

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan hewan uji berupa tikus jantan galur Wistar sebagai hewan percobaan dan etanol 80% sebagai penginduksi pada percobaan gastroprotektif.

3.2 Alat dan bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan:

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: 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, kaca pembesar, sentrifugasi.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *C.costata*, omeprazol 20 mg dalam bentuk kapsul, etanol 70% dan 80%, PGA 1%, N-heksan dan aquadest.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan 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 dan usia 8-12 minggu.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Klasifikasi Variabel

a. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu fraksi n-heksan daun *C.costata* yang diberikan dalam berbagai variasi dosis yang berbeda-beda (D1, D2, dan D3).

b. 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%.

c. Variabel terkontrol

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

3.3.2 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 air, etanol 80%, dan omeprazole, serta kelompok varian dosis Fraksi daun <i>C. costata</i> .	-	Nominal	1. Kontrol normal menggunakan aquadest 2. K - = Kontrol negatif, etanol 1 ml 80% Peroral pada hari ke-15 3. K + = kontrol positif omeprazole 20 mg/kg Peroral selama 14 hari dan diinduksi etanol 80% pada hari ke-15 4. Kelompok Fraksi dengan 3 dosis yang berbeda (D1,D2,D3) selama 14 hari dan diinduksi etanol 80% pada hari ke-15

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
2	Variabel terikat tukak lambung dan pH lambung dan Volume lambung terhadap model cairan lambung tikus ulcer yang diinduksi etanol 80%.	tukak lambung dan penentuan pH lambung dan volume cairan lambung terhadap model cairan lambung tikus ulcer yang diinduksi etanol 80%.	Sentrifugasi, pH meter.	Rasio	angka dalam pH meter

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Proses Ekstraksi dan Fraksinasi

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). Setelah itu, 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:

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

3.4.2 Pembuatan Fraksi n-heksan

Ekstrak kental atau cair dari daun *C.costata* yang diperoleh kemudian difraksinasi menggunakan metode cair-cair dengan pelarut berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya. Pelarut non-polar yang digunakan adalah n-heksan, pelarut semi-polar adalah etil asetat, dan pelarut polar berupa air. Sejumlah ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam n-heksan di dalam corong pisah, lalu dibiarkan hingga terbentuk lapisan yang terpisah. Proses ini diulangi hingga lapisan n-heksana yang bening diperoleh. Lapisan tersebut kemudian dikumpulkan dalam

wadah terpisah.

Residu dari proses sebelumnya digunakan untuk fraksinasi dengan pelarut polar (air). Residu ini dikocok dengan air hingga lapisan air yang bening terbentuk. Fraksi cair dari setiap pelarut kemudian diuapkan menggunakan alat *Rotary Evaporator* untuk mendapatkan fraksi kental. Rendemen fraksi dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Redemen Fraksi} = \frac{\text{Bobot Fraksi N-heksan}}{\text{Bobot Ekstrak}} \times 100 \%$$

3.4.3 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	Hanya diberikan minum dan pakan selama 15 hari.
II.	Kontrol Negatif	Diberikan minum dan pakan selama 14 hari, dan diinduksi etanol 80% sebanyak 1 mL pada hari ke-15 secara per-oral.
III.	Kontrol Positif	Diberikan 20 mg/kg omeprazol selama 14 hari secara per-oral dan diinduksi etanol 80% sebanyak 1 mL pada hari ke-15.
IV.	Fraksi N-heksan Dosis 1	Diberikan ekstrak <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 N-heksan Dosis 2	Diberikan ekstrak <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 N-heksan Dosis 3	Diberikan ekstrak <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 Skrinning Fitokimia

3.5.1 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).

3.5.2 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).

3.5.3 Pemeriksaan Glikosida Antrakuinon

Sedikit sampel 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).

3.5.4 Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

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

3.5.5 Pemeriksaan Saponin

Sedikit sampel 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).

3.5.6 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).

3.6 Pengamatan Hasil Penelitian

3.6.1 Pengujian Tukak Lambung

Tikus dipuasakan dari makanan selama 18 jam dengan tetap diberikan air untuk minum. Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok fraksi n-heksan 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%. 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 14 hari pemberian fraksi n-heksan, tikus dibius terlebih dahulu menggunakan eter kemudian dimatikan dengan metode dislokasi leher. Selanjutnya dilakukan pembedahan abdomen, diikuti dengan pengikatan pilorus dan esofagus dekat kardia. Duodenum bagian atas dan esofagus dipotong untuk mengeluarkan lambung, yang kemudian diamati kondisi mukosanya (Fitria *et al.*, 2023).

