

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

Populasi pada penelitian ini yaitu daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) dari UPF (Unit Pelaksana Fungsional), Tawangmangu, Jawa Tengah. Pemanenan pada bulan Februari saat musim kemarau karena pada bulan tersebut curah hujan tidak terlalu tinggi.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) yang segar diperoleh dari UPF (Unit Pelaksana Fungsional), Tawangmangu, Jawa Tengah dengan karakteristik daun yang utuh, berwarna hijau, dan tidak terkena hama. Panen dilakukan dengan memetik daun tua yang berukuran besar tapi masih segar.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang dilakukan pada penelitian ini adalah ekstrak daun binahong dan daun kenikir yang diperoleh dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

2. Klasifikasi variabel utama

2.1 Variabel bebas merupakan variabel yang telah diubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu hasil persentase basis karbopol emulgel ekstrak daun binahong dan daun kenikir dengan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5% .

2.2 Variabel tergantung merupakan pusat permasalahan yang menggambarkan kriteria penilaian. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu mutu fisik emulgel yang baik dan efek dari ekstrak daun binahong dan daun kenikir dalam menyembuhkan luka sayat pada kelinci *New Zealand White*.

2.3 Variabel terkendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya untuk memperoleh hasil yang tidak tersebar serta dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu proses pembuatan ekstrak kental, peralatan yang digunakan, kedalaman pencukuran bulu, panjang luka yang dibuat,

keadaan fisik hewan uji meliputi usia, bobot, galur, kandang hewan, dan laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun binahong dan daun kenikir adalah daun yang berasal dari UPF (Unit Pelaksana Fungsional), Tawangmangu, Jawa Tengah dengan kondisi segar, berwarna hijau, dan bebas dari hama.

Kedua, serbuk daun binahong dan daun kenikir adalah serbuk yang diperoleh dari daun binagong dan daun kenikir segar yang dicuci bersih dan melalui proses seperti sortasi basah, pengeringan, penggilingan, dan pengayakan daun binahong dan daun kenikir menggunakan ayakan nomor mesh 40.

Ketiga, ekstrak daun binahong dan daun kenikir yaitu ekstrak yang dihasilkan dari metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 70% kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Keempat, hewan uji yang digunakan yaitu kelinci jantan *New Zealand* berusia 2 bulan dengan bobot 1,5-2 kg.

Kelima, luka sayat adalah luka yang dibuat dengan cara menyayat bagian punggung kelinci dengan menggunakan pisau bedah dan diperkirakan panjang pada luka 2 cm.

Keenam, emulgel ekstrak daun binahong dan daun kenikir adalah sediaan emulgel yang dibuat dari variasi konsentrasi zat aktif ekstrak daun binahong dan daun kenikir dengan basis *gelling agent* karbopol.

Ketujuh, uji mutu fisik sediaan emulgel meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat dan stabilitas.

Kedelapan, uji organoleptis adalah uji yang dilakukan dengan melihat tampilan secara fisik dari sediaan emulgel dengan mengamati warna, tekstur, dan bau.

Kesembilan, uji homogenitas adalah uji yang dilakukan dengan melihat secara visual pada permukaan kaca objek.

Kesepuluh, uji pH adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui tingkat keasaman sediaan emulgel sehingga tidak mengiritasi kulit, yaitu 4,5-6,5.

Kesebelas, uji viskositas adalah uji yang dilakukan untuk menentukan nilai kekentalan suatu sediaan, suatu sediaan tidak boleh terlalu kental dan tidak boleh terlalu encer dengan nilai viskositas 2000-50000 cP.

Keduabelas, uji daya sebar adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan sediaan emulgel dapat menyebar dipermukaan kulit. Semakin besar daya sebar maka sediaan emulgel semakin baik.

Ketigabelas, uji daya lekat adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan emulgel dapat melekat pada kulit yang berhubungan dengan lama waktu kontak emulgel dengan kulit sehingga mempengaruhi khasiatnya. Daya lekat yang baik > 1 detik.

Keempat belas, aktivitas penyembuhan luka sayat adalah kemampuan emulgel ekstrak terhadap penyembuhan luka sayat berdasarkan parameter penurunan panjang luka, dan lama penyembuhan luka.

Konsentrasi efektif adalah konsentrasi emulgel ekstrak daun binahong dan kenikir yang bisa menyembuhkan panjang luka yang sebanding dengan kontrol positif, sedangkan hari penyembuhan adalah yang tidak berbeda signifikan tetapi dapat dilihat dari rata-rata panjang luka terkecil.

C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayakan no.40 mesh, bejana maserasi, beaker glass, botol maserasi, gelas ukur, mortar, stamper, batang pengaduk, corong, kaca arloji, kain flannel, kertas saring, pot gel, jar, pipet, cawan porselen, kurs, *waterbath*, timbangan analitik, oven, *moisture balance*, *vacuum rotary evaporator*, gunting bedah, pot gel, uji daya sebar kaca bulat, uji daya lekat obyek glass, *stick* pH meter, *viscometer brookfield*, kandang kelinci, pisau bedah, alat pencukur bulu, penggaris, mesin *grinding*.

