

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi pada penelitian ini yaitu daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) didapat dari Unit Pelaksana Fungsional (UPF), Tawangmangu, Jawa Tengah. Pemanenan dilakukan pada bulan februari karena pada bulan tersebut cuaca hujan tidak terlalu tinggi.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun binahong (*Anredera cordiolia* (Ten.) Steenis) dan daun jarak pagar (*jatropha curcas* L.) yang segar dengan karakteristik daun yang tidak terlalu tua, berwarna hijau, dan bebas hama yang dapat diperoleh dari Instansi Unit Pelaksana Fungsional (UPF) Pelayanan Kesehatan Tradisional Tawangmangu – RSUD Dr. Sardjito, Tawangmangu, Jawa Tengah.

#### **B. Variabel Penelitian**

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

Penelitian ini menggunakan variabel utama berupa ekstrak daun binahong dan daun jarak pagar yang diperoleh melalui metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

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

Variabel utama dalam penelitian ini dapat dikelompokkan menjadi tiga jenis variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

**2.1 Variabel bebas.** Variabel bebas adalah variabel yang dimodifikasi untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Dalam penelitian ini, variabel bebas adalah konsentrasi penutupan luka sayat yang dihasilkan dari penggunaan gel ekstrak daun binahong dan daun jarak pagar dengan konsentrasi 5%:10%; 7,5%:7,5% dan 10%:5%

**2.2 Variabel Tergantung.** Variabel tergantung adalah variabel utama yang mencerminkan kriteria penilaian dalam penelitian. Pada penelitian ini, variabel tergantung mencakup kualitas fisik sediaan gel yang optimal serta efektivitas ekstrak daun binahong dan daun jarak pagar dalam mempercepat penyembuhan luka sayat pada kelinci *New Zealand White*.

**2.3 Variabel Terkendali.** Variabel terkendali adalah variabel yang berpotensi memengaruhi variabel tergantung, sehingga harus diatur secara ketat untuk memastikan hasil penelitian yang konsisten dan dapat direplikasi oleh peneliti lain. Dalam penelitian ini, variabel terkendali meliputi proses pembuatan ekstrak kental, jenis peralatan yang digunakan, kedalaman pencukuran bulu, panjang luka yang dibuat, serta kondisi fisik hewan uji seperti usia, bobot, galur, kondisi kandang, dan lingkungan laboratorium.

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

Pertama, daun binahong dan daun jarak pagar adalah daun yang segar, tidak terlalu tua, dan bebas hama yang dapat diperoleh dari Unit Pelaksana Fungsional (UPF), Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun binahong dan daun jarak pagar diperoleh dari daun segar yang telah dicuci bersih. Proses pembuatannya meliputi sortasi basah, pengeringan, penggilingan, dan pengayakan, di mana daun binahong dan daun jarak pagar disaring menggunakan ayakan dengan ukuran mesh nomor 40.

Ketiga, ekstrak daun binahong dan daun jarak pagar diperoleh melalui proses maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian hasilnya dipadatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C.

Keempat, Gel ekstrak daun binahong dan daun jarak pagar merupakan sediaan gel yang diformulasikan dengan variasi konsentrasi bahan aktif dari ekstrak daun binahong dan daun jarak pagar. Evaluasi mutu fisik sediaan gel meliputi pengujian organoleptik, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, serta stabilitas.

Kelima, kelinci yang digunakan adalah kelinci yang diperoleh dari Laboratorium di Universitas Setia Budi.

Keenam, Aktivitas penyembuhan luka sayat merujuk pada kemampuan gel ekstrak dalam mempercepat penyembuhan luka sayat, yang dinilai berdasarkan parameter seperti penurunan panjang luka, dan lama waktu penyembuhan luka.

Konsentrasi efektif adalah konsentrasi gel ekstrak daun binahong dan jarak pagar yang bisa menyembuhkan panjang luka yang sebanding dengan kontrol positif, sedangkan hari penyembuhan yang berbeda signifikan dengan hari lain dan memiliki rata-rata panjang luka terkecil.

## C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu beaker glass, botol maserasi, gelas ukur, mortir, stamper, batang pengaduk, kaca arloji, corong, kain flannel, kertas saring, pot gel, wadah ekstrak, timbangan analitik, oven, ayakan dengan nomor mesh 40, *vacum rotary evaporator*, *moisture balance*, mesin *grinding*, *water bath*, pipet tetes, cawan porselen, kurs porselen, pH meter, alat uji daya sebar (kaca bulat) dan uji daya lekat, kandang kelinci, pisau bedah, alat pencukur bulu, penggaris, gunting, masker dan *handscone*.

