

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Metode penelitian yang dilakukan oleh peneliti yaitu eksperimental, buah parijoto (*Medinilla speciosa*) di ekstraksi dengan metode maserasi yaitu menggunakan pelarut etanol 96%. Kemudian hasil dari ekstrak akan di buat menjadi sediaan gel ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dan di uji aktivitasnya terhadap luka insisi dan uji terhadap jumlah leukosit pada hewan.

#### **B. Lokasi Penelitian**

1. Determinasi tanaman akan dilaksanakan di laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro.
2. *Ethical Clearance* dilaksanakan di Komite Etik Penelitian Universitas Ngudi Waluyo.
3. Proses pembuatan ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
4. Pembuatan gel ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) di Laboratorium Farmasetika Universitas Ngudi Waluyo.

5. Laboratorium Biologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo, untuk uji aktivitas gel ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) terhadap tikus putih jantan galur wistar.

### C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah gel ekstrak etanol buah parijoto sebagai uji aktivitas terhadap luka insisi dan pengaruh jumlah leukosit pada tikus putih jantan galur wistar. Sedangkan sampel buah parijoto diperoleh dari Bandungan, Kabupaten Semarang. Kemudian sampel tersebut selanjutnya akan diformulasikan menjadi bentuk sediaan gel.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar, sebanyak 24 ekor dengan berat 150gram – 200gram dan berusia 2-3 bulan. Perhitungan besar sampel minimal pada eksperimen ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus Federer (Hermawan, 2013).

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

Keterangan:

n = besar pengulangan

t = jumlah kelompok

Dalam penelitian ini terdapat 6 kelompok percobaan yang telah ditentukan berdasarkan perlakuan dan kontrol. Pada penelitian ini 6 kelompok dibagi sebagai berikut :

1. Kelompok I adalah kelompok kontrol positif yang diberi perlakuan dengan Octenilin gel

2. Kelompok II adalah kelompok kontrol negatif tanpa diberi perlakuan setelah diberi luka
3. Kelompok III adalah kelompok kontrol basis yang diberi perlakuan dengan basis gel
4. Kelompok IV adalah kelompok yang diberi gel ekstrak etanol buah parijoto 0,5%
5. Kelompok V adalah kelompok yang diberi gel ekstrak etanol buah parijoto 1%
6. Kelompok VI adalah kelompok yang diberi gel ekstrak etanol buah parijoto 1,5%

Bila dimasukkan dalam rumus, maka :

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

$$(6-1) (t-1) \geq 15$$

$$(5) (t-1) \geq 15$$

$$(t - 1) \geq 3$$

$$t = 4$$

Dari penghitungan diatas didapatkan jumlah minimal dalam 1 kelompok adalah 4 ekor tikus, sehingga besarnya subjek keseluruhan adalah 24 ekor tikus yang dibagi menjadi 6 kelompok.

#### **D. Definisi Operasional**

1. Ekstraksi berarti proses menarik senyawa dari tumbuhan atau hewan dengan menggunakan pelarut yang sesuai, dan kemudian menggunakan pelarut untuk menguapkan semua atau hampir semua pelarut.

2. Buah pariijoto secara tradisional digunakan sebagai anti inflamasi, anti kolestrol dan anti bakteri
3. Luka insisi (sayatan) merupakan trauma yang disebabkan benda tajam sehingga jaringan mengalami kerusakan
4. Uji efek penyembuhan merupakan pengujian suatu sampel pada hewan uji dan kemudian mengamati efeknya pada kesehatan hewan.
5. Sediaan gel yaitu sistem setengah padat yang terdiri dari suatu disperse yang tersusun baik dari partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar dan saling diresapi cairan.

