

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan hewan uji tikus putih jantan galur Wistar sebagai hewan percobaan dan etanol 80% sebagai penginduksi pada uji efek gastroprotektif dengan melakukan pengamatan pada mukosa lambung untuk menentukan skor jumlah tukak lambung, keparahan tukak serta pH lambung dan volume cairan lambung.

3.2. Alat dan bahan

3.2.1 Alat

Alat yang dipakai pada penelitian ini adalah kandang individual hewan, sonde oral tikus, spuit 1 mL, gunting bedah, neraca analitik, erlenmeyer 250 mL, labu ukur 10-100 mL, batang pengaduk, *rotary evaporator*, penangas air, *freeze dryer*, tabung reaksi, gelas beaker 250 mL, kaca pembesar, sentrifugasi, gunting bedah dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis.

3.2.2 Bahan

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

3.2.3 Hewan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih jantan galur Wistar yang dengan bobot tikus antara 150-250 gram dan usia 8-12 minggu.

3.3. Variabel penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu menggunakan fraksi air daun *C. costata* dengan beberapa dosis yang berbeda-beda (D_1 , D_2 dan D_3).

3.3.2 Variabel Terikat

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

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu bobot tikus, volume pemberian, jenis kelamin, dan 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	6 kelompok perlakuan	-	Nominal	1. Kontrol normal = 1 mL air.
	Dosis	dengan			2. Kontrol negatif = 1 mL Etanol 80%.
	fraksi air	menggunakan			3. Kontrol positif = Dosis omeprazole 20 mg/kg.
	daun <i>C. costata</i>	an air, etanol 80%, omeprazole			4. D_1 = Kelompok terapi dosis 1.
		, Kelompok Fraksi air <i>C. costata</i> dengan dosis yang bervariasi			5. D_2 = Kelompok terapi dosis 2.
					6. D_3 = Kelompok terapi dosis 3.

2	Variabel	Mengukur	Lup / Interval	Parameter jumlah
	terikat	jumlah	kaca	tukak :
	tukak	tukak	pembsa	1. Normal = skor 1
	lambung	lambung	r	2. Bintik pendarahan = skor 2
	dan	dan		3. Jumlah tukak 1-3 = skor 3
		keparahan		4. Jumlah tukak 4-6 = skor 4
		tukak		5. Jumlah tukak 7-9 = skor 5
		lambung.		6. Jumlah >9 / perforasi = skor 6
				Parameter keparahan tukak:
				1. Normal = skor 1
				2. Bintik pendarahan = skor 2
				3. Peradangan ringan = skor 3
				4. Peradangan sedang = skor 4
				5. Peradangan berat = skor 5
				6. Perforasi / seluruh area mukosa mengalami pendarahan = skor 6

pH	Mengukur	pH	Interval	pH dan mL
lambung	pH	meter		
dan	lambung	dan		
Volume	dan Volume	tabung		
cairan	cairan	reaksi		
lambung	lambung			

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 dengan pelarut etanol 70% dalam waktu 3x24 jam. Kemudian hasil maserat ditampung dan dimasukkan ke alat *rotary evaporator* untuk diuapkan pelarutnya dengan suhu 50°C hingga kental dan kembali dipanaskan pada waterbath pada suhu 50°C sehingga dihasilkan ekstrak kental. Dihitung % rendemen ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

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

3.4.2 Pembuatan Fraksi Air Daun *C. costata*

Ekstrak kental/air daun *C. costata* yang didapat, dilanjutkan dengan fraksinasi cair-cair dilakukan dengan menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda yaitu menggunakan pelarut non polar seperti *n*-heksan, pelarut semi polar seperti etil asetat dan pelarut polar seperti air. Setengah ekstrak *C. costata* ditimbang kemudian dilarutkan dalam *n*-heksan di dalam corong pisah, kemudian dibiarkan hingga terbentuk pemisahan lapisan dan perlakuan tersebut diulangi hingga beberapa kali sampai didapatkan suatu hasil lapisan *n*-heksan yang jernih, lalu dikumpulkan disuatu wadah. Residu yang tersisa digunakan untuk fraksinasi dengan pelarut

semi polar yaitu etil asetat. Residu tersebut ditambahkan dengan etil asetat dan dibiarkan hingga terbentuk lapisan etil asetat dan perlakuan dilakukan berulang kali hingga mendapatkan hasil lapisan etil asetat yang jernih, kemudian dipisahkan. Residu yang diperoleh digunakan untuk fraksinasi dengan pelarut polar yaitu air. Residu dikocok dan dibiarkan hingga terbentuk lapisan air yang jernih. Kemudian fraksi cair dari masing-masing pelarut dikeringkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan fraksi serbuk.

$$\% \text{ Rendemen Fraksi} = \frac{\text{Bobot Fraksi Air}}{\text{Bobot Ekstrak}} \times 100\%$$