3.6.2 Pengamatan Tukak Lambung

Bersihkan terlebih dahulu lambung yang telah dibedah menggunakan cairan NaCl. Lalu amati menggunakan kaca pembesar atau lup untuk melihat mukosa lambung. Tentukan skor jumlah tukak lambung (Tabel 3.3) dan keparahan tukak (Tabel 3.4) (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 Keparahannya Tukak

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

Untuk menentukan nilai Indeks tukak dapat digunakan rumus sebagai berikut (Fitria *et al.*, 2023) :

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

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

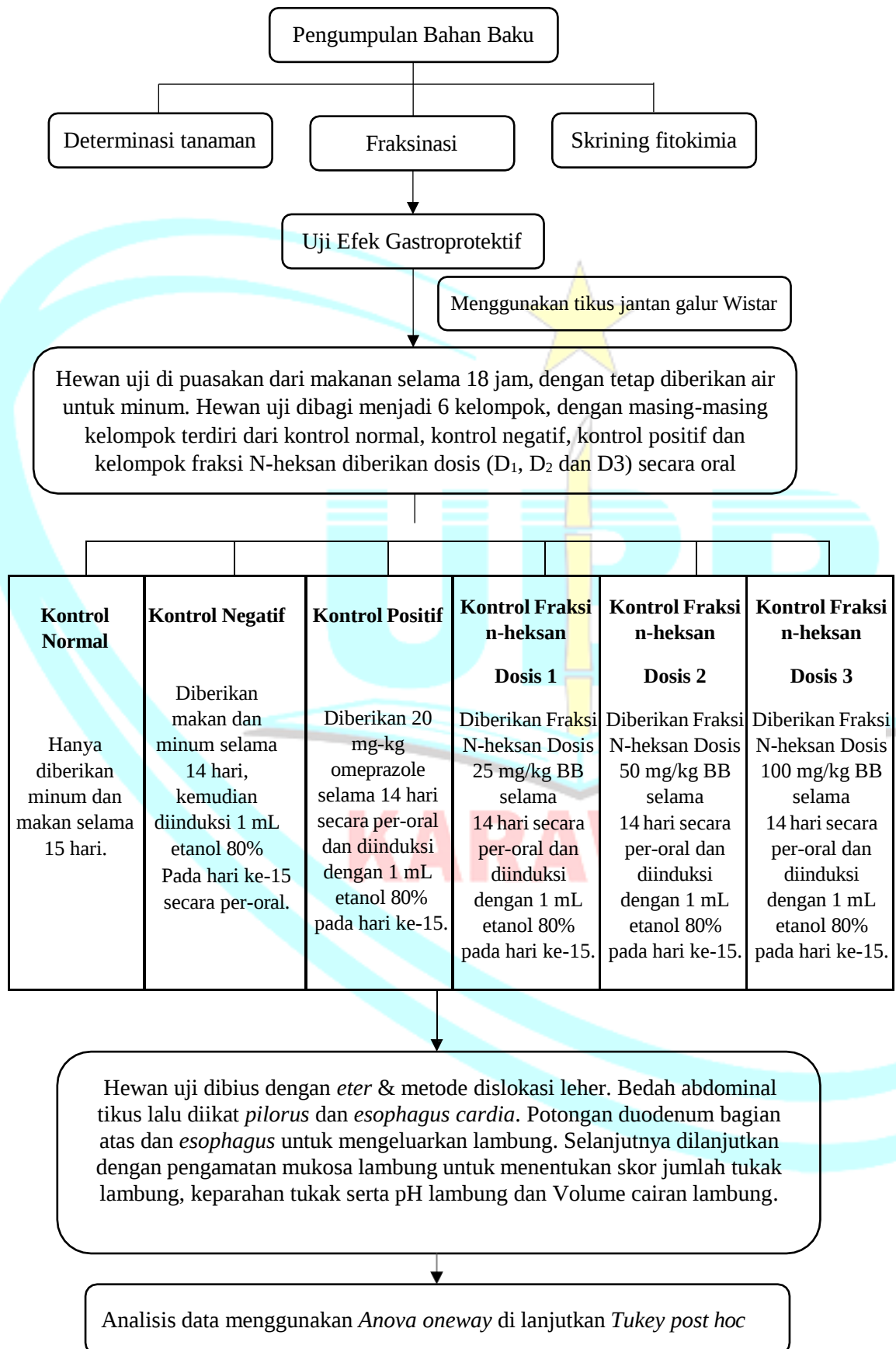
Untuk menentukan nilai Persentase inhibisi dapat digunakan rumus sebagai berikut (Fitria *et al.*, 2023) :

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

3.6.3 pH Lambung dan Volume Cairan Lambung

Cairan lambung diperoleh dari perut tikus dan dikeringkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit, dan volume supernatan diukur dan catat. Kemudian, cairan lambung diencerkan dengan 1,0 mL aquadest, dan ukur pH yang dihasilkan oleh cairan lambung tersebut menggunakan pH meter (Mohemmad *et al.*, 2024).

3.7 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.8 Analisis Data

Data dinyatakan sebagai rata-rata $\pm$ standar error mean (SEM), dan analisis statistika 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 $<0,05$ (Alkandahri *et al.*, 2021).

3.9 Lokasi Kegiatan

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

