

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium. Metode penelitian ini adalah buah Parijoto (*Medinilla speciosa*) di ekstrak menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dibuat sediaan salep dengan variasi konsentrasi 0,5%, 1% dan 1,5%, kemudian sediaan salep di uji aktivitasnya sebagai anti-inflamasi untuk penyembuhan luka insisi dan uji terhadap jumlah leukosit pada hewan.

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

##### 1. Lokasi

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Ethical Clearance dilaksanakan di Komite Etik Penelitian Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Pembuatan ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dilakukan di Laboratorium Fitokimia Progran Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- d. Pembuatan salep ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa*) di laboratorium Farmasetika Universitas Ngudi Waluyo.

- e. Uji aktivitas salep ekstrak etanol buah pariijoto (*Medinilla speciosa*) terhadap tikus putih jantan galur wistar di laboratorium Biologi Universitas Ngudi Waluyo.

### C. Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian buah pariijoto (*Medinilla speciosa*). Sampel diperoleh dari Bandungan, Kabupaten Semarang. Sampel tersebut selanjutnya diformulasikan dalam bentuk sediaan salep. Salep dimaksudkan sebagai sediaan anti-inflamasi pada uji aktivitas penyembuhan luka insisi dan pengaruh jumlah leukosit pada tikus putih jantan galur wistar. Tikus yang digunakan tikus putih jantan galur wistar sebanyak 24 ekor. Perhitungan jumlah sampel minimal pada eksperimen ini dapat dihitung menggunakan rumus Federer (Hermawan, 2013).

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

Keterangan:

n = Besar pengulangan

t = Jumlah Kelompok

Pada penelitian ini dibagi menjadi 6 kelompok percobaan yang ditentukan berdasarkan perlakuan dan kontrol, sebagai berikut:

1. Kelompok I adalah kelompok yang diberi salep ekstrak etanol buah pariijoto 0,5%
2. Kelompok II adalah kelompok yang diberi salep ekstrak etanol buah pariijoto 1%

3. Kelompok III adalah kelompok yang diberi salep ekstrak etanol buah parijoto 1,5%
4. Kelompok IV adalah kelompok kontrol positif yang diberi perlakuan dengan salep Povidone Iodine
5. Kelompok V adalah kelompok kontrol negatif yang diberi perlakuan dengan basis salep
6. Kelompok VI adalah kelompok kontrol sakit, tanpa diberi perlakuan

Jika dimasukkan dalam rumus, sebagai berikut:

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

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

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

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

$$t = 4$$

Dari perhitungan tersebut diperoleh jumlah minimal dalam 1 kelompok adalah 4 ekor tikus, sehingga total subjek keseluruhannya adalah 24 ekor tikus yang di bagi menjadi 6 kelompok.

#### **D. Variabel Penelitian**

##### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau sebab perubahan timbulnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dalam sediaan salep 0,5%, 1% dan 1,5%.

## 2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah variabel penelitian yang diukur untuk mengetahui efek atau pengaruh variabel lain. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah uji aktivitas penyembuhan luka insisi dengan sediaan salep ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa*), persentase daya anti-inflamasi ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dan total leukosit setelah penggunaan salep ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*).

## 3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya supaya hasil yang ditetapkan tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah pembuatan sediaan salep ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa*).

## **E. Pengumpulan Data**

### 1. Alat Penelitian

- a. Alat untuk pembuatan ekstrak meliputi batang pengaduk, *beaker glass* (Herma), corong kaca (Pyrex), rotary evaporator (Ika), neraca analitik (Ohaus), cawan porselin dan *waterbath*.
- b. Alat untuk pembuatan salep meliputi neraca (Ohaus), mortir, stamper, sudip, sendok tanduk, dan pot salep.

- c. Alat untuk melakukan uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis) meliputi chamber, plat KLT, sinar UV 254 nm dan 366 nm, dan botol penampak bercak.
- d. Alat uji aktivitas penyembuhan luka insisi pada hewan meliputi bak plastik, kawat penutup, scalpel (Braun), gunting, jangka sorong (Mitutoyo), dan microtube (Monotes).
- e. Alat untuk mengukur jumlah leukosit meliputi microtube (Monotes) dan *hematology analyzer* (Royto RT – 7600).

