

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan seluruh bagian pada sarana penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit pisang kepok (*Musa acuminata*) dengan variasi yang didapatkan dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar.

2. Sampel

Bagian dari objek penelitian yang diambil untuk mewakili populasi disebut sampel. Pada penelitian ini, ekstrak kulit pisang kepok (*Musa acuminata*) dipilih sebagai sampel dengan dosis yang bervariasi, yaitu 75 mg, 150 mg, dan 300 mg per kilogram berat badan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Pada penelitian ini, variabel utama pertama adalah ekstrak etanol kulit pisang kepok, variabel kedua berupa tiga variasi dosis ekstrak tersebut, dan variabel ketiga adalah pengujian aktivitas analgesik dari ekstrak etanol kulit pisang kepok.

2. Klasifikasi variabel utama

Pada penelitian, variabel utama biasanya dikategorikan menjadi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel yang dikendalikan.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah faktor yang dirancang oleh peneliti untuk mengetahui pengaruhnya pada variabel tergantung. Dalam penelitian ini, variabel bebasnya adalah pemberian ekstrak kulit pisang kepok (*Musa acuminata*) dengan tiga tingkat dosis berbeda.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan kriteria penilaian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah skor tukak lambung dan jumlah respon geliat mencit.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung dan harus ditentukan standarnya. Dalam penelitian ini, variabel terkendali meliputi peneliti, kondisi laboratorium, serta kondisi fisik hewan uji yang mencakup berat badan, umur, galur, dan jenis kelamin.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, kulit pisang kepok (*Musa acuminata*) yang telah diambil segera diproses dengan sortasi basah, dicuci, dan dipilih sesuai kriteria selanjutnya kemudian ditiriskan dan dipotong kecil – kecil. Selanjutnya dikeringkan dengan oven pada suhu 40° , kemudian dilakukan sortasi kering dan dihaluskan dengan cara diblender selanjutnya diayak.

Selanjutnya, ekstrak etanol dari kulit pisang kepok dihasilkan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, lalu dipadatkan menggunakan rotary evaporator hingga berbentuk ekstrak kental. Ekstrak tersebut diberikan dengan dosis bervariasi, yaitu 75 mg, 150 mg, dan 300 mg per kg berat badan.

Ketiga, hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur dengan berat badan 20–30 g dan umur 2–3 bulan digunakan dalam penelitian ini.

Keempat, minuman beralkohol diberikan secara oral untuk menginduksi ulkus lambung pada mencit jantan.

Kelima, paracetamol adalah kontrol positif merupakan obat analgesik yang diberikan pada mencit jantan dengan dosis 1,3 mg/ 20 g BB.

Keenam, CMC-Na adalah kontrol negatif yang diberikan pada mencit jantan galur dengan dosis 0,2 ml.

Ketujuh, pemeriksaan analgesik dilakukan dengan pengamatan berupa lompatan atau jilatan akibat reaksi nyeri ketika diinduksi minuman beralkohol.

Kedelapan, hispatologi lambung dengan menghitung skor tukak atau ulkus lambung pada mencit setelah diinduksi minuman beralkohol.

C. Alat, Bahan, dan Hewan Uji

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak yaitu oven, blender, ayakan ukuran 40 mesh, dan timbangan analitik. Dalam pelaksanaan maserasi menggunakan seperangkat alat maserasi dan *rotary evaporator*. Alat yang digunakan dalam proses induksi dan pengamatan uji aktivitas proteksi tukak adalah gelas ukur, labu ukur, spon, sonde, *water bath*, dan kaca pembesar.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit pisang, aquadest, etanol 70%, paracetamol tablet, HCl pekat, Mg, FeCl₃ 1%, alkohol 96%, CMC Na 0,5%.

