BAB III
METODE PENELITIAN
3.1. Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

a. Bahan

Serbuk kering batang *Jatropha multifida* Linn (CV. Merapi Herba Farma), etil asetat (CV. Genera Labora), n-heksan (CV. Genera Labora), etanol 96% (CV. Genera Labora), fase diam silica gel 60 F254, fase gerak kloroform p.a, pereaksi semprot $AlCl_3$, $FeCl_3$, serbuk natrium alginat, larutan kalsium klorida ($CaCl_2$), akuades, akuabides, gliserin (PT. Brataco), tween 80 (PT. Brataco), dan PVA dari Laboratorium Teknologi Farmasi UII, larutan injeksi ketamin HCl 10%, Povidone-Iodine 10% (Betadine®), kassa steril, plester.

b. Subjek Uji

Subjek uji yang nantinya akan digunakan adalah tikus jantan galur Wistar yang diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, berat badan tikus 180-250 g dan tikus berumur 2-3 bulan, sebanyak 24 ekor. Tikus dipelihara di Laboratorium Farmakologi Farmasi Universitas Islam Indonesia. Kriteria penggunaan tikus Wistar jantan adalah sebagai berikut:

(a. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi subjek uji yang digunakan adalah sehat, suhu tubuh normal, mata bersinar dan tidak menonjol, tingkah laku normal, tidak ada kotoran, tidak ada luka, gigitan, dan memar, tidak ada abnormalitas yang tampak, bergerak aktif, rambut tidak kusam atau rontok, berat badan (BB) 180-250 gram dengan umur berkisar antara 2-3 bulan, dan tidak ada penurunan signifikan berat badan subjek uji selama masa penelitian berlangsung.

(b. Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi subjek uji yang digunakan adalah terjadinya kecacatan, dan hewan uji sakit pada saat penerimaan sebelum masa

penelitian, hewan uji mengalami sakit dan atau kematian selama uji berlangsung.

(c. Aklimatisasi

Hewan uji diadaptasikan pada kondisi laboratorium untuk menghilangkan stres akibat proses transportasi. Dilakukan aklimatisasi selama 7 hari dengan suhu berkisar 20-24ºC di dalam kandang polypropylene berukuran 40 cm × 30 cm × 10 cm yang ditutup kawat dan beralaskan sekam, hewan uji diberi makan pelet dan minum *ad libitum,* dengan siklus terang gelap 12/12 jam serta penggantian jerami setiap 2 hari sekali.

(d. Cara pengorbanan dan pemusnahan

Hewan uji dimusnahkan dengan cara dengan memberikan ketamine atau xylazin dalam dosis tinggi (75-100 mg/Kg dan 5-10 mg/Kg). Dikarenakan Laboratorium Farmakologi Farmasi Universitas Islam Indonesia belum memiliki fasilitas insenerator, hewan uji yang telah dieuthanasia akan disimpan di freezer, hingga jadwal insenerasi dilakukan. Proses insenerasi dilakukan caranya bekerja sama dengan Fakultas Kedokteran Hewan UGM yang telah memiliki fasilitas insenerator.

