

BAB III METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan dengan metode eksperimental selama 2-3 bulan. Preparasi bahan baku, pembuatan ekstrak, pembuatan sediaan, dan penyembuhan luka bakar pada hewan uji dilaksanakan di laboratorium Farmasi Universitas Setia Budi.

B. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan adalah ceker ayam broiler yang diperoleh dari pedaging ayam yang didapat dari peternakan ayam broiler di Desa Karangwader, Kecamatan Penawangan, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan adalah kolagen dari ceker ayam broiler yang dibuat menjadi sediaan emulgel dengan variasi konsentrasi HPMC 2%; 2,5%; dan 3%. Pengambilan ceker dari ayam yang sudah siap panen berumur sekitar 5-6 minggu, yang diambil secara acak dalam keadaan bersih, segar, dan tidak busuk.

C. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah kolagen ceker ayam broiler yang diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut asam asetat.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan pada berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi HPMC 2%; 2,5%; dan 3% yang diujikan pada punggung kelinci.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas penyembuhan luka bakar dengan parameter pengecilan diameter luka setelah kelinci diberikan sediaan emulgel kolagen ceker ayam broiler dengan dosis yang bervariasi dan mutu fisik sediaan emulgel meliputi organoleptik, homogenitas, viskositas, pH, daya lekat, daya sebar, tipe emulgel, dan stabilitas.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah prosedur ekstraksi. Peralatan yang digunakan, lingkungan, luas luka bakar, kedalaman pencukuran bulu, dan kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat, umur, galur, dan laboratorium. Pada sediaan emulgel juga dapat dikendalikan dengan suhu, kecepatan pengadukan, cahaya penyimpanan, dan wadah yang digunakan selama proses penyimpanan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, ceker ayam adalah bagian dari tubuh ayam broiler yang dijual oleh pedagang ayam broiler dari peternakan ayam broiler di Desa Karangwader, Kecamatan Penawangan, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah.

Kedua, kolagen ceker ayam adalah ekstrak yang melewati proses pengumpulan dan persiapan sampel, pencucian, pemotongan, pengeringan, penghilangan jaringan non kolagen, perendaman menggunakan pelarut asam asetat, dan pengeringan kolagen cair menjadi serbuk kolagen.

Ketiga, emulgel kolagen ceker ayam broiler adalah sediaan dari pencampuran antara fase minyak dan fase air yang kemudian dicampur *gelling agent* HPMC dengan tiga variasi konsentrasi yaitu 2%; 2,5%; dan 3% dengan kandungan zat aktif kolagen ceker ayam broiler.

Keempat, uji mutu fisik sediaan emulgel adalah pengujian yang meliputi uji organoleptis, uji pH, uji viskositas, uji daya lekat, uji daya sebar, dan uji tipe emulgel.

Kelima, stabilitas sediaan yang baik menentukan kualitas dan keamanan sediaan dalam keberhasilan pengobatan.

Keenam, hewan uji yang digunakan adalah kelinci putih karena memiliki respon yang hampir sama dengan manusia pada penyakit dan pengobatannya.

Ketujuh, luka bakar dibuat menggunakan lempeng logam berdiameter 2 cm yang dipanaskan dan diletakkan pada kulit punggung kelinci.

Kedelapan, aktivitas penyembuhan luka bakar adalah kemampuan dari formula emulgel kolagen ceker ayam broiler dalam menyembuhkan luka bakar yang diukur dari pengecilan diameter luka bakar.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik, beaker glass, gelas ukur, blender, wadah maserasi, cawan porselin, oven, pisau, stik pH, cawan, nampan, kertas saring, kain flanel, corong, deck glass, jar, objek glass, sendok tanduk, spatula, label, waterbath, alat daya sebar, alat daya lekat, musture balance, muffle, kurs, jangka sorong, kertas pH, multimeter, anak timbangan, kaca arloji, viskometer, kulkas, desikator, stopwatch, pot gel, kertas perkamen, batang pengaduk, mortir dan stemper, solder berdiameter 2 cm, gunting, dan isolasi.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini sebagai zat aktif adalah kolagen dari ceker ayam broiler. Bahan yang digunakan untuk membuat sediaan emulgel diantaranya adalah HPMC, Paraffin cair, Gliserin, Phenoxyethanol, Span 80, Twen 80, dan Aquadest. Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah kelinci *new zealand* umur 5,0 - 6,0 bulan dengan berat 1,5 - 2,0 kg yang telah diadaptasikan selama 1 minggu kemudian dibuat luka bakar sesuai yang diinginkan.