### 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu daun binahong, daun jarak pagar, etanol 70%, reagen fitokimia (Dragendorff, Mayer, Bourchardat, serbuk Mg, HCL), karbopol, Trietanolamin (TEA), Propilenglikol (PGA), metil paraben dan aquadest.

### 3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan untuk penelitian ini adalah kelinci *New Zealand White* yang berumur sekitar 4-5 bulan dan dengan berat badan rata-rata 4,5-5 kg.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Ethical Clearance (EC)

*Ethical clearance* (EC), atau yang sering disebut sebagai kelayakan etik, merupakan izin tertulis yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian sebagai persetujuan untuk melaksanakan suatu penelitian yang melibatkan makhluk hidup. Izin ini diberikan setelah proposal penelitian dinyatakan memenuhi kriteria dan persyaratan yang telah ditetapkan. Proses pengajuan perizinan *ethical clearance* (EC) dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, yang berlokasi di Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

### 2. Determinasi Tanaman

Langkah awal dalam penelitian ini adalah melakukan identifikasi terhadap daun binahong dan daun jarak pagar. Proses determinasi ini bertujuan untuk memastikan keaslian sampel sesuai dengan karakteristik morfologi tumbuhan dan dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur.

### 3. Pengabilan Bahan

Daun binahong dan daun jarak pagar segar yang diperoleh dari UPF, Tawangmangu, Jawa Tengah, menjalani proses sortasi basah dan dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, sehingga risiko kontaminasi dapat diminimalkan. Setelah itu, daun dipotong menjadi bagian kecil-kecil, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 40-50°C hingga benar-benar kering untuk mengurangi kadar air dan mencegah pembusukan akibat mikroorganisme.

### 4. Pembuatan Serbuk

Pembuatan serbuk simplisia adalah tahap awal dalam proses pembuatan ekstrak. Serbuk simplisia dibuat dari simplisia yang telah dikeringkan, baik dalam bentuk utuh atau potongan-potongan halus, dan kemudian digiling hingga mencapai derajat kehalusan tertentu. Serbuk simplisia yang digunakan berasal dari daun binahong dan daun jarak pagar, yang digrinding dan disaring menggunakan ayakan nomor 40 tanpa merusak kandungan kimia yang ada. Selanjutnya, serbuk simplisia ditimbang untuk menentukan persen berat kering dan basahnya (Kemenkes RI, 2022).

### 5. Penetapan Susut Pengeringan Serbuk

Hasil penetapan susut pengeringan serbuk dilakukan dengan metode gravimetri, yang dipilih karena kesederhanaannya, alat yang digunakan juga sederhana seperti *moisture balance* dengan suhu 105°C, dan prosesnya yang relatif cepat. Prosedur dimulai dengan kalibrasi alat terlebih dahulu untuk memastikan akurasi yang tepat. Setelah alat terkalibrasi dengan benar, serbuk sebanyak 2 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam plat pengukuran. Ketika alat mengeluarkan bunyi "beep", layar moisture balance akan menunjukkan angka dalam persen, yang kemudian dicatat sebagai hasil pengukuran. Berdasarkan Farmakope Indonesia, batas maksimum susut pengeringan untuk daun adalah  $\leq 10\%$ . Batas ini memberikan informasi mengenai jumlah senyawa yang hilang selama proses pengeringan (Kemenkes RI, 2022).

### 6. Identifikasi Kandungan Kimia Serbuk

**6.1 Flavonoid.** Sebanyak 5 gram dari masing-masing sampel dipanaskan dalam 100 mL air suling dan dididihkan selama 15 menit, lalu disaring untuk menghasilkan filtrat A. Metode yang digunakan adalah uji Sianidin/Shinoda/Shibata, yang juga dikenal sebagai uji Willstatter. Sebanyak 5 mL filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium, asam hidroklorida pekat, dan

amil alkohol. Campuran dikocok dengan kuat dan dibiarkan hingga lapisannya terpisah. Indikasi positif adanya flavonoid ditandai dengan munculnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol. Warna jingga hingga merah menunjukkan flavon, merah hingga merah tua menunjukkan flavanol, dan merah tua hingga magenta (merah keunguan) menunjukkan flavanon.

**6.2 Tanin.** Sebanyak 5 mL filtrat A ditambah larutan besi (III) klorida. Indikasi positif adanya tanin ditunjukkan dengan perubahan larutan menjadi biru hingga hijau kehitaman. Metode lain untuk identifikasi tanin adalah uji gelatin. Sebanyak 5 mL filtrat A dicampur 2 mL larutan gelatin 1% dalam 10% NaCl. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih (Rahman *et al.*, 2023).