2. Bahan

Daun binahong, daun kenikir, etanol 70%, akuades, etanol, reagen fitokimia (Dragendorff, Meyer, Bouchardat, serbuk Mg, HCl), karbopol, propilen glikol, metil paraben, dan TEA.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci jantan galur *New Zealand White* yang berumur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 1,5-2 kg.

D. Jalannya Penelitian

1. *Ethical clearance* (EC)

Ethical clearance atau yang biasanya dikenal dengan kelayakan etik merupakan keterangan tertulis yang diberikan oleh Komisi Etik Penelitian untuk melakukan suatu riset yang melibatkan makhluk hidup yang menyatakan bahwa proposal riset layak untuk dilaksanakan setelah memenuhi persyaratan tertentu. Pengurusan perizinan EC dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

2. Determinasi tanaman

Determinasi untuk menentukan keaslian bahan baku tanaman binahong dan daun kenikir melalui membandingkan sifat makroskopik dan morfologi tanaman yang dicocokkan dengan kunci determinasi. Pengujian dilakukan di UPF (Unit Pelaksana Fungsional), Tawangmangu, Jawa Tengah.

3. Pengumpulan bahan

Daun binahong dan daun kenikir diambil dari Tawangmangu, Jawa Tengah. dibersihkan dengan air mengalir, lalu dikeringkan dengan metode oven selama ± 2 hari hingga memiliki tekstur yang renyah.

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 kenikir, yang di grinding 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

Penetapan susut pengeringan serbuk menggunakan alat *Moisture balance*. Serbuk sebanyak 2 gram dan mengatur suhu alat hingga 105°C sampai bobot konstan, kadar susut pengeringan yang dipersyaratkan <10% (Kemenkes RI, 2010).

$$\text{Susut pengeringan (\%)} = \frac{\text{Bobot awal} - \text{bobot setelah dikeringkan}}{\text{Bobot awal}} \times 100\% \quad (1)$$

6. Identifikasi kandungan kimia serbuk ekstrak daun binahong dan kenikir

6.1 Pemeriksaan flavonoid. Sebanyak 100 mg serbuk ditambahkan 3 tetes HCl pekat ditambah serbuk Mg. Hasil positif

ditunjukkan dengan perubahan warna merah dan jingga dalam waktu 3 menit (Mustikasari dan Aryani, 2010).

6.2 Pemeriksaan saponin. Sampel 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan air panas 10 mL, dinginkan kemudian dikocok kuat selama 10 detik. Apabila terdapat busa dengan tinggi 1–10 cm yang stabil dan >10 ketika ditambahkan 1 tetes HCl 2N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1979).

6.3 Pemeriksaan tanin. Sampel ekstrak 1 gram dimasukkan ke tabung reaksi dengan 10 mL air panas dan dididihkan 5 menit, setelah itu filtrat ditambah FeCl_3 3 tetes. Apabila hasil berwarna hijau biru menandakan adanya tannin galat dan hasil biru hitam menandakan adanya tannin katekol (Ergina *et al.*, 2014).

6.4 Pemeriksaan steroid. Serbuk sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan 2 mL etil asetat lalu dikocok, tambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika hasil berwarna hijau menandakan adanya steroid (Ergina *et al.*, 2014).

6.5 Pemeriksaan terpenoid. Sampel serbuk sebanyak 2 gram diambil lalu ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat. Apabila terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Ergina *et al.*, 2014).

6.6 Pemeriksaan alkaloid. serbuk 2 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan 5 ml HCl 2 N lalu dipanaskan dan didinginkan lalu dibagi menjadi 3 bagian (masing–masing 1 mL). Pada tabung 1 ditambahkan pereaksi Mayer, jika terbentuk adanya endapan putih atau kuning maka terdeteksi adanya alkaloid. Pada tabung 2 ditambahkan pereaksi Bouchardat akan terbentuk endapan coklat yang menandakan positif alkaloid (Mustikasari dan Aryani, 2010).

6.7 Pemeriksaan 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 ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Burchard. Indikasi positif steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru-hijau, sedangkan merah-ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Rahman *et al.*, 2023).

7. Pembuatan ekstrak etanol

Serbuk diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Daun binahong dan kenikir masing-masing sebanyak

800 gram dimaserasi dan dengan total waktu 2 hari dengan perbandingan serbuk dan pelarut 1:10, kemudian serbuk direndam sambil diaduk secara berkala setiap 6 jam. Proses maserasi setelah didiamkan selama 18 jam, diaduk sekali lagi, lalu disaring dengan kain flanel dan kertas saring, selanjutnya dilakukan remaserasi. Filtrat yang dihasilkan diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C untuk memisahkan pelarut dari ekstrak. Ekstrak hasil ekstraksi diuapkan dan air yang tersisa diuapkan dalam waterbath pada suhu 30-60°C hingga diperoleh ekstrak kental. Hasil rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\% \quad (2)$$

8. Penetapan kadar air ekstrak etanol

Metode ini dilakukan dengan memasukkan ekstrak ke dalam wadah lebih kurang 10 g sampel, masukkan ke dalam wadah yang telah ditara, keringkan suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang, proses diulang setiap 1 jam sampai diperoleh perbedaan antara dua penimbangan tidak lebih dari 0,25% (Kemenker RI, 2017).

9. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun binahong dan daun kenikir

9.1 Pemeriksaan flavonoid. Sebanyak 100 mg ekstrak ditambahkan 3 tetes HCl pekat yang kemudian ditambahkan sedikit serbuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna merah dan jingga dalam waktu 3 menit. Adanya flavonoid diakibatkan dari reduksi oleh HCl pekat dan Mg yang ditandai dengan adanya warna merah (Mustikasari dan Aryani, 2010).

9.2 Pemeriksaan saponin. Sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan air panas 10 ml. Dinginkan kemudian dikocok dengan kuat selama 10 detik. Apabila terdapat busa dengan tinggi 1–10 cm yang stabil dan >10 menit busa tidak hilang ketika ditambahkan 1 tetes HCl 2N maka menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1979).

9.3 Pemeriksaan tanin. Sampel ekstrak sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dengan 10 ml air panas dan dididihkan 5 menit, setelah itu filtrat ditambah FeCl₃ 3 tetes. Apabila hasil berwarna hijau biru menandakan adanya tannin galat dan apabila hasil berwarna biru hitam menandakan adanya tannin katekol (Ergina *et al.*, 2014).

9.4 Pemeriksaan steroid. Ekstrak sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan 2 ml etil asetat lalu dikocok, tambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika hasil berwarna hijau menandakan adanya steroid (Ergina *et al.*, 2014).

9.5 Pemeriksaan terpenoid. Sampel ekstrak sebanyak 2 gram diambil lalu ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Apabila terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Ergina *et al.*, 2014).

9.6 Pemeriksaan alkaloid. Ekstrak sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan 5 ml HCl 2 N lalu dipanaskan dan didinginkan lalu dibagi menjadi 3 bagian (masing-masing 1 ml). Pada tabung 1 ditambahkan pereaksi Mayer, jika terbentuk adanya endapan putih atau kuning maka terdeteksi adanya alkaloid. Pada tabung 2 ditambahkan pereaksi Bouchardat akan terbentuk endapan coklat (Mustikasari dan Aryani, 2010).

9.7 Pemeriksaan 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).

10. Uji ekstrak pada hewan uji

Sebagai uji pendahuluan untuk menentukan ekstrak yang memiliki efek paling optimal dilakukan uji pendahuluan dengan variasi ekstrak yang dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Formulasi ekstrak daun binahong dan daun kenikir %

Komposisi	Fungsi	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Ekstrak daun binahong	Zat aktif	0	12,5	0	3,125	6,25	9,375
Ekstrak daun kenikir	Zat aktif	0	0	12,5	9,375	6,25	3,125

Keterangan :

F1 (-) : tanpa ekstrak

F2 : ekstrak Tunggal daun binahong

F3 : ekstrak Tunggal daun kenikir

F4 : ekstrak daun binahong dan daun kenikir 3,125% : 9,375%

F5 : ekstrak daun binahong dan daun kenikir 6,25% : 6,25%

F6 : ekstrak daun binahong dan daun kenikir 9,375% : 3,125%

11. Uji *in vivo* aktivitas penyembuhan luka sayat

11.1 Adaptasi hewan uji. Hewan uji berupa kelinci jantan *New Zealand White* sebanyak 3 ekor diadaptasikan dengan lingkungan baru selama 7 hari untuk menghindari stress pada hewan uji.

11.2 Persiapan hewan uji. Bulu punggung dilakukan pencukuran. Kelinci dianastesi menggunakan ketamin dengan dosis 1,2 mg/BB kelinci yang diberikan melalui i.m. (*intra muscular*). Punggung kelinci yang akan disayat, dibersihkan dengan *alcohol swab*, penyayatan dilakukan sejajar dengan *os. vertebra* menggunakan skalpel sepanjang 5 cm dengan kedalaman 0,3 cm sampai lapisan subkutis.

11.3 Pemberian perlakuan pada kelinci. Pemberian perlakuan pada luka sayat pada punggung kelinci dengan konsentrasi 3,125%, 6,25%, dan 9,375% yang dilakukan secara merata 3 kali per 8 jam sebanyak 1 gram selama 14 hari.

11.4 Pengamatan pada luka pengamatan pada luka. Luka diamati sampai setiap hari hingga 14 hari. Luka dikatakan sembuh jika panjang luka sampai 0 cm merapat dan menutup lukanya (Fitri *et al.*, 2016).