## 2. Bahan Penelitian

- a. Bahan untuk pembuatan ekstraksi adalah serbuk buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dan etanol 96%.
- b. Bahan untuk pembuatan salep adalah ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*), vaselin flavum (Extra Light Yellow Vaseline), dan nipagin (Methyl Paraben).
- c. Bahan untuk uji KLT adalah ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*), fase geraknya adalah n-heksan:etil asetat (8:2), fase diamnya adalah silika gel GF 254 nm dan penampak bercak adalah asam sitrat, asam borat dan etanol.

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Pengumpulan Bahan

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

## 2. Determinasi Tanaman

Tanaman parijoto di determinasi di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang, dengan tujuan mengetahui kebenaran dari buah parijoto (*Medinilla speciosa*) untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan penelitian.

## 3. Pembuatan Simplisia

Buah Parijoto (*Medinilla speciosa*) segar sebanyak 5 kg dikumpulkan kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan buah dari tangkai dan membuang bagian yang tidak dibutuhkan. Buah setelah disortasi basah dicuci untuk menghilangkan kotoran dengan menggunakan air mengalir. Setelah pencucian selesai dilakukan pengeringan di bawah sinar matahari dengan ditutup menggunakan kain hitam bertujuan agar proses pengeringan berlangsung cepat dan tidak terpapar sinar matahari langsung yang dapat menyebabkan kerusakan senyawa aktif dalam simplisia (Handayani *et al.*, 2016). Pengeringan adalah tahapan untuk menjaga stabilitas senyawa pada simplisia. Pengeringan simplisia bertujuan untuk mencegah tumbuhnya jamur, mengurangi kadar air dan mempermudah proses penghalusan menjadi serbuk (Diana & Peta, 2017). Setelah buah kering dilakukan sortasi kering untuk memisahkan pengotor yang tertinggal pada simplisia kering (Rivai *et al.*, 2014). Simplisia kemudian dihaluskan

menggunakan alat penghalus untuk dijadikan serbuk (Fajriyah dan Qulub, 2018).

#### 4. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) menggunakan metode maserasi. Metode maserasi adalah proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Pemilihan metode maserasi untuk ekstraksi dikarenakan maserasi merupakan metode yang paling sederhana, mudah dilakukan, dan dapat menghindari rusaknya senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani, 2014). Metode maserasi dilakukan dengan perendaman serbuk buah parijoto (*Medinilla speciosa*) menggunakan pelarut bersifat polar yaitu etanol 96% dan bertujuan agar senyawa metabolit yang bersifat polar maupun non polar dalam buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dapat tersari sempurna (Saiffudin *et al.*, 2011).

Pada proses evaporasi menggunakan *evaporator rotary* dengan suhu 50<sup>0</sup>C dipilih karena mampu menguapkan pelarut dibawah titik didih sehingga zat yang terkandung didalam ekstrak tidak rusak oleh suhu tinggi (Pangestu & Handayani, 2011). Pembuatan ekstrak yaitu serbuk buah parijoto (*Medinilla speciosa*) sebanyak 400 gram dimasukkan ke dalam toples kaca. Serbuk dalam toples kaca ditambahkan etanol 96% sebanyak 3 L dengan perbandingan (1:7,5).