**6.3 Triterpenoid.** Sebanyak 1 gram sampel dimaserasi dengan 20 mL n-heksana selama 1 jam, kemudian disaring untuk memperoleh filtrat B. Selanjutnya, 5 mL filtrat B diuapkan dalam cawan penguap hingga meninggalkan residu. Residu tersebut ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchard, yang terdiri dari campuran anhidrida asetat dan asam sulfat pekat dengan perbandingan 2:1. Indikasi positif adanya steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru hingga hijau, sedangkan terbentuknya warna merah hingga ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Rahman *et al.*, 2023).

**6.4 Saponin.** Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas. Setelah itu, campuran didinginkan dan dikocok dengan kuat selama 10 detik. Adanya busa setinggi 1–10 cm yang stabil selama lebih dari 10 menit, meskipun ditambahkan 1 tetes HCl 2N, mengindikasikan hasil positif untuk saponin (Rahman *et al.*, 2023).

**6.5 Alkaloid.** Sebanyak 2 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml HCl 2 N. Campuran tersebut dipanaskan terlebih dahulu, lalu didinginkan. Setelah itu, larutan dibagi menjadi tiga bagian dengan volume masing-masing 1 ml. Masing-masing bagian ditambahkan pereaksi yang berbeda. Penambahan pereaksi Mayer akan menghasilkan endapan berwarna putih atau kuning jika alkaloid terdeteksi. Sementara itu, pada tabung yang ditambahkan pereaksi Bouchardat, terbentuk endapan cokelat sebagai indikasi positif keberadaan senyawa alkaloid (Rahman *et al.*, 2023).

## 7. Pembuatan Ekstrak Etanol

Serbuk diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Menggunakan etanol 70% karena lebih cocok untuk mengekstrak senyawa polar hingga semi-polar, seperti flavonoid glikosida, tanin, dan saponin serta Lebih efektif dalam mengekstrak senyawa aktif dari tanaman obat karena adanya kandungan air yang membantu memecah dinding sel. Timbang serbuk sebanyak 400 gram daun binahong dan 800 gram daun jarak pagar masing-masing dimaserasi dengan perbandingan serbuk terhadap pelarut 1:10. Serbuk dimasukkan kedalam wadah kaca gelap dan direndam dalam pelarut etanol 70% sebanyak 4 L (daun binahong) dan 8 L (daun jarak pagar) sambil diaduk secara berkala setiap 6 jam kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah didiamkan selama 18 jam, larutan diaduk kembali dan disaring menggunakan kain flanel serta kertas saring, kemudian dilanjutkan dengan proses remaserasi dengan penambahan pelarut setengahnya dan dilakukan sebanyak 1 kali. Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C untuk memisahkan pelarut dari ekstrak, kemudian ekstrak kental yang dihasilkan diletakkan di atas water bath pada suhu 40-60°C hingga mencapai konsistensi yang diinginkan. Rendemen dihitung antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia (Kemenkes RI, 2022).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot simplisia}}{\text{bobot simplisia segar}} \times 100\%$$

## 8. Penetapan Kadar Air Ekstrak

Studi ini menggunakan gravimetri. Sampel yang beratnya kurang lebih sepuluh gram dimasukkan ke dalam wadah yang ditara. Setelah itu, sampel dikeringkan selama lima jam pada suhu 105°C. Penimbangan dan pengeringan dilakukan setiap satu jam hingga perbedaan antara dua penimbangan berbeda tidak lebih dari 0,25% (Kemenkes RI, 2022).

## 9. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Daun

**9.1 Flavonoid.** Sebanyak 5 gram dari masing-masing sampel dipanaskan dalam 100 mL air suling dan dididihkan selama 15 menit, lalu disaring untuk menghasilkan filtrat A. Metode yang digunakan adalah uji Sianidin/Shinoda/Shibata, yang juga dikenal sebagai uji Willstatter. Sebanyak 5 mL filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium, asam hidroklorida pekat, dan amil alkohol. Campuran dikocok dengan kuat dan dibiarkan hingga lapisannya terpisah. Indikasi positif adanya flavonoid ditandai dengan

munculnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol. Warna jingga hingga merah menunjukkan flavon, merah hingga merah tua menunjukkan flavanol, dan merah tua hingga magenta (merah keunguan) menunjukkan flavanon.

