

Kegiatan Tambahan Pengajuan Guru Besar

Ketua hibah penelitian tahun 2021 dengan judul :

Formulasi Salep Madu Kelulut dan Minyak Zaitun sebagai Sediaan Penyembuh Ulkus Diabetikum

No Kontrak : PD-379/SP3/LPPM-UAD/V/2021

Dokumen terlampir adalah kontrak penelitian dan laporan akhir penelitian.



SURAT PERJANJIAN PELAKSANAAN PENELITIAN

Nomor : PD-379/SP3/LPPM-UAD/V/2021

Pada hari ini, Selasa tanggal Dua Puluh Lima bulan Mei tahun Dua ribu dua puluh satu (25-05-2021), kami yang bertandatangan di bawah ini :

1. Nama : Anton Yudhana, S.T., M.T., Ph.D.
Jabatan : Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Ahmad Dahlan (LPPM UAD), selanjutnya disebut sebagai PIHAK PERTAMA.
2. Nama : Dr. apt. Nining Sugihartini, M.Si.
Jabatan : Dosen/Peneliti pada Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi (FFAR) Universitas Ahmad Dahlan (UAD), selaku Ketua Peneliti, selanjutnya disebut PIHAK KEDUA.

Kedua belah pihak menyatakan setuju dan mufakat untuk mengadakan perjanjian pelaksanaan penelitian untuk selanjutnya disebut Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian (SP3) dengan ketentuan dan syarat-syarat sebagai berikut.

Pasal 1
DASAR HUKUM

- (1) Hasil review/penilaian proposal yang dilakukan oleh Tim Reviewer Penelitian Internal UAD.
- (2) Surat Keputusan Kepala LPPM UAD Nomor: U12.3/316/V/2021 tanggal 29 Mei 2021 tentang Penetapan Hasil Seleksi Proposal Penelitian Dana UAD Tahun Akademik 2020/2021.

Pasal 2
RUANG LINGKUP DAN JANGKA WAKTU PENELITIAN

- (1) PIHAK PERTAMA memberikan pekerjaan kepada PIHAK KEDUA dan PIHAK KEDUA menyatakan menerima pekerjaan dari PIHAK PERTAMA berupa kegiatan penelitian sebagai berikut :
Skema : Penelitian Dasar
Judul penelitian : Formulasi Salep Madu Kelulut dan Minyak Zaitun sebagai Sediaan Penyembuh Ulkus Diabetikum
Jenis Riset : Dasar, TKT : 3
Luaran Wajib : Artikel di Jurnal Nasional Terakreditasi
- (2) Jangka waktu pelaksanaan penelitian tersebut pada ayat (1) dimulai sejak ditandatangani SP3 ini sampai dengan batas akhir unggah Laporan Akhir Penelitian pada tanggal 22 Desember 2021

Pasal 3
PERSONALIA PELAKSANA PENELITIAN

Personalia pelaksana penelitian ini terdiri dari :

- Ketua Peneliti : Dr. apt. Nining Sugihartini, M.Si.
Pembimbing : -
Anggota : 1. apt. Lina Widiyastuti, M.Sc.
2. apt. Yudha Rizky Nuari, M.Sc.

Pasal 4
BIAYA PENELITIAN DAN CARA PEMBAYARAN

(1) PIHAK PERTAMA menyediakan dana pelaksanaan penelitian kepada PIHAK KEDUA sejumlah Rp. 23.125.000,00 (Dua Puluh Tiga Juta Seratus Dua Puluh Lima Ribu Rupiah) yang dibebankan pada Anggaran Pendapatan dan Belanja (APB) LPPM UAD Tahun Akademik 2020/2021 dibayarkan melalui rekening bank atas nama Ketua Peneliti oleh Biro Keuangan dan Anggaran UAD sebagai berikut :

- Nama : Dr. apt. Nining Sugihartini, M.Si.
Nama Bank : BPD DIY SYARIAH
Nomor Rekening : 801211007380

- (2) Tahap I sebesar $70\% \times \text{Rp } 23.125.000,00 = \text{Rp } 16.187.500,00$ (enam belas juta seratus delapan puluh tujuh ribulima ratus Rupiah), dibayarkan setelah SP3 ini ditandatangani oleh PARA PIHAK dan PIHAK KEDUA telah mengunggah file kontrak SP3 ini pada portal Penelitian UAD.
- (3) Tahap II sebesar $30\% \times \text{Rp } 23.125.000,00 = \text{Rp } 6.937.500,00$ (enam juta sembilan ratus tiga puluh tujuh ribu lima ratus Rupiah), dibayarkan setelah (a) PIHAK KEDUA mengunggah Laporan Akhir Penelitian dan (b) luaran wajib penelitian dinyatakan tercapai.
- (4) Jika sampai pada batas akhir penelitian PIHAK KEDUA hanya dapat mengunggah Laporan Akhir Penelitian dan TIDAK DAPAT merealisasikan luaran wajib, maka dana penelitian Tahap II hanya dapat dicairkan sebesar 15%.

Pasal 5
PELAKSANAAN PEMBIMBINGAN

- (1) Khusus skema Penelitian Dosen Pemula (PDP), peneliti wajib melakukan pembimbingan atau konsultasi dengan dosen pembimbing penelitian paling sedikit 4 (empat) kali pembimbingan.
- (2) Pembimbingan sebagaimana dimaksud dalam ayat (1) antara lain dalam hal-hal berikut.
- a. penyusunan angket/kuesioner dan atau teknik pengumpulan data lainnya;
 - b. analisis data dan interpretasinya;
 - c. penyusunan hasil penelitian, pembahasan, penarikan kesimpulan;
 - d. penyusunan luaran penelitian.
- (3) Pembimbingan sebagaimana dimaksud dalam ayat (1) dan ayat (2) dituliskan sesuai dengan template form pembimbingan yang tersedia.

Pasal 6
JENIS LAPORAN PENELITIAN

- (1) PIHAK KEDUA wajib menyusun dan mengunggah laporan penelitian melalui portal Penelitian UAD yang terdiri atas :
 - a. Laporan Kemajuan
 - b. Laporan Akhir
- (2) Berkas Laporan Kemajuan digunakan sebagai bahan monitoring dan evaluasi (monev) internal, diunggah selambat-lambatnya tanggal 30 September 2021.
- (3) Berkas Laporan Akhir digunakan sebagai acuan pencairan dana Tahap II dan bahan pertimbangan berlanjut atau tidaknya kontrak penelitian tahun jamak (multi years), diunggah selambat-lambatnya tanggal 22 Desember 2021.

Pasal 7
LUARAN WAJIB PENELITIAN

- (1) PIHAK PERTAMA berkewajiban untuk merealisasikan luaran wajib penelitian sebagaimana yang dijanjikan dalam proposal.
- (2) Status minimal luaran wajib yang harus dicapai oleh PIHAK KEDUA adalah sebagai berikut. (i) accepted untuk jenis luaran artikel jurnal/seminar/konferensi, atau (ii) naik cetak untuk jenis luaran buku, atau (iii) diterima atau dibahas instansi pengguna untuk jenis luaran naskah akademik, atau (iv) telah terdaftar atau didaftarkan untuk jenis kekayaan intelektual (KI), atau (v) telah terwujud atau telah dilakukan uji laboratorium untuk jenis luaran purwarupa (prototipe), dan sejenisnya.

Pasal 8
MONITORING DAN EVALUASI

- (1) PIHAK PERTAMA berhak untuk melakukan monitoring dan evaluasi (monev) pelaksanaan penelitian, baik secara administrasi maupun substansi.
- (2) Pemantauan kemajuan penelitian dilakukan oleh Tim Monev yang dibentuk oleh PIHAK PERTAMA.
- (3) Monev internal dilakukan terhadap dokumen Laporan Kemajuan yang diunggah oleh PIHAK KEDUA.
- (4) PIHAK PERTAMA berhak untuk menentukan lanjut atau putusnya kontrak penelitian tahun jamak (multi years) berdasarkan hasil dari monev tahap II terhadap Laporan Akhir dan capaian luaran penelitian tahun berjalan yang diunggah PIHAK KEDUA.

Pasal 9
TANGGUNGAN PENELITIAN DAN LUARAN PENELITIAN

- (1) Peneliti dinyatakan memiliki tanggungan penelitian apabila sampai pada masa penerimaan proposal penelitian periode berikutnya belum menyelesaikan kewajiban unggah Laporan Akhir Penelitian.
- (2) Peneliti yang memiliki tanggungan penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) tidak diperkenankan mengajukan proposal penelitian pada periode tersebut.
- (3) Peneliti dinyatakan memiliki tanggungan luaran penelitian apabila sampai pada masa akhir unggah Laporan Akhir Penelitian, luaran wajib belum tercapai dengan status minimal seperti disebutkan pada Pasal 7 ayat (2).

- (4) Peneliti yang memiliki tanggungan luaran penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (3) masih diperkenankan mengajukan proposal penelitian pada periode terdekat.
- (5) Peneliti yang belum memenuhi luaran wajib sampai pada penerimaan proposal penelitian pada periode tahun berikutnya tidak diperkenankan mengajukan proposal pada periode tersebut.
- (6) Tanggungan penelitian dan/atau luaran wajib penelitian berlaku bagi Ketua dan Anggota peneliti dari Universitas Ahmad Dahlan.

Pasal 10

SANKSI DAN PEMUTUSAN PERJANJIAN PENELITIAN

- (1) PIHAK PERTAMA berhak memberikan peringatan dan atau teguran atas kelalaian dan atau pelanggaran yang dilakukan oleh PIHAK KEDUA yang mengakibatkan tidak dapat terpenuhinya kontrak penelitian ini.
- (2) PIHAK PERTAMA berhak melakukan pemutusan perjanjian penelitian, jika PIHAK KEDUA tidak mengindahkan peringatan yang diberikan oleh PIHAK PERTAMA.
- (3) Segala kerugian material maupun finansial yang disebabkan akibat kelalaian PIHAK KEDUA, maka sepenuhnya menjadi tanggungjawab PIHAK KEDUA.
- (4) Jenis sanksi yang diberikan dapat berupa :
 - (a) tidak diperkenankannya mengajukan proposal penelitian sebagaimana dimaksud pada Pasal 9 ayat (5) sampai kewajibannya terselesaikan; dan atau
 - (b) tidak dapat mencairkan dana Tahap II; dan atau
 - (c) mengembalikan dana yang telah diterima oleh PIHAK KEDUA.

