

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan yaitu eksperimental, buah parijoto (*Medinilla speciosa*) di ekstraksi dengan metode maserasi yaitu menggunakan pelarut etanol 96%. Hasil dari ekstrak dibuat menjadi sediaan gel ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dengan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5% dan diuji aktivitas antiinflamasi dengan metode uji penghambatan denaturasi protein menggunakan uji Spektrofotometer UV-Vis.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi tanaman dilaksanakan di laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro.
2. Proses pembuatan ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dilaksanakan di Laboratorium bahan alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Pembuatan gel ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
4. Pengujian mutu fisik gel ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh bagian buah parijoto (*Medinilla Speciosa*).

2. Sampel

Sampel buah parijoto (*Medinilla Speciosa*) diperoleh dari Bandungan, Kabupaten Semarang. Sampel tersebut diformulasikan menjadi sediaan gel.

D. Definisi Operasional

1. Buah parijoto (*Medinilla speciosa*) diperoleh dari daerah Bandungan, Jawa Tengah, Kab. Semarang.
2. Konsentrasi ekstrak buah parijoto (*Medinilla Speciosa*) yang digunakan adalah 0,5%;1%;1,5%.
3. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan penyari etanol 96% dengan metode maserasi selama 5 hari.
4. Metode in vitro dengan menghambat denaturasi protein digunakan sebagai metode untuk menguji aktivitas antiinflamasi ekstrak buah parijoto (*Medinilla Speciosa*) dan sediaan gel ekstrak buah parijoto (*Medinilla Speciosa*).
5. Pengujian mutu fisik yang dilakukan pada sediaan gel ekstrak buah parijoto meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, viskositas, daya lekat, dan daya proteksi
6. Pengujian anti inflamasi pada sediaan gel ekstrak parijoto dengan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%

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 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 mutu fisik meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, viskositas, daya lekat, dan daya proteksi sediaan gel dan uji penghambatan denaturasi protein.
3. Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu, alat, bahan, suhu dan kondisi laboratorium.

F. Pengumpulan Data

1. Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu blender, timbangan analitik, pH meter, vortex, termometer, *waterbath*, aluminium foil, kertas saring, kapas, labu ukur 1000 mL, 100 mL, 10 mL dan 5 mL, *beker glass*, gelas ukur 100 mL, corong, Erlenmeyer 1000 mL, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi, batang pengaduk, kaca arloji, spatula, plat tetes, seperangkat alat *vacuum rotary evaporator*, *melting point*, mikropipet, botol kaca gelap, spektrofotometer UV-Visible.

2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah buah parijoto (*Medinilla speciosa*) yang diperoleh dari Kecamatan Bandungan, Kabupaten Semarang. Media uji yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: etanol 96, aquadest, NaCl, *Tris base* dan *Tris buffer saline*, natrium diclofenac, HPMC, gliserin, propilen glikol, metil paraben.

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. Buah parijoto 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%, 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 400 gram dilarutkan dalam etanol 96% dengan perbandingan (1:7,5) sebanyak 3L (1,75 L untuk maserasi dan 1,25 untuk remaserasi). Proses maserasi dilakukan selama selama 3 hari dengan pengadukan sekali sehari. Setelah direndam selama 3 hari kemudian diserkai ampas diperas dipisahkan antara ampas dan filtrat. Maserat yang diperoleh dijadikan sebagai filtrat ke 1. Ampas hasil maserasi direndam ulang menggunakan 1,25 liter etanol hingga terendam kemudian ditutup didiamkan 24 jam selama 2 hari, dilakukan pengadukan tiap 1 x 24 jam. Residu yang telah direndam selama 2 hari selanjutnya diserkai ampas diperas. filtrat hasil maserasi

1 dijadikan satu dengan filtrat hasil remaserasi, kemudian dievaporasi menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C.