**9.2 Tanin.** Sebanyak 5 mL filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan larutan besi (III) klorida. Indikasi positif adanya tanin ditunjukkan dengan perubahan larutan menjadi biru kehitaman (tanin galat) atau hijau kehitaman (tanin katekol). Metode lain untuk identifikasi tanin adalah uji gelatin. Dalam metode ini, 5 mL filtrat A dicampur dengan 2 mL larutan gelatin 1% dalam 10% NaCl. Hasil positif tanin ditandai dengan terbentuknya endapan putih (Buckley, 1966).

**9.3 Triterpenoid.** Sebanyak 1 gram sampel dimaserasi dengan 20 mL n-heksana selama 1 jam, kemudian disaring untuk memperoleh filtrat B. Selanjutnya, 5 mL filtrat B diuapkan dalam cawan penguap hingga meninggalkan residu. Residu tersebut ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchard, yang terdiri dari campuran anhidrida asetat dan asam sulfat pekat dengan perbandingan 2:1. Indikasi positif adanya steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru hingga hijau, sedangkan terbentuknya warna merah hingga ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Rahman *et al.*, 2023).

**9.4 Saponin.** Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas. Setelah itu, campuran didinginkan dan dikocok dengan kuat selama 10 detik. Adanya busa setinggi 1–10 cm yang stabil selama lebih dari 10 menit, meskipun ditambahkan 1 tetes HCl 2N, mengindikasikan hasil positif untuk saponin (Rahman *et al.*, 2023).

**9.5 Alkaloid.** Sebanyak 2 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml HCl 2 N. Campuran tersebut dipanaskan terlebih dahulu, lalu didinginkan. Setelah itu, larutan dibagi menjadi tiga bagian dengan volume masing-masing 1 ml. Masing-masing bagian ditambahkan pereaksi yang berbeda. Penambahan pereaksi Mayer akan menghasilkan endapan berwarna putih atau kuning jika alkaloid terdeteksi. Sementara itu, pada tabung yang ditambahkan pereaksi Bouchardat, terbentuk endapan cokelat sebagai indikasi positif keberadaan senyawa alkaloid (Rahman *et al.*, 2023)

## 10. Rancangan Komposisi Sediaan Gel

Penelitian ini menggunakan tiga variasi konsentrasi ekstrak daun binahong yaitu 5%, 7,5% dan 10% dan ekstrak daun jarak pagar dengan konsentrasi 10%, 7,5% dan 5% yang diformulasikan dalam bentuk sediaan gel. Penelitian juga melibatkan kontrol positif berupa salep mebo dan kontrol negatif berupa basis gel. Rancangan formulasi sediaan gel dengan kombinasi ekstrak daun binahong dan ekstrak daun jarak pagar dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Rancangan komposisi gel ekstrak daun binahong dan ekstrak daun jarak pagar.**

<b>Bahan</b>	<b>Fungsi</b>	<b>Konsentrasi ekstrak daun binahong dan daun jarak pagar (%)</b>					
		<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>	<b>K (-)</b>
Ekstrak daun binahong	Zat aktif	5	7,5	10	15	-	-
Ekstrak daun jarak pagar	Zat aktif	10	7,5	5	-	15	-
Karbopol	Basis gel	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Trietanolamin (TEA)	<i>Alkalizing agent</i>	2	2	2	2	2	2
Metilparaben	Pengawet	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Propilenglikol	Humektan	10	10	10	10	10	10
Aquades ad	Pelarut	100	100	100	100	100	100

**Keterangan:**

- F1 : Gel kombinasi ekstrak daun binahong dan jarak pagar konsentrasi (5%:10%).
- F2 : Gel kombinasi ekstrak daun binahong dan jarak pagar konsentrasi (7,5%:7,5%).
- F3 : Gel kombinasi ekstrak daun binahong dan jarak pagar konsentrasi (10%:5%).
- F4 : Gel ekstrak tunggal daun binahong (15%).
- F5 : Gel ekstrak tunggal daun jarak pagar (15%).
- K(-) : Gel tanpa ekstrak daun binahong dan daun jarak pagar.

## 11. Pembuatan Sediaan Gel

Proses pembuatan dimulai dengan membuat gel dasar dari karbopol. Proses pembuatan gel dari ekstrak daun binahong dan daun jarak pagar diawali dengan pengembangan karbopol menggunakan air panas, kemudian untuk menetralkan basis dilakukan dengan menambahkan trietanolamin (TEA). Selanjutnya, metil paraben dan propilen glikol dicampurkan dalam beaker glass dan diaduk hingga merata. Setelah itu, ekstrak ditambahkan sesuai dengan dosis yang telah ditentukan untuk masing-masing formula, lalu diaduk kembali hingga homogen sambil ditambahkan aquades hingga mencapai volume 50 ml. Campuran yang telah homogen kemudian dimasukkan ke dalam pot salep dan disimpan pada suhu ruang. Hasil akhir sediaan gel diperoleh sebanyak 50 gram dan selanjutnya dilakukan evaluasi sediaan.

