, di mana daun Kelor dipetik dan dipisahkan dari batang serta tangkainya.

##### **2.4.4 Perhitungan Rendemen Ekstrak**

Penghitungan persentase rendemen dilakukan sebagai metode perbandingan ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal, Kualitas ekstrak dapat dinilai dari % Rendemen, dan menurut

Farmakope Herbal Indonesia ED II Tahun 2017, nilai rendemen ekstrak kental daun kelor seharusnya tidak kurang dari 9,2% (Sugihartini dkk., 2020). Rumus perhitungan % Rendemen sebagai berikut :

$$\text{Rendemen Ekstrak (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak kental (gram)}}{\text{berat simplisia (gram)}} \times 100\%$$

#### 2.4.5 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* L)

Daun Kelor (*Moringa oleifera* L) yang telah dibersihkan dengan air, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari dengan penutup kain hitam. Setelah proses pengeringan, sampel dihaluskan dan ditimbang hingga menjadi simplisia kering. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%, disimpan dalam toples kaca selama 10 hari pada suhu kamar. Setelah periode tersebut, dilakukan penyaringan, diikuti dengan pengentukan filtrat menggunakan rotary evaporator selama 2 jam pada suhu 60° C. Proses terakhir melibatkan waterbath selama 2 hari untuk mendapatkan ekstrak kental.

#### 2.4.6 Pembuatan Formulasi Sediaan Hydrogel berbasis PVA

Setiap bahan yang telah disiapkan ditimbang beratnya dan peralatan pun disiapkan. PVA dikembangkan dalam aquadest panas hingga mengembang sempurna didalam cawan penguap, lalu diaduk. Dikembangkan pula HPMC dalam aquadest panas hingga mengembang sempurna, kemudian PVA dan HPMC di gerus bersamaan hingga homogen setelah itu tambahkan propil paraben yang telah dilarutkan. Selanjutnya, dimasukkan metil paraben dan propilenglikol, digerus hingga homogen, dan ditambahkan sisa air destilasi, di gerus hingga homogen. Langkah berikutnya adalah menambahkan ekstrak etanol daun kelor secara perlahan, diikuti dengan penggerusan hingga homogen (Kartikasari & Anggraini, 2018)

**Tabel 1. Rancangan Formulasi Sediaan Gel *Peel-off***

Nama bahan	F1	F2	F3	F4	Fungsi bahan
	Konsentrasi %				
Ekstrak daun kelor	-	3	6	9	Zat aktif
HPMC	3	3	3	3	Basis
PVA	10	10	10	10	Filming agent
Metil paraben	0,3	0,3	0,3	0,3	Pengawet
Propil paraben	0,2	0,2	0,2	0,2	Pengawet
Propilenglikol	7	7	7	7	Humektan
Aquadest	ad 200 ml	ad 200 ml	ad 200 ml	ad 200 ml	Pembawa

#### 2.4.7 Evaluasi Sediaan Hydrogel berbasis PVA

##### Uji Organoleptik

Pengamatan sediaan mencakup warna, tektur dan aroma dari setiap formula sediaan gel *peel-off* yang diamati (Slamet dkk., 2020).

##### Uji Daya Lekat

Uji daya lekat dilakukan dengan menggunakan alat uji daya lekat, dengan fokus pada waktu yang diperlukan hingga kedua kaca objek pada alat uji terlepas (Arief, 2020).

## Uji Viskositas

Uji viskositas bertujuan mengidentifikasi perubahan kekentalan pada setiap formula gel. Prosedur melibatkan penempatan sediaan gel dalam gelas kimia 100 ml, menyisipkan spindle yang sesuai, dan mengaktifkan rotor hingga mencapai angka stabil pada layar monitor. Formula gel *peel-off* yang optimal biasanya memiliki nilai viskositas antara 2.000 hingga 50.000 cps (Rusli dkk., 2021).