12. Rancangan komposisi emulgel ekstrak daun binahong dan kenikir

Penelitian ini digunakan 3 variasi konsentrasi karbopol yaitu 1%, 1,5%, dan 2% yang dibuat sediaan emulgel. Penelitian menggunakan kontrol positif yaitu mebo salep dan kontrol negatif yaitu basis emulgel. Berdasarkan hasil uji pendahuluan, kombinasi ekstrak daun binahong dan kenikir yang memberikan efektivitas terbaik dalam mempercepat penyembuhan luka sayat pada hewan uji adalah pada konsentrasi 6,25% : 6,25%. Rancangan komposisi sediaan emulgel ekstrak daun binahong dan kenikir dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Formulasi emulgel ekstrak daun binahong dan daun kenikir %

Komposisi	Fungsi	KN	F2	F3	F4
Ekstrak daun binahong	Zat aktif	0	6,25	6,25	6,25
Ekstrak daun kenikir	Zat aktif	0	6,25	6,25	6,25
Karbopol	<i>Gelling agent</i>	1	0,5	1	1,5
Parafin cair	Emolien	5	5	5	5
Tween 80	Pengemulsi	1	1	1	1
Span 80	Pengemulsi	0,4	0,4	0,4	0,4
Propilen glikol	Humektan	10	10	10	10
Metil paraben	Pengawet	0,2	0,2	0,2	0,2
TEA	Penstabil	1,5	1,5	1,5	1,5
Akuades ad	Pelarut	100	100	100	100

Keterangan :

KN : emulgel tanpa ekstrak daun binahong dan daun kenikir

F2 : emulgel ekstrak daun binahong dan daun kenikir dengan karbopol 0,5%

F3 : emulgel ekstrak daun binahong dan daun kenikir dengan karbopol 1%

F4 : emulgel ekstrak daun binahong dan daun kenikir dengan karbopol 1,5%

13. Pembuatan sediaan emulgel

Bahan-bahan dari formula yang tercantum dalam tabel digunakan untuk membuat sediaan emulgel. Semua bahan yang digunakan ditimbang sebelumnya. Baik fase minyak maupun fase air dicampur pada suhu 70 derajat Celcius. Fase minyak terdiri dari paraffin cair, propil paraben, tween 80 dan sebagian aquadest. Fase air terdiri dari propilen glikol, metil paraben, tween 80 dan sebagian aquadest. Mereka dicampur sampai membentuk emulsi yang tidak terpisah. Carbopol 940 ditambahkan ke aquadest yang telah digerus hingga membentuk massa gel. Kemudian, menggunakan mortir untuk mencampur emulsi dengan gel secara homogen. Selanjutnya, menambah ekstrak daun binahong dan kenikir dengan konsentrasi 9,375% dan 3,125% digerus hingga membentuk emulgel, dan aquadest ditambahkan hingga 100 gram. Uji penyembuhan luka sayat pada kelinci.

14. Pengujian sifat fisik sediaan emulgel ekstrak daun binahong dan kenikir

14.1 Uji homogenitas. Sebanyak 1 gram krim yang dioleskan di atas kaca arloji, jika tidak memiliki gumpalan maka dinyatakan sediaan homogen (Tambunan & Sulaiman, 2018).

14.2 Uji viskositas. Pengujian viskositas menggunakan viskometer *brookfield*. Spindle dipasang pada viskometer kemudian dimasukkan sampel yang akan diamati pada wadah, putar alat. Viskositas dibaca dengan melihat pada layar dengan satuan cP. Nilai viskositas yang baik yaitu berkisar antara 2000-50000 (Nurlely *et al.*, 2022).

14.3 Uji pH. Alat pengukur pH digunakan untuk menentukan tingkat pH. PH diukur setelah sepenuhnya merendam elektroda pengukur. Penting agar pH krim berada dalam kisaran alami kulit 4,5-6,5 dengan pengujian dilakukan 3 kali (Tambunan & Sulaiman, 2018).

14.4 Uji daya lekat. Sampel diletakkan di alas kaca, ditindih kaca serta beban berat 1 kg diterapkan dan ditahan selama 5 menit. Jumlah waktu yang dibutuhkan kedua gelas untuk jatuh ke tanah dicatat. Pengujian dilakukan 3 kali. Syarat uji daya lekat yaitu > 1 detik (Asma, 2016).

14.5 Uji daya sebar. Uji daya sediaan krim dengan menggunakan 0,5 g sampel diletakkan di tengah kaca bundar dan tindih dengan beban t50-150 gram untuk mengetahui diameter sebaran alas, panjang rata-rata masing-masing sisi dihitung. Eksperimen ini dilakukan

tiga kali, dan diameter rata-rata (\pm SD) dari setiap muatan yang ditambahkan dihitung. Daya difusi yang baik antara 5 hingga 7 cm (Asma, 2016).

