

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental Laboratorium dengan menggunakan hewan uji berupa model tikus ulcer sebagai hewan percobaan. Pengujian gastroprotektif digunakan omeprazol dengan dosis sebesar 20 mg/kg.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan :

1. Alat

Alat yang digunakan yaitu kandang individual hewan, corong pisah 1000 ml, kaca arloji, gelas beker 250 mL, sonde oral tikus, spuit 1 ml, gunting bedah, pisau bedah, pinset, neraca analitik, erlenmeyer 250 mL, pengaduk kaca, *rotary evaporator*, penangas air,

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun *C. Costata*, omeprazol 20 mg dalam bentuk kapsul, etanol 80%, PGA 1%, Etanol 70%, dan etil asetat, aquadest.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu model tikus ulcer dengan berat badan tikus antara 150-250 gram, dan usia 8 hingga 12 minggu.

3.3 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat *C. Costata* yang diberikan dalam berbagai variasi dosis (D1, D2, dan D3).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu tukak lambung dan penentuan pH lambung dan volume cairan lambung terhadap model tikus ulcer yang diinduksi etanol 80%.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini meliputi berat badan tikus, volume pemberian, jenis kelamin, usia tikus, dan jenis makanan yang digunakan.

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 3. K + = kontrol positif omeprazol 20 mg/kg Peroral

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
					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 yang diinduksi etanol 80%.	Sentrifugasi, pH meter.	Rasio	angka dalam pH meter

3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Proses Pembuatan Ekstrak dengan Metode Maserasi

Simplisia daun *C. costata* berbentuk serbuk dimasukkan ke dalam wadah untuk diekstraksi menggunakan metode maserasi. Proses maserasi dilakukan dengan pelarut etanol 70% selama 3 hari (3x24 jam). Larutan hasil maserasi dikumpulkan, dan pelarutnya diuapkan menggunakan *Rotary Evaporator* pada suhu 50°C hingga menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak ini kemudian dipanaskan kembali di *water bath* pada suhu 40°C untuk menghasilkan ekstrak kental yang optimal. Rendemen ekstrak yang diperoleh dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Rendemen Ekstraksi} = \frac{\text{Bobot Ekstraksi}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100 \%$$

2. Pembuatan Fraksi Etil Asetat Daun *C. Costata*

Ekstrak kental atau cair dari daun *C. costata* yang diperoleh kemudian diproses lebih lanjut melalui fraksinasi cair-cair menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran berbeda, yaitu pelarut non-polar (n-heksan), semi-polar (etil asetat), dan polar (air). Ekstrak sebagian ditimbang dan dilarutkan dalam n-heksan di dalam corong pisah. Larutan tersebut dibiarkan hingga terbentuk lapisan terpisah. Proses ini diulang beberapa kali hingga diperoleh lapisan n-heksan yang jernih.. Lapisan tersebut dikumpulkan dalam wadah terpisah. Residu yang tertinggal dari tahap ini digunakan untuk fraksinasi selanjutnya dengan pelarut semi-polar, etil asetat. Residu ditambahkan dengan etil asetat, kemudian dibiarkan hingga terbentuk lapisan etil asetat yang jernih. Proses ini diulang beberapa kali, dan hasil lapisan jernih yang diperoleh dipisahkan.

Tahap terakhir menggunakan residu yang tersisa untuk fraksinasi dengan pelarut polar, yaitu air. Residu tersebut dikocok hingga terbentuk lapisan air yang jernih. Cairan dari masing-masing fraksi pelarut (n-heksan, etil asetat, dan air) kemudian diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* untuk menghasilkan fraksi kental.

$$\% \text{ Rendemen Fraksi} = \frac{\text{Bobot Fraksi etil asetat}}{\text{Berat Ekstrak}} \times 100 \%$$

3. Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Uji

Pada penelitian ini tikus yang digunakan yaitu model tikus ulcer 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 3.2 Pengelompokan Hewan Uji

	Kelompok	Perlakuan
I.	Kontrol Normal	Diberikan 1 mL air selama 14 hari secara per-oral.
II.	Kontrol Negatif	Diberikan 1 mL etanol 80% selama 14 hari secara per-oral.
III.	Kontrol Positif	Diberikan 20 mg/kg omeprazol selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi dengan 1 mL etanol 80% pada hari ke 15.
IV.	Fraksi Etil Asetat Dosis 1	Diberikan ekstrak <i>C. costata</i> dengan Dosis 1 selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi dengan 1 mL etanol 80% pada hari ke 15.
V.	Fraksi Etil Asetat Dosis 2	Diberikan ekstrak <i>C. costata</i> dengan Dosis 2 selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi dengan 1 mL etanol 80% pada hari ke 15.
VI.	Fraksi Etil Asetat Dosis 3	Diberikan ekstrak <i>C. costata</i> dengan Dosis 3 selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi dengan 1 mL etanol 80% pada hari ke 15.

