

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran dalam penelitian. Populasi dalam penelitian ini yaitu herba seledri (*Apium graveolens* L.) yang diperoleh dari daerah Plaosan, Kabupaten Magetan, Jawa Timur.

Sampel adalah bagian dari populasi yang diteliti, yang ciri-ciri dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili atau menggambarkan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba seledri (*Apium graveolens* L.) yang berwarna hijau, masih segar, bersih, bebas dari penyakit, tidak busuk, dan bagian herba yang masih muda maupun sudah tua.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah minyak atsiri herba seledri (*Apium graveolens* L.) dapat memberikan efek antidepresan terhadap mencit putih jantan dilihat dari peningkatan aktivitas motorik dan daya konsentrasi dengan berbagai variasi konsentrasi minyak atsiri.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dapat diklasifikasikan kembali ke dalam beberapa macam variabel antara lain: variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi penyebab perubahan terhadap variabel tergantung yang ingin diketahui pengaruhnya. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah minyak atsiri herba seledri (*Apium graveolens* L.) dengan berbagai varian konsentrasi.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah titik pusat permasalahan yang menjadi kriteria dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek antidepresan minyak atsiri herba seledri (*Apium graveolens* L.) dengan melihat pengamatan pada waktu aktivitas motorik dan jumlah perpindahan mencit putih jantan (*Mus musculus*) dengan metode ultrasonik serta *latency time* dengan menggunakan uji labirin.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar tidak terjadi pengulangan dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi sampel, waktu pengamatan, kondisi hewan uji seperti jenis kelamin, usia, dan kondisi penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, herba seledri (*Apium graveolens* L.) adalah seluruh bagian dari tanaman seledri yang diambil dari daerah Plaosan, Kabupaten Magetan, Jawa Timur dalam keadaan berwarna hijau, masih segar, bersih, bebas dari penyakit, tidak busuk, dan bagian herba yang masih muda maupun sudah tua.

Kedua, minyak atsiri herba seledri (*Apium graveolens* L.) adalah minyak atsiri hasil dari destilasi dengan menggunakan metode destilasi uap air yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Ketiga, antidepresan adalah obat yang digunakan untuk mengobati depresi. Aroma dari minyak atsiri digunakan sebagai antidepresan alternatif.

Keempat, metode ultrasonik modifikasi adalah metode yang digunakan dalam penelitian untuk membuat hewan uji menjadi depresi dengan frekuensi suara 26.000 Hz. Dalam alat ini akan diberi penguapan minyak atsiri selama 15 menit yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kelima, aktivitas motorik dalam penelitian ini merupakan perpindahan hewan uji dari bilik A ke bilik B atau sebaliknya dengan melihat parameter berupa waktu aktivitas motorik dan jumlah perpindahan.

Keenam, waktu aktivitas motorik adalah waktu yang dibutuhkan oleh hewan uji dari keadaan bergerak bebas hingga hewan uji berdiam diri di suatu tempat selama 1 menit karena induksi suara ultrasonik yang diberikan.

Ketujuh, jumlah perpindahan adalah banyaknya perpindahan yang dilakukan oleh hewan uji dalam box selama pemberian induksi suara ultrasonik.

Kedelapan, daya konsentrasi adalah kemampuan hewan uji dalam memusatkan perhatian dan fokus setelah dimasukkan ke dalam labirin dengan adanya pemberian umpan sampai mencit keluar dari labirin dengan melihat parameter *latency time*.

Kesembilan, *latency time* adalah waktu yang dibutuhkan saat hewan uji dimasukkan ke dalam labirin sampai hewan uji keluar dari labirin dengan menemukan umpan yang ada di dalam labirin.

Kesepuluh, konsentrasi efektif adalah konsentrasi minyak atsiri herba seledri yang memiliki aktivitas antidepresan paling besar dan sebanding dengan kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam pengujian antidepresan adalah alat ultrasonik modifikasi dengan rentang frekuensi 26.000 Hz. Alat ini berupa kotak yang berbentuk persegi dengan ukuran panjang 85 cm, lebar 30 cm, dan tinggi 15 cm. Alat ini terbuat dari bahan triplek dan kaca bening, terdiri dari 4 ruang bilik dengan 2 ruang bilik untuk penguapan minyak atsiri yang diberi lubang dan 2 ruang bilik untuk pengujian antidepresan dengan ultrasonik. Alat yang digunakan untuk pengujian daya konsentrasi yaitu labirin. Alat ini terbuat dari kardus yang tingginya 15 cm dengan steroform sebagai alasnya. Serta *stopwatch* untuk

mengukur waktu pengujian dan kamera untuk pengamatan terhadap aktivitas motorik.

Alat lain yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat yang digunakan untuk membuat minyak atsiri yaitu destilasi uap dan air. Alat-alat pendukung lainnya yaitu piknometer, corong pisah, botol kaca gelap, neraca analitik, pipet, kertas saring, refraktometer, dan sebagainya.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba seledri (*Apium graveolens* L.) segar, tidak busuk, berwarna hijau, dan bebas dari pirogen. Kontrol positif yang digunakan yaitu minyak mint (*Mentha arvensis* L.) dengan konsentrasi 1% yang sudah beredar di pasaran.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah Na₂SO₄ eksikatus dan air (pembawa).

2.3 Hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang berumur 2-3 bulan yang metabolismenya berjalan dengan baik serta memiliki berat badan 20-30 gram.