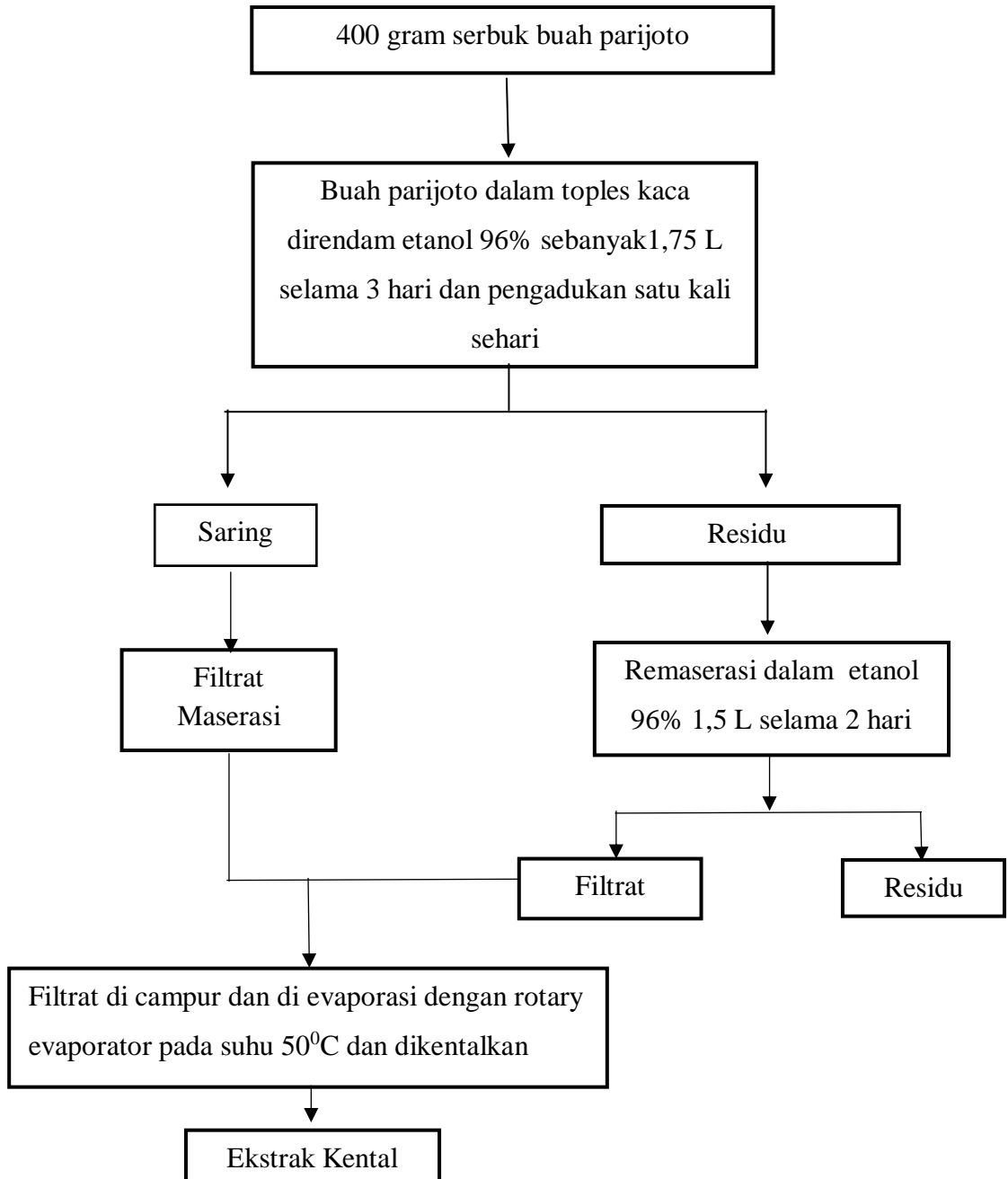
Sebanyak 1,75 L digunakan untuk maserasi dan 1,25 L digunakan untuk remaserasi. Pada proses maserasi perendaman dilakukan selama 3 hari dengan pengadukan satu kali sehari. Setelah 3 hari perendaman residu diperas dan dipisahkan dari filtrat, maserat yang diperoleh kemudian disaring menggunakan kertas saring, kemudian dilanjutkan remaserasi. Residu hasil maserasi direndam ulang menggunakan 1,25 L etanol 96% dan didiamkan selama 2 hari dan diaduk satu kali sehari, setelah 2 hari perendaman maserat disaring dengan kertas saring. Kemudian filtrat maserasi 1 dijadikan satu dengan filtrat remaserasi, selanjutnya dilakukan evaporasi menggunakan *evaporator rotary* dengan suhu 50<sup>0</sup>C rpm pengadukan yang digunakan 50 rpm kemudian ekstrak cair yang diperoleh, dilanjutkan dengan penguapan pada *waterbath* dengan suhu 50<sup>0</sup>C menggunakan cawan porselen hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak disimpan dan dihitung randemennya (Abdillah, 2021).

