

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorium dengan pendekatan true experimental yang melibatkan hewan coba tikus putih jantan galur Wistar. Desain penelitian dipilih untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak dan fraksi daun cep-cepan terhadap kerusakan histopatologi lambung yang diinduksi etanol 80%.

Metode induksi ulkus lambung dilakukan dengan pemberian etanol 80% secara oral untuk menghasilkan kerusakan mukosa lambung yang menyerupai kondisi ulkus. Setelah induksi, tikus dibagi ke dalam beberapa kelompok perlakuan yang meliputi kelompok kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, serta kelompok perlakuan dengan dosis ekstrak maupun fraksi daun cep-cepan. Penelitian ini memungkinkan adanya perbandingan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, sehingga dapat diketahui sejauh mana efek protektif maupun penyembuhan dari ekstrak dan fraksi daun cep-cepan terhadap jaringan lambung.

3.2 Alat dan Bahan

Berikut penelitian ini menggunakan berbagai alat dan bahan yang diperlukan untuk menunjang kelancaran proses penelitian diantaranya :

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kandang individual hewan, sonde oral mencit, spuit 1 ml, gunting bedah, pisau bedah, neraca analitik, kertas perkamen, rotary evaporator, penangas air, tabung reaksi, rak tabung reakti, gelas beker 250 mL, mikroskop, mikrotom, wadah embedding dan alat-alat gelas yang lazim digunakan dilaboratorium analisis.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu simplisia daun *C. Costata*, Etanol 70% untuk maserasi daun *C. Costata*. Etanol 80% (PT. Bratacho), aquadest (PT. Bratacho), Omeprazol 20mg dalam bentuk kapsul, PGA 1%.

3.2.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L) galur wistar yang didapatkan dari CV. Mitra Putra Animal Bandung dengan berat badan tikus antara 150-250 gram.

3.3 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan beberapa variabel untuk mempermudah pengamatan dan analisis. Variabel tersebut terdiri dari variabel bebas, variabel terikat, variabel terkendali dan definisi operasional variabel.

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini yaitu ekstrak dan fraksi daun *C Costata* dengan beberapa variasi dosis (D1, D2 dan D3).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat ini yaitu uji histopatologi dengan menghitung indeks ulcer lambung, perdarahan, nikosis dan inflamasi pada lambung.

3.3.3. Variabel Terkendali

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

3.4 Definisi Operasioanal Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini digunakan untuk menjabarkan secara jelas dan terukur bagaimana masing-masing variabel diidentifikasi, diukur dan dianalisis. Berikut ini tabel definisi operasional variabel .

Tabel 3. 1 Definisi Operasioanal Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
1	Variabel	kelompok		Nominal	1. Kontrol normal
	bebas	perlakuan	-		menggunakan aquadest
	dosis	dengan			kelompok perlakuan
	Ekstrak	menggunakan			dengan menggunakan
	dan Fraksi	penginduksi			penginduksi dan 3
	daun C.	dan	3		kelompok varian dosis
	<i>costata</i>	kelompok			Ekstrak daun C. <i>costata</i> .
	dosis	ekstrak			2. K Kontrolnegatif etanol
	atau	fraksi			1 ml 80% Peroral
	daun C. <i>costata</i>				3.K +positif omeperazole
					20 mg/kg Peroral
					diinduksi etanol kontrol.
					4.Kelompok
					ekstrak/fraksi dengan 3
					variasi dosis diinduksi etanol
2	Variabel	Pengamatan	Mikroskop, Rasio/		Skor histopatologi untuk
	terikat	jaringan	preparat	Ordinal	masing-masing
	berupa	lambung tikus	histologi		parameter: indeks ulkus,
	hasil uji	secara			perdarahan, nekrosis dan
	histopatologi	mikroskopis			inflamasi
	gi	setelah			
	lambung:	perlakuan dan			
	indeks	pewarnaan			
	ulkus,	preparat			
	perdarahan				
	ekrosis dan				
	inflamasi				

3.5 Prosedur Penelitian

Berikut adalah prosedur pada penelitian ini :

3.5.1 Proses Ekstraksi dan Fraksinasi

Untuk mengekstraksi serbuk simplisia daun *C. costata*, wadah diletakkan di atasnya dan etanol 70% digunakan selama tiga hari, atau tigakali sehari. Kemudian, masetar dimasukkan ke dalam tampung, dan pelarut dipanaskan dengan Rotary Evaporator pada suhu 50 °C hingga menjadi kental. Selanjutnya, pelarut dipanaskan kembali pada waterbath pada suhu 400 °C untuk menghasilkan ekstrak kental. Sebuah presentasi rendemen ekstrak dihitung :