3.4.3 Skrining Fitokimia

1. Pemeriksaan Alkaloid

Sampel pada proses diawali dengan penambahan ammonia untuk membasakan sampel, diikuti dengan penambahan kloroform, lalu digerus dengan kuat. Lapisan kloroform dipipet dan disaring, kemudian ditambahkan asam klorida 2 N. Campuran tersebut dikocok kuat hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam dipipet dan dibagi menjadi tiga bagian. Bagian pertama digunakan sebagai kontrol, bagian kedua diberi pereaksi Mayer jika terbentuk kekeruhan atau endapan putih, menunjukkan keberadaan alkaloid. Bagian ketiga ditambahkan pereaksi Dragendorff jika terbentuk kekeruhan atau endapan berwarna kuning hingga jingga, menunjukkan adanya alkaloid (Farnsworth, 1966).

2. Pemeriksaan Flavonoid

Warna lapisan amil alkohol diamati setelah campuran dikocok kuat. Setelah proses penyaringan, larutan yang dihasilkan diberi serbuk magnesium dan asam klorida 5 N. Filtrat disaring kembali setelah dipanaskan dengan penambahan air. Senyawa flavonoid teridentifikasi

melalui perubahan warna lapisan amil alkohol menjadi kuning hingga merah yang bisa ditarik oleh amil alkohol (Farnsworth, 1966).

3. Pemeriksaan Saponin

Sampel ditambahkan air pada tabung reaksi lalu di panaskan pada penangas air dengan waktu 15 menit, kemudian saring dan dinginkan. Setelah sudah dingin, filtrat dikocok kuat secara vertikal selama 30 detik. Senyawa saponin ditandai dengan terbentuknya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang persisten dengan waktu beberapa menit serta tidak hilang juga sesudah ditambahkan asam klorida atau setelah didiamkan dengan waktu 20 menit (Farnsworth, 1966).

4. Pemeriksaan Tanin

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).

5. Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Sampel diberi tambahan eter lalu digerus kemudian dikocok serta didiamkan, 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).

6. Pemeriksaan Fenolik

pemeriksaan fenolik suatu ekstrak tanaman dilakukan dengan cara penambahan pereaksi FeCl_3 pada larutan ekstrak. Hasil memperlihatkan perubahan warna biru, hijau, ungu, atau hitam sebagai indikasi keberadaan senyawa fenolik (Kaidun et al., 2022).

3.4.4 Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Uji

Dalam penelitian ini, hewan uji (tikus) yang dipakai merupakan tikus putih jantan galur Wistar. Tikus yang digunakan berjumlah 24 ekor dan dibagi 4 ekor untuk digunakan dalam 6 kelompok.. Dosis fraksi air ekstrak *C.costata* yang dioralkan pada setiap kelompok perlakuan ditentukan melalui orientasi. Serbuk fraksi air daun *C. costata* dilarutkan menggunakan air serta PGA dan omeprazole dilarutkan menggunakan air dan PGA. Adapun pengelompokan dan perlakuan hewan uji dapat dilihat pada tabel sebagai berikut :

Tabel 3.2 Pengelompokan Hewan Uji

	Kelompok	Perlakuan
I.	Kontrol Normal	Hanya diberikan minum dan pakan selama 15 hari secara per-oral.
II.	Kontrol Negatif	Diberikan minum dan pakan selama 15 hari dan diinduksi etanol 80% sebanyak 1 ml pada hari ke-15.
III.	Kontrol Positif	Diberikan 20 mg/kg omeprazole selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi etanol 80% sebanyak 1 ml pada hari ke-15.
IV.	Fraksi Air Dosis 1	Diberikan Fraksi <i>C. costata</i> dengan Dosis 1 selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi etanol 80% sebanyak 1 ml pada hari ke-15.
V.	Fraksi Air Dosis 2	Diberikan Fraksi <i>C. costata</i> dengan Dosis 2 selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi etanol 80% sebanyak 1 ml pada hari ke-15.
VI.	Fraksi Air Dosis 3	Diberikan Fraksi <i>C. costata</i> dengan Dosis 3 selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi etanol 80% sebanyak 1 ml pada hari ke-15.

3.5. Pengamatan Hasil Penelitian

3.5.1 Pengujian Tukak Lambung

Tikus dipuasakan dari makanan selama 18 jam (hanya diberi minum). Pengelompokkan perlakuan dibagi menjadi 6 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok fraksi air diberikan dosis (D₁, D₂ dan D₃) secara oral. Satu jam setelah pemberian sediaan uji, semua kelompok ekstrak *C. costata* dan kontrol positif diberikan 1 mL etanol 80%. Setelah 14 hari pemberian fraksi air dan diinduksi etanol 80% sebanyak 1 mL, hewan uji dibius menggunakan eter dan dimatikan dengan metode dislokasi leher. Bedah abdominal tikus, kemudian ikat pilorus dan *esophagus et cardia*. Potong duodenum bagian atas dan *esophagus* untuk mengeluarkan lambung. Selanjutnya dilanjutkan dengan pengamatan mukosa lambung (Elisma *et al.*, 2021).