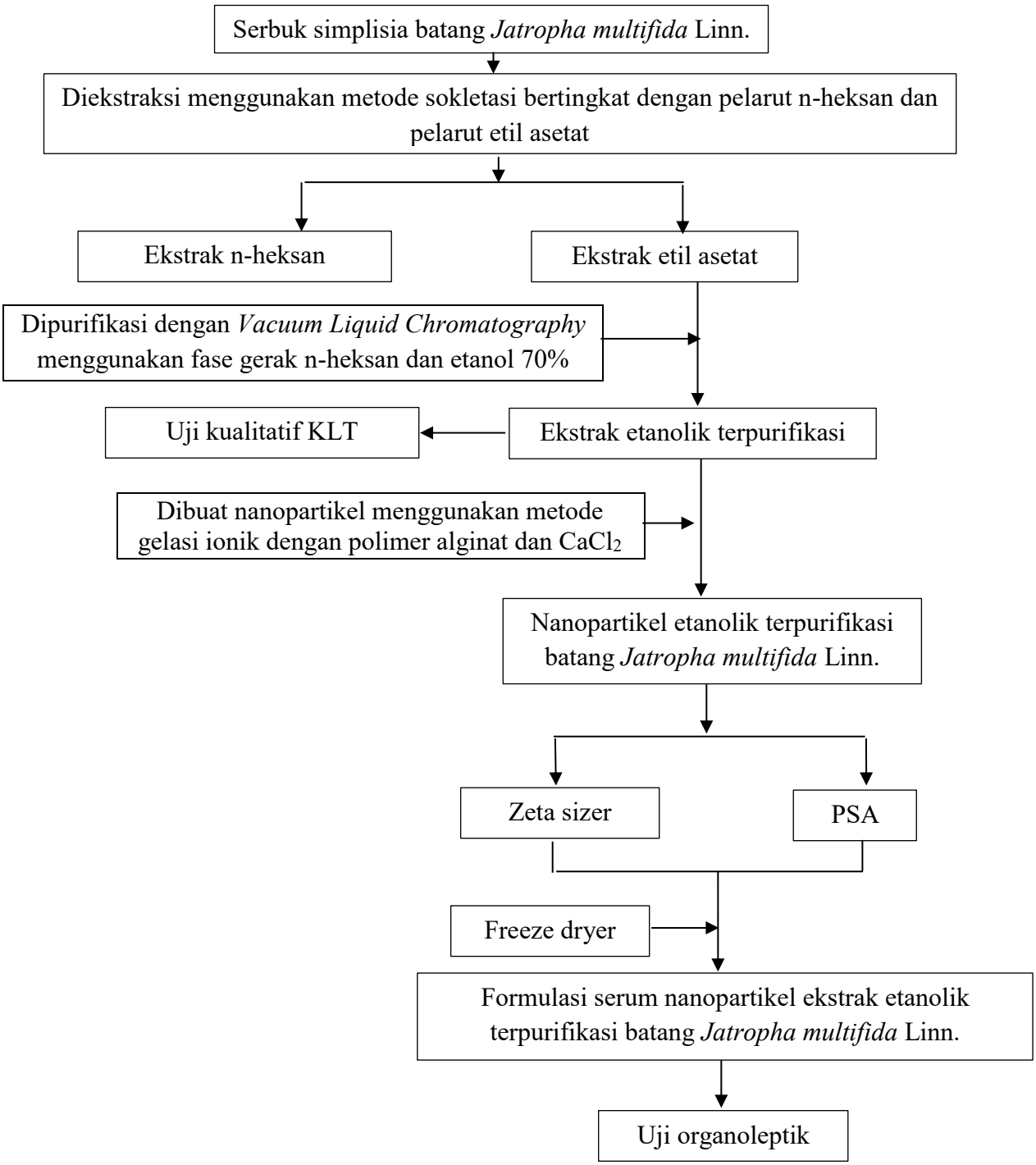
3.1.2. Alat

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat soxhlet, *rotary evaporator (Heidollph-L4000)*, neraca analitik *(Metlertoledo), ultrasonificator* (BRANSON 5510), sentrifuse, *freezer*, cawan porselin, spatula, sendok tanduk, pH meter, dan labu ukur, PSA *(Particle Size Analyzer))*, kromatografi gas, kandang hewan uji, holder, gunting, pisau cukur, pisau skapel/pisau bedah, spuit injeksi (Terumo®), penggaris, kamera.