E. Jalannya Penelitian

1. Penyiapan sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah kolagen ceker ayam broiler yang dibuat dalam sediaan emulgel dengan variasi konsentrasi HPMC 2%; 2,5%; 3%. Pengambilan sampel ceker dari ayam yang sudah siap panen berumur sekitar 5-6 minggu yang diambil dari pedaging ceker ayam broiler di Desa Karangwader, Kecamatan Penawangan, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah.

2. Preparasi sampel

Ceker ayam broiler segar sebanyak 3,5 kg dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel. Ceker ayam dipotong kecil-kecil ± 2 cm. Ceker ayam yang telah dipotong-potong dikeringkan menggunakan oven 40°C selama 2 x 24 jam, kemudian dihaluskan menggunakan blender (Sonia *et al.*, 2020)

Ceker ayam yang sudah kering ditimbang dan kemudian direndam menggunakan n-heksan dengan perbandingan (1:2) selama 2 x 24 jam untuk pembebasan lemak. Ceker ayam yang sudah selesai

perendaman disaring dan dicuci menggunakan air bersih dan mengalir agar pembersihan dapat merata (Setyawaty dan Triliandari, 2018)

3. Pembuatan ekstrak kolagen

Proses untuk memperoleh kolagen, yaitu dengan ceker ayam terlebih dahulu didemineralisasi kemudian direndam dalam larutan asam asetat 5% dengan perbandingan w/v 1:8 selama 3 x 24 jam hingga terbentuk ossein. Ossein disaring menggunakan kain flanel lalu dilanjutkan penyaringan dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dari proses penyaringan ditambahkan dengan larutan NaOH 1N untuk mendapatkan pH yang netral yaitu pH 6-7. Kolagen yang terbentuk kemudian disaring dengan kertas saring, lalu dituang dalam wadah dan dikeringkan dalam oven pada suhu 36°C sampai diperoleh kolagen kering. Kolagen kering dihaluskan dalam mortir untuk menghasilkan serbuk kolagen yang halus (Santosa *et al.*, 2018). Pemilihan metode ekstraksi kolagen secara asam berdasarkan beberapa alasan, yakni ekstraksi asam dinilai lebih efektif dan menghasilkan rendemen lebih tinggi dibandingkan metode basa (Khirzin *et al.*, 2019).

4. Analisis kuantitatif hasil ekstraksi kolagen

4.1. Rendemen. Rendemen kolagen yang diperoleh dihitung berdasarkan berat akhir kolagen terhadap berat awal (Budiarti *et al.*, 2019).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Akhir}}{\text{Berat Awal}} \times 100\%$$

4.2. Kadar air. Pengukuran kadar air pada sampel menggunakan alat *moisture analyzer* DSH-SO-I. Sampel diletakkan diatas pan dan ditimbang seberat 2 gram. Kemudian ditutup bagian cover dan dilakukan pengukuran kadar air sekitar 5 menit. (AOAC, 2005).

4.3. Kadar abu. Kurs yang berisi sampel sebanyak 1 gram dibakar sampai tidak berasap, selanjutnya diabukan pada muffle menggunakan suhu 500-600°C selama 6-8 jam hingga terbentuk abu, kemudian didinginkan dan ditimbang berat cawan dan abu (Budiarti *et al.*, 2019).

4.4. Nilai pH. Kolagen ceker ayam sebanyak 1 gram terlebih dahulu dilarutkan dalam 50 mL aquades sampai homogen. Alat pH meter dinyalakan dan ditunggu hingga stabil. Elektroda dicelupkan dalam larutan kolagen sampai diperoleh angka yang stabil pada proyektor pH meter (Budiarti *et al.*, 2019).