Pasal 11

KEADAAN MEMAKSA (FORCE MAJEUR)

Ketentuan dalam Pasal 10 tersebut di atas tidak berlaku dalam keadaan sebagai berikut :

- a. Keadaan memaksa (force majeure)
- b. PIHAK PERTAMA menyetujui atas terjadinya keterlambatan yang didasarkan pada pemberitahuan sebelumnya oleh PIHAK KEDUA kepada PIHAK PERTAMA dengan Surat Pemberitahuan mengenai kemungkinan terjadinya keterlambatan dalam penyelesaian kegiatan penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2; dan sebaliknya PIHAK KEDUA menyetujui terjadinya keterlambatan pembayaran sebagai akibat keterlambatan dalam penyelesaian perjanjian penelitian.

Pasal 12

- (1) Keadaan memaksa (force majeure) sebagaimana yang dimaksud dalam Pasal 11 ayat (1) adalah peristiwa-peristiwa yang secara langsung mempengaruhi pelaksanaan perjanjian serta terjadi di luar kekuasaan dan kemampuan PIHAK KEDUA ataupun PIHAK PERTAMA.
- (2) Peristiwa yang tergolong dalam keadaan memaksa (force majeure) antara lain berupa bencana alam, pemogokan, wabah penyakit, huru-hara, pemberontakan, perang, waktu kerja diperpendek oleh pemerintah, kebakaran dan atau peraturan pemerintah mengenai keadaan bahaya serta hal-hal lainnya yang dipersamakan dengan itu, sehingga PIHAK KEDUA ataupun PIHAK PERTAMA terpaksa tidak dapat memenuhi kewajibannya.

- (3) Peristiwa sebagaimana dimaksud pada ayat (2) tersebut di atas, wajib dibenarkan oleh penguasa setempat dan diberitahukan dengan surat pemberitahuan oleh PIHAK KEDUA kepada PIHAK PERTAMA atau PIHAK PERTAMA kepada PIHAK KEDUA yang menyebutkan telah terjadinya peristiwa yang dikategorikan sebagai keadaan memaksa (force majeure).
- (4) PIHAK PERTAMA memberikan kesempatan kepada PIHAK KEDUA untuk menyelesaikan perjanjian kontrak ini sampai pada batas waktu yang disepakati oleh PARA PIHAK jika keadaan force majeure dinyatakan telah selesai.

Pasal 13

PENYELESAIAN PERSELISIHAN

- (1) Apabila dalam pelaksanaan perjanjian dan segala akibatnya timbul perbedaan pendapat atau perselisihan, PIHAK PERTAMA dan PIHAK KEDUA setuju untuk menyelesaikannya secara musyawarah untuk mencapai mufakat.
- (2) Apabila penyelesaian sebagaimana termaksud dalam ayat (1) di atas tidak tercapai, maka PIHAK PERTAMA dan PIHAK KEDUA sepakat menyerahkan perselisihan tersebut melalui mediasi dengan Rektor sebagai atasan langsung dari PIHAK PERTAMA yang putusannya bersifat final dan mengikat.

Pasal 14

PENGUNDURAN DIRI

- (1) Apabila PIHAK KEDUA mengundurkan diri atau membatalkan SP3 ini, maka PIHAK KEDUA wajib mengajukan Surat Pengunduran Diri yang ditujukan kepada PIHAK PERTAMA.
- (2) Surat Pengunduran Diri sebagaimana dimaksud pada ayat (1) wajib disahkan oleh dekan fakultas ketua peneliti yang bersangkutan.
- (3) PIHAK KEDUA wajib mengembalikan dana yang telah diterima kepada PIHAK PERTAMA

Pasal 15

LAIN-LAIN

- (1) Hal-hal yang dianggap belum cukup dan perubahan-perubahan perjanjian akan diatur kemudian atas dasar permufakatan kedua belah pihak yang akan dituangkan dalam bentuk Surat atau Perjanjian Tambahan (addendum), yang merupakan satu kesatuan dan bagian yang tidak terpisahkan dari perjanjian awal.
- (2) Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian (SP3) ini berlaku sejak ditandatangani dan disetujui oleh PARA PIHAK.

PIHAK PERTAMA,



Anton Yudhana

Anton Yudhana, S.T., M.T., Ph.D.
NIP/NIY. 60010383

PIHAK KEDUA,



Dr. apt. Nining Sugihartini M.Si.
NIP/NIY. 60990198

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Ringkasan penelitian berisi: (i) latar belakang penelitian, (ii) tujuan penelitian, (iii) tahapan metode penelitian, (iv) luaran yang ditargetkan, (v) uraian TKT penelitian yang ditargetkan serta (vi) hasil penelitian yang diperoleh sesuai dengan tahun pelaksanaan penelitian.

RINGKASAN

Ulkus Diabetes merupakan komplikasi umum dari Diabetes Mellitus yang meningkatkan resiko morbiditas dan mortalitas, serta besarnya biaya perawatan kesehatan. Madu kelulut dan minyak zaitun telah sejak lama digunakan pada perawatan berbagai jenis luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komposisi madu kelulut dan minyak zaitun yang optimum dalam formula salep untuk luka diabetes.

Penelitian ini dibagi atas 3 tahap penelitian. Pertama adalah tahap orientasi kadar bahan aktif berupa madu kelulut dan minyak zaitun (1:1) di dalam salep dengan menggunakan parameter pH dan viskositas. Kadar bahan aktif yang diuji adalah 5%, 10%, 15%, 20%, 25% dan 30%. Kedua adalah tahap optimasi formula salep dengan dasar kadar bahan aktif dari hasil tahap pertama dengan menggunakan metode *Simplex lattice design*. Berdasarkan metode tersebut maka diperoleh 8 variasi komposisi madu kelulut dan minyak zaitun. Sediaan dengan variasi komposisi tersebut selanjutnya diuji dengan parameter uji sebagaimana tahap pertama ditambah dengan parameter daya hambat bakteri menggunakan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Tahap ketiga yaitu uji daya penyembuhan luka salep formula optimum pada luka sayatan mencit putih jantan Balb/c diabetes.

Luaran yang ditargetkan dari penelitian ini adalah artikel yang dipublikasikan di Jurnal *Pharmaceutical Science Research*. Pada penelitian ini masuk pada tahapan uji pembuktian bahwa campuran kedua bahan aktif akan memberikan aktivitas yang lebih baik sehingga masuk kategori TKT 3.

Hasil uji menunjukkan bahwa kadar bahan aktif dalam sediaan sebesar 20% yang paling optimal. Pada tahap kedua diperoleh formula optimum terverifikasi dengan komposisi madu kelulut dan minyak zaitun dalam formula masing-masing 0,586 dan 0,414. Hasil uji tahap ketiga menunjukkan bahwa potensi daya penyembuhan luka salep formula optimum pada mencit diabetes lebih baik dibandingkan salep antibiotik gentamycin ($p > 0,05$).

.....
.....

Kata kunci maksimal 5 kata kunci. Gunakan tanda baca titik koma (;) sebagai pemisah dan ditulis sesuai urutan abjad.

Optimasi; madu kelulut; minyak zaitun; salep hidrofilik; ulkus diabetes;

Hasil pelaksanaan penelitian berisi: (i) kemajuan pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian, (ii) data yang diperoleh, (iii) hasil analisis data yang telah dilakukan, (iv) pembahasan hasil penelitian, serta (v) luaran yang telah didapatkan. Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. **Penyajian data** dan **hasil penelitian** dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta **pembahasan hasil penelitian** didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN

A. Tahap Orientasi Kadar Bahan Aktif

Tahapan pada penelitian ini diawali terlebih dahulu dengan melaksanakan orientasi kadar bahan aktif madu kelulut dan minyak zaitun di dalam sediaan salep. Tahap ini perlu dilakukan untuk mengetahui kadar bahan aktif dalam salep yang dapat diterima dengan baik oleh basis salep sebagai acuan untuk tahap optimasi formula. Sediaan salep dengan 6 kadar bahan aktif disiapkan masing – masing sesuai komposisi yang tertera pada tabel I.

Tabel I. Komposisi formula optimasi kadar bahan aktif

Nama Bahan	Total Kadar Bahan Aktif					
	5%	10%	15%	20%	25%	30%
Madu kelulut	2,5	5	7,5	10	12,5	15
Minyak zaitun	2,5	5	7,5	10	12,5	15
Dasar salep hidrofilik	95	90	85	80	75	70
Prosentase akhir sediaan	100	100	100	100	100	100

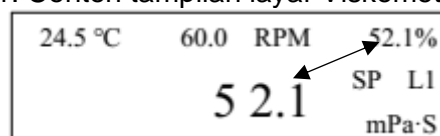
Penambahan TEA 0,4% pada basis salep dibutuhkan karena pada uji pendahuluan diperoleh nilai pH untuk semua variasi kadar bahan aktif memiliki gambaran yang kurang dari 4,5 (asam) sehingga penambahan TEA sebagai *alkalizing agent* bertujuan untuk menaikkan nilai pH sediaan agar menjadi lebih basa (Sehro; Luliana, 2015). Kondisi sediaan salep pada uji pendahuluan yang cenderung asam diduga kuat berasal dari pengaruh madu kelulut yang memiliki nilai pH pada rentang 3,15 – 4,66 (Aina et al., 2018). Setelah penambahan TEA 0,4% pada tiap kadar maka nilai pH berhasil meningkat ke arah basa.

Pada saat proses pembuatan sediaan salep didapati bahwa hanya 5 dari 6 kadar yang berhasil membentuk massa salep yaitu 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% sedangkan kadar 30% tidak terbentuk. Kondisi ini diduga karena pada kadar 30% kemampuan basis salep untuk mengemulsikan fase air dan fase minyak sudah tidak memadai lagi. Pada kadar bahan aktif 25%, penulis mendapatkan kesulitan yang berarti dalam upaya membentuk massa salep jika dibandingkan dengan pembuatan salep dengan 4 kadar lain di bawahnya, pada kadar ini diperlukan waktu yang jauh lebih lama untuk dapat membentuk massa salep.

Lima kadar bahan aktif yang berhasil membentuk massa salep diukur 2 parameter sifat fisiknya, yaitu derajat keasaman (pH) dan viskositas. Pada parameter pH, suhu pengukuran yang digunakan adalah pada saat suhu larutan massa salep dalam air mencapai 40°C. Suhu ini dipilih untuk mendekati suhu tubuh normal manusia (36-37°C) namun tetap memungkinkan untuk diukur, karena pada suhu lebih rendah larutan massa salep dalam air kembali memadat sehingga dikhawatirkan berpengaruh pada keakuratan pengukuran oleh pH meter.