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

Untuk memfraksinasi ekstrak daun Cep-cepan menggunakan metode cair-cair, beberapa pelarut dengan kepolaran yang berbeda digunakan. Ini termasuk pelarut non-polar, seperti n-heksan, pelarut semi-polar etil asetat, dan pelarut polar, air. Ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam pelarut etil asetat dalam corong pisah, lalu didiamkan hingga terjadi pemisahan. Proses ini diulangi hingga lapisan N-heksan bening terbentuk, dan fraksi etil asetat Untuk memfraksinasi pelarut polar, yaitu air, sisa yang dihasilkan dikocok dan didiamkan hingga terbentuk lapisan air bening. Setelah itu, fraksinasi cair dari masing-masing pelarut menggunakan freezy dryluntuk menghasilkan fraksinasi kental. Sebuah presentasi reendemen fraksi dihitung:

$$\text{Rendemen Fraksi} = \frac{\text{Bobot Fraksi yang diperoleh}}{\text{Boot Ekstrak}} \times 100 \%$$

3.5.2 Skrining Fitokomia

Berikut adalah penapisan skrining fitokimia ekstrak dan fraksi etanol daun *C.costata*:

1. Pemeriksaan Alkaloid

Proses dimulai dengan menambahkan amonia untuk mengalkalisasi sampel, diikuti dengan penambahan kloroform dan pengadukan yang intens. Kloroform yang terbentuk kemudian dipipet dan disaring, sebelum

ditambahkan asam klorida 2 N.

Campuran selanjutnya dikocok dengan kuat hingga terpisah menjadi dua lapisan. Lapisan asam dipipet dan dibagi menjadi tiga bagian. Bagian pertama berfungsi sebagai kontrol, bagian kedua diuji dengan reagen Mayer yang jika menimbulkan kekeruhan atau endapan putih, menandakan adanya alkaloid. Bagian ketiga dicampur dengan reagen Dragendorff yang jika menghasilkan kekeruhan atau endapan berwarna kuning sampai oranye, menunjukkan kehadiran alkaloid, (Farnsworth, 1966).

2. Pemeriksaan Flavonoid

Warna pada lapisan amil alkohol diamati setelah campuran dikocok dengan baik. Setelah penyaringan, larutan yang dihasilkan diberi serbuk magnesium dan asam klorida 5 N. Filtrat disaring kembali setelah dipanaskan dan ditambahkan air. Senyawa flavonoid dapat dikenali lewat perubahan warna pada lapisan amil alkohol menjadi kuning hingga merah yang bisa diekstraksi oleh amil alkohol, (Farnsworth, 1966).

3. Pemeriksaan Glikosida

Sampel dicampurkan dengan kombinasi etanol 70% dan air dalam perbandingan 7:3, serta asam klorida 2 N hingga semua bagian tertutup, kemudian dilakukan refluks selama satu jam. Setelah proses ini selesai dan sampel sudah dingin, dilakukan penyaringan. Cairan filtrat yang dihasilkan kemudian dicampurkan dengan air murni dan timbal (II) asetat 0,4 M, diaduk, dan dibiarkan hingga muncul endapan yang kemudian disaring. Filtrat yang dihasilkan selanjutnya dipisahkan menggunakan campuran kloroform dan isopropanol dalam rasio 2:3 dengan menggunakan corong pisah. Setelah dilakukan pengocokan, akan terbentuk dua lapisan: lapisan atas mengandung gula, sedangkan lapisan bawah berisi non-gula.

a. Lapisan atas

Dengan menambahkan air dan reagen Molish, lalu dengan hati-hati menambahkan asam sulfat pekat di sepanjang dinding tabung, akan muncul cincin berwarna coklat, coklat keunguan, atau ungu di

perbatasan kedua cairan. Cincin ini mengindikasikan keberadaan ikatan gula.

b. Lapisan bawah

Ketika reagen Lieberman-Bouchard ditambahkan dan tampak warna ungu kemerahan, ini menunjukkan keberadaan triterpenoid. Namun, jika muncul warna biru hijau atau hijau, ini menunjukkan adanya steroid, (Farnsworth, 1966).