5. Rancangan formula emulgel kolagen ceker ayam

Formula emulgel kolagen ceker ayam dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 2. Formula emulgel kolagen ceker ayam broiler

Bahan	Fungsi bahan	Konsentrasi %			
		F1	F2	F3	F4
Kolagen	Zat aktif	5	5	5	-
HPMC	<i>Gelling agent</i>	2	2,5	3	3
Gliserin	Humektan	10	10	10	10
Parafin Cair	Penghidrasi	6,5	6,5	6,5	6,5
Span 80	Emulgator	1	1	1	1
Tween 80	Emulgator	0,5	0,5	0,5	0,5
Phenoxyethanol	Pengawet	0,5	0,5	0,5	0,5
Aquadest	Pelarut	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Keterangan :

F1 : Emulgel kolagen ceker ayam broiler dengan konsentrasi HPMC 2%

F2 : Emulgel kolagen ceker ayam broiler dengan konsentrasi HPMC 2,5%

F3 : Emulgel kolagen ceker ayam broiler dengan konsentrasi HPMC 3%

F4 : Kontrol negatif dengan konsentrasi HPMC 3% (Tanpa zat aktif kolagen)

6. Pembuatan sediaan emulgel

Pembuatan sediaan emulgel dilakukan sesuai dengan komposisi formula yang tertera pada tabel. Semua bahan ditimbang terlebih dahulu dengan seksama. Fase minyak dibuat dengan mencampurkan paraffin cair, span 80, dan phenoxyethanol diatas *waterbath*. Fase air dibuat dengan mencampurkan tween 80 dan gliserin dengan sebagian aquadest hingga homogen diatas *waterbath*. Fase minyak dimasukkan pada mortir panas, aduk sampai homogen. Fase air dituangkan secara bertahap sampai terbentuk emulsi. *Beaker glass* berisi HPMC diberi sedikit demi sedikit air panas untuk mendispersikan HPMC, diaduk sampai terbentuk basis gel. Emulsi dan gel yang sudah terbentuk dicampur dan dihomogenkan dalam mortir panas hingga terbentuk emulgel yang homogen dan kemudian ditambahkan dengan zat aktif kolagen ceker ayam broiler.

7. Evaluasi sediaan emulgel

7.1. Uji organoleptis. Dilakukan secara makroskopis dengan pemeriksaan bau, warna dan bentuk dari emulgel ceker ayam (Wiyono *et al.*, 2020).

7.2. Uji homogenitas. Dilakukan dengan mengoleskan 1 gram emulgel pada sekeping kaca transparan, sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak boleh terlihat ada gumpalan-gumpalan partikel yang kasar (Wiyono *et al.*, 2020).

7.3. Uji pH. Pengukuran dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi menggunakan dapar pada pH 4 dan 7. Selanjutnya elektroda dicelupkan kedalam emulgel. Nilai pH akan muncul pada layar kemudian dicatat, kesesuaian pH emulgel dengan pH kulit yaitu antara 4,5–6,5 (Safitri *et al.*, 2016).

7.4. Uji daya sebar. Metode yang paling sering digunakan untuk pengukuran daya sebar adalah parallel - plate. Sebanyak 0,5 gram emulgel ceker ayam ditimbang dan diletakkan di atas kaca bulat berskala. Kemudian ditutup dengan kaca lain dan secara bertahap ditambah beban (50 gram, 100 gram, dan 150 gram) selama 1 menit kemudian diukur diameternya (Pratasik *et al.*, 2019). Persyaratan uji daya sebar yang baik untuk sediaan topikal yaitu sekitar 5-7.

7.5. Uji daya lekat. Uji daya lekat dilakukan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan oleh sediaan untuk melekat pada kulit. Pada permukaan kaca diletakan 0,5 gram emulgel kolagen ceker ayam. Selanjutnya, lempeng kaca kedua diletakkan di atas objek kaca pertama dan ditekan menggunakan beban 1 kg selama 5 menit. Kemudian angkat beban seberat 1 kg, tarik tuas, dan mulai menyalakan stopwatch dan dihentikan saat objek kaca terlepas. Persyaratan uji daya lekat yang baik untuk sediaan topikal yaitu lebih dari 4 detik. Semakin lama waktu melekat maka semakin lama daya kerja obat (Wiyono *et al.*, 2020)

7.6. Uji viskositas. Viskositas berperan penting dalam meningkatkan stabilitas sediaan. Penelitian ini menggunakan Viskometer *Brookfield* untuk menguji viskositas emulgel dan menggunakan ukuran spindle dengan menyesuaikan konsistensi sediaan. Spindel yang telah disiapkan dicelupkan ke dalam sediaan emulgel, kemudian dilakukan penentuan viskositasnya dengan melihat jarum yang menunjukkan angka yang stabil dengan satuan dpas. Nilai viskositas untuk sediaan semi solid adalah 2000-4000 cP (Wiyono *et al.*, 2020)

7.7. Determinasi tipe emulsi. Tipe emulsi dapat ditentukan dengan beberapa cara (Tania *et al.*, 2020)

7.7.1. Metode pengenceran. Emulgel dikatakan bertipe M/A apabila dapat segera diencerkan dengan air dan bertipe emulgel A/M apabila tidak dapat diencerkan dengan air (Tania *et al.*, 2020).

