BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *experimental laboratories* dengan menggunakan metode HET-CAM. Tujuan dilakukannya penelitian ini untuk mengidentifikasi pengaruh kombinasi variasi konsentrasi basis polivinil alkohol (PVA) dan hidroksipropil metilselulosa (HPMC) terhadap uji iritasi pada sediaan masker *peel off* ekstrak daun kelor.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi dan Laboratorium Sintesis Prodi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang serta Laboratorium Materia Medica Batu.

4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2023 sampai dengan bulan Juli 2023.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi variasi konsentrasi basis polivinil alkohol (PVA) dan hidroksipropil metilselulosa (HPMC) pada sediaan masker *peel off* ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.).

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah hasil uji iritasi dengan menggunakan metode *Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM) pada sediaan masker *peel off* yang mengandung ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.).

4.4 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1) Iritasi adalah fenomena peradangan yang terjadi karena adanya zat asing di kulit. Gejala dapat berupa panas akibat pelebaran pembuluh darah pada area yang terpapar benda asing, ditandai dengan kemerahan pada area tersebut

(eritema) dan dapat juga menyebabkan pembengkakan (Fajriyah *et al*, 2020).

2) Darah lisis atau hemolisis adalah pecahnya membran eritrosit, sehingga hemoglobin bebas ke dalam medium sekelilingnya (plasma/serum). Lisis dapat terjadi melalui cara-cara alami, seperti infeksi virus, atau melalui cara buatan untuk tujuan penelitian. Darah lisis dapat dilihat secara visual dengan adanya warna merah dalam serum/ plasma (Cahyaningtyas, 2017).
3) koagulasi merupakan proses dimana terjadi penggumpalan partikel koloid karena penambahan bahan kimia sehingga partikel-partikel tersebut bersifat netral dan membentuk endapan karena adanya gaya gravitasi (Trisanyoto *et al*., 2015).
4) Perdarahan (*Hemorage*) adalah keluarnya darah dari pembuluh darah yang disertai penimbunan dalam jaringan atau ruang tubuh (Yuliati, 2017).

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

• Alat Pembuatan Masker Gel *Peel Off* :

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mortir stamper, beaker glass, cawan porselen, gelas ukur, kaca arloji, timbangan analitik balance, *hotplate*, spatula, sudip, batang pengaduk, pipet tetes, pot plastik.

• Alat Pengujian Iritasi HET-CAM :

Inkubator, gelar ukur, gunting steril, *hotplate* dan pinset steril.

4.5.2 Bahan

• Bahan Pembuatan Masker Gel *Peel Off* :

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstrak daun kelor, polivinil alkohol (PVA), hidroksipropil metilselulosa (HPMC), gliserin, metilparaben, propilparaben, aquadest.

• Bahan Pengujian Iritasi HET-CAM :

Telur ayam fertil, sampel masker *peel off*, larutan SLS dan larutan NaCl 0,9%.