3. Hewan uji

Dalam penelitian ini, 25 ekor mencit (*Mus musculus*) dengan berat 20–30 gram dan usia 2–3 bulan dipakai sebagai hewan uji. Hewan tersebut dikelompokkan ke dalam lima kelompok: satu kontrol negatif, satu kontrol positif, dan tiga kelompok uji dengan berbagai dosis ekstrak etanol kulit pisang.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan dan pemilihan bahan

Pengambilan kulit pisang diambil dari Tawangmangu, Jawa Tengah dengan memilih kulit buah yang masih segar, sehat, dan terbebas dari hama ataupun serangga. Bahan kulit pisang yang sudah terkumpul selanjutnya akan dilakukan pembuatan serbuk

2. Determinasi tanaman

Tujuan determinasi tanaman adalah mengetahui identitas tanaman yang belum diketahui dengan mengamati dan mendeskripsikan ciri morfologi kulit buah pisang secara detail. Determinasi ini dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Kulit pisang kepok dipisahkan dari buahnya dan dikumpulkan terlebih dahulu untuk membuat simplisia. Kemudian dilakukan pencucian dengan air sumur mengalir sebanyak tiga kali untuk menghilangkan kotoran dan benda asing, lalu ditiriskan. Setelah itu, simplisia dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40° dan di sortasi kering.

4. Penentuan susut pengeringan serbuk

Pengujian kadar susut pengeringan dilakukan dengan memasukkan 1–2 gram ekstrak ke dalam botol timbang yang telah dipanaskan pada 105°C dan ditara. Ekstrak diratakan dengan ketebalan 5–10 mm, kemudian dikeringkan di dalam oven bersuhu 105°C dengan tutup botol terbuka hingga beratnya konstan (Depkes RI, 2000).

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{Bobot awal (g)} - \text{Bobot akhir(g)}}{\text{Bobot awal (g)}} \times 100\%$$

5. Pembuatan ekstrak etanol kulit pisang

Untuk mengekstraksi simplisia kulit pisang, digunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Dalam wadah maserasi, 500 gram simplisia dimasukkan dan kemudian ditambahkan etanol 70% sampai seluruh bahan terendam. Campuran ini diaduk, ditutup rapat, dan dibiarkan selama 3 hari dengan pengadukan ulang setiap 8 jam. Ekstrak cair hasil maserasi disaring untuk memisahkan filtrat dan residu. Residu selanjutnya menjalani proses maserasi ulang menggunakan pelarut yang sama. Setelah proses filtrasi, filtrat dipanaskan pada suhu 55°C dengan rotary evaporator hingga konsentrasi ekstrak meningkat dan menjadi kental. Kemudian, ekstrak kental dikeringkan pada suhu kamar hingga pelarut benar-benar hilang sehingga menghasilkan ekstrak kering.

6. Penetapan kadar air

Penentuan kadar air ekstrak dilakukan menggunakan metode gravimetri. Sebanyak 10 gram sampel ditimbang ke dalam kurs yang telah ditara, kemudian dipanaskan pada 105° C selama lima jam. Setelah itu, sampel ditimbang ulang dan proses pemanasan dilanjutkan setiap satu jam sampai selisih berat antar penimbangan kurang dari 0,25% (Kemenkes RI, 2017)).

7. Identifikasi kualitatif kandungan kimia ekstrak kulit pisang

7.1 Identifikasi Flavonoid. Prosedur uji flavonoid melibatkan pencampuran 1 ml ekstrak dengan 3 ml etanol 70%, pengocokan, dan pemanasan. Larutan kemudian dikocok ulang dan disaring. Setelah filtrat diperoleh, ditambahkan 0,1 g magnesium serta 2 tetes HCl pekat. Warna merah, oranye, atau hijau pada lapisan etanol menunjukkan indikasi positif flavonoid (Somba *et al.*, 2023).

7.2 Saponin. Sebanyak 1 ml ekstrak dicampur dengan 10 ml aquadestilata, kemudian campuran tersebut dipanaskan hingga mendidih menggunakan penangas air, lalu disaring untuk memperoleh filtrat. Filtrat tersebut dikocok dan dibiarkan selama 15 menit. Kehadiran saponin ditunjukkan oleh terbentuknya busa stabil yang tahan lama (Somba *et al.*, 2022).

7.3 Tanin. Untuk uji tannin, 2 g ekstrak dicampur dengan etanol sampai seluruh bagian terendam. Sebanyak 1 ml larutan dipindahkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2–3 tetes larutan FeCl_3 1%. Terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau menunjukkan adanya senyawa tanin secara positif (Somba *et al.*, 2022)

7.4 Pektin. Berdasarkan penelitian oleh Febriyanti dkk. (2018), filtrat hasil ekstraksi dicampurkan dengan alkohol 96% dalam rasio 1:1 dan dibiarkan selama satu malam. Setelah terbentuk, endapan disaring menggunakan kertas saring dan dibersihkan dengan alkohol 96%. Endapan tersebut kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60–62°C selama kira-kira tiga jam setelah diletakkan di cawan porseLEN. Saat dipanaskan dengan 1 mL air dan didinginkan, endapan menghasilkan gel yang keras.

