

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan hewan uji yaitu tikus putih jantan galur Wistar sebagai hewan percobaan. Untuk pengujian gastroprotektif menggunakan etanol 80%.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: gunting bedah, penangas air, labu ukur, kandang individual hewan, batang pengaduk, sonde oral mencit, spuit 1 mL, neraca analitik, erlenmeyer, *rotary* evaporator, tabung reaksi, gelas beaker serta alat - alat gelas yang dapat digunakan di laboratorium.

3.2.2 Bahan

Bahan yang dipakai pada penelitian ini adalah daun *C. costata*, omeprazole 20 mg dalam bentuk kapsul, etanol 70% dan 80%, PGA 1%, dan aquadest.

3.2.3 Hewan Uji

Hewan uji yang di gunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.) galur Wistar yang di dapatkan dari Mitra Putra Animal Rancaekek Bandung dengan bobot tikus antara 150 – 250 gram dengan usia 8-12 minggu.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian kali ini yaitu Ekstrak etanol daun *C. costata* dengan menggunakan beberapa dosis kelompok yang berbeda (D₁ D₂ dan D₃).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu tukak lambung dan penentuan pH lambung dan volume cairan lambung terhadap tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi etanol 80%.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol yang digunakan pada penelitian ini yaitu bobot tikus, volume pemberian, jenis kelamin, usia tikus.

3.3.4 Definisi Operasional Variabel

Berikut tabel definisi operasional variabel pada penelitian ini, yaitu:

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
1	Variabel bebas dosis Ekstrak daun <i>C. costata</i>	6 kelompok perlakuan dengan menggunakan penginduksi dan 3 kelompok varian dosis Ekstrak daun <i>C. costata</i> .	-	Nominal	1. Kontrol normal menggunakan aquadest 2. K - = Kontrol negatif etanol 1 ml 80% Peroral 3. K + = kontrol positif omeprazole 20 mg/kg Peroral diinduksi etanol 4. Kelompok

					ekstrak dengan 3 dosis diinduksi etanol
2	Variabel Terikat	tukak lambung dan penentuan pH lambung dan volume cairan lambung terhadap model tikus ulcer	Sentrifugasi, pH meter.	Rasio	angka dalam pH meter

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekstrak dengan Metode Maserasi

Siapkan 2 kg serbuk simplisia daun *C. costata* dan tempatkan pada wadah untuk perlakuan ekstraksi menggunakan metode maserasi yaitu dengan pelarut etanol 70% dalam waktu secara triplo dalam 24 jam. Penggunaan etanol 70% pada proses ekstraksi dikarenakan etanol 70% merupakan pelarut polar, dimana dapat memisahkan berbagai senyawa polar sampai non polar, jika semakin tinggi konsentrasi pada etanol, maka semakin kurang tingkat kepolaran pada pelarut (Surya & Luhurningtyas, 2021). Kemudian maserat tersebut ditampung dengan alat *rotary evaporator* untuk diuapkan dengan suhu 50°C hingga mengental. Pemilihan suhu 50°C dilakukan karena titik didih etanol yakni 78°C. Kemudian dilakukan perhitungan rendemen untuk mengetahui persentase pada bahan tersisa dari proses ekstraksi serta

mengetahui tingkat efektif pada proses yang dihasilkan dengan perhitungan persentasi rendemen sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100$$

3.4.2 Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Uji

Tikus pada penelitian ini yaitu tikus putih jantan galur wistar. Tikus penelitian umumnya menggunakan tikus jantan dikarenakan tidak mengalami siklus estrus seperti tikus betina sehingga hasil penelitian lebih stabil. Selain itu, alasan penggunaan galur wistar karena cepatnya proses metabolisme nya sehingga kesensitifan nya pun tinggi jika digunakan pada penelitian yang berkaitan dengan metabolisme tubuh (Lahamendu *et al.*, 2019).