3.5 Hasil Pengamatan

1. Pengujian Tukak Lambung

Tikus dipuasakan dari makanan selama 18 jam, namun tetap diberikan akses air minum. Hewan uji dibagi menjadi enam kelompok, yaitu kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, dan tiga kelompok yang menerima fraksi etil asetat dengan dosis berbeda (D1, D2, dan D3) secara oral. Satu jam setelah pemberian

sediaan uji, semua kelompok yang menerima ekstrak *C. costata* dan kontrol positif diberikan 1 mL etanol 80%. Setelah 14 hari perlakuan dengan fraksi etil asetat, tikus dibius terlebih dahulu menggunakan eter. Kemudian, tikus dimatikan menggunakan metode dislokasi leher. Selanjutnya, dilakukan pembedahan abdomen dan pengikatan pilorus serta esofagus dekat kardia. Duodenum bagian atas dan esofagus dipotong untuk mengeluarkan lambung, yang kemudian diamati kondisi mukosanya.

2. Pengamatan Tukak Lambung

Dibersihkan terlebih dahulu lambung yang telah dibedah, lalu amati menggunakan kaca pembesar atau lup untuk melihat mukosa lambung. Perlu ditentukan skor jumlah tukak lambung (**Tabel 3.2**) dan keparahan tukak (**Tabel 3.3**) (Elisma *et al.*, 2021) :

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 Keparahannya Tukak

Skor	Parameter Keparahannya 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 yang terkena tukak dalam tiap kelompok perlakuan

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

$$\% inhibisi = \frac{IT kontrol - IT uji}{IT kontrol} \times 100\%$$

3. pH Lambung dan Volume Cairan Lambung

Cairan lambung yang diperoleh dari lambung tikus ditampung ke dalam tabung reaksi selanjutnya, cairan tersebut disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit. Volume supernatan yang dihasilkan kemudian dicatat dan diukur. Setelah itu, cairan lambung diencerkan dengan 1 mL akuadest dan pH-nya diukur menggunakan pH meter (Mohemmad *et al.*, 2024).

3.6 Skrinning Fitokimia

3.6.1 Pemeriksaan Alkaloid

Identifikasi alkaloid dilakukan menggunakan metode Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia dicampur dengan 20 ml larutan HCl 2N, kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit. Setelah didinginkan, larutan disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi tiga bagian, kemudian masing-masing bagian diberi pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff (Dasopang, 2017).

3.6.2 Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 10 g serbuk simplisia dicampur dengan 10 ml etanol, lalu direfluks selama 10 menit. Campuran tersebut disaring panas menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh kemudian diencerkan dengan 10 ml aquadest. Setelah dingin, ditambahkan 5 ml eter minyak tanah, dikocok perlahan, dan dibiarkan sesaat hingga terbentuk lapisan. Lapisan etanol diambil, lalu diuapkan pada suhu 40°C. Sisa hasil penguapan dilarutkan dalam 5 ml etil asetat dan disaring. Filtrat yang dihasilkan digunakan sebagai larutan uji flavonoid. Untuk uji flavonoid, sebanyak 1 ml larutan uji diuapkan hingga kering, sisa yang tertinggal dilarutkan kembali dalam 2 ml etanol 96%, lalu ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 10 tetes HCl pekat (Dasopang, 2017).

3.6.3 Pemeriksaan Glikosida Antrakuinon

Sebanyak 10 g ekstrak etanol dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan etanol hingga sampel terendam sepenuhnya. Selanjutnya, ditambahkan 2 ml larutan FeCl_3 1% dan asam klorida pekat hingga larutan mencapai pH asam. Campuran tersebut direfluks selama 30 menit setelah mulai mendidih. Setelah larutan mendingin, dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 10 ml benzen, lalu dikocok. Setelah itu, ditambahkan 2 ml larutan NaOH 2N dan dibiarkan. Munculnya warna merah pada lapisan NaOH mengindikasikan keberadaan glikosida antrakuinon (Dasopang, 2017).

3.6.4 Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Sebanyak 10 g ekstrak etanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas. Larutan tersebut didinginkan dan dikocok dengan kuat selama sekitar 10 detik. Jika terbentuk buih 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 2N, hal ini mengindikasikan keberadaan saponin (Kaidun *et al.*, 2022).

3.6.5 Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 10 g ekstrak etanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas. Setelah didinginkan, campuran tersebut dikocok kuat selama sekitar 10 detik. Jika terbentuk buih stabil setinggi 1 cm hingga 10 cm yang bertahan selama kurang lebih 10 menit dan tidak menghilang setelah penambahan 2 tetes asam klorida 2N, hal ini menunjukkan adanya saponin (Kaidun *et al.*, 2022).