14.6 Uji tipe emulsi. Pengujian tipe emulsi dilakukan dengan metode pewarnaan, daya hantar listrik dan pengenceran. Metode pewarnaan menggunakan *methylene blue* dilakukan pada cawan yang sudah diberi sediaan emulgel dan dihomogenkan, lalu diletakkan pada objek glass dan diamati. Pengujian juga dilakukan dengan menambahkan sudan (III) pada masing-masing formula emulgel dan diamati. Emulgel pada tipe M/A akan homogen pada *methylene blue* dan tidak homogen pada sudan (III). Pengujian emulsi dengan daya hantar listrik dilakukan dengan cara menghubungkan rangkaian arus listrik pada sediaan emulgel. Pada sediaan emulgel tipe M/A menandakan bahwa lampu menyala artinya dapat menghantarkan arus listrik (Cahya *et al.*, 2022). Metode pengenceran dilakukan dengan sediaan diencerkan menggunakan aquadest. Tipe emulgel M/A menandakan bahwa emulgel dapat larut dalam aquadest, sedangkan tipe A/M akan larut dalam minyak (Ritu, 2021).

14.7 Uji stabilitas. Sediaan emulgel disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian dipindahkan dan disimpan pada suhu 40°C selama 24 jam. Waktu penyimpanan pada kedua suhu tersebut dianggap sebagai satu siklus. Percobaan ini diulang sebanyak 6 siklus (Tambunan & Sulaiman, 2018)

14.8 Pengelompokan hewan uji. Pada penelitian ini akan menggunakan 5 ekor hewan uji kelinci. Kelinci yang akan digunakan yaitu kelinci yang berjenis kelamin jantan dengan usia 4-5 bulan dan berat badan kelinci yang akan digunakan berkisar 4,5-5 kg. Setiap masing masing kelinci mendapatkan 7 perlakuan yang berbeda-beda pada punggung hewan uji dengan 7 lokasi luka sebagai berikut :

- Perlakuan I : dioleskan emulgel tanpa ekstrak (kontrol negatif)
- Perlakuan II : dioleskan emulgel formula 1 karbopol 0,5%
- Perlakuan III : dioleskan emulgel formula 2 karbopol 1%
- Perlakuan IV : dioleskan emulgel formula 3 karbopol 1,5%
- Perlakuan V : dioleskan salep mebo luka (kontrol positif)

15. Uji *in vivo* aktivitas penyembuhan luka sayat

15.1 Adaptasi hewan uji. Hewan uji berupa kelinci jantan *New Zealand White* sebanyak 5 ekor diadaptasikan dengan lingkungan baru selama 7 hari untuk menghindari stress pada hewan uji.

15.2 Persiapan hewan uji. Bulu punggung dilakukan pencukuran. Kelinci dianastesi menggunakan ketamin dengan dosis 1,2 mg/BB kelinci yang diberikan melalui i.m. (*intra muscular*). Punggung kelinci yang akan disayat, dibersihkan dengan *alcohol swab*, penyayatan dilakukan sejajar menggunakan skalpel sepanjang 2 cm.

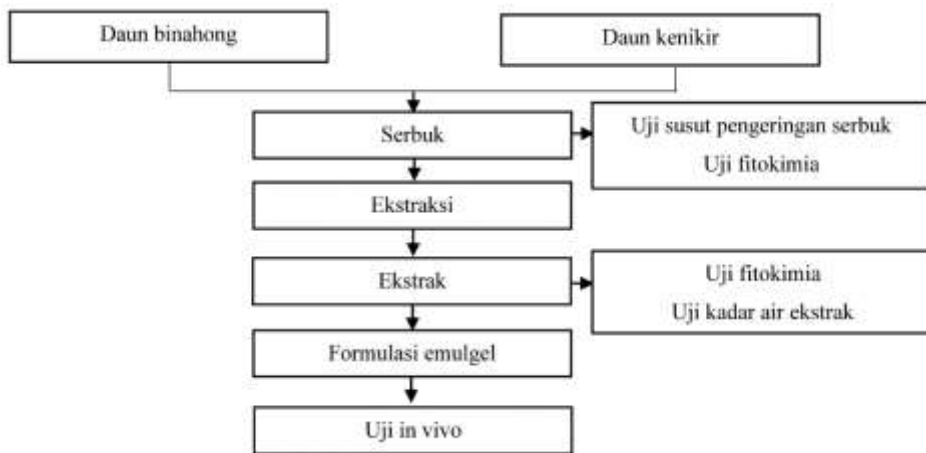
15.3 Pemberian perlakuan pada kelinci. Pemberian perlakuan pada luka sayat di punggung kelinci sesuai pada Gambar 14 yang dilakukan secara merata 2 kali tiap 8 jam sebanyak 1 gram selama 14 hari.

15.4 Pengamatan pada luka pengamatan pada luka. Luka diamati sampai setiap hari hingga 14 hari. Luka dikatakan sembuh jika diameter luka sampai 0 cm rapat dan menutup lukanya (Fitri *et al.*, 2016).