c. Pemeriksaan Glikosida Antarkuinon

Setelah didinginkan, sampel ditempatkan dalam corong pisah, lalu ditambahkan 10 ml benzena, dikocok, dan dibiarkan sejenak. Kemudian, lapisan benzena dipisahkan dan disaring. Selanjutnya, lapisan benzena dikocok dengan 2 ml larutan natrium hidroksida 2 N dan dibiarkan sejenak. Jika lapisan natrium hidroksida berubah warna menjadi merah, ini menandakan adanya glikosida antrakuinon. Sebelum tahap ini, sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer, dicampur dengan etanol hingga terendam, lalu diaplikasikan asam sulfat 2 N dan dipanaskan sebentar (Farnsworth, 1966). Reagen Lieberman- Bouchard kemudian diambil dan warnanya diamati. Komponen steroid akan menunjukkan warna biru-hijau, sedangkan keberadaan triterpenoid akan ditandai dengan munculnya warna ungu (Farnsworth, 1966).

d. Pemeriksaan Saponin

Air ditambahkan ke sampel dalam tabung reaksi dan lalu dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit, setelah itu disaring dan didiamkan hingga dingin. Setelah mencapai suhu yang lebih rendah, filtrat dikocok dengan kuat secara vertikal selama 30 detik. Keberadaan senyawa saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang mencapai sekitar 1 cm dan bersifat stabil dalam beberapa menit, bahkan tetap ada setelah penambahan asam klorida atau setelah dibiarkan selama 20 menit (Farnsworth, 1966).

e. Pemeriksaan Tannin

Air ditambahkan ke sampel, dan larutan tersebut kemudian dipanaskan dalam tabung reaksi menggunakan penangas air selama 15 menit, setelah itu disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh dilarutkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Ambil 2 ml dari larutan tersebut dan tambahkan 1 hingga 2 tetes larutan besi (III) klorida 1%. Jika muncul warna biru, hitam, atau hijau kehitaman, ini menunjukkan adanya tanin (Farnsworth, 1966).

3.6 Perlakuan Hewan Uji

Tikus putih Jantan galur wistar dengan berat sekitar 150-250 gr dan berumur 8-12 minggu digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian ini. Dengan menggunakan hewan uji 24 ekor tikus diacak menjadi 6 kelompok percobaan, masing-masing 4 ekor tikus, kelompok pertama adalah kontrol normal diberikan 1 ml air selama 14 hari secara Peroral, kelompok kedua adalah kontrol negatif yang diberikan 1 ml etanol 80% selama 15 hari secara peroral, kelompok ketiga kontrol positif diberikan 20 mg/kg omeperazole selama 14 hari secara peroral dan diinduksi dengan 1 ml etanol 80% selama 15 hari, kelompok keempat ekstrak dosis 1 diberikan ekstrak *C. Costata* dengan dosis 1 selama 14 hari secara peroral dan diinduksi dengan 1 ml etanol 80% selama 15 hari, kelompok kelima ekstrak dosis 2 diberikan ekstrak *C. Costata* dengan dosis 2 selama 14 hari secara peroral dan diinduksi dengan 1 ml etanol 80% selama 15 hari, kelompok keenam ekstrak dosis 3 diberikan ekstrak *C. Costata* dengan dosis 3 selama 14 hari secara peroral dan diinduksi dengan 1 ml etanol 80% selama 15 hari.

3.7 Pengujian Histopatologi

Selama proses otopsi, sampel jaringan lambung dikumpulkan dan dikirim ke Laboratorium Patologi Anatomi, Universitas Jenderal Achmad Yani untuk pemeriksaan histopatologi. Sampel jaringan diproses melalui tahap dehidrasi menggunakan etanol, dilanjutkan dengan pembersihan menggunakan xilena, serta infiltrasi parafin. Blok parafin kemudian dipotong menjadi irisan setebal 3–4 μm , selanjutnya slide dideparafinisasi dengan xilena dan diwarnai menggunakan pewarnaan hematoksin-eosin (H&E). Preparat diamati dengan mikroskop cahaya (Olympus BX-51) yang dilengkapi kamera (Olympus Q Color-5) dan terhubung ke

komputer.

Untuk analisis lebih lanjut, gambaran histopatologi lambung diamati dengan lensa objektif 100×. Mikrograf dari setiap kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perubahan yang terjadi dicatat menggunakan sistem penilaian semikuantitatif nonlinier standar dengan skala 0–5, yang digunakan sebagai kriteria penilaian kerusakan jaringan. Berikut kriteria penilaian skoring histopatologi 0-5 :

Tabel 3.2 Kriteria Skoring Histopatologi Lambung

Skor	Kriteria Penilaian
0	Tidak beresap kerusakan jaringan (normal)
1	Terjadi kerusakan ringan, ditandai dengan sedikit erosi pada mukosa
2	Kerusakan sedang, tampak erosi lebih luas serta sedikit perdarahan
3	Kerusakan nyata, ditandai dengan ulkus kecil perdarahan dan inflamasi ringan
4	Kerusakan berat terdapat ulkus luas, perdarahan jelas dan inflamasi sedang-berat
5	Kerusakan sangat berat, ulkus meluas hingga lapisan lebih dalam, disertai perdarahan masif, nekrosis serta inflamasi hebat.