### 2.4.8 Penyiapan Hewan Uji

Sebelum memulai eksperimen, mencit putih jantan (*Mus musculus*) sehat dengan berat badan 20-35 gram dan usia 2-3 bulan diadaptasi selama satu minggu dalam lingkungan percobaan. Setelah itu, mereka dipuaskan selama 8 jam. Kandang tikus menggunakan wadah plastik dengan alas untuk kemudahan pembersihan, dan dibersihkan setiap 3 hari. Selama periode adaptasi, mencit diberi makanan dan minuman standar. Jumlah total mencit yang digunakan adalah 25 ekor, dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing dengan 5 mencit,

Dalam penelitian ini, 25 mencit putih jantan (*Mus musculus*) digunakan dan dibagi ke dalam lima kelompok. Setiap kelompok mencit menerima perlakuan berbeda terkait luka sayat, sebagai berikut: K- diberikan formula hydrogel berbasis PVA tanpa ekstrak, pada K+ diberikan bioplacenton, pada K1 diberikan formula hydrogel berbasis PVA dengan tambahan daun Kelor (*Moringa oleifera L*) sebanyak 3%. Pada K2 diberikan formula hydrogel berbasis PVA dengan tambahan daun Kelor (*Moringa oleifera L*) sebanyak 6%, pada K3 diberikan formula hydrogel berbasis PVA dengan tambahan daun Kelor (*Moringa oleifera L*) sebanyak 9%.

### 2.4.9 Pengujian efek penyembuhan luka sayat secara *in vivo*

Sebelum pembuatan luka sayat, ditentukan terlebih dahulu daerah yang akan dilukai atau disayat. Kemudian mencit pada setiap kelompok dilakukan pembiusan dengan anastesi lidocaine menggunakan spuit 1 ml frekuensi dosis 0,1 ml secara intramuscular. Tanda-tanda mencit yang terbius, seperti lemas, tetap bernafas, dan tanpa kejang-kejang, serta mata yang tetap merah, diamati untuk memastikan dosis yang sesuai. Bius lidocaine bekerja pada mencit dalam waktu sekitar 20 menit. Setelah terbius, rambut di sekitar punggung mencit dicukur dengan alat cukur berukuran 3 x 3 cm. Perlak dan alas bawah diposisikan pada tubuh mencit yang akan mengalami luka sayat. Disinfeksi dilakukan pada kulit yang telah dicukur dengan menggunakan alcohol swab. Panjang luka sayat diukur menggunakan penggaris, dan titik akhir diberi tanda menggunakan spidol pada masing-masing ujungnya.

Pada punggung mencit, dilakukan luka sayat menggunakan scalpel steril dengan mata pisau no. 11, menciptakan irisan sepanjang  $\pm 1$  cm dan mencapai area epidermis. Proses ini melibatkan merenggangkan kulit dengan menggunakan jari telunjuk dan ibu jari tangan kiri sebagai peregang atau penekan. Luka sayat tersebut selanjutnya diobati dengan mengoleskan salep Bioplacenton gel dan gel *peel-off* ekstrak daun kelor sesuai dengan kelompok dan desain penelitian. Pengobatan dilakukan hingga luka sayat tertutup dan dianggap sembuh. Pada hari berikutnya, panjang luka diukur setiap hari, dan kondisi luka didokumentasikan setiap 3 hari sekali. Observasi dilakukan sekali sehari hingga luka sembuh, ditandai dengan adanya indikator tidak ada kemerahan disekitar luka, adanya granulasi, dan luka menutup dengan pembentukan jaringan baru (Wahyuni dkk., 2021).

## 2.5 Analisa Data

**2.5.1** Pengukuran efek penyembuhan luka sayat dilakukan dengan memperhatikan perubahan panjang luka yang diukur menggunakan penggaris. Data hasil pengujian diamati dan kemudian dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro Wilk*. Jika data tidak terdistribusi normal dan varian data tidak homogen, uji lanjutan seperti *Kruskall-Wallis* dan *Post Hoc (Man-Whitney)* dilakukan untuk mengidentifikasi kelompok perlakuan yang secara signifikan berbeda dari yang lain. Proses penyembuhan luka dipantau dengan mengukur panjang luka setiap hari, mulai dari pembuatan luka hingga hari ke-14.

## **2.6 Etika Penelitian**

Uji kelayakan etik diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang dengan No. 75/40/EC/KEPK-FKIK/01/2024, dalam konteks penelitian digunakan istilah “hewan coba” atau “hewan model” untuk merujuk pada hewan yang sengaja dipelihara dalam rangka penelitian, baik di laboratorium maupun skala yang lebih besar. Pemanfaatan hewan coba dalam penelitian dan pengujian bertujuan meningkatkan kesejahteraan hewan itu sendiri serta memberikan manfaat pada manusia, seperti dalam pengembangan obat, peralatan diagnosis, uji toksisitas, percobaan klinis obat, dan berbagai keperluan lainnya (Wahyuwardani dkk., 2020)