Ekstrak cair buah piri-joto yang diperoleh, dilanjutkan dengan penguapan di *waterbath* menggunakan cawan porselen hingga diperoleh ekstrak kental kemudian ekstrak disimpan dan dihitung rendemennya (Luqman H, 2021). Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus :

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

5. Uji Flavonoid

Ekstrak etanol dari ekstrak buah piri-joto (*Medinilla speciosa*) diletakkan di dalam plat tetes lalu beberapa tetes NaOH. Terbentuknya kuning intens yang jika ditambahkan dengan larutan asam, warna kuning akan memudar, hal ini menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

6. Formulasi

Tabel 3. 1 Formulasi Gel Ekstrak Buah Piri-joto (*Medinilla speciosa*)

| Nama bahan | Konsentrasi % | | | |
|--|------------------|--------|--------|--------|
| | Kontrol negative | FI | FII | FIII |
| Ekstrak Buah Piri-joto (<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 *beaker glass* sebelumnya, aduk rata dan diamkan selama 24 jam. Dalam *beaker glass* 2, ditimbang metil paraben dilarutkan dengan 2 mL etanol. Gliserin dan propilen glikol ditimbang, 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 glass* 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. *Beaker glass* 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, diaduk dan dihomogenkan (Puspitasari & Kusuma Wardhani, 2018).

8. Uji Organoleptis

Pemeriksaan organoleptic dilakukan secara visual dengan mengamati bentuk, warna dan bau. (Wardani *et al.*, 2021) Standar yang harus dipenuhi gel yaitu memiliki tekstur lembut, warna merata, dan baunya enak.

9. Uji pH

Pengujian pH pada sediaan menggunakan pH meter. Langkah pertama pH meter dikalibrasi dengan larutan standar netral (pH 7,01) dan larutan dapar asam (pH 4,01). Elektroda kemudian dicuci dengan etanol kemudian dikeringkan dengan tisu. Sampel ditimbang 1 gram dan dilarutkan dalam 100 mL metanol, kemudian elektroda dimasukkan dalam larutan tersebut. pH diamati dengan membiarkan larutan sampai pH konstan dan nilai yang ditunjukkan oleh pengukuran pH adalah pH sediaan. Sediaan gel yang aman dan tidak mengiritasi kulit dapat ditentukan dengan menguji pH. Sediaan gel yang baik adalah yang memenuhi standar pH kulit yaitu 4,5-6,5 (Nunik K, 2016).

10. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan pengamatan sediaan gel dibuktikan pada obyek glass

tidak terasa adanya bahan padat atau butiran-butiran kasar, hal ini menunjukkan pada saat proses pencampuran sudah baik.

11. Viskositas

Pengujian viskositas gel menggunakan viskometer Brookfield dengan spindle nomor 64. Langkah pertama uji viskositas dengan memasang spindel pada gantungan spindel terlebih dahulu. Sampel yang diuji viskositasnya dimasukkan dalam beaker glass 100 mL, kemudian spindle diletakkan di tengah beaker glass dan dibiarkan sampai tercelup. Selanjutnya menekan tombol “run” sampai muncul hasilnya (Mudhana & Pujiastuti, 2021).

12. Uji Daya Lekat

Sebanyak 0,5 g gel diletakkan diatas objek gelas dengan luas tertentu. Kemudian ditutup objek gelas lain, ditekan dengan menggunakan beban seberat 1 kg selama 5 menit. Objek gelas dipasang pada alat uji, dilepaskan dengan beban seberat 80 g dan dicatat waktu yang diperlukan untuk memisahkan kedua objek tersebut (A. S. Ulandari & Sugihartini, 2020).

13. Uji Daya Sebar

Sebanyak 0,5 g sediaan diletakkan diatas kaca bulat berskala kemudian ditutup dengan menggunakan kaca bulat yang telah ditimbang dan diketahui bobotnya selama 5 menit serta dicatat diameter penyebarannya. Beban seberat 50 g, 100 g, 150 g, 200 g, 250 g ditambahkan secara bergantian selama 1 menit dan dicatat diameter penyebarannya (A. S. Ulandari & Sugihartini, 2020).

14. Uji Proteksi

Pengukuran daya proteksi dilakukan terhadap sediaan gel yang telah dibuat sebelum dan sesudah diberi kondisi penyimpanan. Uji daya proteksi dilakukan dengan cara sepotong kertas saring (10 x 10 cm) dibasahi dengan larutan phenolphthalein (PP) sebagai

indikator hingga seluruh permukaan terbasahi kemudian dikeringkan. Olesi kertas tersebut dengan 0,5 g sediaan pada sisi salah satu permukaan secara merata seperti lazimnya orang menggunakan (Nurhaini *et al.*, n.d.).