## 12. Pengujian Sifat Fisik Sediaan Gel

**12.1 Uji Organoleptis.** Pengujian organoleptis dilakukan untuk memeriksa konsistensi, warna, tekstur, dan bau sediaan gel guna

menevaluasi kondisi fisik gel. Gel dinyatakan stabil jika tetap menunjukkan karakteristik yang sama setelah disimpan dalam jangka waktu tertentu (Kaban *et al.*, 2024).

**12.2 Uji Homogenitas.** Pengujian homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan gel secukupnya pada gelas objek, lalu diamati apakah terdapat partikel atau zat yang belum tercampur secara merata (Kaban *et al.*, 2024).

**12.3 Uji pH.** Pengukuran pH dilakukan untuk menentukan tingkat keasaman atau kebasaan suatu sediaan dengan menggunakan pH meter. Sebelum digunakan untuk sampel sediaan, pH meter terlebih dahulu dikalibrasi menggunakan larutan dapar standar dengan pH 7, karena pH ini dianggap netral (Nurlely *et al.*, 2022). Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam gel, kemudian catat nilai pH yang dilihat pada skala setelah diperoleh pH yang stabil. Sediaan topikal yang baik harus memiliki pH yang sesuai dengan pH kulit. Jika pH sediaan terlalu tinggi, dapat menyebabkan kulit menjadi bersisik, sedangkan pH yang terlalu rendah berpotensi menimbulkan iritasi pada kulit. Syarat uji pH yaitu 4,5-7,0 (Sri Kuncari & Praptiwi, 2014).

**12.4 Uji Viskositas.** Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield. Spindle dipasang pada alat, kemudian sampel yang akan diuji dimasukkan ke dalam wadah. Setelah itu, viskometer dijalankan menggunakan alat, dan nilai viskositas dapat dibaca langsung pada layar yang menampilkan hasil dalam satuan cP. Syarat nilai viskositas yang tepat untuk sediaan gel umumnya berada dalam rentang 2.000-50.000 cP (centipoise), tergantung pada jenis dan tujuan penggunaan gel. Pengujian ini dilakukan setelah sediaan gel selesai dibuat (Nurlely *et al.*, 2022).

**12.5 Uji Daya Lekat.** Pengujian daya lekat dilakukan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan agar sediaan gel dapat melekat pada kulit. Sebanyak 0,25 g gel ditimbang secara terpisah, kemudian ditempatkan di atas kaca objek. Kaca objek diberi beban 1 kg dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya, kaca objek dipasang pada alat uji daya lekat khusus, diberi beban 80 g, lalu dilepaskan, dan waktu yang dibutuhkan untuk pelepasan gel dari kaca objek dicatat. Syarat daya lekat yaitu lebih dari 1 detik. (Nurlely *et al.*, 2022).

**12.6 Uji Daya Sebar.** Uji daya sebar sediaan gel dilakukan dengan menempatkan sekitar 0,5 g sediaan di tengah alat berupa kaca bundar. Setelah itu, penutup yang telah ditimbang diletakkan di atas

platform dan dibiarkan selama 1 menit. Diameter sebaran gel kemudian diukur dengan mengambil rata-rata panjang diameter dari beberapa sisi. Selanjutnya, beban tambahan seberat 50 gram ditempatkan di atas sediaan, didiamkan selama 1 menit, lalu diameter bentangan gel dicatat. Pengujian dilanjutkan dengan menambah beban secara bertahap, masing-masing 50 gram hingga mencapai total 150 gram, dan setiap kali didiamkan selama 5 menit sebelum pencatatan diameter sebaran. Eksperimen ini dilakukan sebanyak tiga kali, dan hasil akhir diperoleh dalam bentuk rata-rata diameter sebaran beserta standar deviasi (SD) untuk setiap tingkat beban yang digunakan. Daya sebar yang baik antara 5-7 cm (Kaban *et al.*, 2024).

**12.7 Uji Stabilitas.** Metode ini untuk menguji kestabilan sediaan terhadap perubahan suhu selama periode penyimpanan yang ditetapkan. Sediaan obat kumur disimpan selama satu hari pada suhu 4 derajat Celcius. Selanjutnya, bahan tersebut dipindahkan dan disimpan selama satu hari lagi pada suhu 40 derajat Celcius. Periode penyimpanan ini disebut sebagai satu siklus. Percobaan ini diulang selama enam siklus, dan sediaan diuji pada awal dan akhir setiap siklus untuk organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya lekat, dan daya sebar.