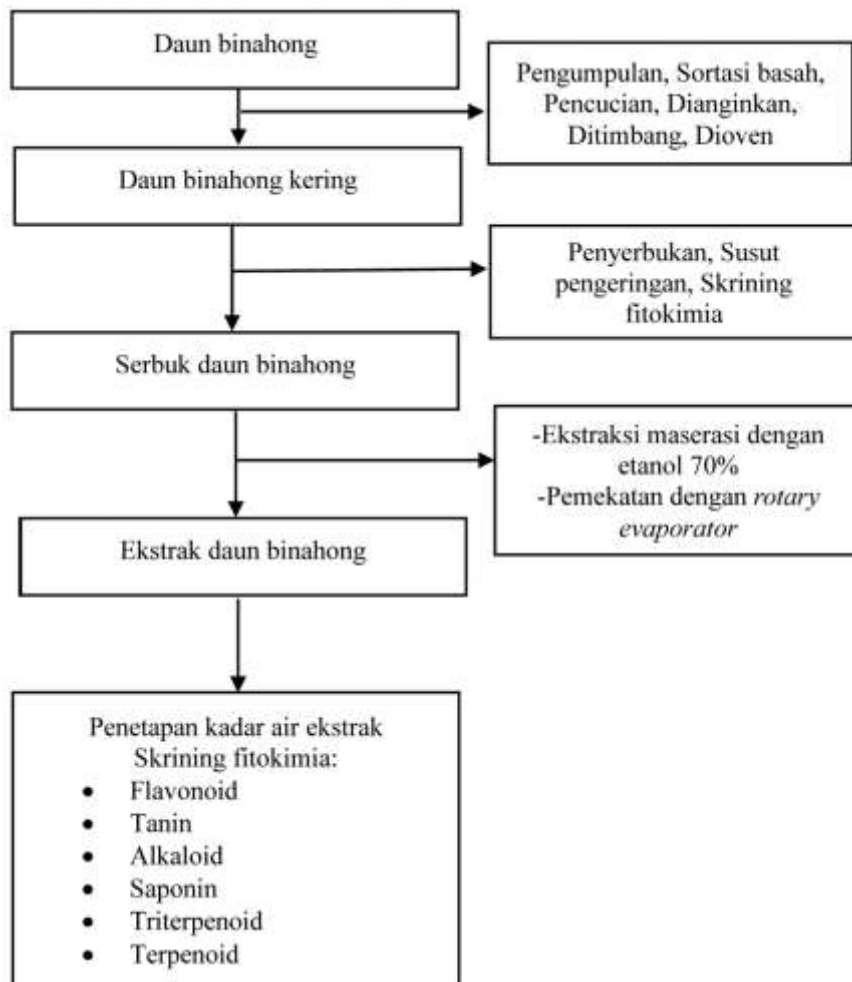
E. Analisis Data

Data yang diperoleh yaitu uji mutu fisik sediaan (uji viskositas, uji pH, uji daya lekat, dan uji daya sebar) sampai data farmakologi melalui pengamatan terhadap adanya proses penyembuhan luka mulai dari awal hingga luka menutup sempurna dan berdasarkan pengukuran penurunan panjang luka sayat dari seluruh uji yang sudah dikumpulkan dan dianalisis statistik menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan *Lavene's test*. Data yang terbukti normal dan homogen (Sig. >0,05) dapat dilanjutkan dengan analisis metode *one-way Anova*, lalu dilanjutkan menggunakan uji *Post hoc*. Namun, apabila data tidak terdistribusi normal atau homogen, maka uji dapat dilanjutkan menggunakan metode analisis non-parametrik. Guna mengetahui stabilitas, uji menggunakan metode *paired t-test* apabila data normal, namun apabila tidak normal uji dilanjutkan menggunakan uji *Wilcoxon*.