Pada pengukuran viskositas, digunakan alat Viskometer NDJ-5S. Pengukuran dilaksanakan di dalam ruangan laboratorium berpengatur suhu otomatis (*air conditioner*) dengan suhu 25°C Merujuk pada *Manual Book* Viskometer NDJ-5S bahwa untuk menentukan ukuran *spindle* dan kecepatan putaran rotor yang akan digunakan terlebih dahulu diorientasi pada sediaan yang akan diukur untuk tiap ukuran *spindle* mulai dari nomor 1 sampai nomor 4 dengan kecepatan rotor mulai dari 6 rpm, 12 rpm, 30 rpm dan 60 rpm (Anonim, n.d.). *Spindle* dan kecepatan putaran rotor yang dipilih adalah yang menunjukkan nilai prosentase berkesesuaian dengan nilai viskositas (mPa.s) sebagaimana yang ditunjukkan oleh garis pada contoh tampilan layar alat di gambar 1.

Gambar 1. Contoh tampilan layar Viskometer NDJ-5S



Pada penelitian didapatkan bahwa nomor *spindle* dan kecepatan rotor yang mampu memberikan nilai prosentase berkesesuaian dengan nilai viskositas adalah pada *spindle* no 4 dengan kecepatan rotor 6 rpm. Hasil pengukuran pH dan viskositas pada 5 kadar orientasi tersajikan pada tabel II berikut:

Tabel II. Data evaluasi sifat fisik kadar orientasi

Kadar Orientasi (%)	Parameter	
	pH	Viskositas (mPa.s)
5	8,17±0,06	68.100,00±2.892
10	7,47±0,06	55.042,86±2.630
15	7,10±0,10	41.271,43±2.103
20	6,20±0,10	26.500,00±2.941
25	5,83±0,06	13.274,00±2.170

Data evaluasi sifat fisik pada tabel II selanjutnya dibandingkan dengan nilai parameter standar untuk sediaan salep yaitu untuk pH adalah antara 4,5 – 6,5 dan untuk viskositas adalah antara 2.000 – 50.000 mPa.S (Anonim, 1996). Setelah dibandingkan dengan nilai parameter standar diketahui bahwa untuk nilai rerata pH yang memenuhi standar adalah pada kadar 20% dan 25% sedangkan untuk nilai rerata viskositas yang memenuhi standar adalah pada kadar 15%, 20% dan 25%. Dari data tersebut dapat kita lihat bahwa terdapat 2 kadar bahan aktif yang mampu mengakomodir kedua nilai parameter standar untuk sediaan salep yaitu kadar bahan aktif 20% dan 25%. Namun dikarenakan pada kadar 25% proses pembentukan massa salep relatif lebih sulit, membutuhkan pengadukan konstan dalam waktu yang jauh lebih lama dibandingkan pada pembuatan massa salep dengan kadar bahan aktif 20% sehingga dikhawatirkan pada tahap optimasi nanti, jarak ruang variasi komposisi tidak cukup tersedia untuk tetap dapat membentuk massa salep. Atas dasar hal tersebut maka penulis menetapkan bahwa kadar 20% yang dipilih untuk dijadikan acuan pada tahap optimasi formula salep berikutnya.

B. Tahap Optimasi Formula Salep

Setelah diperoleh kadar orientasi, penelitian dilanjutkan untuk mengetahui formula optimum dari sediaan salep untuk luka diabetes. Pada tahapan ini metode *Simplex Lattice Design* dipilih sebagai metode optimasi. Dengan menggunakan aplikasi *Design Expert® 13*, dibuat rancangan formula dengan batas atas (*upper limit*) 0,8 dan batas bawah (*lower limit*) 0,2 dihasilkan 8 *run* formula percobaan seperti disajikan pada tabel III.

Tabel III. Formula rancangan *Design Expert® 13*

Formula	Komposisi (bagian)	
	Madu Kelulut	Minyak Zaitun
R1	0,8	0,2
R2	0,65	0,35
R3	0,5	0,5
R4	0,5	0,5
R5	0,35	0,65
R6	0,2	0,8
R7	0,8	0,2
R8	0,2	0,8

Berdasarkan tabel III dilanjutkan perhitungan bahan baku untuk salep dan diperoleh hasil seperti disajikan pada tabel IV dan V.

Tabel IV. Perhitungan bahan baku salep

Formula	Komposisi (gram)			
	Madu Kelulut	Minyak Zaitun	Dasar Salep	Total Bahan
R1	16	4	80	100
R2	13	7	80	100
R3	10	10	80	100
R4	10	10	80	100
R5	7	13	80	100
R6	4	16	80	100
R7	16	4	80	100
R8	4	16	80	100

Tabel V. Komposisi Basis salep hidrofilik formula optimasi

Nama Bahan	Gram
Metil paraben	0,020
Propil paraben	0,012
Na-lauril sulfat	0,800
Propilen glikol	9,600
Stearil alkohol	20,000
Vaselin album	20,000
TEA	0,320
Aquadest	29,280
Untuk membuat basis salep	80,032

Berdasarkan data pada tabel V dan VI, salep formula rancangan disiapkan sebagaimana cara penyiapan pada tahap orientasi. Setelah semua salep siap selanjutnya dilaksanakan pengujian meliputi pengukuran pH dan viskositas ditambah dengan uji daya hambat bakteri. Pada uji daya hambat bakteri digunakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Bakteri ini dipilih sebagai model karena bakteri jenis ini yang lazim terdapat pada luka diabetes dan dominan jumlahnya (Nur & Marissa, 2016). Hasil pengukuran pH, viskositas dan daya hambat bakteri tersaji pada tabel VI.

Tabel VI. Hasil pengukuran pH, viskositas dan daya hambat bakteri

Formula	pH	Viskositas (mPa.S)	Daya Hambat (mm)
R1	5,63 ± 0,15	10.995,24 ± 842	11,12 ± 0,62
R2	5,50 ± 0,10	27.928,57 ± 622	14,99 ± 0,65
R3	6,30 ± 0,10	24.761,90 ± 343	13,85 ± 0,75
R4	6,17 ± 0,06	24.814,29 ± 598	13,55 ± 0,37
R5	7,03 ± 0,06	28.123,81 ± 624	13,64 ± 0,71
R6	7,90 ± 0,00	19.019,05 ± 200	15,16 ± 0,44
R7	5,60 ± 0,10	11.242,86 ± 679	10,92 ± 0,73
R8	7,47 ± 0,06	19.300,00 ± 324	13,25 ± 0,21

Data tersebut selanjutnya dimasukkan kedalam aplikasi *Design Expert® 13* untuk dianalisa seperti tampak pada gambar 1.

Gambar 1. Input data hasil uji pada aplikasi *Design Expert*® 13

Std	Run	Component 1 A:Madu Kelulut	Component 2 B:Minyak Zaitun	Response 1 pH	Response 2 Viskositas	Response 3 Zona hambat bakteri
1	1	0.8	0.2	5.6	10995.2	11.12
4	2	0.65	0.35	5.5	27928.6	14.99
8	3	0.5	0.5	6.3	24761.9	13.85
3	4	0.5	0.5	6.2	24814.3	13.55
5	5	0.35	0.65	7	28123.8	13.64
2	6	0.2	0.8	7.9	19019	15.16
6	7	0.8	0.2	5.6	11242.9	10.92
7	8	0.2	0.8	7.5	19300	13.25

Berikutnya data yang telah dimasukkan ke dalam tabel di proses untuk dianalisa.

Gambar 2. Tampilan jendela optimasi pada aplikasi *Design Expert*® 13

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
A:Madu Kelulut	is in range	0.2	0.8	1	1	3
B:Minyak Zaitun	is in range	0.2	0.8	1	1	3
pH	is in range	4.5	6.5	1	1	4
Viskositas	is in range	2000	50000	1	1	3
Zona hambat bakteri	maximize	10	20	1	1	3

Number	Madu Kelulut	Minyak Zaitun	pH	Viskositas	Zona hambat bakteri	Desirability	Desirability (w/o intervals)
1	0.586	0.414	5.924	25443.633	14.575	0.762	0.791 Selected

Pada Gambar.2 dapat dilihat bahwa target capaian (*goal*) pada nilai pH dan viskositas berupa nilai *range* yaitu untuk pH pada 4,5 – 6,5 dengan derajat kepentingan 4+ dan viskositas pada 2.000 – 50.000 mPa.S dengan derajat kepentingan 3+. Sedangkan target capaian pada zona hambat bakteri adalah semaksimal mungkin (*maximized*), dengan batas terkecil 10 mm dan batas terbesar 20 mm dengan derajat kepentingan 3+. Setelah pengaturan target capaian selesai, data di proses oleh aplikasi dan memberikan 1 solusi yaitu suatu formula dengan komposisi Madu kelulut 0,586 bagian, dan Minyak zaitun 0,414 bagian. Formula tersebut diharapkan akan menghasilkan suatu salep dengan nilai pH 5,924, viskositas 25.443,6 mPa.s dan daya hambat bakteri sebesar 14,575mm dengan kemungkinan untuk terpenuhinya (*desirability*) target – target tersebut adalah sebesar 0,762.

Komposisi Madu kelulut dan Minyak zaitun yang diperoleh kemudian disiapkan berdasarkan hasil perhitungan pada tabel VII dan diverifikasi.

Tabel VII. Perhitungan bahan baku salep formula optimum

Nama Bahan	Gram
Madu kelulut	11,72
Minyak zaitun	8,28
Metil paraben	0,020
Propil paraben	0,012
Na-lauril sulfat	0,800
Propilen glikol	9,600
Stearil alkohol	20,000
Vaselin album	20,000
TEA	0,320
Aquadest	29,280
Untuk membuat salep	100,032

Kemudian salep optimum disiapkan dan diukur nilai pH, viskositas dan daya hambat bakterinya. Hasil verifikasi dan analisa *one sample t-test* sebagaimana tercantum pada tabel VIII.

Tabel VIII. Hasil verifikasi formula optimum

Keterangan	pH	Viskositas	Daya hambat
Target	5,9	25.443,6 mPa.s	14,575 mm
Verifikasi	5,6 ± 0,15	27.704,8 ± 1.759	14,13 mm ± 0,49
Sig.(2-tailed)	0,094	0,156	0,161

Dari data pada tabel VIII tersebut dapat diketahui bahwa semua parameter yang diverifikasi memenuhi parameter standar sediaan salep topikal dengan daya hambat bakteri yang memadai dan hasil uji *one sample t-test* pada data hasil verifikasi parameter pH, viskositas dan daya hambat bakteri terhadap target memiliki Sig.(2-tailed) > 0.05 yaitu masing-masing 0,094; 0,156 dan 0,161 yang ini berarti bermakna bahwa formula yang diusulkan tidak berbeda signifikan dengan target (memenuhi target) nilai verifikasi sehingga solusi yang diusulkan oleh aplikasi *design Expert® 13* dapat diterima sebagai formula optimum.