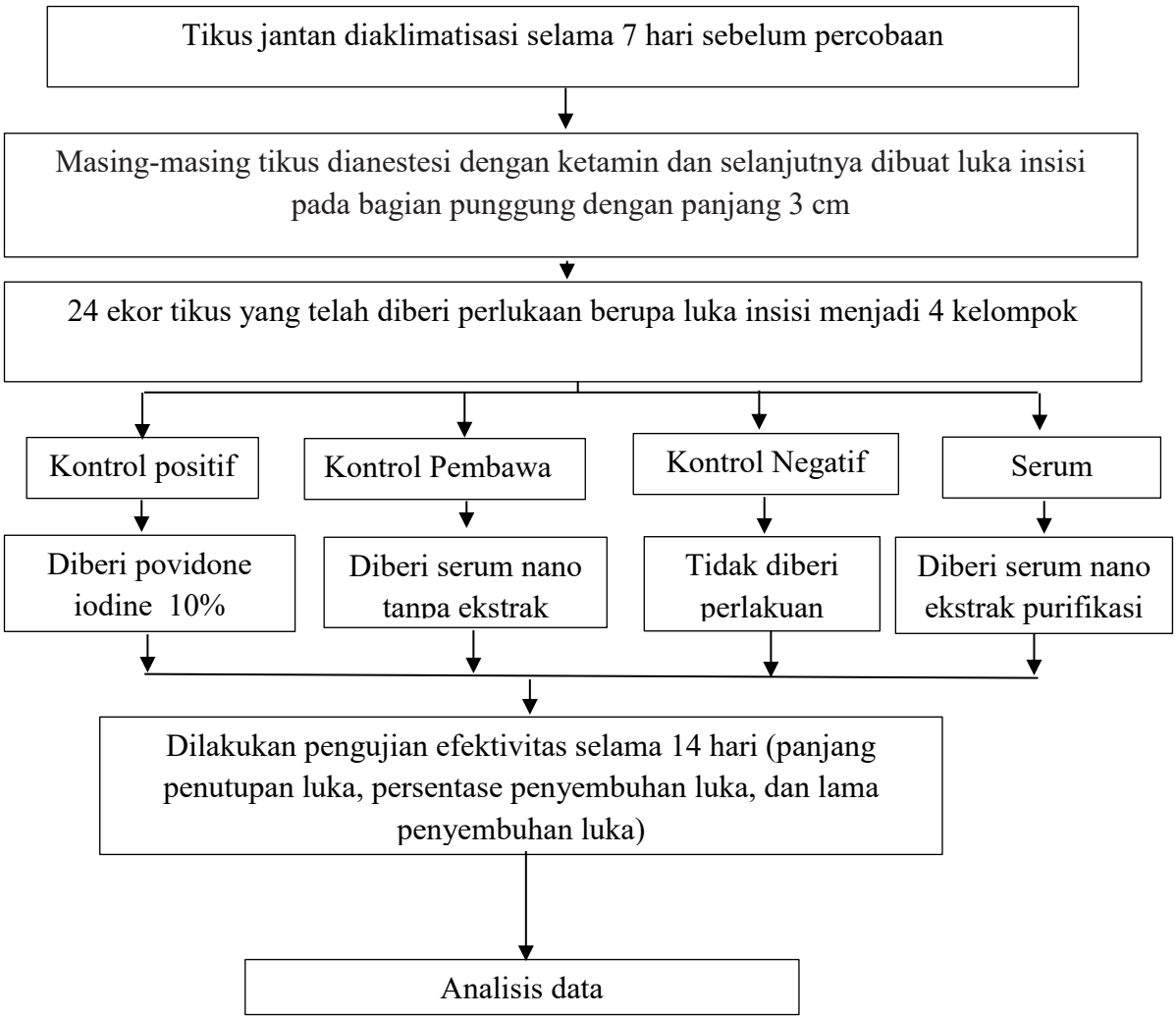
3.2. Cara Penelitian

3.2.1. Skema Penelitian

Skema penelitian tercantum pada gambar 3.1 dan gambar 3.2



Gambar 3.1. Skematika Pembuatan Serum Nanopartikel



Gambar 3.2. Skematika Pengujian Efektivitas Serum Nanopartikel

3.2.2 *Ethical Clearence*

Ethical clearance (kelayakan etik) merupakan surat keterangan tertulis yang dikeluarkan oleh Komite Etik Penelitian. *Ethical clearance* berisi tentang pernyataan bahwa penelitian yang dirancang layak untuk dilakukan pada makhluk hidup (hewan, manusia, tumbuhan). Kelayakan etik pada pengujian ini diajukan kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

3.2.3 Pengumpulan Simplisia

Serbuk simplisia batang *Jatropha multifida* L. diperoleh dari Merapi Farma Herbal yang beralamat di Jalan Kaliurang Km 21,5 Dusun Sidorejo, Desa Hargobinangun, Pakem, Sleman – Yogyakarta.

3.2.4 Determinasi Serbuk

Determinasi tanaman jarak cina (*J. multifida* L.) dilakukan menggunakan serbuk simplisia batang tanaman di Laboratorium Farmakognosi, Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.2.5 Ekstraksi Batang *Jatropha multifida* Linn.

Serbuk simplisia batang jarak cina yang di ekstraksi adalah sebanyak 450 g dengan metode soxhletasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksan terlebih dahulu, sehingga diperoleh hasil filtrat dan presipitat. Presipitat dari hasil ekstraksi n-heksan kemudian diekstraksi kembali menggunakan pelarut etil asetat, dimana pada masing-masing total pelarut yang digunakan adalah sebanyak 4500 mL (simplisia : pelarut yaitu 1 : 10). Setelah didapatkan ekstrak etil asetat, diuapkan ekstrak cair etil asetat hasil soxhletasi menggunakan *rotary evaporator*.

3.2.6 Purifikasi Ekstrak Batang Jarak Cina (*Jatropha multifida* Linn.)

Proses purifikasi pada ekstrak etil asetat batang jarak cina menggunakan *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC), pelarut yang digunakan adalah n-heksan dan etanol 70%. Sedangkan Fase diam yang digunakan pada VLC ini adalah silica gel 60 F254.