8. Pembuatan larutan uji dan penginduksi

8.1 Pembuatan larutan CMC-Na 0,5%. Suspensi CMC-Na 0,5% dibuat berdasarkan konsentrasi 0,5% b/v, yang berarti 500 mg CMC dilarutkan dalam 100 ml air suling. Proses pembuatannya dimulai dengan menimbang 500 mg serbuk CMC dan memasukkannya ke dalam mortir yang telah berisi 10 ml air suling hangat. Campuran tersebut dibiarkan selama sekitar 20 menit hingga membentuk massa transparan yang mengembang sempurna. Selanjutnya, campuran digerus sambil ditambahkan air suling sedikit demi sedikit hingga volume mencapai 100 ml, membentuk gel kental dan homogen. Larutan ini digunakan sebagai kontrol negatif dalam penelitian.

8.2 Pembuatan suspensi ekstrak etanol kulit pisang. CMC 0,5% ditimbang dan dilarutkan dalam air hangat di dalam mortir, kemudian dibiarkan hingga mengembang secara sempurna dan diaduk hingga merata. Larutan ini disisihkan. Selanjutnya, ekstrak etanol kulit pisang ditimbang dan dihancurkan dalam mortir hingga halus. Mucilago CMC kemudian dimasukkan ke dalam mortir yang berisi ekstrak, diaduk sampai membentuk suspensi yang homogen, lalu ditambahkan air suling hingga mencapai volume yang ditentukan.

9. Perhitungan dosis

9.1 Perhitungan dosis minuman beralkohol. Pemberian minuman beralkohol sebagai penginduksi tukak lambung pada hewan uji diberikan dengan dosis 0,14 ml.

9.2 Perhitungan dosis CMC-Na 0,5%. Pemberian CMC-Na 0,5% sebagai kontrol negatif dilakukan dengan dosis 0,2 ml/ 20 g BB mencit.

9.3 Perhitungan dosis paracetamol. Manusia dewasa dengan berat badan 70 kg menerima dosis terapi paracetamol sebesar 500 mg. Dengan faktor konversi 0,0026 ke mencit yang memiliki berat 20 gram,

maka dosis paracetamol yang diberikan pada mencit adalah 1,3 mg/20 g BB.

9.4 Perhitungan dosis ekstrak etanol kulit pisang. Setiap kelompok perlakuan akan menerima dosis sediaan uji dengan variasi sebanyak 75 mg/kg BB, 150 mg/kg BB, dan 300 mg/kg BB.

10. Persiapan Hewan Uji

Mencit jantan yang digunakan sebagai hewan uji merupakan individu dewasa, sehat, dan normal, dengan rentang usia 2 sampai 3 bulan serta berat badan 20–30 gram. Hewan uji di aklimatisasikan selama 7 hari agar terbiasa dengan lingkungan. Hewan selanjutnya dipuaskan selama 6 jam sebelum dilakukan pengujian. Hewan uji yang dipilih sebanyak 25 ekor dan terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan diantaranya :

Kelompok I : Kontrol negatif diberi Na CMC 0,5% peroral

Kelompok II : Kontrol positif diberi parasetamol secara peroral

Kelompok III : Dosis ekstrak kulit pisang kepok 75 mg/Kg BB

Kelompok IV : Dosis ekstrak kulit pisang kepok 150 mg/Kg BB

Kelompok V : Dosis ekstrak kulit pisang kepok 300 mg/Kg BB

11. Pemberian Minuman Keras Beralkohol

Jenis minuman beralkohol yang diberikan pada hewan uji adalah bir dengan dosis subletal 0,14 ml/ 20 g BB mencit. Akibat pemberian tersebut, ditemukan perubahan mikroskopik pada lambung, yaitu deskuamasi pada lapisan epitel mukosa (Keba *et al.*, 2019).