C. Tahap Uji Daya Penyembuhan Luka Diabetes

Setelah diperoleh formula salep optimum, penelitian dilanjutkan ke tahap uji untuk mengetahui potensi farmakologi salep tersebut secara *in vivo*. Uji ini penting untuk dilakukan sebagai gambaran/model efektifitas salep formula optimum dalam membantu penyembuhan ulkus diabetes. Hewan uji yang dipilih pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) albino jantan galur BALB/c. Hewan ini dipilih selain karena struktur anatomi dan fisiologinya yang mempunyai kemiripan dengan struktur anatomi dan fisiologi manusia (Nugroho, 2018), mencit juga memiliki keunggulan lain diantaranya yaitu siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi dan mudah dalam penanganannya (Hasanah et al., 2015).

Pada penelitian ini penulis mengikuti metode induksi diabetes tipe 1 (T1DM) pada mencit dengan dosis streptozocin dosis rendah karena protokol ini memberikan respon yang cenderung lebih mirip T1DM dalam patogenesis dan perubahan morfologis dibanding protokol STZ dosis tinggi tunggal (Furman, 2015). Oleh karena adanya pengaruh yang berarti dari jenis kelamin mencit terhadap perkembangan kondisi diabetes maka mencit jantan dipilih karena pada mencit betina cenderung lebih resisten terhadap induksi STZ dosis rendah (Kolb, 1987).

Jumlah replikasi hewan uji yang digunakan diperhitungkan dengan seksama agar memenuhi kaidah *Reduction* yang ada pada prinsip 3R dalam penggunaan hewan pada penelitian (Yurista et al., 2016). Dari hasil perhitungan rumus Federer diketahui bahwa dengan 4 kelompok perlakuan jumlah replikasi yang dibutuhkan adalah 6 ekor mencit

untuk tiap kelompoknya, sehingga untuk 4 kelompok perlakuan total dibutuhkan 24 ekor mencit dengan pengelompokan mencit dilakukan secara acak.. Jumlah tersebut kemudian diverifikasi menggunakan rumus *resource equation metode* dan diketahui bahwa dengan jumlah 6 replikasi/kelompok ini sudah memadai karena total replikasi (24) sudah menghasilkan nilai hitung E sebesar 20 yang merupakan batas atas untuk efektifitas jumlah sampel agar dapat memberikan hasil analisis ANOVA yang signifikan. Metode ini ditambahkan dalam perhitungan karena penulis tidak dapat menemukan asumsi tentang besaran pengaruh penelitian ini, standar deviasi juga tidak tersedia karena tidak ada penelitian sebelumnya dan juga belum diketahui titik akhir dari penelitian yang dilakukan. Setelah 5 hari adaptasi, sebelum diinduksi mencit terlebih dahulu ditimbang kembali berat badannya untuk dibandingkan dengan berat badan awal saat mau masuk tahap adaptasi dan diukur glukosa darah puasanya dan diukur kembali setelah selesai tahapan induksi berikutnya. Data berat badan dan gula darah puasa awal dan data berat badan dan gula darah puasa pada akhir induksi disajikan pada tabel IX.

Tabel IX. Data BB dan Gula Darah Puasa awal dan akhir periode induksi

Kel.	No. Urut	BB ₀	BB _{Pra}	Prosentase Perubahan BB	GDP Pra (mg/dL)	GDP Pasca (mg/dL)	Kategori DM
Kontrol Negatif	1.1	33,27	30,89	-7,15%	133	240	Diabetes Ringan
	1.2	32,42	31,67	-2,31%	142	283	Diabetes Ringan
	1.3	34,59	36,43	5,32%	189*	443	Diabetes Berat
	1.4	33,29	32,74	-1,65%	121	283	Diabetes Ringan
	1.5	35,17	35,96	2,25%	140	362*	Diabetes Berat
	1.6	32,27	30,24	-6,29%	123	249	Diabetes Ringan
Salep Formula Optimum	2.1	32,83	31,78	-3,20%	127	284	Diabetes Ringan
	2.2	36,99	35,53	-3,95%	133	285	Diabetes Ringan
	2.3	39,41	38,74	-1,70%	127	248	Diabetes Ringan
	2.4	33,48	35,01	4,57%	101	336*	Diabetes Berat
	2.5	33,62	31,43	-6,51%	111	266	Diabetes Ringan
	2.6	35,27	33,88	-3,94%	124	394*	Diabetes Berat
Kontrol Positif	3.1	37,71	38,97	3,34%	158*	231	Diabetes Ringan
	3.2	35,79	34,89	-2,51%	165*	306*	Diabetes Berat
	3.3	34,30	32,91	-4,05%	163*	279	Diabetes Ringan
	3.4	39,28	36,94	-5,96%	130	340*	Diabetes Berat
	3.5	34,47	35,31	2,44%	151*	304*	Diabetes Berat
	3.6	33,92	33,07	-2,51%	196*	225	Diabetes Berat
Normal	N.1	38,08	37,78	-0,79%	131	123	Non Diabetes
	N.2	33,98	33,56	-1,24%	162*	144	Non Diabetes
	N.3	32,22	34,22	6,21%	109	101	Non Diabetes
	N.4	38,73	37,72	-2,61%	142	125	Non Diabetes
	N.5	39,52	37,77	-4,43%	126	99	Non Diabetes
	N.6	34,49	36,79	6,67%	104	113	Non Diabetes

Dari tabel terlihat bahwa terdapat 17 mencit yang mengalami penurunan BB (prosentase negatif) dan 7 mencit yang mengalami peningkatan BB (prosentase positif). Dengan melihat besaran perubahan berat badan (BB) dapat disimpulkan bahwa seluruh mencit memenuhi kriteria untuk dimasukkan sebagai mencit yang akan diinduksi karena perubahan BB mencit tidak ada yang melebihi dari $\pm 10\%$. Secara statistik, data BB Pra Induksi terbukti bersifat homogen karena hasil analisa aplikasi IBM SPSS version 26 menunjukkan bahwa signifikansinya lebih besar dari 0,05 yaitu 0,868; 0,883; 0,883 dan 0,865.

Dari sisi kadar gula darah puasa (GDP), untuk GDP pra-induksi nampak terlihat ada 7 mencit yang mengalami GDP >150 mg/dL. Namun hal ini tidak menunjukkan bahwa mencit pra induksi ada yang telah mengalami kondisi diabetes, karena setelah ditelusuri bahwa pakan mencit ternyata masih banyak tersisa pada bagian alas kandang mencit tersamarkan dengan warna dan bentuk dari sekam padi, sehingga nampaknya kondisi pengukuran GDP tidak terwujud justru yang tergambar adalah kondisi gula darah sewaktu atau setidaknya adalah gambaran kadar gula darah 2 jam setelah makan, sehingga wajar jika kadar gula darah plasma lebih dari 150 mg/dL namun masih kurang dari 200 mg/dL (Association, 2010).

Pada data kadar GDP pasca induksi nampak terlihat bahwa semua mencit yang diinduksi yang berasal dari kelompok perlakuan kontrol negatif, salep formula optimum dan kelompok kontrol positif menunjukkan kondisi diabetes dengan 19 mencit masuk kategori diabetes ringan dan 5 mencit masuk diabetes berat. Ini menunjukkan bahwa proses induksi STZ dosis rendah berhasil menginduksi kondisi diabetes pada hewan uji. Dengan jumlah mencit yang mengalami kematian hanya 1 ekor, ini memberikan gambaran bahwa tingkat kematian (MR) dengan metode ini sangat rendah yaitu hanya 3,57%. Atas capaian tersebut, metode ini dapat direkomendasikan untuk diterapkan pada penelitian berikutnya yang sejenis.

Dikarenakan data BB bersifat homogen maka untuk memudahkan proses induksi dan pembiusan pada tahap perlakuan dapat digunakan dosis yang sama baik untuk STZ maupun Pehacain® injeksi. Dihitung rerata BB mencit, diperoleh 34,76 g dan selanjutnya digunakan untuk menghitung dosis STZ untuk induksi yaitu 34,76 g dikali 40 mg/Kg BB sehingga diperoleh dosis yang dibutuhkan untuk 1 kali induksi tiap mencit adalah 1,39 mg. Untuk membuat larutan STZ yang dibutuhkan untuk tiap induksi dilarutkan 33,36 mg STZ dalam larutan buffer sitrat pH 4,5. Untuk dosis Pehacain® injeksi (dihitung sebagai Lidokain) karena faktor konversi dosis dari manusia ke mencit dengan BB 20 g adalah 0,0026 (Stevani, 2016) maka untuk mencit dengan rerata BB 34,76 g faktor konversi menjadi 0,0045 sehingga dosis Pehacain® injeksi yang dibutuhkan untuk tiap mencitnya adalah $0,0045 \times 20 \text{ mg} = 0,09 \text{ mg}$ dan karena untuk setiap cc Pehacain® injeksi mengandung 20mg Lidokain maka injeksi yang diperlukan untuk tiap mencit adalah 0,0045 cc dan karena jumlah ini secara teknis tidak memungkinkan untuk dikelola dengan spuit 1 cc sehingga Pehacain® injeksi harus diencerkan (menggunakan *aquapro injection*) terlebih dahulu dengan pengenceran bertingkat sebanyak 2 kali (perhitungan terlampir) hingga diperoleh kadar Lidokain 0,1 mg/cc maka untuk setiap mencit dibutuhkan 0,9 cc Pehacain® injeksi yang telah diencerkan tersebut.

Pada proses perlakuan, penulis mengalami sedikit kesulitan pada saat menyayat kulit mencit dikarenakan kondisi mencit yang hanya dibius lokal (sadar) nampak gelisah dan terus bergerak. Kesulitan tersebut mengakibatkan ukuran panjang sayatan bervariasi pada tiap mencit antara 10,5mm untuk yang terpendek dan 15mm untuk yang terpanjang. Untuk pemberian perlakuan, tiap kelompok dilakukan 2 kali sehari yakni pada jam 08:00 dan 16:00 WITA. Hal ini sebagai permodelan penggunaan pada manusia yakni cukup 2 kali sehari saja. Selengkapannya data ukuran luka dan perkembangannya dapat terlihat pada tabel X.