15. Uji in vitro aktivitas antiinflamasi

Berdasarkan penelitian (Holothuria & Pulau, 2016) pengujian aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol 96 dari gel ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) secara in vitro meliputi tahapan-tahapan yang diawali dengan pembuatan larutan TBS (*Tris Buffer Saline*) sebanyak 1000 mL pH 6,2 - 6,5, pembuatan larutan 0,2% BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebanyak 100 mL, pembuatan larutan kontrol negatif sebanyak 5 mL, pembuatan larutan konsentrasi uji (etanol), pembuatan larutan konsentrasi kontrol positif, pengukuran aktivitas antiinflamasi, perhitungan persentase penghambatan denaturasi protein dan perhitungan persentase nilai IC_{50} . Tahapan-tahapan ini dijelaskan sebagai berikut :

1) Pembuatan Larutan TBS (*Tris Buffer Saline*)

Sebanyak 1,21 gram *tris base* dan 8,7 gram NaCl lalu ditambahkan aquades sampai 900 mL. *Adjust* pH dengan asam asetat glasial sampai pH 6,2-6,5 (pH patologis). Kemudian ditambahkan aquadest sampai 1000 mL dalam labu ukur 1000 mL (Mohan, 2003).

2) Pembuatan 0,2% BSA (*Bovine Serum Albumin*)

Sebanyak 0,2 gram BSA (*Bovine Serum Albumin*) dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian ditambahkan dengan larutan TBS (*Tris Buffer Saline*) hingga volume 100 mL (William *et al.*, 2008).

3) Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Sebanyak 50 μ L pelarut etanol 96 lalu ditambahkan larutan 0,2% BSA ke labu ukur hingga volume mencapai 5 mL.

4) Pembuatan Larutan Uji (Ekstrak buah parijoto)

Sebanyak 500 mg ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*). Dilarutkan dalam pelarut ekstrak buah parjoto di dalam labu ukur 25 mL, kemudian dicukupkan dengan pelarut sampai volume 25 mL, sehingga didapatkan konsentrasi 2000 ppm sebagai larutan induk. Larutan dengan konsentrasi 2000 ppm dibuat seri konsentrasi, sehingga menjadi larutan uji dengan konsentrasi 400 ppm, 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm.

Dengan cara pengenceran $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$

5) Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Sebanyak 100 mg Natrium Diklofenak kemudian dilarutkan dengan metanol ke dalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan dengan metanol sampai 25 mL, sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 4000 ppm yang dijadikan sebagai larutan induk. Dari larutan induk 4000 ppm ini, selanjutnya dibuat seri konsentrasi larutan kontrol positif menjadi 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm.

6) Pengukuran Aktivitas Antiinflamasi

Diambil sebanyak 500 μ L dari setiap konsentrasi larutan (larutan uji dan larutan kontrol positif), kemudian ditambahkan larutan 0,2% BSA hingga volume mencapai 5 mL. Dari campuran tersebut akan menghasilkan konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm untuk setiap konsentrasi ekstrak dan 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm larutan konsentrasi natrium diklofenak. Kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit kemudian dipanaskan selama 5 menit pada suhu 72°C menggunakan hotplate stirrer, lalu didiamkan selama 25 menit pada suhu 23°C. Setelah dingin, larutan divortex dan dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometri Uv-Visible pada panjang gelombang 660 nanometer. Uji aktivitas antiinflamasi

dilakukan sebanyak tiga kali replikasi.

7) Perhitungan Persentase Penghambatan Denaturasi Protein

Persentase penghambatan denaturasi protein diukur dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi larutan uji}}{\text{absorbansi kontrol negatif}} \times 100\%$$

Senyawa yang menghambat denaturasi protein lebih besar dari 20% dianggap memiliki sifat antiinflamasi dan dapat digunakan sebagai nilai acuan untuk pengembangan obat (Williams *et al.*, 2008).

8) Perhitungan Persentase Nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} dihitung dengan membuat persamaan regresi linear antara konsentrasi (X) dengan % inhibisi (Y). Sehingga didapatkan nilai IC_{50} dari gel ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa*) dan Natrium Diklofenak.

9) Analisa data

Data yang diperoleh dianalisis dengan uji Shapiro-Wilk untuk melihat distribusi data dan analisis dengan uji Levene untuk melihat homogenitas data. Jika data normal dan homogenitas maka dilanjutkan dengan uji Analisa Varians (ANOVA) satu arah dengan taraf kepercayaan sehingga dapat diketahui apakah perbedaan yang diperoleh bermakna atau tidak. Jika data normal dan tidak homogenitas dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis (Santoso, 2007).