### 13. Pengelompokan Hewan Uji

Dalam penelitian ini, digunakan 5 ekor kelinci sebagai hewan uji. Kelinci-kelinci tersebut berjenis kelamin jantan, berumur 4-5 bulan, dengan berat antara 4,5-5 kg. Setiap kelinci menerima 7 perlakuan berbeda pada bagian punggungnya, dengan lokasi luka yang dibagi sebagai berikut:

Perlakuan I : Dioleskan sebanyak dua kali sehari gel tanpa ekstrak (kontrol negatif).

Perlakuan II : Dioleskan sebanyak dua kali sehari gel kombinasi ekstrak daun binahong dan jarak pagar dengan konsentrasi 5%:10% (F1).

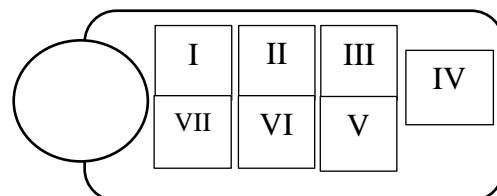
Perlakuan III : Dioleskan sebanyak dua kali sehari gel kombinasi ekstrak daun binahong dan jarak pagar dengan konsentrasi 7,5%:7,5% (F2).

Perlakuan IV : Dioleskan sebanyak dua kali sehari gel kombinasi ekstrak daun binahong dan jarak pagar dengan konsentrasi 10%:5% (F3).

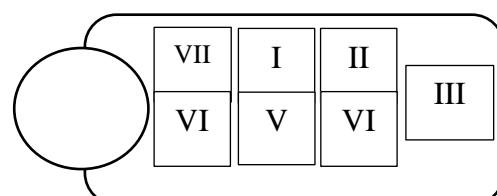
Perlakuan V : Dioleskan sebanyak dua kali sehari gel ekstrak tunggal daun binahong 15% (F4).

Perlakuan VI : Dioleskan sebanyak dua kali sehari gel ekstrak tunggal daun jarak pagar 15% (F5).

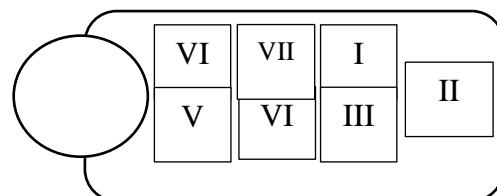
Perlakuan VII : Dioleskan sebanyak dua kali sehari salep mebo (kontrol positif).



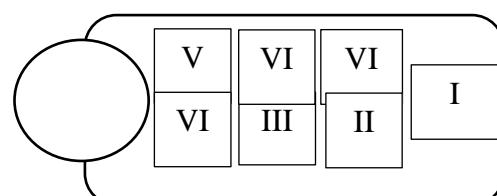
**Gambar 10. Perlakuan Luka Sayat Pada Kelinci 1.**



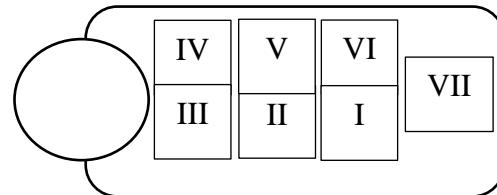
**Gambar 11. Perlakuan Luka Sayat Pada Kelinci 2.**