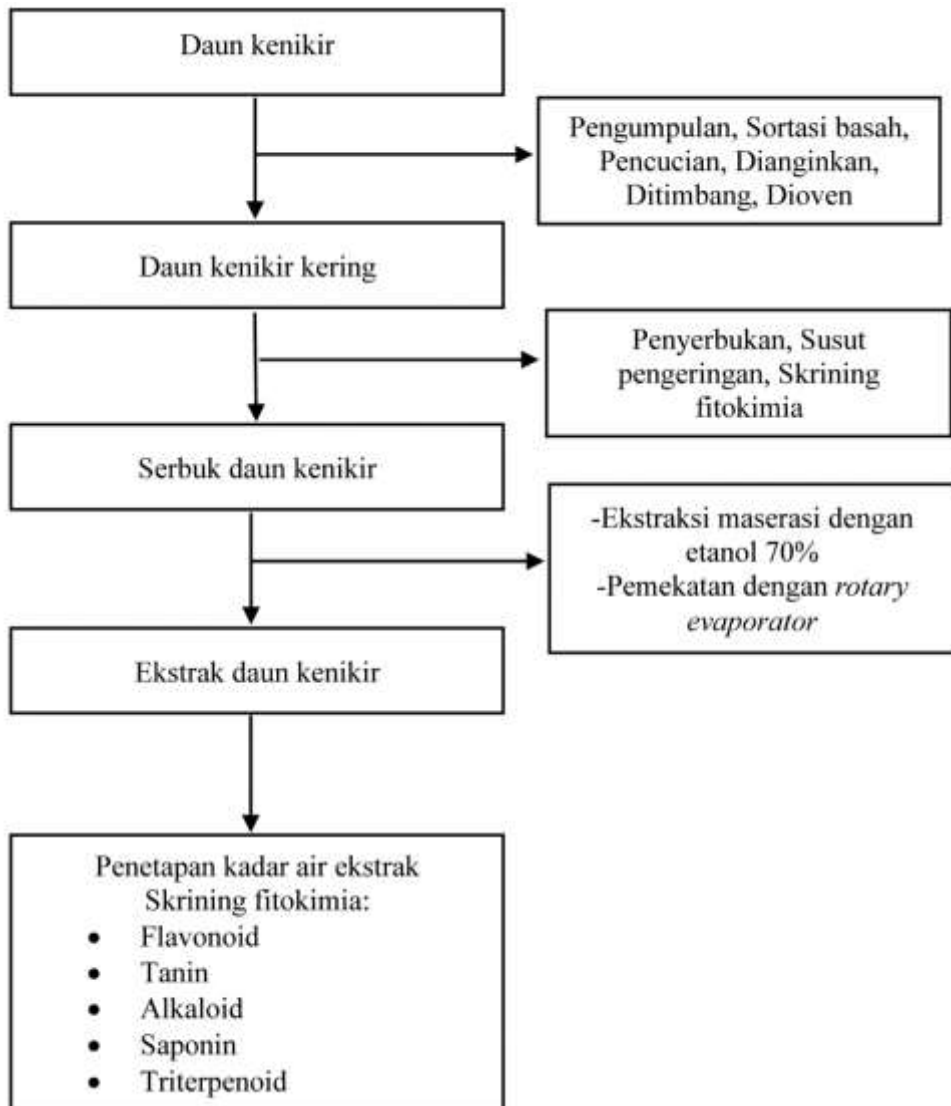
F. Skema penelitian



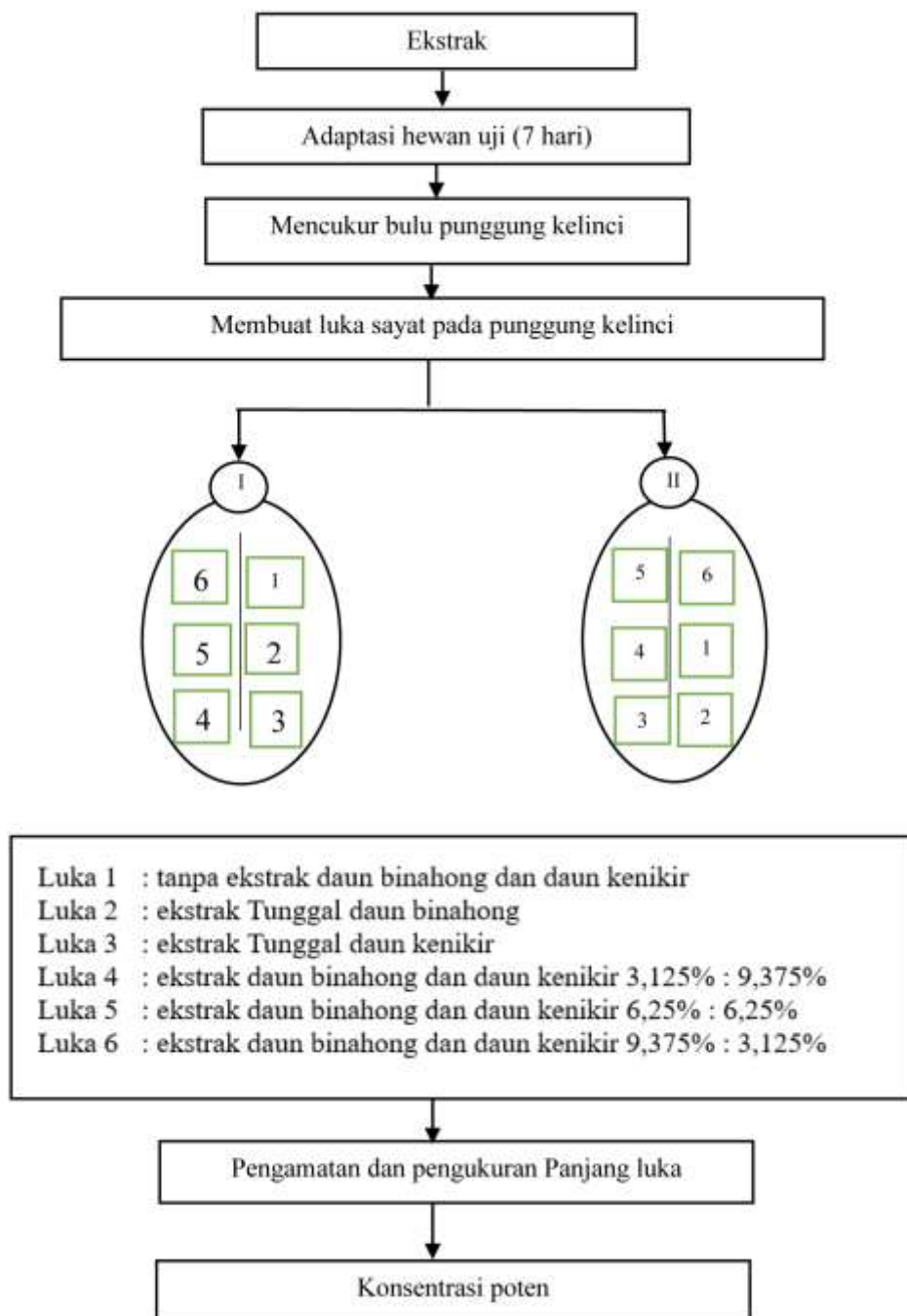
Gambar 13. Skema penelitian in vivo luka sayat