Sebanyak 24 ekor dibagi menjadi 6 kelompok dan setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Adapun pengelompokan dan perlakuan hewan uji dapat dilihat pada tabel sebagai berikut:

Tabel 1.2 Pengelompokan Hewan Uji

No	Kelompok	Perlakuan
I.	Kontrol Normal	Diberikan aquadest selama 15 hari secara per-oral
II.	Kontrol Negatif	Diberikan makan dan minum selama 15 hari kemudian diinduksi 1 mL etanol 80% pada hari ke-15
III.	Kontrol Positif	Diberikan 20 mg / kg omeprazole selama 14 hari secara per-oral & di diinduksi 1 mL etanol 80% pada hari ke-15
IV.	Ekstrak Etanol Dosis 1	Diberikan ekstrak etanol <i>C. costata</i> dengan dosis 50 mg / kg BB selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi dengan 1 mL etanol 80% selama 15 hari

V.	Ekstrak Etanol Dosis 2	Diberikan ekstrak etanol <i>C. costata</i> dengan dosis 50 mg / kg BB selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi dengan 1 mL etanol 80% selama 15 hari
VI.	Ekstrak Etanol Dosis 3	Diberikan ekstrak etanol <i>C. costata</i> dengan dosis 200 mg / kg BB selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi dengan 1 mL etanol 80% selama 15 hari

3.5 Pengamatan Hasil Penelitian

3.5.1 Pengujian Tukak Lambung

Tikus dipuasakan makanan dengan lama 18 jam dengan tetap diberi minum. Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok dengan masing - masing kelompok terdiri dari kontrol negatif, kontrol normal, kontrol positif dan kelompok ekstrak etanol diberikan dosis (D1, D2 dan D3) secara oral. Kemudian 1 jam setelah dilakukan semua dosis, semua kelompok ekstrak *C. costata* dan kontrol positif diberikan 1 mL etanol 80%. Alasan pemilihan etanol 80% sebagai induksi dikarenakan etanol 80% memiliki nilai indeks ulkus tertinggi dimana adanya kondisi tidak normal pada sel - sel mukosa lambung dengan tanda adanya terjadi inflamasi (Saputri, FC., Sari, SP., & Mun'im, A., 2008). Setelah 15 hari pemberian ekstrak etanol, hewan dimatikan dengan metode dislokasi leher. Bedah abdominal tikus kemudian ikat pilorus serta esophagus et cardia. Potong duodenum bagian atas dan esophagus untuk mengeluarkan lambung. Selanjutnya dilanjutkan dengan mengamati mukosa lambung.

3.5.2 Pengamatan Tukak Lambung

Bersihkan terlebih dahulu lambung yang sudah dilakukan pembedahan. Lalu amati menggunakan kaca pembesar atau lup untuk melihat mukosa lambung. Tentukan skor jumlah tukak lambung (Tabel 3.2) dan keparahan tukak (Tabel 3.3) (Sukandar *et al.*, 2014) :

Tabel 3.3 Skor Jumlah Tukak

Skor	Parameter Jumlah Tukak
1	Normal
2	Bintik Pendarahan
3	Jumlah 1 - 3
4	Jumlah 4 - 6
5	Jumlah 7 - 9
6	Jumlah > 9 atau perforasi

Tabel 3.4 Skor Keparahan Tukak

Skor	Parameter Keparahan Tukak
1	Normal
2	Bintik Pendarahan
3	Peradangan Ringan
4	Peradangan Sedang
5	Pendarahan Berat
6	Perforasi / Seluruh area mukosa mengalami pendarahan

Untuk menentukan nilai Indeks tukak dapat digunakan rumus sebagai berikut (Elisma *et al.*, 2021):

$$IT = RSJT + RSPT + 0,1 PT$$

Keterangan :

IT : Indeks tukak

RSJT : Rata-rata skor jumlah tukak tiap kelompok perlakuan

RSPT : Rata-rata skor keparahan tukak tiap kelompok perlakuan

PT : Persentase hewan terkena tukak dalam tiap kelompok perlakuan

Untuk menentukan nilai Persentase inhibisi dapat digunakan rumus sebagai berikut (Elisma *et al.*, 2021) :

$$\% \text{ Inhibisi} : \frac{IT \text{ kontrol} - IT \text{ uji}}{IT \text{ kontrol}} \times 100\%$$

3.5.3 pH Lambung dan Volume Cairan Lambung

Tampung cairan lambung yang diperoleh dari lambung tikus, kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit. Catat dan ukur volume supernatan yang dihasilkan. Kemudian, cairan lambung diencerkan dengan 1 mL aquadest dan ukur pH yang dihasilkan oleh cairan lambung tersebut menggunakan pH meter (Mohemmad *et al.*, 2024).