**Gambar 12. Perlakuan Luka Sayat Pada Kelinci 3.**



**Gambar 13. Perlakuan Luka Sayat Pada Kelinci 4.**



**Gambar 14. Perlakuan Luka Sayat Pada Kelinci 5.**

#### 14. Perlakuan Hewan Uji

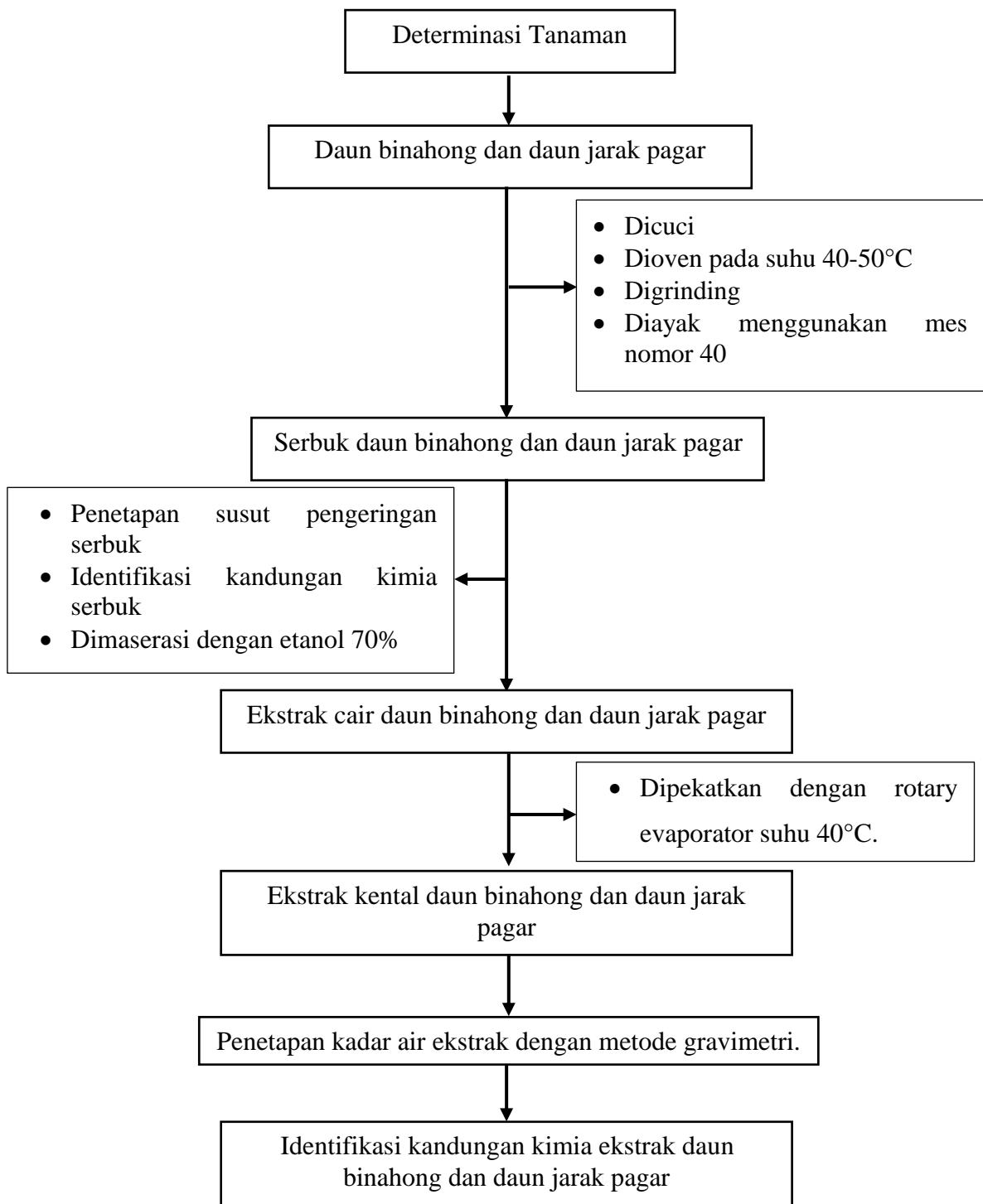
Hewan uji berupa kelinci diadaptasikan terlebih dahulu pada lingkungan selama tujuh hari. Selama masa adaptasi, kelinci diberi makan dengan pakan standar dan minum secukupnya. Setiap ekor kelinci mendapat perlakuan dari semua formula serta kontrol positif. Sehari sebelum diberi perlakuan, bulu pada punggung kelinci dicukur menggunakan gunting hingga terlihat bagian kulitnya.

Selanjutnya, kelinci diberi luka sayat pada punggung menggunakan pisau bedah dengan panjang luka 2 cm dan kedalaman 0,3 cm. Luka sayat yang dibuat kemudian diberi perlakuan sebanyak dua kali sehari berupa pengolesan sediaan gel pada punggung kelinci sebanyak 1 gram. Perlakuan dilakukan setiap hari. Panjang luka diukur menggunakan penggaris untuk mengetahui perubahan panjang luka dari hari pertama hingga luka sembuh sempurna (tertutup). Pengamatan dilakukan selama 14 hari berturut-turut hingga luka sayat sembuh sepenuhnya.