Tabel X. Data Perkembangan sembuh luka

Kelompok Perlakuan	Kode No.	Hari Ke						Prosentase Penyembuhan di hari ke-11
		0	3	5	7	9	11	%
Kontrol Negatif	1.1	14,20	11,40	10,00	9,70	8,40	8,10	42,96
	1.2	13,70	12,20	11,60	9,60	7,00	5,50	62,77
	1.3	14,00	10,40	7,80	7,40	7,20	7,00	50,00
	1.4	15,00	14,50	12,60	11,80	10,70	8,70	42,00
	1.5	12,20	11,10	8,80	8,00	6,90	7,30	40,16
	1.6	10,50	10,50	9,20	8,70	7,20	5,00	52,38
Salep Formula Optimum	2.1	12,40	11,20	8,10	7,50	4,90	2,40	80,65
	2.2	14,80	14,00	8,90	5,40	3,30	2,40	83,78
	2.3	12,00	10,80	7,80	6,90	4,30	0,00	100,00
	2.4	14,80	11,60	4,50	2,60	1,80	0,00	100,00
	2.5	11,20	8,50	5,80	4,70	1,90	1,00	91,07
	2.6	11,70	10,30	6,50	5,20	5,00	3,50	70,09
Kontrol Positif	3.1	12,50	11,70	8,30	7,90	6,30	4,20	66,40
	3.2	12,50	11,70	8,30	6,10	5,40	1,60	87,20
	3.3	13,20	11,50	10,90	8,90	5,90	3,60	72,73
	3.4	11,50	10,80	7,70	7,20	4,70	0,00	100,00
	3.5	12,10	11,00	7,90	7,20	4,40	1,30	89,26
	3.6	14,20	12,50	10,90	8,00	5,10	4,20	70,42
Normal	N.1	14,90	13,90	10,50	8,50	5,20	4,20	71,81
	N.2	14,90	13,70	10,40	7,70	4,60	3,10	79,19
	N.3	14,50	12,50	9,60	7,30	5,10	3,40	76,55
	N.4	14,00	12,60	9,80	9,80	5,80	2,90	79,29
	N.5	14,80	13,90	10,50	7,90	5,70	4,70	68,24
	N.6	14,40	13,60	11,60	11,40	7,10	4,10	71,53

Penelitian dihentikan pada saat mulai ada prosentase penyembuhan luka 100% agar data yang ada dapat dikomparasi. Prosentase penyembuhan luka pertama kali terjadi pada hari ke 11 di kelompok perlakuan yang diberi salep formula optimum (2 mencit) dan kelompok perlakuan kontrol positif (1 mencit).

Berdasarkan hasil uji statistik yang dilakukan terhadap data tersebut yang meliputi uji *One Way ANOVA* ditunjukkan perbedaan bermakna ($sign < 0,05$) terhadap prosentase penyembuhan luka antar kelompok perlakuan. Sedangkan pada uji *post hoc test* berupa uji *Least Significant Difference (LSD)* ditunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara prosentase penyembuhan luka kelompok kontrol negatif dengan semua kelompok perlakuan lainnya, antara kelompok salep formula optimum dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok normal non diabetes, antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif, antara kelompok normal non diabetes dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok salep formula optimum. Ini berarti mengkonfirmasi bahwa salep formula optimum terbukti lebih baik dalam membantu proses penyembuhan luka diabetes dibanding dengan kontrol positif.

Kemampuan madu kelulut dalam membantu penyembuhan luka termasuk luka diabetes setidaknya bersumber dari 3 potensi yang dimilikinya. Potensi pertama adalah kemampuan sebagai antioksidan (Abd Jalil et al., 2017). Potensi ini sangat berpengaruh pada proses penyembuhan luka diabetes karena pada penderita hiperglikemia dapat memicu kondisi stress oksidatif (Aumiller & Dollahite, 2015) sehingga dengan adanya kandungan *protocatechuic acid (PCA)* dan *4-hydroxyphenylacetic acid* pada madu kelulut dapat menangkal stress oksidatif tersebut dan pada akhirnya akan meningkatkan proses proliferasi sel dalam proses penyembuhan luka (Kakkar & Bais, 2014). Potensi kedua yang dimiliki madu kelulut adalah sebagai antimikroba. Pada penelitian Nishio et al., 2016 diungkapkan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) 2 jenis madu kelulut pada 16 strain bakteri diantaranya *S. aureus* yang merupakan bakteri umum dan dominan pada luka diabetes. Berkesesuaian dengan penelitian ini yang mendapatkan zona hambat madu kelulut yang mencapai 14,13 mm, ini memberikan gambaran positif akan penggunaannya dalam melawan kondisi infeksi pada luka diabetes. Potensi berikutnya adalah sebagai

agen anti inflamasi. Kemampuan penghambatan madu kelulut pada sitokin pro-inflamasi TNF- α , IL-6, IL-12p70 dan INF- γ memegang peranan penting dalam hal ini (Biluca et al., 2019).

Selain madu kelulut, bahan aktif minyak zaitun dalam salep formula optimum pada penelitian ini juga memiliki potensi farmakologi yang luar biasa. Diketahui bahwa minyak zaitun terdiri dari 98% trigliserida, termasuk asam oleat tak jenuh tunggal yang mendominasi, yang memiliki sifat anti-inflamasi dan telah terbukti penting, karena sifat tersebut mirip dengan ibuprofen (sebagai antiinflamasi kimia sintetis), dan ini dapat mempercepat proses penyembuhan ulkus. Selanjutnya, karena konsentrasi polifenol dalam minyak zaitun yang tinggi dan bersifat sebagai antioksidan alami, maka aplikasinya mampu mengurangi proses inflamasi dan meningkatkan aliran darah, sehingga juga membantu mempercepat proses penyembuhan ulkus.

Dengan mengetahui potensi-potensi kedua bahan aktif dan ditambah data-data hasil penelitian ini maka dapat penulis konfirmasi bahwa kemampuan salep formula optimum dalam menyembuhkan luka pada mencit diabetes dapat dijadikan bahan pertimbangan untuk digunakan pada terapi penyembuhan luka diabetes pada manusia.

.....
.....

Status luaran berisi **identitas** dan **status ketercapaian setiap luaran wajib** dan **luaran tambahan** (jika ada) yang dijanjikan. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan **bukti kemajuan** ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan serta **lampirkan bukti dokumen** ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan.

STATUS LUARAN

Luaran sampai laporan akhir ini diunggah adalah draft artikel yang akan di submit pada Pharmaceutical Science Research

.....
.....

Peran Mitra berupa **realisasi kerjasama** dan **kontribusi Mitra** baik *in-kind* maupun *in-cash* (untuk Penelitian Terapan dan Pengembangan). **Bukti pendukung** realisasi kerjasama dan realisasi kontribusi mitra **dilaporkan** sesuai dengan kondisi yang sebenarnya. **Lampirkan bukti dokumen** realisasi kerjasama dengan Mitra.

PERAN MITRA

Tidak ada mitra

.....
.....

Kendala Pelaksanaan Penelitian berisi **kesulitan** atau **hambatan** yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan, termasuk **penjelasan jika** pelaksanaan penelitian dan luaran penelitian **tidak sesuai** dengan yang direncanakan atau dijanjikan.

KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN

Adanya pandemic sehingga ada kemunduran pelaksanaan

.....
.....

Rencana Tindak Lanjut Penelitian berisi uraian rencana tindak lanjut penelitian selanjutnya dengan melihat hasil penelitian yang telah diperoleh. Jika ada target yang belum diselesaikan pada akhir tahun pelaksanaan penelitian, pada bagian ini dapat dituliskan rencana penyelesaian target yang belum tercapai tersebut.

RENCANA TINDAK LANJUT PENELITIAN

Melakukan uji stabilitas dan toksisitas sediaan

.....
.....

Daftar Pustaka disusun dan ditulis **berdasarkan sistem nomor** sesuai dengan urutan pengutipan. **Hanya pustaka yang disitasi/diacu** pada laporan kemajuan saja yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sehro; Luliana, S. D. R. (2015). Pengaruh Penambahan TEA (Trietanolamine) terhadap pH Basis Lanolin Sediaan Losio. *Jurnal UNTAN*, 148, 148–162
2. Anonim. (n.d.). *Operating Instructions NDJ Series Digital Viscometer Drawell International Technology Limited Shanghai Drawell Scientific Instrument Co ., Ltd.* Drawell International Technology Limited.
3. Anonim. (1996). SNI. 16-4399-1996 Sediaan Tabir Surya. In *Dewan Standardisasi Nasional* (Vol. 16, Issue 4399)
4. Nur, A., & Marissa, N. (2016). Gambaran Bakteri Ulkus Diabetikum di Rumah Sakit Zainal Abidin dan Meuraxa Tahun 2015. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 44(3), 187–196. <https://doi.org/10.22435/bpk.v44i3.5048.187-196>
5. Hasanah, U., Rusny., & Masri, M. (2015). Analisis Pertumbuhan Mencit (*Mus musculus L.*) ICR Dari Hasil Perkawinan Inbreeding Dengan Pemberian Pakan AD1 dan AD2. *Prosiding Seminar Nasional Mikrobiologi Kesehatan Dan Lingkungan*, 140–145
6. Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology*, 70(1), 5.47.1-5.47.20. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>
7. Kolb, H. (1987). Mouse Models of Insulin Dependent Diabetes: Low-Dose Streptozocin-Induced Diabetes and Nonobese Diabetic (NOD) Mice. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 3(3), 751–778. <https://doi.org/10.1002/dmr.5610030308>
8. Yurista, S. R., Ferdian, R. A., & Sargowo, D. (2016). Prinsip 3Rs dan Pedoman ARRIVE Pada Studi Hewan Coba. *Jurnal Kardiologi Indonesia*, 37(3), 156–163
9. Association, A. diabetes. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>
10. Abd Jalil, M. A., Kasmuri, A. R., & Hadi, H. (2017). Stingless bee honey, the natural wound healer: A review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 30(2), 66–75. <https://doi.org/10.1159/000458416>
11. Alexiadou, K., & Doupis, J. (2012). Management of diabetic foot ulcers. *Diabetes Therapy*, 3(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13300-012-0004-9>
12. Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology*, 304–309. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2014/952943>
13. Biluca, F. C., da Silva, B., Caon, T., Mohr, E. T. B., Vieira, G. N., Gonzaga, L. V., Vitali, L.,

Micke, G., Fett, R., Dalmarco, E. M., & Costa, A. C. O. (2019). Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). *Food Research International*, 129, 108756. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108756>

Lampiran-Lampiran

1. Bukti luaran wajib (draft artikel)

OPTIMASI KOMPOSISI MADU KELULUT (*Trigona sp*) DAN MINYAK ZAITUN (*Olive oil*) DALAM FORMULA SALEP UNTUK ULKUS DIABETES

Erwin Fauzana¹, Nining Sugihartini², and Sapto Yuliani²

¹Mahasiswa Pascasarjana Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

²Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

ning.sugihartini@pharm.uad.ac.id

Abstract

Ulkus Diabetes merupakan komplikasi umum dari Diabetes Mellitus yang meningkatkan resiko morbiditas dan mortalitas, serta besarnya biaya perawatan kesehatan. Madu kelulut dan minyak zaitun telah sejak lama digunakan pada perawatan berbagai jenis luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komposisi madu kelulut dan minyak zaitun yang optimum dalam formula salep untuk luka diabetes. Penelitian ini dibagi atas 3 tahap penelitian. Pertama adalah tahap orientasi kadar bahan aktif berupa madu kelulut dan minyak zaitun (1:1) di dalam salep dengan menggunakan parameter pH dan viskositas. Kadar bahan aktif yang diuji adalah 5%, 10%, 15%, 20%, 25% dan 30%. Kedua adalah tahap optimasi formula salep dengan dasar kadar bahan aktif dari hasil tahap pertama dengan menggunakan metode *Simplex lattice design*. Berdasarkan metode tersebut maka diperoleh 8 variasi komposisi madu kelulut dan minyak zaitun. Sediaan dengan variasi komposisi tersebut selanjutnya diuji dengan parameter uji sebagaimana tahap pertama ditambah dengan parameter daya hambat bakteri menggunakan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Tahap ketiga yaitu uji daya penyembuhan luka salep formula optimum pada luka sayatan mencit putih jantan Balb/c diabetes. Hasil uji menunjukkan bahwa kadar bahan aktif dalam sediaan sebesar 20% yang paling optimal. Pada tahap kedua diperoleh formula optimum terverifikasi dengan komposisi madu kelulut dan minyak zaitun dalam formula masing-masing 0,586 dan 0,414. Hasil uji tahap ketiga menunjukkan bahwa potensi daya penyembuhan luka salep formula optimum pada mencit diabetes lebih baik dibandingkan salep antibiotik gentamycin ($p > 0,05$).