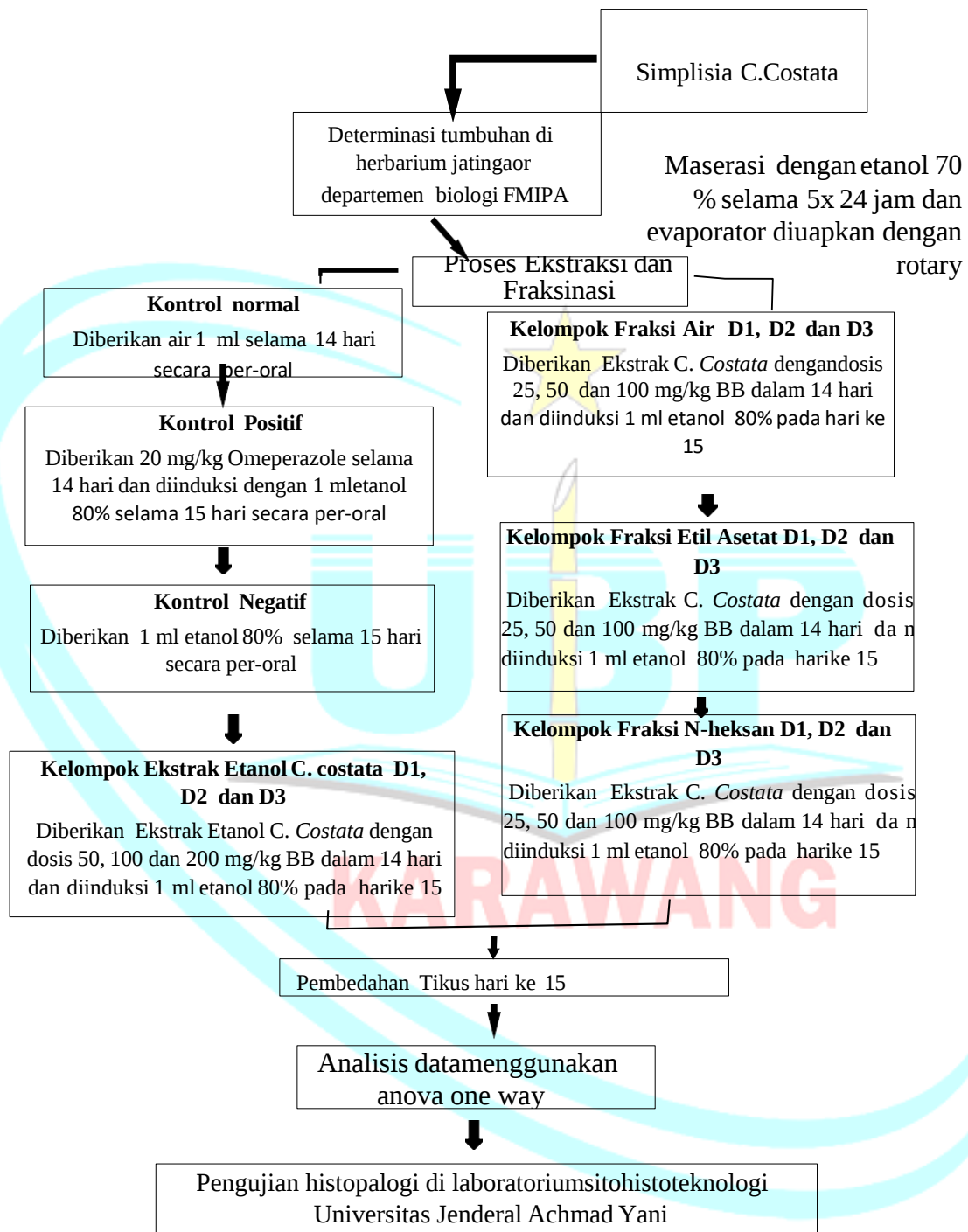
3.8 Analisis Statistika

Data dinyatakan sebagai rata-rata + 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. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel. (Mohemmad *et al.*, 2024).

3.9 Waktu dan Lokasi Kegiatan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sitohistoteknologi Universitas Jendral Achmad Yani. Penelitian ini dilaksanakan dalam rentang waktu bulan Maret hingga April tahun 2025.

3.10 Skema penelitian



Gambar 3. 1 Skema Penelitian