#### **E. Variabel penelitian**

1. Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau sebab perubahan timbulnya variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak dalam formula pembuatan sediaan gel 0,5%, 1%, dan 1,5%.
2. Variabel tergantung merupakan variabel penelitian yang diukur untuk mengetahui efek atau pengaruh variabel lain. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu penyembuhan luka berdasarkan panjang luka, nilai AUC dan persen daya antiinflamasi, jumlah leukosit.
3. Variabel terkontrol merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang ditetapkan tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu pembuatan sediaan gel ekstrak

etanol buah parijoto, pembuatan luka sayat, penyembuhan luka sayat, lingkungan hewan uji pada saat perlakuan.

## **F. Pengumpulan Data**

### 1. Alat penelitian

- a. Untuk proses ekstraksi buah parijoto digunakan peralatan gelas standar, batang pengaduk, kertas saring (Whatman), corong kaca, erlenmeyer (Phyrex), gelas ukur (IWAKI CTE33 ASAHI GLASS), neraca analitik (Ohous), rotary evaporator (Ika), ayakan mesh 40.
- b. Alat untuk pembuatan gel meliputi neraca analitik (Ohous), beaker glass (HERMA), batang pengaduk, gelas ukur (IWAKI CTE33 ASAHI GLASS), cawan porselen, water bath, pipet tetes.
- c. Alat untuk KLT meliputi lempeng KLT, chamber.
- d. Alat untuk uji aktivitas penyembuhan luka insisi meliputi scapel (Braun), jangka sorong (Mitutoyo).
- e. Alat untuk mengukur jumlah leukosit meliputi scalpel (Braun), microtube (Monotes), hematology analyzer (Royto RT-7600).

### 2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah buah parijoto (*Medinilla speciosa*) yang diperoleh dari Kecamatan Bandungan, Kabupaten Semarang, bahan berupa HPMC (Teknis) teknis yang dimaksud adalah HPMC yang tidak memiliki COA (*Certificate Of Analysis*), gliserin (Pharmaceutical grade), propilenglikol (Pharmaceutical

grade), metil paraben (Pharmaceutical grade), kertas saring (Whatman), kain kasa, Octenilin gel, etanol 96% (Technical grade), kuersetin dan rutin (Sigma).

## **G. Prosedur Penelitian**

### **1. Pengumpulan Bahan**

Buah parijoto (*Medinilla speciosa*) yang digunakan pada penelitian diambil dari Kecamatan Bandungan, Kabupaten Semarang.

### **2. Determinasi Tanaman**

Determinasi buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Hasil determinasi ini digunakan untuk menunjukkan kebenaran jenis atau spesies tanaman yang digunakan untuk penelitian.

### **3. Penyiapan Bahan**

Buah parijoto (*Medinilla speciosa*) yang telah diperoleh dilakukan sortasi basah untuk memisahkan buah dengan ranting dan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor, selanjutnya dicuci menggunakan air mengalir, diangin-anginkan sampai tidak terdapat sisa air. Kemudian dikeringkan dan ditutup menggunakan kain hitam di bawah sinar matahari, kemudian dihaluskan dengan blender, dan diayak menggunakan ayakan nomor 40 sehingga didapatkan serbuk

halus, dicek kadar air serbuk <10%, dan kadar abu serbuk, kemudian dilakukan ekstraksi. (Luqman H, 2021).