Keywords: Optimasi; madu kelulut; minyak zaitun; salep hidrofilik; ulkus diabetes

INTRODUCTION

Prevalensi penderita Diabetes Melitus (DM) di Indonesia semakin meningkat. Jika pada laporan RISKESDAS 2013 prevalensinya berada pada 6,9% maka pada laporan RISKESDAS 2018 telah meningkat pada kisaran 10,9%, dimana komplikasi DM paling umum yang sangat mempengaruhi produktifitas penderitanya adalah Ulkus Diabetikum (UD) yang biasanya terjadi pada kaki. Sebagai gambaran, di Amerika Penderita DM yang mengalami komplikasi tersebut, membutuhkan biaya pengobatan 5,4 kali lebih tinggi dibandingkan yang tidak mengalami ulkus utamanya pada kaki¹.

Beberapa upaya dalam penanganan DFU adalah pelatihan opada pasien, kontrol gula, penanganan infeksi, pembongkaran luka¹. Terdapat 2 bahan alami dalam khasanah

pengobatan Islami yang sejak lama telah banyak digunakan dalam perawatan UD yaitu madu dan minyak zaitun. Efektifitas penggunaan kedua bahan alami ini dalam membantu penyembuhan UD tidak hanya dibuktikan secara empiris namun juga secara klinis²⁻⁶.

Madu kelulut (*stingless bee honey*), salah satu jenis madu yang diketahui memiliki potensi farmakologi yang baik pada penyembuhan luka. Jenis lebah tidak menyengat yang menghasilkan madu yang berguna untuk Kesehatan adalah *Melipona* dan *Trigona*. Madu lebah tak menyengat dapat digunakan untuk woundhealing, diabetes, luka pada mata, hipertensi, fertilitas, kanker, infeksi mikroba, kontrol lemak. Selain itu jga dapat digunakan untuk antioksidan, antiinflamasi, dan antiaging². Polifenol dalam minyak zaitun bermanfaat sebagai pengontrol gula, tekanan darah dan oksidasi lipoprotein⁶. Selain itu dari sisi ketersediaan bahan baku, madu kelulut juga terjangkau sepanjang tahun dan dengan harga yang terjangkau³.

Melihat kenyataan prevalensi DM di Indonesia yang semakin meningkat dari tahun ketahun dan adanya potensi sumber daya alami Indonesia yang dapat dimanfaatkan untuk membantu mengatasi komplikasi DM berupa UD, sangat disayangkan bahwa hingga saat ini di Indonesia belum memiliki sediaan topikal dengan kandungan aktif kedua bahan tersebut yang secara khusus digunakan untuk perawatan UD. Sehingga menjadi penting untuk dilaksanakan suatu penelitian yang mampu memberikan gambaran pengaruh konsentrasi madu kelulut dan minyak zaitun pada sifat fisik sediaan dan pengaruhnya terhadap efek farmakologi pada upaya perawatan UD agar diperoleh suatu formula sediaan topikal dengan sifat fisik dan potensi farmakologi yang optimal. Penggunaan sediaan salep dalam pengobatan luka diabetes pada kaki juga telah dilakukan oleh penelitian sebelumnya⁷.

Pada proses pembentukan luka diabetes terjadi karena adanya bakteri⁸. Madu memiliki manfaat sebagai antibakteri, antiinflamasi dan kontrol kadar gula sehingga dapat digunakan dalam pengobatan luka diabetes¹⁻². Minyak zaitun mengandung polifenol yang dapat digunakan untuk mengontrol gula⁶. Kombinasi kedua bahan aktif tersebut diharapkan akan memberikan efek sinergis sehingga pengobatan luka diabetes pada kaki dapat lebih efektif.

Penelitian diawali dengan optimasi formula sediaan dalam rangka untuk melihat gambaran awal kemampuan basis sediaan dalam menerima tambahan bahan aktif alami. Selanjutnya dilaksanakan pengujian sifat fisik pada masing-masing formula untuk mengetahui pengaruh kadar tiap bahan aktif terhadap sifat fisik sediaan. Sedangkan untuk mengetahui pengaruh kadar bahan aktif terhadap potensi farmakologi, penelitian dilanjutkan secara *in vitro* menggunakan bakteri yang umumnya terlibat pada kejadian

infeksi UD dan secara *in vivo* menggunakan hewan percobaan berupa tikus putih. Selain akan memberikan sumbangsih bagi perkembangan ilmu pengetahuan di bidang farmasetika, penelitian ini diharapkan juga mampu menghasilkan suatu produk yang dapat diproduksi secara massal guna memenuhi kebutuhan perawatan pasien UD khususnya di Indonesia.

METHODS

A. Pembuatan sediaan

Formula yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel I.

Bahan	F1	F2	F3
Madu kelulut	40	20	0
Minyak Zaitun	0	20	40
Hidrophilic ointment	60	60	60

Formula dari *Hidrophilic ointment base* disajikan pada tabel II.

Hydrophilic ointment (USP)	Prosentase (%)
Methylparaben	0,025
Propylparaben	0,015
Sodium Lauryl Sulfate	1
Propylene Glycol	12
Stearyl Alcohol	25
White Petrolatum	25
Purified Water	37

Sediaan salep dibuat dengan metode peleburan. Pada tahapan pertama maka dicampurkan metil paraben, sodium lauril silfat, propilen glikol dan air dengan dipanaskan pada suhu 60⁰ C (fase 1). Pada wadah lainnya juga dileburkan dengan suhu yang sama propil paraben, stearyl alkohol dan vaselin putih (fase 2). Setelah masing-masing melebur maka fase 1 dituang ke fase 2 dan diaduk sampai homogen. Setelah mencapai suhu kamar maka ditambahkan madu kelulut dan minyak zaitun.

B. Uji Sifat Fisik Sediaan

Sediaan diuji sifat fisiknya meliputi penetapan pH dan viskositas

a. Uji pH

Salep ditetapkan pH dengan menggunakan pH meter²³

b. Viskositas

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kekentalan dari tiap sediaan salep yang diformulasikan dengan menggunakan alat viscometer²⁴.

C. Uji Antibakteri

Uji potensi antibakteri yang umumnya terlibat pada infeksi ulkus diabetikus yaitu *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. Uji ini dilakukan untuk mengetahui seberapa besar potensi daya hambat tiap sediaan salep yang diformulasikan terhadap pertumbuhan bakteri. Uji dilakukan dengan media agar dan aktivitasnya diukur berdasarkan uas daya hambat yang diperoleh²⁵

D. Uji aktivitas penyembuhan luka

Uji dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan salep dalam menyembuhkan luka pada hewan uji tikus putih yang sebelumnya telah diinduksi menderita diabetes. Luka diabetes diberikan pada punggung tikus putih. Kemampuan penyembuhan luka diamati dengan mengukur luas luka selama uji yaitu selama 30 hari. Salep yang dioleskan pada bagian yang luka sebanyak 100 mg²⁶

RESULTS AND DISCUSSION

Tahapan pada penelitian ini diawali terlebih dahulu dengan melaksanakan orientasi kadar bahan aktif madu kelulut dan minyak zaitun di dalam sediaan salep. Tahap ini perlu dilakukan untuk mengetahui kadar bahan aktif dalam salep yang dapat diterima dengan baik oleh basis salep sebagai acuan untuk tahap optimasi formula. Sediaan salep dengan 6 kadar bahan aktif disiapkan masing – masing sesuai komposisi yang tertera pada tabel I.

Tabel I. Komposisi formula optimasi kadar bahan aktif

Nama Bahan	Total Kadar Bahan Aktif					
	5%	10%	15%	20%	25%	30%
Madu kelulut	2,5	5	7,5	10	12,5	15
Minyak zaitun	2,5	5	7,5	10	12,5	15
Dasar salep hidrofilik	95	90	85	80	75	70
Prosentase akhir sediaan	100	100	100	100	100	100

Penambahan TEA 0,4% pada basis salep dibutuhkan karena pada uji pendahuluan diperoleh nilai pH untuk semua variasi kadar bahan aktif memiliki gambaran yang kurang dari 4,5 (asam) sehingga penambahan TEA sebagai *alkilizing agent* bertujuan untuk menaikkan nilai pH sediaan agar menjadi lebih basa (Sehro; Luliana, 2015). Kondisi sediaan salep pada uji pendahuluan yang cenderung asam diduga kuat berasal dari pengaruh madu kelulut yang memiliki nilai pH pada rentang 3,15 – 4,66 (Aina et al., 2018). Setelah penambahan TEA 0,4% pada tiap kadar maka nilai pH berhasil meningkat ke arah basa.

Pada saat proses pembuatan sediaan salep didapati bahwa hanya 5 dari 6 kadar yang berhasil membentuk massa salep yaitu 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% sedangkan kadar 30% tidak terbentuk. Kondisi ini diduga karena pada kadar 30% kemampuan basis salep untuk mengemulsikan fase air dan fase minyak sudah tidak memadai lagi. Pada kadar bahan aktif 25%, penulis mendapatkan kesulitan yang berarti dalam upaya membentuk massa salep jika dibandingkan dengan pembuatan salep dengan 4 kadar lain di bawahnya, pada kadar ini diperlukan waktu yang jauh lebih lama untuk dapat membentuk massa salep.