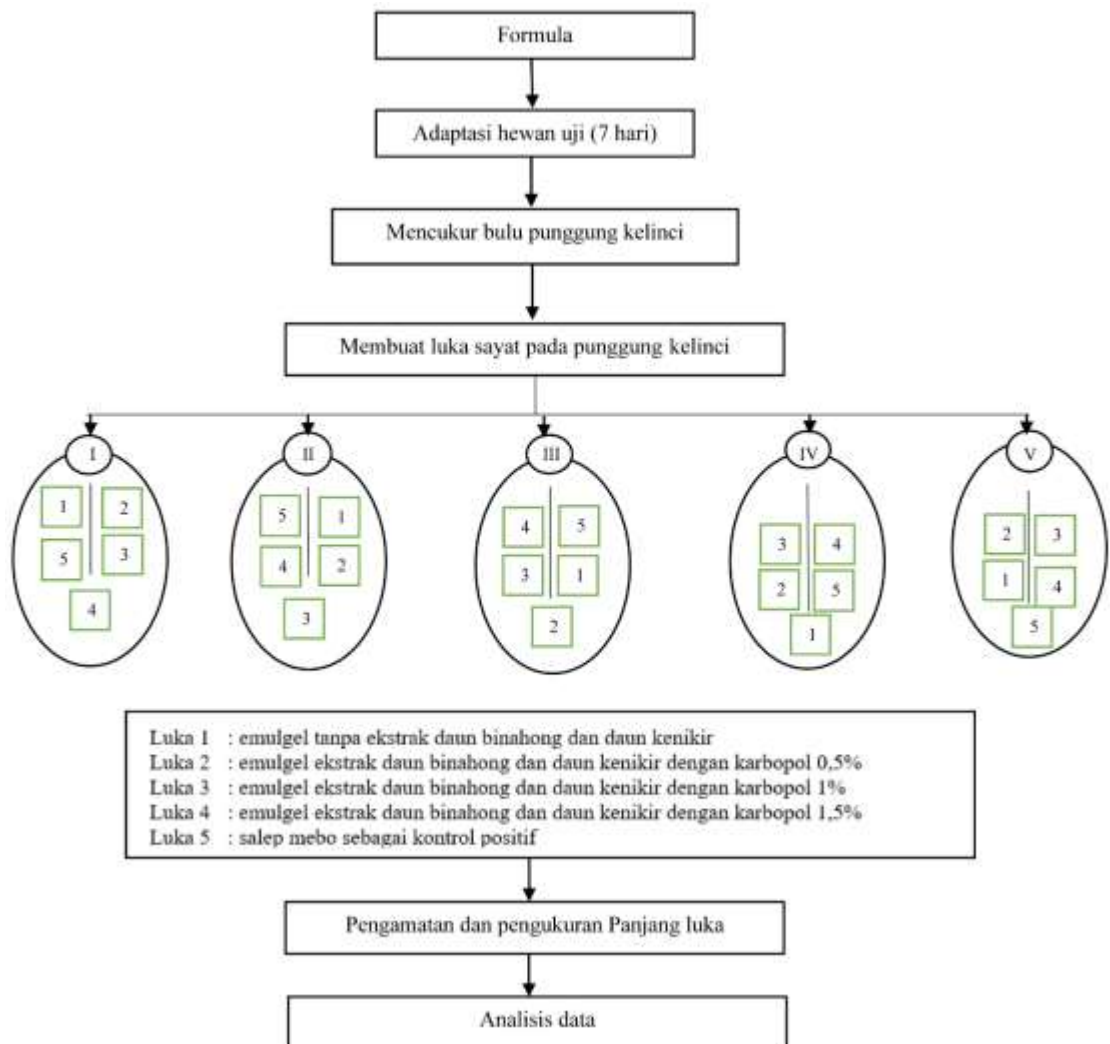
Gambar 14. Pembuatan ekstrak daun binahong



Gambar 15. Pembuatan ekstrak daun kenikir



Gambar 16. Luka sayat pada uji pendahuluan



Gambar 17. Luka sayat pada uji sediaan