3.5.2 Pengamatan Tukak Lambung

Bersihkan terlebih dahulu lambung yang telah dibedah. 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	Pendarahan Ringan
4	Pendarahan 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

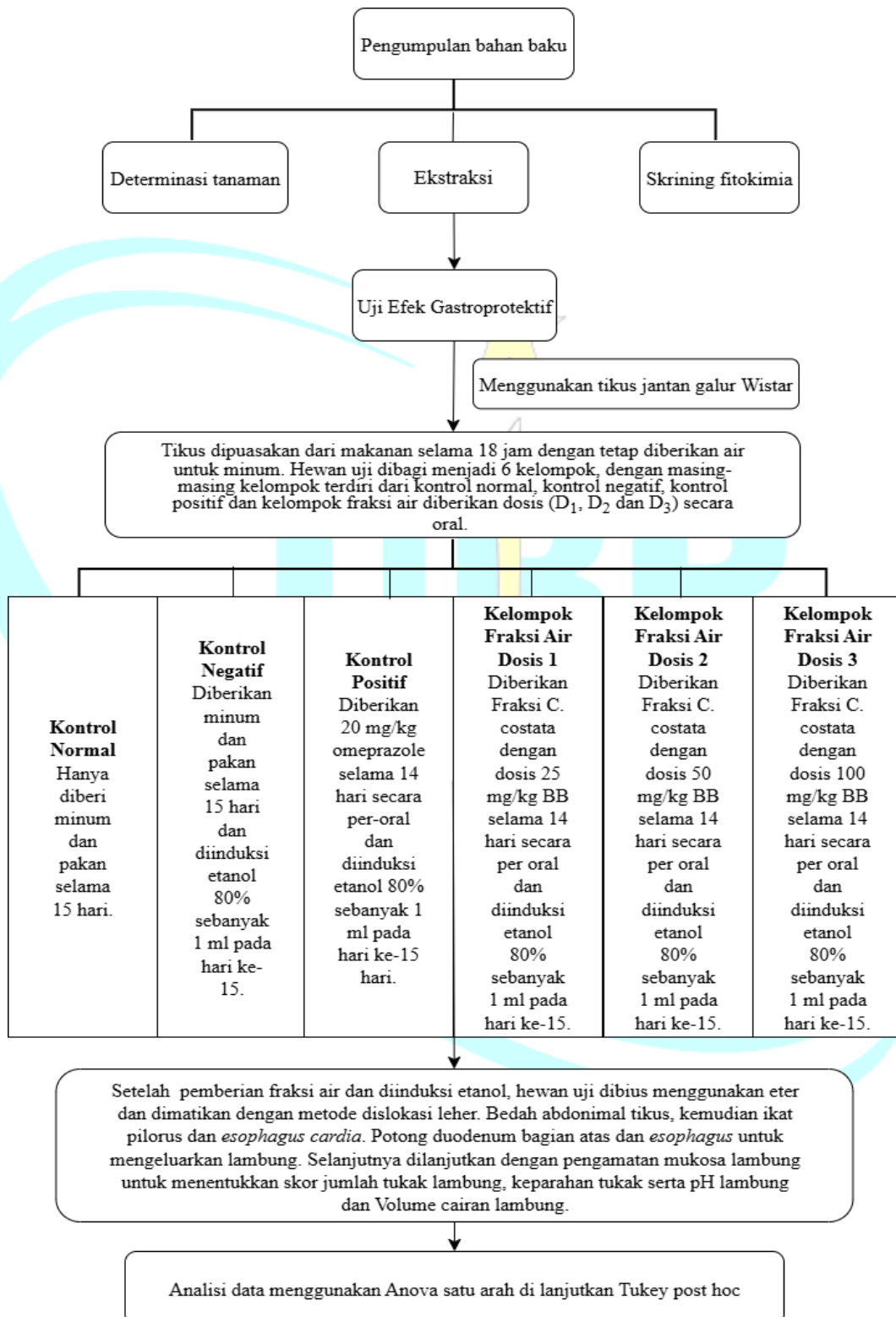
Untuk menentukan nilai Persentase inhibisi dapat digunakan rumus sebagai berikut (Elisma *et al.*, 2021) :

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

3.5.3 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 akuadest dan ukur pH yang dihasilkan oleh cairan lambung tersebut menggunakan pH meter (Mohammad *et al.*, 2024).

3.6. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.7. Analisis Statistika

Data dinyatakan sebagai rata-rata $\pm$ standar error mean (SEM), dan analisis statistik dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Graphpad Prism (Versi 10). ANOVA satu arah digunakan untuk membandingkan perbedaan antar kelompok perlakuan dan diikuti dengan uji Tukey post hoc. Hasilnya dianggap signifikan secara statistika jika nilai p adalah $<0,05$ (Mohemmad *et al.*, 2024).

3.8. Lokasi kegiatan

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