3.2.7 Uji Kandungan Senyawa Ekstrak Etanolik Terpurifikasi *Jatropha multifida* Linn.

Pengujian kandungan senyawa dilakukan secara kualitatif untuk melihat senyawa yang terkandung dalam fraksi etanolik *Jatropha multifida* Linn. Dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menotolkan esktrak terpurifikasi pada konsentrasi yang sama kemudian dielusikan menggunakan fase gerak kloroform. Hasil elusi kemudian disemprot dengan perekasi semprot $AlCl_3$ untuk mengetahui kandungan senyawa flavonoid, $FeCl_3$ untuk mengetahui kandungan senyawa fenol.

3.2.8 Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Etanolik Terpurifikasi Batang Jarak Cina

Ekstrak etanolik terpurifikasi batang jarak cina sebanyak 1 gram dilarutkan di dalam 35 mL etanol p.a, kemudian ditambahkan 15 mL akuabides. Kemudian di dalam campuran tersebut ditambahkan larutan alginat 0,1% (dibuat dengan melarutkan 0,1 gram serbuk sodium alginat dalam 100 mL *akuabides*) dan larutan $CaCL_2$ 0,02% (dilarutkan 0,02 gram serbuk $CaCl_2$ dalam 100 mL *akuabides*). Kedua polimer tersebut diaduk menggunakan magnetic stirrer pada kecepatan 800 rpm selama kurang lebih 2 jam hingga didapatkan bentuk koloid nanopartikel jarak cina. Kemudian dilakukan ultrasonifikasi selama 10 menit. Koloid yang terbentuk kemudian di *freeze dryer* hingga menjadi padatan kering.

3.2.9 Karakterisasi Hasil Pembuatan Nanopartikel

Nanopartikel esktrak terpurifikasi jarak cina (*Jatropha multifida* Linn.) dikarakterisasi menggunakan PSA (*Particle Size Analyzer*) untuk mengetahui apakah pembuatan nanopartikel dengan metode gelasi ionic dapat menghasilkan partikel berukuran nanometer. Kemudian dilakukan penentuan ukuran nanopartikel dan zeta potensial menggunakan *zeta sizer,* dan pengujian KLT (Kromatografi Lapis Tipis) untuk mengetahui perbandingan senyawa jarak cina dalam keadaan fraksi etanolik mau pun dalam nanopartikel.

3.2.10 Formulasi Serum

Tabel 3.1 Formula Serum Nanopartikel *Jatropha multifida* Linn.

Bahan	Formula
Nanopartikel esktrak etanolik terpurifikasi *Jatropha multifida* Linn. (mg)	5
Gliserin (mL)	3
Tween 80 (mL)	0,5
PVA (mL)	0,02
Asam sitrat (mL)	0,01

Formulasi serum nanopartikel ekstrak etanolik terpurifikasi *Jatropha multifida* Linn menggunakan formulasi bahan terbaik yang telah disesuaikan dengan penelitian sebelumnya (Guslindayani, 2018) dapat dilihat pada tabel 3.1.

Serum dengan bahan dasar nanopartikel ekstrak etanolik terpurifikasi batang *Jatropha multifida* Linn. dicampur dengan gliserin menggunakan ultrasonik selama 10 menit hingga homogen, kemudian ditambahkan dengan tween 80 dan PVA, pencampuran dilakukan kembali dengan ultrasonik hingga homogen.

3.2.11 Uji Organoleptik Serum

Uji organoleptik dilakukan pada sediaan serum yang telah dibuat. Pengamatan dilakukan secara visual pada uji ini meliputi bentuk, warna, bau, dan homogenitasnya.

3.2.12 Pemeliharaan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar sehat yang diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Protokol eksperimen terhadap hewan uji telah melewati persetujuan Komite Etik. Prosedur pemeliharaan hewan uji sesuai dengan yang tertulis di bagian subjek uji. Tikus yang digunakan berjumlah 24 ekor yang dibagi ke dalam 4 kelompok. Setiap kandang ditempati oleh 6 ekor tikus yang masih satu kelompok. Prosedur pemeliharaan ini dilakukan selama masa aklimatisasi hingga berkahirnya penelitian.