#### E. Analisis Hasil

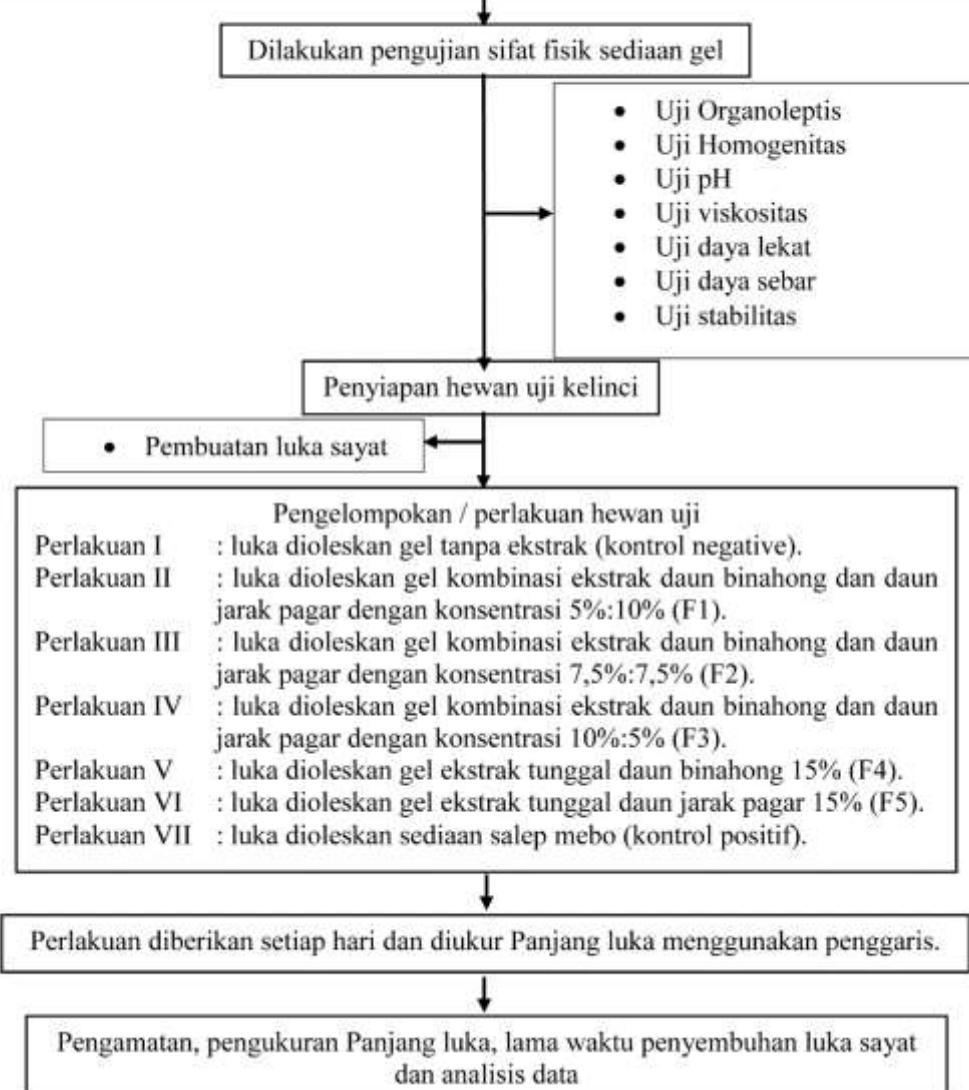
Data diperoleh melalui pengamatan terhadap adanya proses penyembuhan luka mulai dari awal hingga luka menutup sempurna dan berdasarkan pengukuran penurunan panjang luka. Data hasil pengamatan penurunan panjang luka sayat dianalisis menggunakan program statistik SPSS (*Statistical Program for Social Sciences*). Analisis dimulai dengan uji *Sapiro-Wilk* untuk menentukan apakah data berdistribusi normal atau tidak. Selanjutnya, uji *Levene* dilakukan untuk mengevaluasi homogenitas data. Jika data menunjukkan distribusi normal dan homogenitas, maka analisis dilanjutkan dengan uji parametrik ANOVA (*Analysis of Variance*) diikuti oleh uji *Tukey* untuk mengidentifikasi perbedaan signifikan antara perlakuan terhadap penyembuhan luka sayat pada hewan uji kelinci dan dilakukan uji *Pairetd Sample T-Test* pada uji stabilitas. Namun, jika data tidak terdistribusi normal atau tidak homogen, analisis dilanjutkan menggunakan uji statistik non-parametrik. Uji *Kruskal-Wallis* digunakan untuk menentukan perbedaan antar kelompok, dan jika ditemukan perbedaan signifikan, dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengevaluasi perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan.

## F. Skema Penelitian



Gambar 15. Skema Pembuatan Ekstrak Daun Binahong dan Daun Jarak Pagar.

Pembuatan sediaan gel dengan kombinasi ekstrak daun binahong dengan konsentrasi 5%, 7,5% dan 10% dan ekstrak daun jarak pagar dengan konsentrasi 10%, 7,5% dan 5%.



**Gambar 16. Skema uji mutu fisik gel dan pengujian pada hewan uji.**