7.7.2. Metode pewarnaan. Dua jenis pewarna berbeda digunakan dalam metode ini. Pewarna yang larut dalam air dan pewarna yang larut dalam minyak. Pewarna yang larut dalam air dapat

menggunakan metilen biru dan untuk pewarna yang larut dalam minyak menggunakan Sudan III. Emulgel yang terwarnai homogen oleh pewarna larut air adalah emulgel tipe M/A dan emulgel yang terwarnai oleh pewarna larut minyak adalah emulgel tipe A/M (Tania *et al.*, 2020).

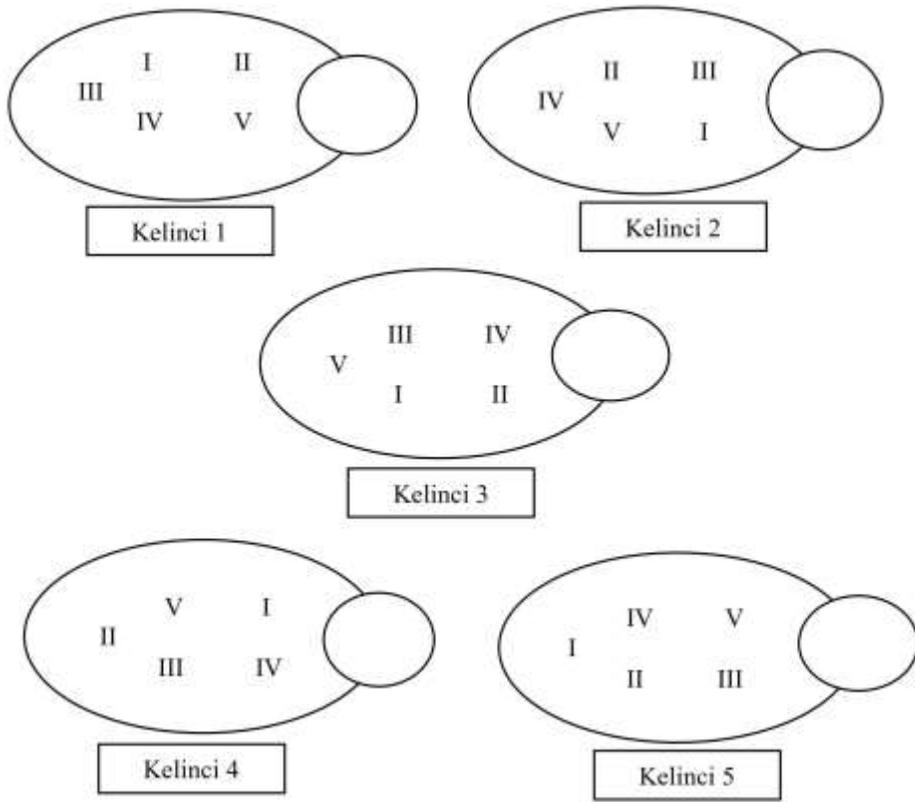
7.7.3. Konduktivitas elektrik. Apabila elektroda yang terhubung dengan lampu dan sumber listrik dicelupkan ke dalam emulgel dapat mengakibatkan menyalanya lampu pada alat uji, maka tipe emulgel tersebut adalah M/A. Sebaliknya, apabila lampu tidak menyala, maka tipe emulgel tersebut adalah M/A. Hal ini disebabkan oleh fakta bahwa air merupakan konduktor listrik yang lebih unggul dibandingkan minyak (Tania *et al.*, 2020).

7.8. Uji stabilitas freeze-thaw. Stabilitas formula dilakukan selama 6 siklus. Setiap siklus diamati setelah 24 jam penyimpanan pada suhu 4°C dan 24 jam pada suhu 40°C selama 12 hari. Siklus yang diamati adalah ada atau tidaknya pemisahan fase pada emulgel, serta parameter pergeseran sifat fisik yaitu pergeseran organoleptis, homogenitas, viskositas, dan pH emulgel. Selama percobaan, keadaan fisik emulgel dibandingkan dengan sediaan sebelumnya (Wiyono *et al.*, 2020).