3.2.13 Perlukaan Jaringan pada Hewan Uji

Metode perlukaan jaringan kulit tikus dilakukan dengan cara, tikus jantan galur Wistar dianastesi dengan ketamin (5 mg/kg BB) dan dan xylazin (0,08mg/kgBB) secara intraperitonial. Selanjutnya rambut tikus dibagian punggung digunting; lalu dicukur, dan dibersihkan dengan alkohol 70%. Kemudian dibuat luka irisan dengan panjang ±2 cm dan kedalaman ±0,2 cm sampai subkutis pada punggung tikus menggunakan pisau skapel. Untuk memastikan panjang luka sama, maka digunakan penggaris untuk mengukur panjang luka. Ada pun kedalaman luka yang seragam dipastikan dengan memberi penanda pada pisau sebagai batas kedalaman pisau saat membuat luka.

3.2.14 Pengelompokkan Hewan Uji

Tikus jantan galur Wistar yang digunakan berjumlah 24 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok dan masing – masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus jantan galur Wistar.

Penentuan jumlah hewan coba pada penelitian ini menggunakan rumus Federer, yaitu : $(n - 1)(t - 1) \geq 15$

Keterangan = t : jumlah perlakuan

n : jumlah pengulangan untuk tiap perlakuan

Maka :

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

$(n - 1)(3) \geq 15$

$3n - 3 \geq 15$

$3n \geq 18$

$n \geq 6$

Berdasar rumus diatas, jumlah hewan uji minimal dalam 1 kelompok adalah 6 ekor. Adapun desain penelitian ini menggunakan 4 kelompok hewan uji, sehingga total hewan uji tikus jantan galur Wistar yang digunakan adalah 24 ekor tikus, dengan tiap tikus terdapat 1 luka insisi pada bagian punggung (24 luka).

Pengelompokkan hewan uji untuk setiap perlakuan meliputi:

a. Kontrol positif (KP) : Tikus kelompok kontrol posistif (KP) diberikan Povidone Iodine 10% pada hari ke-0 sampai hari ke-14.

b. Kontrol negatif (KN) : Tikus kelompok normal tidak diberikan perlakuan apa pun dari hari ke-0 sampai hari ke-14.

c. Kontrol pembawa (KPA) : Tikus kelompok kontrol pembawa (KPA) diberikan serum tanpa ekstrak terpurifikasi nanopartikel batang *J. multifida* pada hari ke-0 sampai hari ke-14

d. Perlakuan serum (PS) : Tikus kelompok perlakuan serum (PS) diberikan serum nanopartikel ekstrak terpurifikasi batang *J. multifida* pada hari ke-0 sampai hari ke-14.

3.2.15 Pengujian Efektivitas Serum Terhadap Penyembuhan Luka

Setiap masing-masing luka tikus diberikan perlakuan sesuai yang telah ditentukan. Setelah bahan uji diaplikasikan pada bagian luka, lalu ditutup dengan

kassa steril dan direkatkan dengan plester. Setelah waktu 24 jam, dibuka plester, kemudian luka dibersihkan dengan akuades. Panjang luka insisi diukur dari arah vertikal dengan menggunakan penggaris. Penggaris diletakkan di sisi luka untuk kemudian difoto, setelah itu bahan uji diaplikasikan dan luka ditutup kembali dengan kassa yang baru dengan durasi pengujian selama 14 hari

3.2.15.1 Perhitungan Panjang Penutupan Luka

Untuk menentukan panjang luka digunakan jangka sorong guna mengetahui panjang dari penutupan luka insisi pada tikus.

3.2.15.2 Penentuan Persentase Penyembuhan Luka

Persentase penyembuhan luka dihitung berdasarkan rumus Wilson (Kant *et al.*, 2015):

$$\% \text{ Kontraksi Luka} = \frac{\text{Panjang luka pada hari ke 0 - Panjang luka pada hari ke n}}{\text{Area luka pada hari ke 0}} \times 100\%$$

3.2.15.3 Penentuan Lama Penyembuhan Luka

Lama penyembuhan luka ditentukan dengan pengamatan secara makroskopik dan membandingkan penampakan luka antar kelompok selama 14 hari.

3.3. Analisis Hasil

3.3.1 Pengujian Efektivitas serum nanopartikel terhadap Penyembuhan Luka

Data yang diperoleh meliputi panjang penutupan luka, persentase penyembuhan luka, dan lama penyembuhan luka selama 14 hari dari masing-masing kelompok perlakuan. Data panjang penutupan luka dan persentase penyembuhan luka selama 14 hari yaitu pada hari ke-3; 7; 10; dan 14 disajikan dalam bentuk rata-rata dan standar deviasi (SD). Kemudian, data tersebut dianalisis menggunakan *One Way ANOVA* dengan membandingkan data persentase penyembuhan luka dari masing-masing kelompok perlakuan untuk mengetahui pengaruh masing-masing perlakuan terhadap penyembuhan luka insisi.