#### 4. Pembuatan Ekstrak

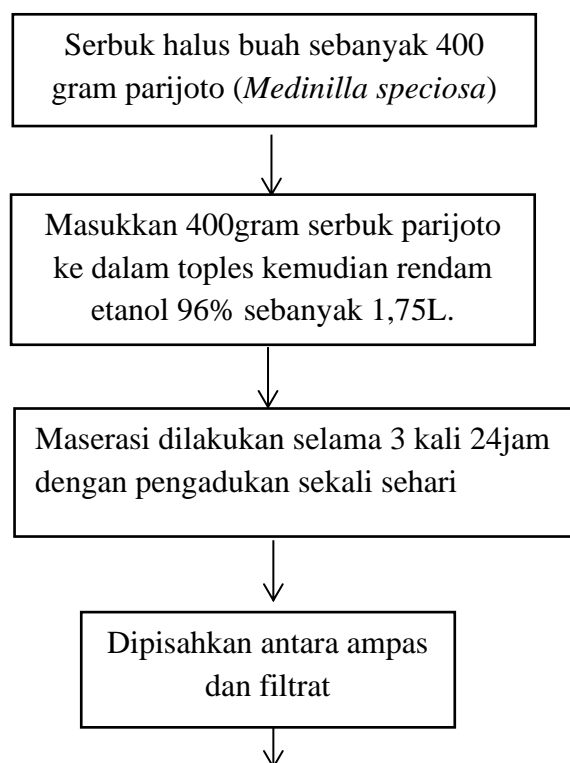
Pembuatan ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk buah parijoto (*Medinilla speciosa*) sebanyak 400gram yang telah diblender dan diayak. Dilarutkan dalam etanol 96% dengan perbandingan (1:7,5) sebanyak 3L (1,75 L untuk maserasi dan 1,25 untuk remaserasi), maserasi dilakukan selama 24 jam selama 3 hari dengan pengadukan sekali sehari. Setelah direndam selama 3 hari kemudian diserka ampas diperas dipisahkan antara ampas dan filtrat, maserat yang diperoleh dijadikan sebagai filtrat ke 1, kemudian dilanjutkan remaserasi, ampas hasil maserasi direndam ulang menggunakan 1,25L hingga terendam kemudian ditutup didiamkan 24 jam selama 2 hari, dilakukan pengadukan tiap 1 x 24 jam, setelah 2 hari perendaman diserka ampas diperas, filtrat hasil maserasi 1 dijadikan satu dengan filtrat hasil maserasi 2, kemudian dievaporasi menggunakan rotary evaporator suhu 50°C, kemudian ekstrak semi kental diperoleh, dilanjutkan dengan penguapan di waterbath menggunakan cawan porselen hingga diperoleh ekstrak kental kemudian ekstrak disimpan dan dihitung rendemennya. (Luqman H, 2021).

Randemen ekstrak dihitung menggunakan rumus :

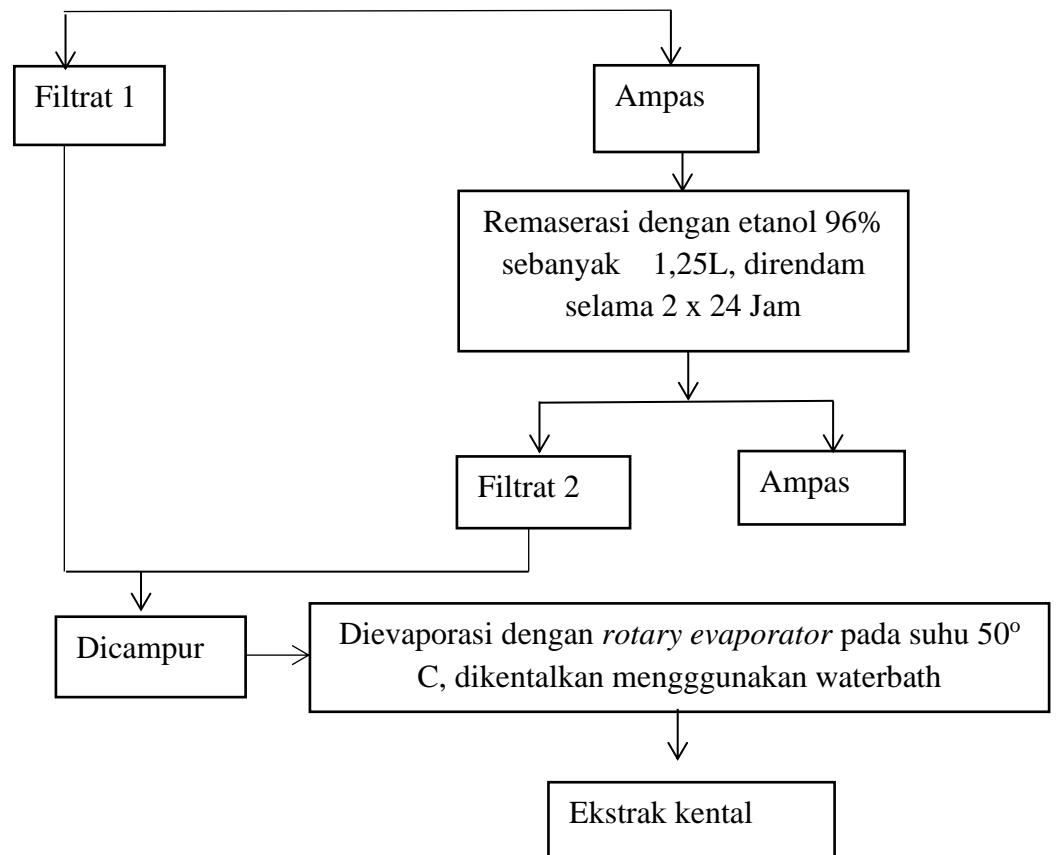
$$\text{Randemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak Pekat (g)}}{\text{Bobot Bahan Sampel (g)}} \times 100\%$$