8. Pengelompokan hewan uji

Terdapat 5 perlakuan dengan 5 ekor kelinci. Tiap kelinci mendapat perlakuan sebagai berikut:

- a. Luka 1 : emulgel kolagen ceker ayam broiler konsentrasi HPMC 2%
- b. Luka 2 : emulgel kolagen ceker ayam broiler konsentrasi HPMC 2,5%
- c. Luka 3 : emulgel kolagen ceker ayam broiler konsentrasi HPMC 3%
- d. Luka 4 : basis emulgel (kontrol negatif)
- e. Luka 5 : Stimul gel (kontrol positif)



Gambar 12. Perlakuan luka pada kelinci

9. Perlakuan hewan uji untuk penyembuhan luka bakar

Kelinci putih sebanyak 5 ekor ditempatkan di dalam kandang yang sudah dipisahkan sesuai kelompok perlakuan. Diadaptasi selama seminggu sebelum dilakukan pengujian. Kelinci diberikan makan dan minum sesuai kebutuhan.

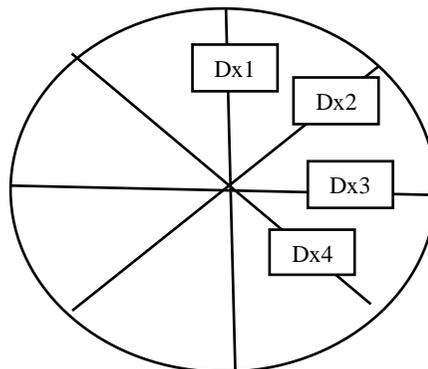
Punggung kelinci di kerok menggunakan alat pencukur. Lempengan logam berdiameter 2 cm dipanaskan 4-10 menit. Logam panas ditempelkan pada punggung kelinci selama beberapa detik hingga terbentuk luka bakar. Luka bakar dibuat sebanyak 5 area. Luka 1 diberikan emulgel dengan konsentrasi HPMC 2%, luka 2 diberikan emulgel dengan konsentrasi HPMC 2,5%, luka 3 diberikan emulgel dengan konsentrasi HPMC 3%, luka 4 diberikan kontrol negatif (basis emulgel), dan luka 5 diberikan kontrol positif (Stimul gel). Pemberian perlakuan dilakukan sebanyak 2x sehari selama 21 hari (Ayati *et al.*, 2019).

10. Pengukuran diameter luka bakar

Penyembuhan luka bakar ditentukan dengan mengukur diameter luka pada pagi hari setelah perawatan dengan dua kali aplikasi emulgel kolagen ceker ayam broiler. Selama 21 hari, luka bakar diukur setiap hari pada pagi hari dengan menggunakan jangka sorong (Saputra, 2023).

11. Pengukuran persentase penyembuhan luka

Pengukuran penyembuhan luka dilakukan setelah pengaplikasian sediaan emulgel ekstrak kolagen ceker ayam selama 21 hari. Persentase penyembuhan dan pengukuran diameter dari luka bakar dilakukan pada pagi hari menggunakan jangka sorong. Setiap hewan uji dilakukan pengukuran setiap hari sampai luka bakar dinyatakan sembuh. Pemberian sediaan emulgel dilakukan 2 kali sehari setiap pagi dan sore (Saputra, 2023). Menentukan persentase penyembuhan berdasarkan diameter luka. Persamaan berikut digunakan untuk menghitung persentase penyembuhan luka bakar :



Gambar 13. Pengukuran diameter luka bakar

Rumus perhitungan rata-rata diameter luka :

$$dx = \frac{dx (1) + dx (2) + dx (3) + dx (4)}{4}$$

Keterangan:

- dx1 : pengukuran dilakukan secara vertikal (dari atas ke bawah)
- dx2 : pengukuran dilakukan dari kemiringan sudut 45°
- dx3 : pengukuran dilakukan secara horizontal (dari kanan ke kiri)
- dx4 : pengukuran dilakukan dari kemiringan sudut 135°

Rumus perhitungan pengukuran persentase penyembuhan luka bakar :

$$px = \frac{dx_1 - dx_n}{dx_1} \times 100\%$$

Keterangan:

Px = persentase penyembuhan luka pada hari ke x

dx1 = diameter luka bakar pada hari pertama (cm)

dxn = diameter luka bakar pada hari ke-n (cm)

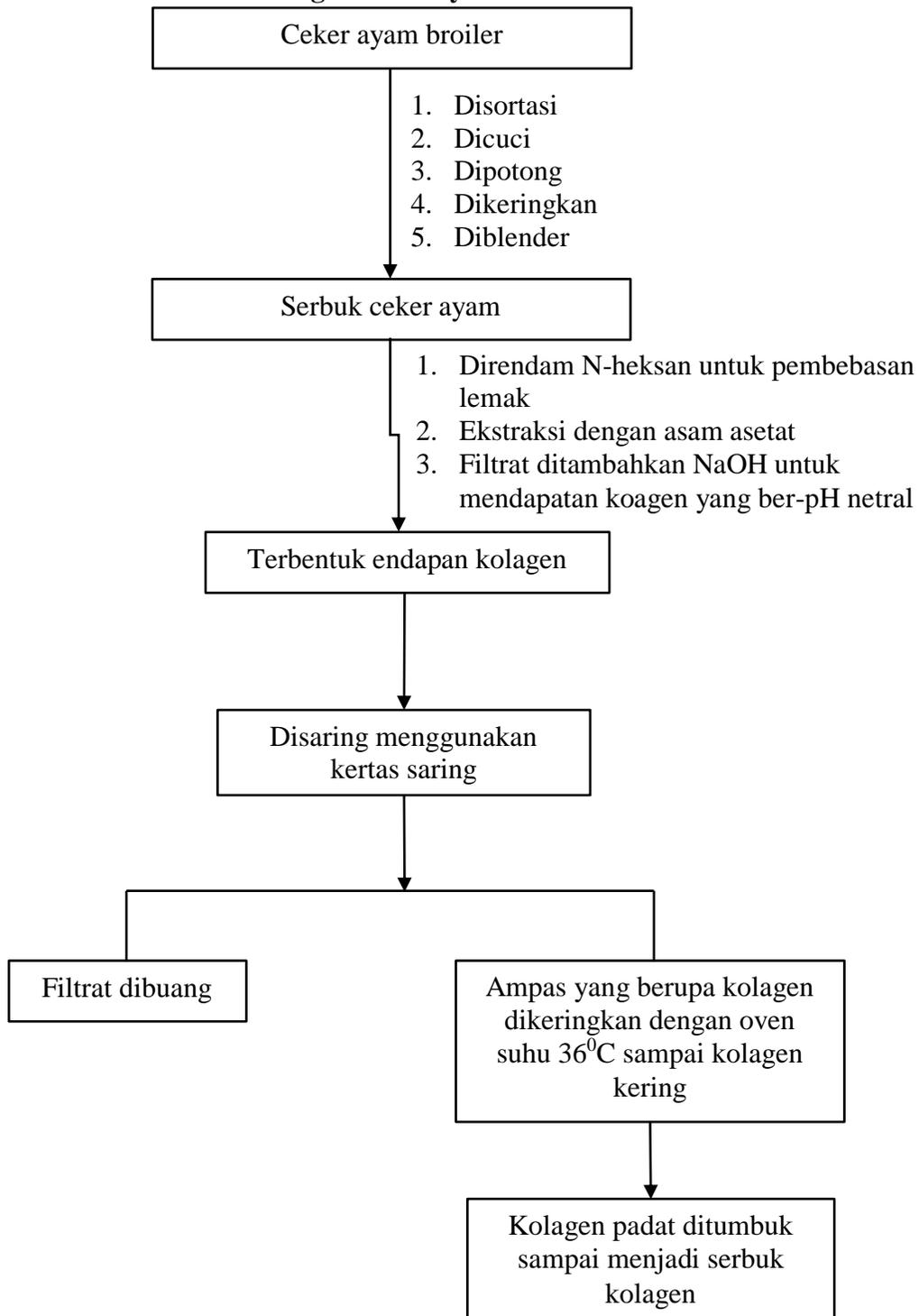
F. Analisis Data

Hasil mutu fisik (pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan stabilitas emulgel) dianalisis statistik menggunakan aplikasi SPSS. Hasil data yang diperoleh terlebih dahulu diuji normalitas Shapiro Wilk, apabila data yang diperoleh menunjukkan signifikansi $>0,05$ distribusi normal maka selanjutnya dilakukan analisis dengan One Way Anova taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan ke analisis Post Hoc Test Tukey.