Rumus perhitungan rendemen:

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot total ekstrak}}{\text{Bobot total serbuk}} \times 100\%$$



Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Parijoto (*Medinilla speciosa*)



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

## 5. Standarisasi Ekstrak

Standarisasi merupakan proses penjaminan produk akhir memiliki nilai parameter tertentu yang konstan dan ditetapkan terlebih dahulu. Parameter mutu tersebut meliputi parameter spesifik dan parameter non spesifik (Nila Ayunaji Halilah, 2017).

### a. Parameter Spesifik

Parameter spesifik memuat analisis kimia yang memberikan informasi komposisi kandungan dan kadar zat kimia ekstrak (Nila Ayunaji Halilah, 2017). Parameter spesifik dalam penelitian ini dilakukan uji organoleptis dan uji KLT.

#### 1) Uji organoleptis

Uji organoleptis merupakan pengenalan awal yang sederhana seobjektif mungkin. Uji organoleptis dilakukan dengan pengamatan terhadap bau, rasa, dan warna (Ahmad Najib, 2017).

#### 2) Uji KLT Flavonoid

Ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) ditotolkan pada plat KLT silika gel GF 254 nm, plat KLT dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah dijenuhkan dengan fase gerak n-heksan:etil-asetat (8:2). Setelah mencapai jarak elusi plat di angkat dari *chamber* dan di angin-anginkan hingga plat KLT disemprot dengan sitroborat dan diaktifkan dalam oven pada suhu 100°C selama 10 menit bertujuan untuk menghilangkan kadar air yang mungkin terkandung dalam plat yang kemudian

dideteksi dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm (Zirconia *et al.*, 2015). Kemudian akan terlihat warna bercak pada sinar UV 366 bercak merah menjadi biru menandakan adanya senyawa antosianin (Made Agus Gelgel Wirasuta *et al.*, 2015) Adanya senyawa metabolit sekunder dengan jenis flavonoid dipertegas dengan penampakan warna kehijauan ketika diamati di sinar UV 254 nm dan RF dicatat (Vifta & Advistasari, 2018).

b. Parameter Non Spesifik

Parameter non spesifik memuat standar umum ekstrak (Nila Ayunaji Halilah, 2017). Parameter Non Spesifik dalam penelitian ini dilakukan uji kadar air dan uji kadar abu.

1) Uji Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan untuk menentukan batas atau kisaran maksimum kadar air dalam sampel. Kandungan air yang berlebihan dalam sampel dapat mempercepat pertumbuhan mikroorganisme dan juga dapat mendorong hidrolisis terhadap kandungan kimianya, sehingga dapat menurunkan mutu sampel (S. Handayani *et al.*, 2017). Syarat kadar air adalah  $\leq 10\%$ . Apabila kadar air melebihi persyaratan mengakibatkan sampel akan ditumbuhi jamur (Kepel & Bodhi, 2020).

2) Uji Kadar Abu

Penetapan kadar abu adalah suatu cara untuk menentukan jumlah zat anorganik atau mineral yang tersisa setelah proses

pengabuan. Syarat kadar abu yaitu kurang dari 16,6% (Kepel & Bodhi, 2020).

## 6. Formulasi Salep

Berikut adalah formula salep berdasarkan penelitian (Fauzia *et al.*, 2017) yang dimodifikasi menjadi konsentrasi 0,5%, 1% dan 1,5%.