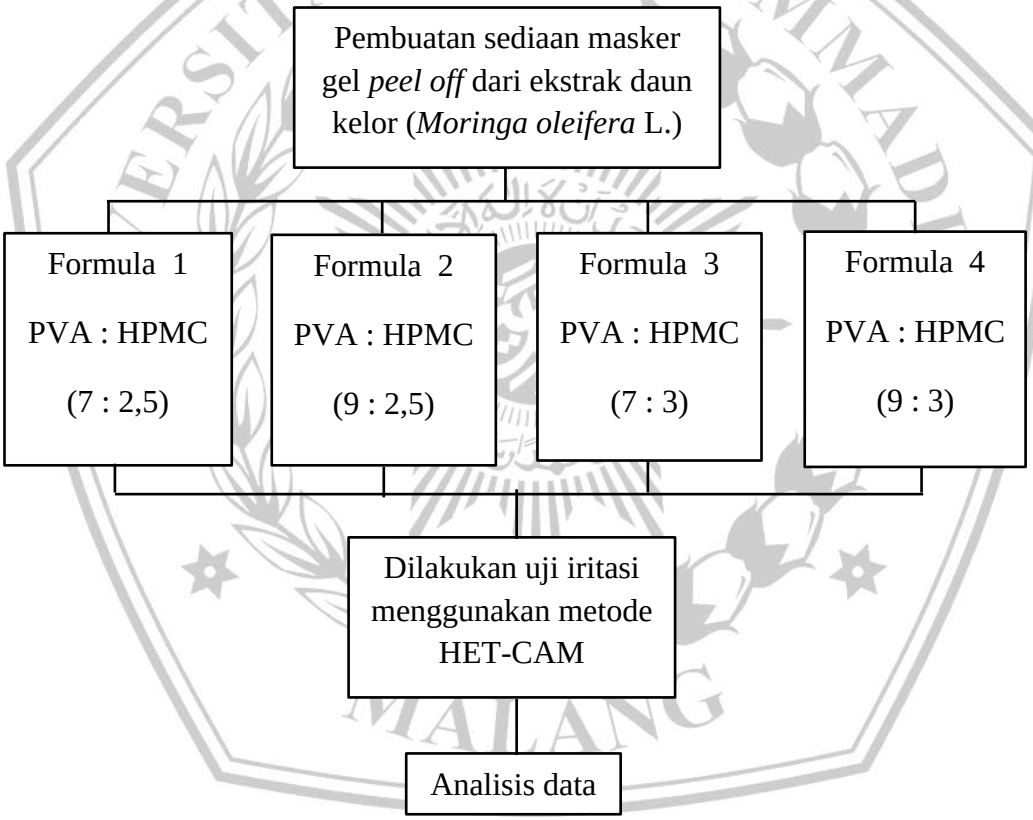
4.6 Metode Kerja

4.6.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor

Penelitian ini dilakukan pertama kali adalah dengan mengekstraksi simplisia daun kelor (*Moringa oleifera* L.) yang menggunakan pelarut etanol 70% dengan rasio perbandingan 1: 6 dan metode yang digunakan yaitu maserasi selama 3x24 jam atau 3 hari (Amanah *et al*., 2014) yang dilakukan di materia medika, Batu.

4.6.2 Rancangan Formula

Penelitian ini akan dibuat 4 formula dengan membedakan kadar dari kombinasi basis polivinil alkohol (PVA) dan hidroksipropil metilselulosa (HPMC) pada sediaan masker gel *peel off* ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.).



Gambar 4. 1 Skema Kerja

4.7 Formula Masker Gel *Peel Off*

4.7.1 Formula Sediaan Masker Gel *Peel Off*

Tabel IV. 1 Formula Masker *Peel Off*

Bahan	**Fungsi**	**Konsentrasi (%)**			
		F1	**F2**	**F3**	**F4**
Ekstrak daun kelor	Bahan aktif	2,5	2,5	2,5	2,5
Polivinil alkohol (PVA)	*Film former agent*	7	9	7	9
hidroksipropil metilselulosa (HPMC)	*Gelling agent/ Plasticizer*	2,5	2,5	3	3
Gliserin	*Humektan*	5	5	5	5
Metilparaben (Nipagin)	Pengawet	0,18	0,18	0,18	0,18
Propilparaben (Nipasol)	Pengawet	0,02	0,02	0,02	0,02
Aquadest	Pelarut	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