3.6 Skrining Fitokimia

Berikut adalah langkah-langkah skrining fitokimia pada simplisia daun *C. costata*:

3.6.1 Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 10 g serbuk simplisia dicampur dengan 10 ml etanol, lalu dipanaskan selama 10 menit. Campuran tersebut disaring panas menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh kemudian

dilakukan pengenceran dengan 10 mL aquadest. Setelah dingin, ditambahkan 5 mL eter lalu kocok perlahan dan dibiarkan sesaat hingga terbentuk lapisan. Lapisan etanol diambil, lalu penguapan pada suhu 40°C. Sisa hasil penguapan dilarutkan dalam 5 mL etil asetat kemudian dilakukan penyaringan. Filtrat yang dihasilkan digunakan sebagai larutan uji flavonoid. Untuk uji flavonoid, sebanyak 1 mL larutan uji dilakukan penguapan sampai kering, sisa yang tertinggal dilarutkan kembali dalam 2 mL etanol 96%, kemudian ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium & 10 tetes HCl 2N (Dasopang, 2017).

3.6.2 Pemeriksaan Glikosida Antarkuinon

Serbuk simplisia dimasukkan ke dalam gelas beaker, kemudian penambahan etanol hingga sampel terendam sepenuhnya. Selanjutnya, penambahan 2 mL larutan FeCl₃ 1% dan asam klorida pekat hingga larutan mencapai pH asam. Campuran tersebut dipanaskan selama 30 menit. Setelah larutan mendingin, masukan ke dalam corong pisah dan tambah 10 mL benzen lalu dilakukan pengocokan. Setelah itu, ditambahkan 2 ml larutan NaOH 2N dan dibiarkan. Munculnya warna merah pada lapisan NaOH mengindikasikan keberadaan glikosida antrakuinon (Dasopang, 2017).

3.6.3 Pemeriksaan Saponin

Masukan simplisia ke dalam gelas beaker lalu tambah air panas. Dilakukan pendinginan pada larutan lalu dikocok dengan kuat selama sekitar 10 detik. Jika adanya busa stabil dengan ketinggian antara 1 cm hingga 10 cm yang bertahan selama kurang lebih 10 menit serta tidak hilang setelah penambahan 2 tetes asam klorida 2 N, hal ini mengindikasikan keberadaan saponin (Kaidun *et al.*, 2022).

3.6.4 Pemeriksaan Tannin

Sebanyak 1 g serbuk simplisia dengan 10 mL aquadest direbus dengan waktu 15 menit, lalu dilakukan pendinginan serta disaring. Filtrat yang dihasilkan kemudian dilakukan pengenceran hingga hampir tidak berwarna, lalu ditambahkan 1 - 2 tetes larutan FeCl_3 1 % dengan perubahan warna biru-kehitaman (Kaidun *et al.*, 2022).