Proses pembuatan ekstrak buah Parijoto (*Medinilla speciosa*) dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut polar (yaitu etanol 96%). Pemilihan metode maserasi berdasarkan sifat beberapa senyawa yang diduga terkandung dalam buah Parijoto (*Medinilla speciosa*) rusak pada suhu tinggi, selain itu metode maserasi tidak memerlukan peralatan yang rumit dan pengerjaannya mudah. Pelarut etanol 96% dipilih karena merupakan pelarut universal, bertujuan agar senyawa metabolit yang terkandung dalam buah parijoto dapat tersari sempurna (senyawa polar maupun nonpolar), tidak toksik dibandingkan dengan pelarut organik lainnya. Lebih mudah menguap karena titik leburnya lebih rendah dari air. Mikroorganisme tidak mudah berkembang biak, dan harganya relatif murah (Saifuddin et al., 2011).

Bagan Skema pembuatan ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*)







Gambar 3.1 Skema Pembuatan Ekstrak Buah Parijoto  
(*Medinilla speciosa*)

## 5. Uji KLT

Ekstrak buah Parijoto (*Medinilla speciosa*) ditotolkan pada lempeng KLT silika gel GF 254 nm, dan lempeng KLT dimasukkan ke dalam chamber yang telah jenuh dengan fase gerak n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 8:2. Setelah jarak elusi tercapai, setelah itu lempeng dikeluarkan dari chamber dan di angin – anginkan. Letakkan lempeng KLT di bawah sinar ultraviolet 254nm noda yang terbentuk akibat totalan ditandai. Lempeng KLT disemprot dengan penampak bercak atau uap amoniak. Ketika Rf diamati dan direkam di bawah sinar ultraviolet 254 nm, warna hijau, kuning, biru menegaskan adanya metabolit sekunder dengan

jenis flavonoid (Vifta dan Advistasari, 2018). Fase gerak n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8:2 dipilih berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Zirconia 2015, menyatakan bahwa dari beberapa eluen hanya campuran n- heksana-etil asetat yang dapat terpisah dengan baik. Ini menunjukkan campuran n-heksana : etil asetat (8:2) dinilai baik dalam memisahkan senyawa flavonoid yang artinya adanya kedekatan kepolaran antara senyawa flavonoid dengan eluen maka senyawa flavonoid semakin terbawa oleh fasa gerak

## 6. Formulasi Gel

Tabel 3.1 Formulasi Gel Ekstrak Buah Parijoto (Luqman H, 2021)

Nama Bahan	Konsentrasi %			
	Kontrol Basis	F II	F III	F III
Ekstrak Buah Parijoto ( <i>Medinilla speciosa</i> )	-	0,5	1	1,5
HPMC	2	2	2	2
Gliserin	5	5	5	5
Propilenglikol	2,5	2,5	2,5	2,5
Metil paraben	0,2	0,2	0,2	0,2
Jumlah	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