Lima kadar bahan aktif yang berhasil membentuk massa salep diukur 2 parameter sifat fisiknya, yaitu derajat keasaman (pH) dan viskositas. Pada parameter pH, suhu pengukuran yang digunakan adalah pada saat suhu larutan massa salep dalam air mencapai 40°C. Suhu ini dipilih untuk mendekati suhu tubuh normal manusia (36-37°C) namun tetap memungkinkan untuk diukur, karena pada suhu lebih rendah larutan massa salep dalam air kembali memadat sehingga dikhawatirkan berpengaruh pada keakuratan pengukuran oleh pH meter.

Pada pengukuran viskositas, digunakan alat Viskometer NDJ-5S. Pengukuran dilaksanakan di dalam ruangan laboratorium berpendingin suhu otomatis (*air conditioner*) dengan suhu 25°C Merujuk pada *Manual Book* Viskometer NDJ-5S bahwa untuk menentukan ukuran *spindle* dan kecepatan putaran rotor yang akan digunakan terlebih dahulu diorientasi pada sediaan yang akan diukur untuk tiap ukuran *spindle* mulai dari nomor 1 sampai nomor 4 dengan kecepatan rotor mulai dari 6 rpm, 12 rpm, 30 rpm dan 60 rpm (Anonim, n.d.). *Spindle* dan kecepatan putaran rotor yang dipilih adalah yang menunjukkan nilai prosentase berkesesuaian dengan nilai viskositas (mPa.s). Hasil pengukuran pH dan viskositas pada 5 kadar orientasi tersajikan pada tabel II.

Tabel II. Data evaluasi sifat fisik kadar orientasi

Kadar Orientasi (%)	Parameter	
	pH	Viskositas (mPa.s)
5	8,17±0,0 6	68.100,00±2.892
10	7,47±0,0 6	55.042,86±2.630
15	7,10±0,1 0	41.271,43±2.103
20	6,20±0,1 0	26.500,00±2.941
25	5,83±0,0 6	13.274,00±2.170

Data evaluasi sifat fisik pada tabel II selanjutnya dibandingkan dengan nilai parameter standar untuk sediaan salep yaitu untuk pH adalah antara 4,5 – 6,5 dan untuk viskositas adalah antara 2.000 – 50.000 mPa.S (Anonim, 1996). Setelah dibandingkan dengan nilai parameter standar diketahui bahwa untuk nilai rerata pH yang memenuhi standar adalah pada kadar 20% dan 25% sedangkan untuk nilai rerata viskositas yang memenuhi standar adalah pada kadar 15%, 20% dan 25%. Dari data tersebut dapat kita lihat bahwa terdapat 2 kadar bahan aktif yang mampu mengakomodir kedua nilai parameter standar untuk sediaan salep yaitu kadar bahan aktif 20% dan 25%. Namun dikarenakan pada kadar 25% proses pembentukan massa salep relatif lebih sulit, membutuhkan pengadukan konstan dalam waktu yang jauh lebih lama dibandingkan pada pembuatan massa salep dengan kadar bahan aktif 20% sehingga dikhawatirkan pada tahap optimasi nanti, jarak ruang variasi komposisi tidak cukup tersedia untuk tetap dapat membentuk massa salep. Atas dasar hal tersebut maka penulis menetapkan bahwa kadar 20% yang dipilih untuk dijadikan acuan pada tahap optimasi formula salep berikutnya.

Setelah diperoleh kadar orientasi, penelitian dilanjutkan untuk mengetahui formula optimum dari sediaan salep untuk luka diabetes. Pada tahapan ini metode *Simplex Lattice Design* dipilih sebagai metode optimasi. Dengan menggunakan aplikasi *Design Expert® 13*, dibuat rancangan formula dengan batas atas (*upper limit*) 0,8 dan batas bawah (*lower limit*) 0,2 dihasilkan 8 *run* formula percobaan seperti disajikan pada tabel III.

Tabel III. Formula rancangan *Design Expert® 13*

Formula	Komposisi (bagian)	
	Madu Kelulut	Minyak Zaitun
R1	0,8	0,2
R2	0,65	0,35
R3	0,5	0,5
R4	0,5	0,5
R5	0,35	0,65
R6	0,2	0,8
R7	0,8	0,2
R8	0,2	0,8

Sediaan yang diperoleh kemudian diukur pH, viskositas dan daya hambat bakteri tersaji pada tabel VI.

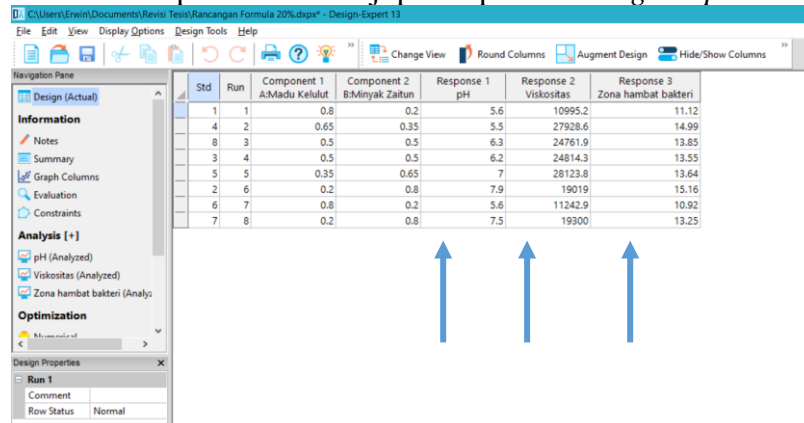
Tabel VI. Hasil pengukuran pH, viskositas dan daya hambat bakteri

Formula	pH	Viskositas (mPa.S)	Daya Hambat (mm)
R1	5,63 ± 0,15	10.995,24 ± 842	11,12 ± 0,62
R2	5,50 ± 0,10	27.928,57 ± 622	14,99 ± 0,65
R3	6,30 ± 0,10	24.761,90 ± 343	13,85 ± 0,75
R4	6,17 ± 0,06	24.814,29 ± 598	13,55 ± 0,37
R5	7,03 ± 0,06	28.123,81 ± 624	13,64 ± 0,71

R6	7,90 ± 0,00	19.019,05 ± 200	15,16 ± 0,44
R7	5,60 ± 0,10	11.242,86 ± 679	10,92 ± 0,73
R8	7,47 ± 0,06	19.300,00 ± 324	13,25 ± 0,21

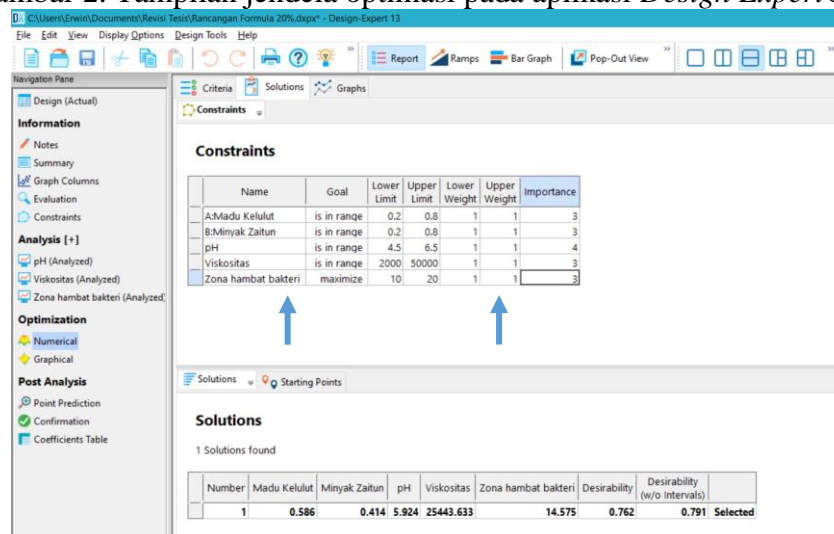
Data tersebut selanjutnya dimasukkan kedalam aplikasi *Design Expert® 13* untuk dianalisa seperti tampak pada gambar 1.

Gambar 1. Input data hasil uji pada aplikasi *Design Expert® 13*



Berikutnya data yang telah dimasukkan ke dalam tabel di proses untuk dianalisa.

Gambar 2. Tampilan jendela optimasi pada aplikasi *Design Expert® 13*



Pada Gambar.2 dapat dilihat bahwa target capaian (*goal*) pada nilai pH dan viskositas berupa nilai *range* yaitu untuk pH pada 4,5 – 6,5 dengan derajat kepentingan 4+ dan viskositas pada 2.000 – 50.000 mPa.S dengan derajat kepentingan 3+. Sedangkan target capaian pada zona hambat bakteri adalah semaksimal mungkin (*maximized*), dengan batas terkecil 10 mm dan batas terbesar 20 mm dengan derajat kepentingan 3+. Setelah pengaturan target capaian selesai, data di proses oleh aplikasi dan memberikan 1 solusi yaitu suatu formula dengan komposisi Madu kelulut 0,586 bagian, dan Minyak zaitun 0,414 bagian. Formula tersebut diharapkan akan menghasilkan suatu salep dengan nilai pH 5,924, viskositas 25.443,6 mPa.s dan daya hambat bakteri sebesar 14,575mm dengan kemungkinan untuk terpenuhinya (*desirability*) target – target tersebut adalah sebesar 0,762.

Komposisi Madu kelulut dan Minyak zaitun yang diperoleh kemudian disiapkan berdasarkan hasil perhitungan pada tabel VII dan diverifikasi.

Tabel VII. Perhitungan bahan baku salep formula optimum

Nama Bahan	Gram
Madu kelulut	11,72
Minyak zaitun	8,28
Metil paraben	0,020
Propil paraben	0,012
Na-lauril sulfat	0,800
Propilen glikol	9,600
Stearil alkohol	20,000
Vaselin album	20,000
TEA	0,320
Aquadest	29,280
Untuk membuat salep	100,032

Kemudian salep optimum disiapkan dan diukur nilai pH, viskositas dan daya hambat bakterinya. Hasil verifikasi dan analisa *one sample t-test* sebagaimana tercantum pada tabel VIII.

Tabel VIII. Hasil verifikasi formula optimum

Keterangan	pH	Viskositas	Daya hambat
Target	5,9	25.443,6 mPa.s	14,575 mm
Verifikasi	5,6 ± 0,15	27.704,8 ± 1.759	14,13 mm ± 0,49
Sig.(2-tailed)	0,094	0,156	0,161

Dari data pada tabel VIII tersebut dapat diketahui bahwa semua parameter yang diverifikasi memenuhi parameter standar sediaan salep topikal dengan daya hambat bakteri yang memadai dan hasil uji *one sample t-test* pada data hasil verifikasi parameter pH, viskositas dan daya hambat bakteri terhadap target memiliki Sig.(2-tailed) > 0.05 yaitu masing-masing 0,094; 0,156 dan 0,161 yang ini berarti bermakna bahwa formula yang diusulkan tidak berbeda signifikan dengan target (memenuhi target) nilai verifikasi sehingga solusi yang diusulkan oleh aplikasi *design Expert® 13* dapat diterima sebagai formula optimum.