4.7.2 Cara Pembuatan Sediaan Masker Gel *Peel Off*

Pembuatan sediaan masker gel *peel off* dilakukan dengan Aquadest dipanaskan diatas *hotplate* dalam wadah dengan suhu 80˚C untuk melarutkan PVA sambil dilakukan pengadukan dengan kecepatan yang konstan lalu diamkan selama 12 jam dan HPMC dikembangkan dengan air dingin selama 24 jam agar cepat mengembang. Setelah PVA dan HPMC mengembang, HPMC dimasukkan ke dalam wadah PVA, diaduk sampai homogen. Metil paraben dan propil paraben dilarutkan dalam gliserin, diaduk sampai homogen. Kemudian dimasukkan dalam campuran PVA dan HPMC kemudian diaduk hingga homogen. Ekstrak dilarutkan dengan aquadest, diaduk sampai homogen, lalu dimasukkan ke dalam campuran basis PVA dan HPMC, sambil diaduk agar homogen. Tambahkan aquadest sedikit demi sedikit hingga terbentuk gel homogen (Masker gel *peel off*) sampai 100 gram.

Kemudian dikemas dalam wadah tertutup rapat. Pada *scale up* sediaan dibuat sebanyak 150 g.

4.8 Uji Iritasi *Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane*

4.8.1 Persiapan Telur

18 Telur ayam betina yang telah dibuahi, disimpan di dalam inkubator dengan suhu 37 ºC ± 1 ºC. Pada hari keempat, telur disenter untuk melihat adanya embrio dalam telur, kemudian tetap dijaga dan diamati setiap hari sampai pada hari ke-10. Kontrol positif yang digunakan yaitu Sodium Lauril Sulfat (SLS) dan kontrol negatifnya adalah air.

4.8.2 Pelaksanaan Pengujian

Pada hari ke-10 telur yang sudah siap untuk pengujian dikeluarkan dari inkubator. Dibuka cangkang terluar telur yang sudah diolesi oleh NaCl 0.9% sebagai pelunak untuk memudahkan cangkang digunting. Setelah cangkang terbuka, larutan SLS ditambahkan ke cincin dalam setiap telur dan diamati selama 300 detik. Lalu ditambahkan air sebagai kontrol negatif ke cincin dalam setiap telur dan diamati juga selama 300 detik. Hal yang sama dilakukan pada sampel sebanyak 300 gram dan masing-masing kontrol dilakukan replikasi sebanyak 3 kali sebagai bentuk validasi yang akan diamati. Kerusakan yang terlihat pada CAM dapat berupa lisis, perdarahan dan atau pembekuan. Kemudian, telur yang sudah diamati tidak lupa dicatat hasilnya untuk dilakukan analisis.

4.8.3 Perhitungan Penilaian Tingkat Iritasi

Seluruh hasil pengujian kemudian dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\mathrm{T} = \frac{(301 - \mathrm{H})}{300} x\, 5 + \frac{(301 - \mathrm{L})}{300} x\, 7 + \frac{(301 - \mathrm{C})}{300} x\, 9$$

Dimana :

T = Skor iritasi

(H) Hemorrhage = waktu pertama terjadinya pendarahan (detik)

(L) Lysis = waktu pertama terjadinya lisis pada pembuluh (detik)

(C) Coagulation = waktu pertama terjadinya pembekuan pada protein (detik)

Hasil perhitungan kemudian dibandingkan dengan kriteria uji iritasi HET-CAM

Nilai pada HET-CAM	Kategori Iritasi
0 – 0,9	Tidak ada reaksi iritasi
1 – 4,9	Iritasi ringan
5 – 8,9 atau 5 – 9,9	Iritasi sedang
9 – 21 atau 10 - 21	Iritasi parah

Gambar 4. 2 Hubungan Nilai dengan Kategori Iritasi HET-CAM

4.8.4 Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada uji iritasi yang menggunakan metode HET-CAM mampu dilihat dengan parameter hemoragi, lisis dan koagulasi yang diamati secara visual dalam waktu pengamatan 300 detik. Pada hasil nilai uji iritasi pada masing-masing parameter dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji *Two-way Anova*. Perolehan data yang didapatkan dilakukan analisa statistik dengan derajat kepercayaan α = 0,05. Untuk mengetahui formula manakah yang terdapat perbedaan bermakna dilihat dari signifikan derajat kepercayaan.