12. Uji Aktivitas Analgesik

Metode geliat digunakan untuk menguji aktivitas analgesik dengan melihat respons mencit. Setiap kelompok beranggotakan lima mencit. Setelah menjalani puasa, mencit diberi perlakuan sesuai kelompoknya: kelompok kontrol negatif (K-) menerima CMC Na 0,5% secara oral, kelompok kedua mendapatkan paracetamol oral, dan kelompok III, IV, V menerima ekstrak kulit pisang kepok dengan dosis 75, 150, dan 300 mg/kgBB secara berturut-turut. Semua diberikan secara peroral, setelah 30 menit, mencit diinjeksi dengan minuman keras beralkohol 8 ml/kgBB. Reaksi geliat pada mencit diamati selama 30 menit dengan selang waktu 5 menit (Febriana *et al.*, 2017).

Perhitungan daya analgesik untuk setiap kelompok dilakukan berdasarkan data yang diperoleh menggunakan rumus Henderson-Forsaith, merujuk pada Debeturu *et al.* (2022) :

$$\% \text{ Proteksi geliat} = 100 - \left(\frac{p}{k} \times 100\% \right)$$

Keterangan : k = jumlah geliat kelompok K-
P = jumlah geliat tikus yang diberi perlakuan

$$\text{Efektivitas analgesik} = \frac{p}{Kp} \times 100\%$$

Keterangan : P = % jumlah proteksi geliat
Kp = % jumlah proteksi kontrol positif
(Lina dan Annis., 2022)

13. Pengamatan makroskopik tukak lambung

Pengujian secara makroskopis mencakup observasi terhadap ulkus yang terbentuk di lambung dan evaluasi tingkat pendarahan ulkus tersebut. Hewan uji dikorbankan dan diamati menggunakan lup untuk melihat jenis keparahan tukak. Pengamatan makroskopik dilakukan terhadap masing-masing kelompok perlakuan yang diambil sebanyak 2 sampel. Hasil pengamatan selanjutnya ditentukan skor parameter jumlah dan keparahan tukak (Afifah., 2023).

Tabel 1. Skor jumlah tukak

Skor	Parameter jumlah tukak
1	Normal
2	Bintik pendarahan
3	Jumlah tukak 1-3
4	Jumlah tukak 4-6
5	Jumlah tukak 7-9
6	Jumlah tukak >9 atau perforasi

Tabel 2. Skor pendarahan tukak

Skor	Parameter keparahan tukak
1	Normal
2	Bintik pendarahan
3	Pendarahan ringan
4	Pendarahan sedang
5	Pendarahan berat
6	Perforasi/seluruh mukosa pendarahan

Nilai indeks tukak dilakukan dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{IT} = \text{RSJT} + \text{RSPT} + 0,1 \text{ PT}$$

Keterangan :

IT = Indeks tukak

RSJT = Rataan skor jumlah tukak setiap kelompok perlakuan

RSPT = Rataan skor keparahan tukak setiap kelompok perlakuan

PT = Persentase hewan yang terkena tukak dalam setiap kelompok

Persentase inhibisi tukak dapat ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

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

E. Skema Penelitian

1. Pembuatan ekstrak

Kulit pisang kepok segar, dicuci hingga bersih dan sortasi basah, keringkan menggunakan oven, haluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan no. 40

Serbuk kulit pisang dilakukan pemeriksaan organoleptis, penetapan susut pengeringan

Pembuatan ekstraksi

Merasasi dengan pelarut etanol 70% perbandingan 1 : 10 selama 3 hari, dilakukan penggojokan selama 8 jam sekali. Remerasasi dengan jumlah setengah pelarut dari pelarut maserasi pertama selama 1 hari