Setelah diperoleh formula salep optimum, penelitian dilanjutkan ke tahap uji untuk mengetahui potensi farmakologi salep tersebut secara *in vivo*. Uji ini penting untuk dilakukan sebagai gambaran/model efektifitas salep formula optimum dalam membantu penyembuhan ulkus diabetes. Hewan uji yang dipilih pada penelitian ini adalah mencit (*Mus mucus*) albino jantan galur BALB/c. Hewan ini dipilih selain karena struktur anatomi dan fisiologinya yang mempunyai kemiripan dengan struktur anatomi dan fisiologi manusia (Nugroho, 2018), mencit juga memiliki keunggulan lain diantaranya yaitu siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi dan mudah dalam penanganannya (Hasanah et al., 2015).

Selengkapnya data ukuran luka dan perkembangannya dapat terlihat pada tabel IX.

Tabel IX. Data Perkembangan sembuh luka

Kelompok Perlakuan	Kode No.	Hari Ke						Prosentase Penyembuhan di hari ke-11
		0	3	5	7	9	11	%
Kontrol Negatif	1.1	14,20	11,40	10,00	9,70	8,40	8,10	42,96
	1.2	13,70	12,20	11,60	9,60	7,00	5,50	62,77
	1.3	14,00	10,40	7,80	7,40	7,20	7,00	50,00
	1.4	15,00	14,50	12,60	11,80	10,70	8,70	42,00
	1.5	12,20	11,10	8,80	8,00	6,90	7,30	40,16
	1.6	10,50	10,50	9,20	8,70	7,20	5,00	52,38
Salep Formula Optimum	2.1	12,40	11,20	8,10	7,50	4,90	2,40	80,65
	2.2	14,80	14,00	8,90	5,40	3,30	2,40	83,78
	2.3	12,00	10,80	7,80	6,90	4,30	0,00	100,00
	2.4	14,80	11,60	4,50	2,60	1,80	0,00	100,00
	2.5	11,20	8,50	5,80	4,70	1,90	1,00	91,07
	2.6	11,70	10,30	6,50	5,20	5,00	3,50	70,09
Kontrol Positif	3.1	12,50	11,70	8,30	7,90	6,30	4,20	66,40
	3.2	12,50	11,70	8,30	6,10	5,40	1,60	87,20
	3.3	13,20	11,50	10,90	8,90	5,90	3,60	72,73
	3.4	11,50	10,80	7,70	7,20	4,70	0,00	100,00
	3.5	12,10	11,00	7,90	7,20	4,40	1,30	89,26
	3.6	14,20	12,50	10,90	8,00	5,10	4,20	70,42
Normal	N.1	14,90	13,90	10,50	8,50	5,20	4,20	71,81
	N.2	14,90	13,70	10,40	7,70	4,60	3,10	79,19
	N.3	14,50	12,50	9,60	7,30	5,10	3,40	76,55
	N.4	14,00	12,60	9,80	9,80	5,80	2,90	79,29
	N.5	14,80	13,90	10,50	7,90	5,70	4,70	68,24
	N.6	14,40	13,60	11,60	11,40	7,10	4,10	71,53

Penelitian dihentikan pada saat mulai ada prosentase penyembuhan luka 100% agar data yang ada dapat dikomparasi. Prosentase penyembuhan luka pertama kali terjadi pada hari ke 11 di kelompok perlakuan yang diberi salep formula optimum (2 mencit) dan kelompok perlakuan kontrol positif (1 mencit).

Berdasarkan hasil uji statistik yang dilakukan terhadap data tersebut yang meliputi uji *One Way ANOVA* ditunjukkan perbedaan bermakna ($\text{sign} < 0,05$) terhadap prosentase penyembuhan luka antar kelompok perlakuan. Sedangkan pada uji dan *post hoc test* berupa uji *Least Significant Difference (LSD)* ditunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara prosentase penyembuhan luka kelompok kontrol negatif dengan semua kelompok perlakuan lainnya, antara kelompok salep formula optimum dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok normal non diabetes, antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif, antara kelompok normal non diabetes dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok salep formula optimum. Ini berarti mengkonfirmasi bahwa salep

formula optimum terbukti lebih baik dalam membantu proses penyembuhan luka diabetes dibanding dengan kontrol positif.

Kemampuan madu kelulut dalam membantu penyembuhan luka termasuk luka diabetes setidaknya bersumber dari 3 potensi yang dimilikinya. Potensi pertama adalah kemampuan sebagai antioksidan (Abd Jalil et al., 2017). Potensi ini sangat berpengaruh pada proses penyembuhan luka diabetes karena pada penderita hiperglikemia dapat memicu kondisi stress oksidatif (Aumiller & Dollahite, 2015) sehingga dengan adanya kandungan *protocatechuic acid* (PCA) dan *4-hydroxyphenylacetic acid* pada madu kelulut dapat menangkal stress oksidatif tersebut dan pada akhirnya akan meningkatkan proses proliferasi sel dalam proses penyembuhan luka (Kakkar & Bais, 2014). Potensi kedua yang dimiliki madu kelulut adalah sebagai antimikroba. Pada penelitian Nishio et al., 2016 diungkapkan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) 2 jenis madu kelulut pada 16 strain bakteri diantaranya *S. aureus* yang merupakan bakteri umum dan dominan pada luka diabetes. Berkesesuaian dengan penelitian ini yang mendapatkan zona hambat madu kelulut yang mencapai 14,13 mm, ini memberikan gambaran positif akan penggunaannya dalam melawan kondisi infeksi pada luka diabetes. Potensi berikutnya adalah sebagai agen anti inflamasi. Kemampuan penghambatan madu kelulut pada sitokin pro-inflamasi TNF- α , IL-6, IL-12p70 dan INF- γ memegang peranan penting dalam hal ini (Biluca et al., 2019).

Selain madu kelulut, bahan aktif minyak zaitun dalam salep formula optimum pada penelitian ini juga memiliki potensi farmakologi yang luar biasa. Diketahui bahwa minyak zaitun terdiri dari 98% trigliserida, termasuk asam oleat tak jenuh tunggal yang mendominasi, yang memiliki sifat anti-inflamasi dan telah terbukti penting, karena sifat tersebut mirip dengan ibuprofen (sebagai antiinflamasi kimia sintesis), dan ini dapat mempercepat proses penyembuhan ulkus. Selanjutnya, karena konsentrasi polifenol dalam minyak zaitun yang tinggi dan bersifat sebagai antioksidan alami, maka aplikasinya mampu mengurangi proses inflamasi dan meningkatkan aliran darah, sehingga juga membantu mempercepat proses penyembuhan ulkus.

Dengan mengetahui potensi-potensi kedua bahan aktif dan ditambah data-data hasil penelitian ini maka dapat penulis konfirmasi bahwa kemampuan salep formula optimum dalam menyembuhkan luka pada mencit diabetes dapat dijadikan bahan pertimbangann untuk digunakan pada terapi penyembuhan luka diabetes pada manusia.

CONCLUSION

Kadar bahan aktif madu kelulut dan minyak zaitun di dalam sediaan salep hidrofilik adalah 20%. Komposisi optimum bahan aktif madu kelulut dan minyak zaitun di dalam formula salep ulkus diabetes optimum masing-masing adalah 0,586 bagian, dan 0,414 bagian.

Bahwa potensi daya penyembuhan luka salep formula optimum pada mencit diabetes lebih baik dibandingkan salep antibiotik gentamycin namun tidak bermakna secara statistik.

ACKNOWLEDGMENT

Penelitian ini terlaksana atas dana hibah penelitian dasar dari LPPM UAD tahun anggaran 2021.

REFERENCES

1. Sehro; Luliana, S. D. R. (2015). Pengaruh Penambahan TEA (Trietanolamine) terhadap pH Basis Lanolin Sediaan Losio. *Jurnal UNTAN*, 148, 148–162
2. Anonim. (n.d.). *Operating Instructions NDJ Series Digital Viscometer Drawell International Technology Limited Shanghai Drawell Scientific Instrument Co ., Ltd.* Drawell International Technology Limited.
3. Anonim. (1996). SNI. 16-4399-1996 Sediaan Tabir Surya. In *Dewan Standardisasi Nasional* (Vol. 16, Issue 4399)
4. Nur, A., & Marissa, N. (2016). Gambaran Bakteri Ulkus Diabetikum di Rumah Sakit Zainal Abidin dan Meuraxa Tahun 2015. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 44(3), 187–196. <https://doi.org/10.22435/bpk.v44i3.5048.187-196>
5. Hasanah, U., Rusny., & Masri, M. (2015). Analisis Pertumbuhan Mencit (*Mus musculus* L.) ICR Dari Hasil Perkawinan Inbreeding Dengan Pemberian Pakan AD1 dan AD2. *Prosiding Seminar Nasional Mikrobiologi Kesehatan Dan Lingkungan*, 140–145
6. Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology*, 70(1), 5.47.1-5.47.20. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>
7. Kolb, H. (1987). Mouse Models of Insulin Dependent Diabetes: Low-Dose Streptozocin-Induced Diabetes and Nonobese Diabetic (NOD) Mice. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 3(3), 751–778. <https://doi.org/10.1002/dmr.5610030308>
8. Yurista, S. R., Ferdian, R. A., & Sargowo, D. (2016). Prinsip 3Rs dan Pedoman ARRIVE Pada Studi Hewan Coba. *Jurnal Kardiologi Indonesia*, 37(3), 156–163
9. Association, A. diabetes. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>
10. Abd Jalil, M. A., Kasmuri, A. R., & Hadi, H. (2017). Stingless bee honey, the natural wound healer: A review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 30(2), 66–75. <https://doi.org/10.1159/000458416>
11. Alexiadou, K., & Doupis, J. (2012). Management of diabetic foot ulcers. *Diabetes Therapy*, 3(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13300-012-0004-9>
12. Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology*, 304–309. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2014/952943>
13. Biluca, F. C., da Silva, B., Caon, T., Mohr, E. T. B., Vieira, G. N., Gonzaga, L. V., Vitali, L., Micke, G., Fett, R., Dalmarco, E. M., & Costa, A. C. O. (2019). Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (*Meliponinae*). *Food Research International*, 129, 108756. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108756>

2. Bukti luaran tambahan (Jika ada)

Mengikuti Seminar International di Farmasi UGM