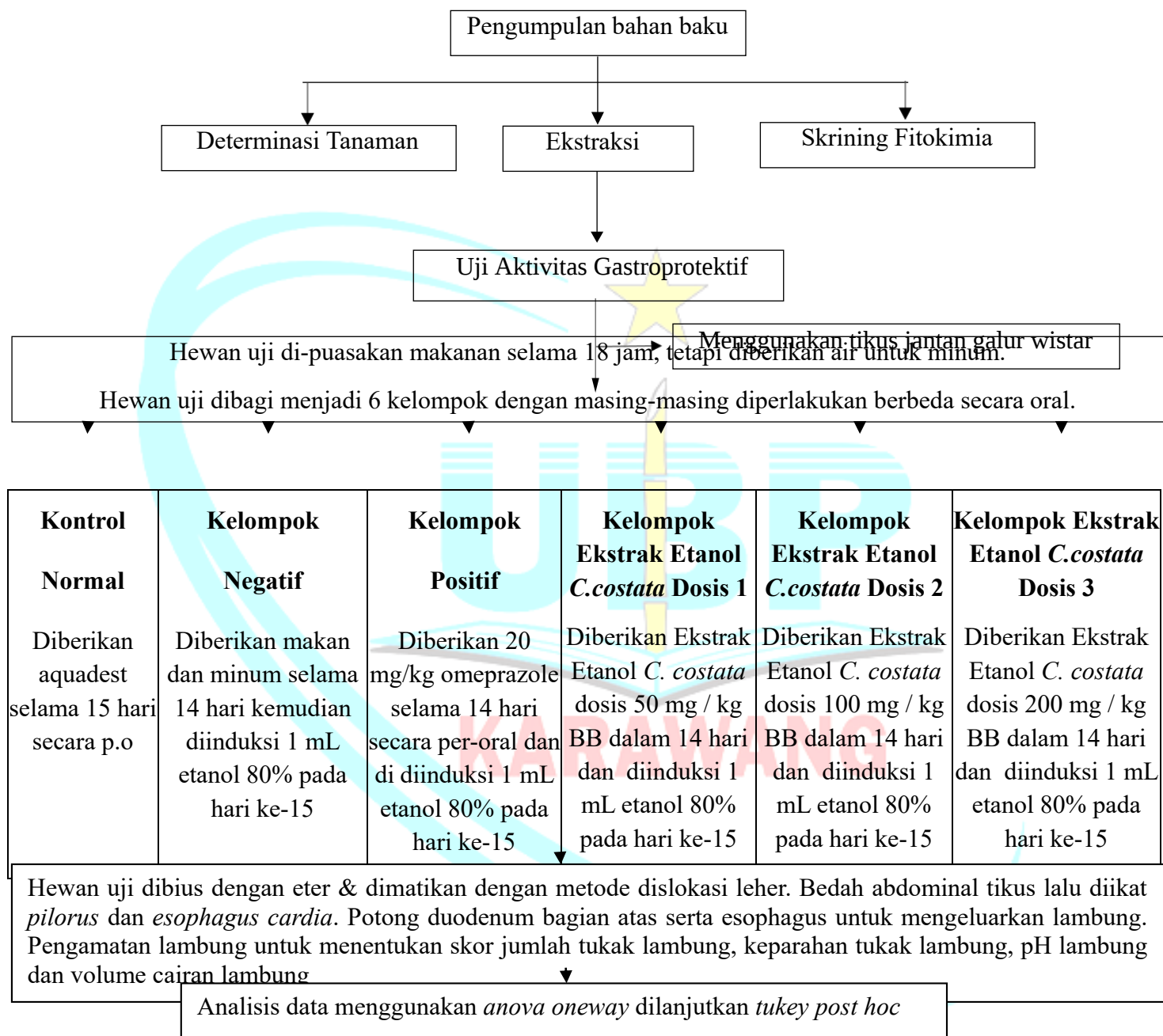
3.6.5 Pemeriksaan Steroid dan Triterpenoid

Sampel diberi tambahan eter lalu digerus kemudian dikocok serta diaman, setelah itu dipipet serta dilakukan penyaringan. Filtrat dilakukan penguapan eter nya lalu residunya diberi tambahan pereaksi Lieberman - Bouchard dan diamati warnanya. Senyawa steroid dapat dilihat dengan membentuknya warna biru - hijau, kemudian senyawa triterpenoid dapat dilihat dengan membentuknya warna ungu (Kaidun *et al.*, 2022).

3.6.6 Pemeriksaan Alkaloid

Serbuk simplisia ditambah 0,5 g NaCl kemudian dilakukan pengadukan serta saring. Filtrat yang didapat kemudian ditambahkan HCl 2M sebanyak 3 tetes, lalu dilakukan pemisahan menjadi 4 bagian (A, B, C, D). Pada Filtrat A digunakan sebagai blanko, filtrat B ditambah pereaksi mayer, filtrat C ditambahkan pereaksi dragendorff, serta filtrat D sebagai uji penegasan. Jika adanya pembentukan endapan putih hingga kekuningan pada pereaksi mayer dan endapan merah hingga jingga pada pereaksi, maka teridentifikasi ada alkaloid. Uji penegasan dengan menambahkan ammonia 25 % pada filtrat sampai PH 8 - 9 (Fajrin & Susila, 2019).

3.7 Alur Penelitian



Gambar 1.1 Alur Penelitian

3.8 Analisis Data

Hasil penelitian di tampilkan sebagai nilai rata-rata SEM pengujian statistika menggunakan oneway analisis variansi (ANOVA) di lakukan untuk menentukan perbedaan nilai rata-rata antara kelompok perlakuan. Kemudian di lakukan

pengujian tukey post hoc untuk menentukan apakah terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) pada masing - masing kelompok (Alkandahri *et al.*, 2021).

3.9 Jadwal Kegiatan

Berikut adalah jadwal kegiatan yang telah di rancang, yakni sebagai berikut :

Tabel 3.5 Jadwal Kegiatan Penelitian

Kegiatan	Bulan ke -				
	1	2	3	4	5
Studi literatur					
Penulisan proposal					
Seminar proposal					
Pelaksanaan penelitian					
Pengolahan dan analisis data					

3.10 Lokasi Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Universitas Buana Perjuangan Karawang, pada bulan Maret - Mei, 2025.