Data hasil luka bakar selama 21 hari pada emulgel luka bakar kolagen ceker ayam broiler di uji normalitas menggunakan metode uji Shapiro Wilk, apabila data yang diperoleh menunjukkan distribusi normal (signifikansi $>0,05$), kemudian dilanjutkan analisis dengan uji parametrik yaitu One Way Anova dengan membandingkan diameter kelompok luka bakar, setelah itu dilanjutkan dengan uji Post Hoc Test Tukey untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya.

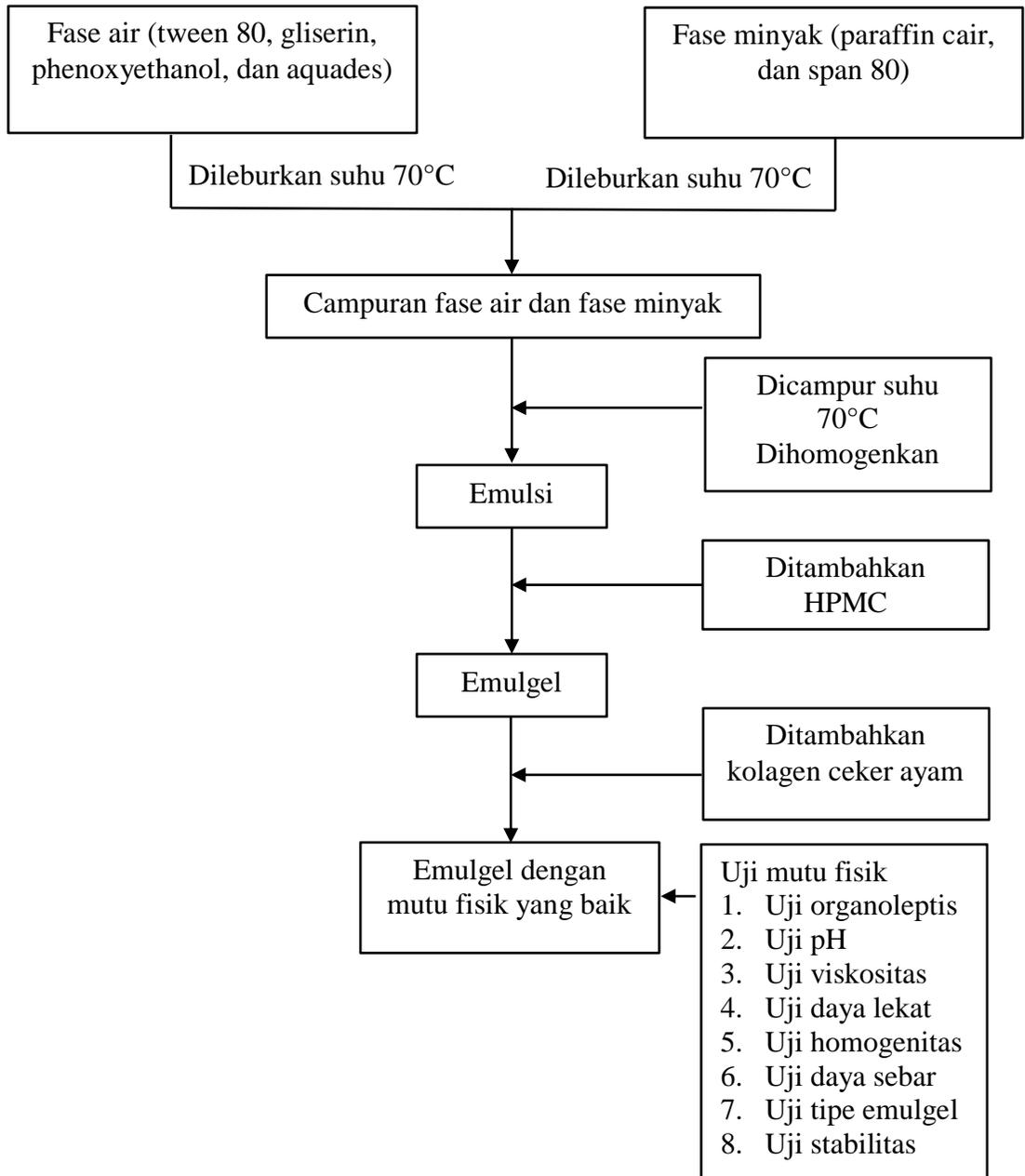
G. Skema Jalannya Penelitian

1. Pembuatan kolagen ceker ayam



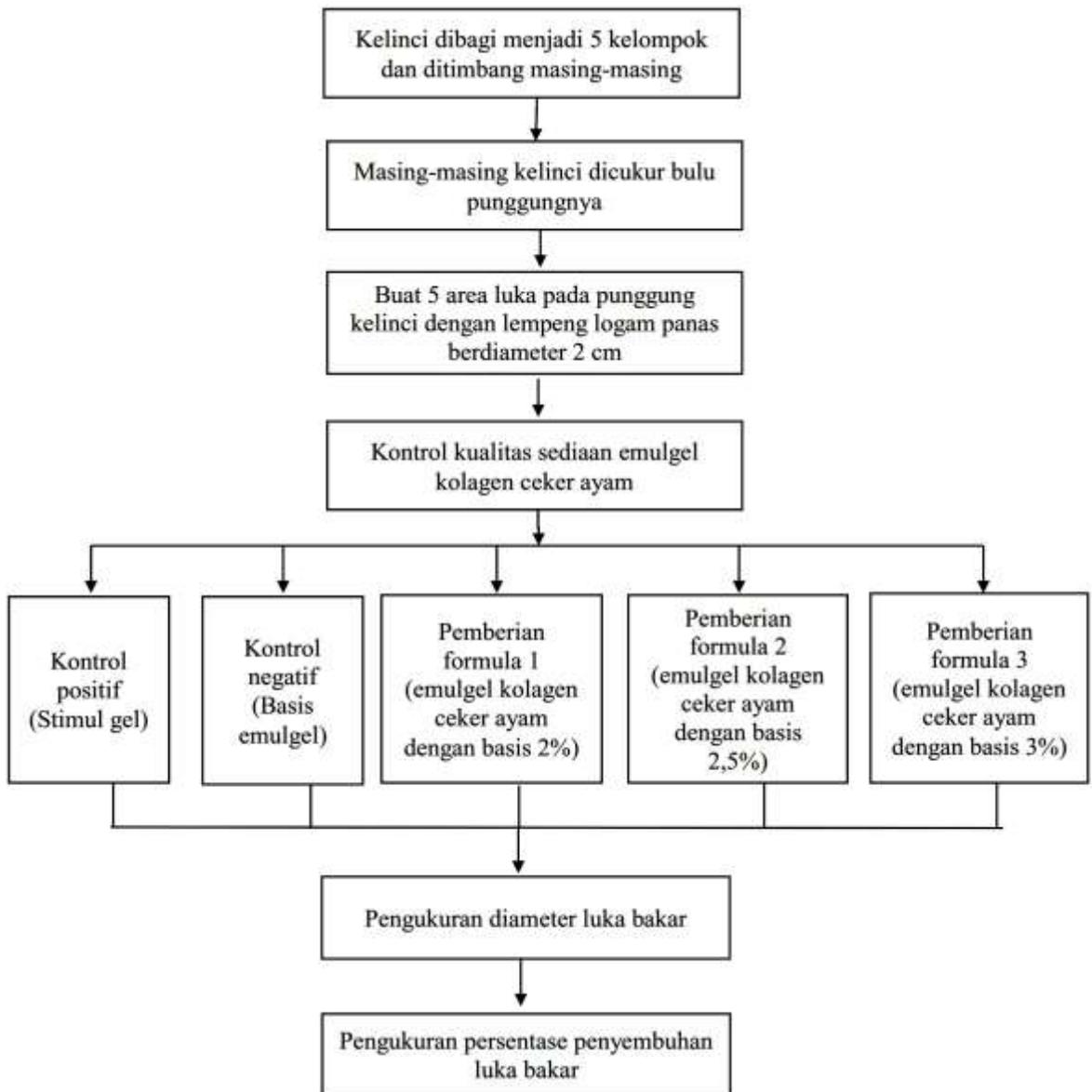
Gambar 14. Skema pembuatan kolagen ceker ayam

2. Pembuatan emulgel kolagen ceker ayam



Gambar 15. Skema pembuatan emulgel kolagen ceker ayam

3. Pengujian luka bakar



Gambar 16. Skema pengujian luka bakar