## 7. Prosedur Pembuatan Gel

HPMC ditimbang untuk masing-masing formula, kemudian dikembangkan dengan air panas dalam beaker glass 1 yang telah ditimbang sebelumnya, aduk rata dan diamkan selama 24 jam. Dalam beaker glass 2, ditimbang metil paraben terlarut dengan 2 mL etanol p.a, ditimbang gliserin dan propilen glikol, kemudian dicampur dengan metil paraben terlarut, dan dihomogenkan. Ekstrak buah Parijoto (*Medinilla speciosa*) ditimbang dalam cawan dilarutkan secara perlahan dengan 3 tetes etanol dan air panas dengan volume  $\pm$  20 mL, ekstrak yang sudah terlarut dicampurkan dalam

beaker 2 yang berisi campuran metil paraben, gliserin, propilenglikol, aduk rata hingga homogen. Dimasukkan perlahan-lahan campuran dalam beaker glass 2 ke dalam beaker glass 1, gelas beaker 1 berisi HPMC yang telah mengembang dan melebur proses peleburan HPMC menggunakan watterbath dengan suhu 70° C, kemudian campuran tersebut dicukupkan dengan aquadest hingga 100g, aduk dan dihomogenkan (Puspitasari & Kusuma Wardhani, 2018).

8. Pengujian Luka Insisi Gel Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa*)

Hewan uji yang digunakan adalah 24 ekor tikus putih jantan galur, sebelum dilakukan percobaan hewan uji diadaptasi selama 7 hari. Tikus dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok 1 untuk pengujian kontrol positif menggunakan Octenilin Gel (Octenidine Hydrochloride 0,15% & Allantoin 0,20%) pemilihan Octenilin gel yaitu berdasarkan dengan bentuk sediaan octenilin gel sama dengan bentuk sediaan gel yang akan dibuat, semua sediaan yang digunakan dalam penelitian ini dalam bentuk gel., kelompok 2 untuk pengujian kontrol negatif (tidak diberi perlakuan lain setelah di beri luka), kelompok 3 untuk pengujian kontrol basis (basis gel ekstrak parijoto), kelompok 4 untuk pengujian ekstrak 0,5%, kelompok 5 untuk pengujian ekstrak 1%, dan kelompok 6 untuk pengujian ekstrak 1,5%. Masing-masing tikus dicukur bulunya secukupnya dibagian punggung kemudian dioleskan alkohol dibagian yang akan disayat, kemudian dibuat luka sayat menggunakan scalpel dengan panjang 2 cm dan kedalaman

$\pm 2$ mm. Setelah dibuat luka, bagian disekitar luka bersihkan sampai pendarahan berhenti kemudian di keringkan menggunakan kasa steril, masing-masing kelompok dioleskan tipis  $\pm 0,5$ gram gel yang disebutkan di atas kecuali kelompok II. Perlakuan tersebut dilakukan hingga sembuh dan dioleskan sehari dua kali pagi dan sore. Perlakuan di amati panjang luka sayat selama 7 hari kemudian dilanjutkan 14 hari (jika luka belum sepenuhnya sembuh). (Fauzia, 2017).

#### 9. Pengujian Jumlah Leukosit

Sampel darah diambil sesudah pemberian luka sayat dan setelah sembuh dari luka. Proses pengambilan darah tikus putih melalui ekor sebanyak  $\pm 1$  ml. Sampel darah yang diambil ditempatkan dalam tabung mikrotube yang mengandung ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA). Jumlah leukosit masing-masing dihitung dengan menggunakan alat Hematology Analyzer. (Zuraidawati, dkk. 2018).

#### 10. Analisis Data

Sumber data didapatkan dari hasil pengamatan sebagai sumber data primer. Teknik pengolahan data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu hasil pengamatan AUC diolah secara statistik dengan menggunakan metode analisa variasi (ANOVA) satu arah dengan  $\alpha$  sebesar 95%, kemudian leukosit diolah menggunakan Uji Paired Sample T Test. Uji Paired T-Test dilakukan dengan bantuan komputer program SPSS pada kepercayaan 95% ( $\alpha 0,05$ ).