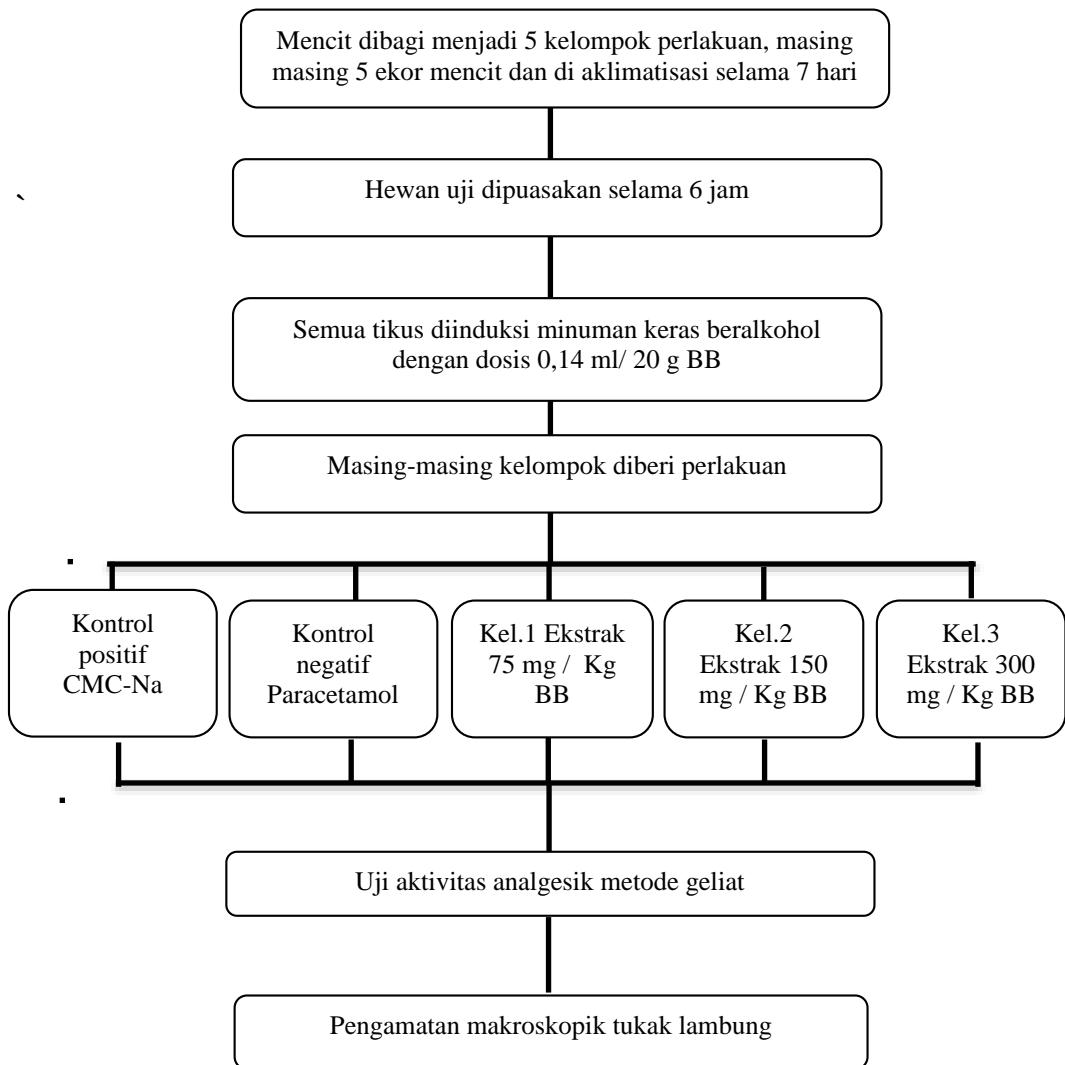
Ekstrak dikumpulkan dan diuapkan menggunakan rotatory evaporator pada suhu 55°C hingga diperoleh ekstrak kental

Ekstrak kulit pisang dilakukan identifikasi pemeriksaan organoleptis dan penetapan kadar air

Ekstrak kulit pisang dilakukan skrining fitokimia yaitu uji flavonoid, uji saponin, uji tannin, dan uji pektin

Gambar 4. Skema Pembuatan Ekstrak

2. Pengamatan perlakuan uji



Gambar 5. Skema Pengamatan Perlakuan Uji

F. Analisis Hasil

Statistik data pengamatan diolah melalui program SPSS dengan pengecekan normalitas menggunakan Shapiro-Wilk. Data yang memiliki nilai signifikansi di atas 0,05 dianggap normal dan kemudian dianalisis lebih lanjut menggunakan One Way ANOVA. Jika data tidak terdistribusi normal $\text{sig} < 0,05$ dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis diikuti dengan uji Mann-Whitney untuk analisis lebih lanjut.