3.6.6 Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 1 g serbuk simplisia direbus dalam 10 ml aquadest selama 15 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang dihasilkan diencerkan hingga hampir tidak berwarna, lalu ditambahkan 1-2 tetes larutan FeCl_3 1% (Kaidun *et al.*, 2022).

3.7 Analisis Statistika

Data dinyatakan sebagai rata-rata $\pm$ standar error mean (SEM), dan analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism versi 10.4.0. Perbandingan antar kelompok perlakuan dianalisis dengan ANOVA satu arah, yang kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* Tukey. Hasil dianggap signifikan secara statistik jika nilai p kurang dari 0,05 (Mohemmad *et al.*, 2024).

3.8 Jadwal Kegiatan

Tabel 3.5 Jadwal Kegiatan

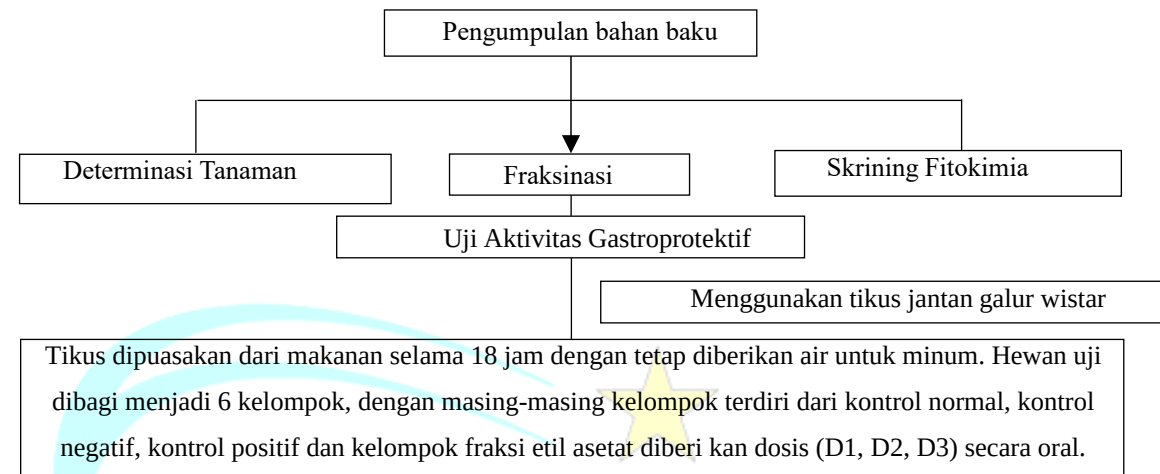
Kegiatan	Bulan ke-									
	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul	
Studi literatur										
Penulisan proposal										
Seminar proposal										
Pelaksanaan penelitian										
Pengolahan dan analisis data										
Penulisan laporan dan atau publikasi										

3.9 Lokasi Kegiatan

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

KARAWANG

3.10 Alur Penelitian



Kontrol Normal	Kelompok Negatif	Kelompok Positif	Kelompok Fraksi Etil Asetat Dosis 1	Kelompok Fraksi Etil Asetat Dosis 2	Kelompok Fraksi Etil Asetat Dosis 3
Diberi air 1 ml selama 14 hari secara Per - oral	Di berikan 1 ml Etanol 80% selama 15 hari secara per – oral	Di berikan 20 mg/kg Omeprazol selama 14 hari secara per – oral dan diinduksi dengan 1 ml Etanol 80% selama 15 hari	Di berikan Ekstrak <i>C.costata</i> dengan dosis 1 selama 14 hari secara per – oral dan diinduksi dengan 1 ml Etanol 80% selama 15 hari	Di berikan Ekstrak <i>C.costata</i> dengan dosis 2 selama 14 hari secara per – oral dan diinduksi dengan 1 ml Etanol 80% selama 15 hari	Di berikan Ekstrak <i>C.costata</i> dengan dosis 3 selama 14 hari secara per – oral dan diinduksi dengan 1 ml Etanol 80% selama 15 hari

Setelah 15 hari pemberian fraksi etil asetat, hewan dimatikan dengan metode dislokasi leher, bedah abdonimal tikus, kemudian ikat pilorus dan *esophagus cardia*. Potong duodenum bagian atas dan *esophagus* untuk mengeluarkan lambung. Selanjutnya dilanjutkan dengan pengamatan mukosa lambung untuk menentukan skor jumlah tukak lambung. Keparahan tukak serta pH lambung dan volume cairan lambung

Analisis data menggunakan anova *oneway* di lanjutkan *tukey post hoc*