**Tabel 3.1 Formula Salep Berdasarkan Fauzia *et al.*, 2017**

Formula Konsentrasi Salep			
	F1	F2	F3
Eks.Rimp.Kencur	5%	10%	15%
Nipagin 0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Vaselin Flavum	ad 75 g	ad 75 g	ad 75 g
M.F.Ungt			

**Tabel 3.2 Formula Konsentrasi Salep**

Formula Konsentrasi Salep				
	Basis	F1	F2	F3
Eks.Buah.Parijoto		0,5%	1%	1,5%
Nipagin	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Vaselin Flavum	ad 75 g	ad 75 g	ad 75 g	ad 75 g
M.F.Ungt				

## 7. Prosedur Pembuatan Salep

Cara pembuatan salep yaitu ditimbang vaselin flavum, nipagin, dan ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) sesuai dengan formula. Dimasukkan sebagian vaselin flavum ke dalam mortir, ditambahkan nipagin gerus dan diaduk sampai homogen, kemudian ditambahkan ekstrak buah parijoto sedikit demi sedikit dan diaduk sampai homogen, dimasukkan sisa bagian vaselin flavum dan diaduk sampai homogen.

Campuran dikeluarkan dari mortir dan dimasukkan ke setiap pot salep (Fauzia *et al.*, 2017). Pada kontrol negatif cara pembuatan salep yaitu ditimbang nipagin dan vaselin flavum, dimasukkan vaselin flavum ke dalam mortir dan ditambahkan nipagin, diaduk sampai homogen. Kemudian dikeluarkan dari mortir dan dimasukkan ke dalam pot salep.

8. Pengujian Anti Inflamasi Ekstrak Etanol Buah Patijoto (*Medinilla speciosa*)

Hewan uji sebanyak 24 ekor tikus putih jantan galur wistar diadaptasi selama kurang lebih 7 hari. Tikus dibagi menjadi 6 kelompok yang terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok 1 dilakukan pengujian salep dengan konsentrasi ekstrak 0,5%, kelompok 2 dilakukan pengujian salep dengan konsentrasi ekstrak 1%, kelompok 3 dilakukan pengujian salep dengan konsentrasi ekstrak 1,5%, kelompok 4 dilakukan pengujian kontrol positif dengan salep povidone Iodine, kelompok 5 dilakukan pengujian kontrol negatif dengan basis salep, dan kelompok 6 dilakukan pengujian kontrol sakit dengan tidak diberikan perlakuan. Masing-masing tikus dicukur secukupnya pada bagian punggung, selanjutnya diberi luka sayat menggunakan *scalpel* dengan panjang 20 mm dengan kedalaman 2 mm. Setelah di sayat bagian disekitar luka dibersihkan sampai pendarahan berhenti kemudian dikeringkan dengan kasa steril, masing-masing kelompok diberikan perlakuan yaitu untuk kelompok positif diberikan salep povidone iodine, kelompok basis diberikan basis salep, kelompok negatif tidak diberi perlakuan apapun

dan ketiga kelompok lainnya diberikan perlakuan dengan pemberian salep ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dengan konsentrasi 0,5%, 1% dan 1,5%. Selama masa pengamatan panjang luka diberikan perawatan salep sesuai perlakuan masing-masing hewan uji sebanyak dua kali sehari pagi dan sore. Perlakuan diamati selama 14 hari (Eriadi *et al.*, 2015).

#### 9. Pengujian Jumlah Leukosit

Pengujian jumlah leukosit dilakukan 2 kali yaitu hari pertama saat diberi luka dan pada saat luka sembuh. Dalam pengambilan darah tikus putih melalui vena lateralis pada ekor tikus sebanyak  $\pm 1$  mL menggunakan scalpel. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung mikrotube yang mengandung *ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA). Jumlah leukosit diuji dengan alat *Hematology Analyzer* (Zuraidawati *et al.*, 2019).

#### 10. Analisis Data

Sumber data didapatkan dari hasil pengamatan sebagai sumber data primer dan literatur buku ataupun hasil penelitian yang lain sebagai sumber data sekunder. Teknik pengolahan data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu hasil pengamatan diolah secara statistik dengan menggunakan metode analisis SPSS uji *Kruskal Wallis* Statistik Non Parametrik dan jumlah leukosit di analisis menggunakan uji *Paired T-Test*.