D. Jalan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahapan awal dari penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman. Determinasi tanaman ini bertujuan untuk menetapkan kebenaran dari tanaman herba seledri (*Apium graveolens* L.) yang akan digunakan yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman berdasarkan acuan data pustaka yang ada. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengambilan tanaman

Herba seledri (*Apium graveolens* L.) diperoleh dari daerah Plaosan, Kabupaten Magetan, Jawa Timur. Herba seledri yang diambil dalam keadaan

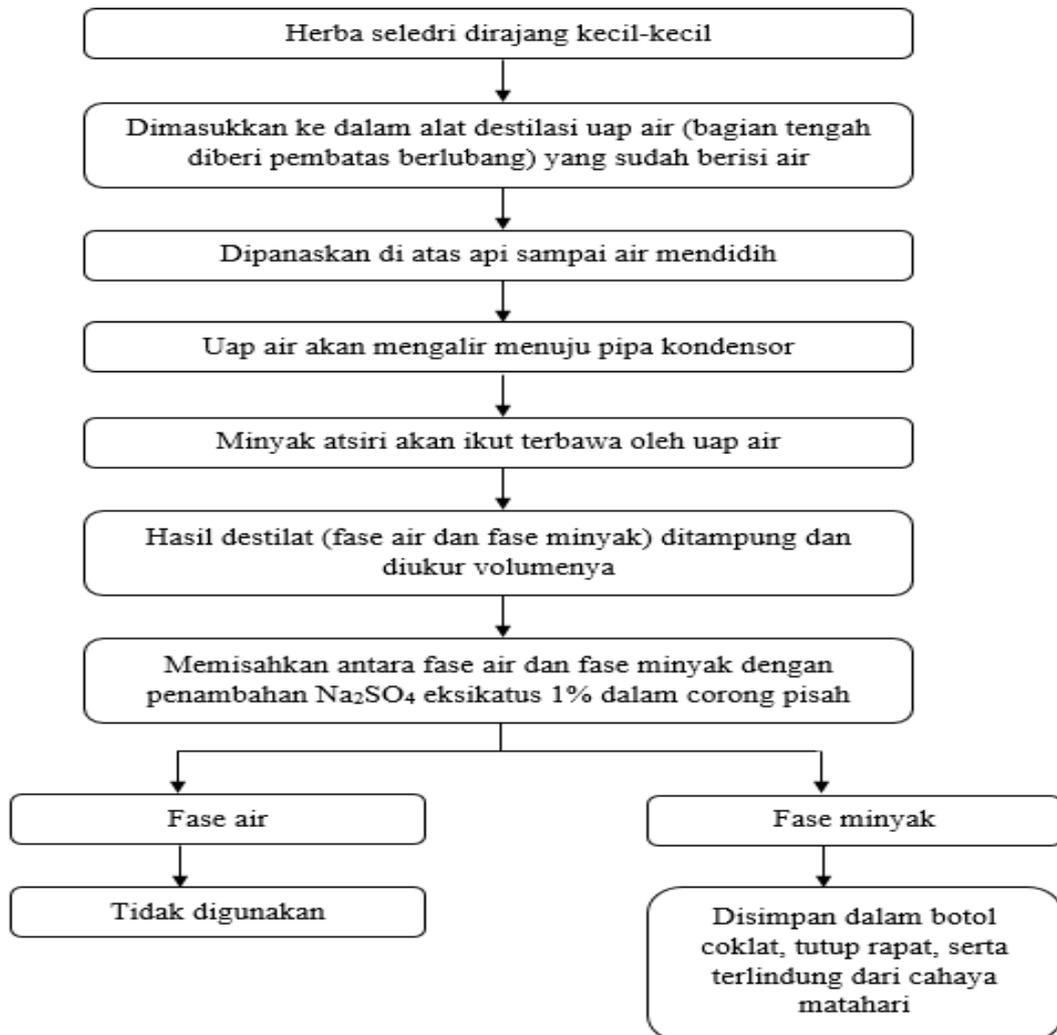
berwarna hijau, masih segar, bersih, bebas dari penyakit, tidak busuk, dan bagian herba yang masih muda maupun sudah tua.

3. Isolasi minyak atsiri herba seledri

Herba seledri (*Apium graveolens* L.) diambil sebanyak 15 kg yang masih dalam keadaan segar dibersihkan dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan pengotor-pengotor atau bahan-bahan asing yang menempel serta terbebas dari debu. Herba seledri dirajang menjadi potongan-potongan kecil agar mempermudah proses penguapan. Herba seledri yang sudah dirajang, dikumpulkan kemudian ditimbang.

Isolasi minyak atsiri herba seledri (*Apium graveolens* L.) dalam penelitian ini menggunakan destilasi uap air. Herba seledri yang digunakan adalah yang sudah dirajang dan masih segar tanpa dilakukan proses pengeringan untuk menghasilkan minyak atsiri yang lebih maksimal karena jika dilakukan pengeringan maka minyak atsiri yang terdapat di dalam herba seledri akan menguap. Herba seledri yang sudah dirajang dimasukkan ke dalam alat destilasi uap air yang menyerupai dandang dengan bagian tengah yang diberi pembatas berlubang (angsan) yang telah terisi air. Penyulingan minyak atsiri dilakukan di atas api sampai air mendidih. Uap air yang dihasilkan akan dialirkan melalui pipa kondensor dan akan mengalami yang namanya kondensasi. Pada saat yang bersamaan minyak atsiri herba seledri akan ikut terbawa oleh uap air tersebut. Pemanasan dilakukan dengan api sampai sudah tidak ada lagi penambahan minyak atsiri sehingga penyulingan diberhentikan, kemudian tampung destilat dan ukur volume yang didapatkan.

Hasil destilat yang diperoleh berupa minyak atsiri yang masih tercampur antara fase air dan fase minyak yang kemudian dilakukan pemisahan antara fase air dan fase minyak menggunakan corong pisah dengan penambahan Na_2SO_4 eksikatus sebanyak 1% dari volume minyak atsiri sehingga diperoleh hasil penyulingan minyak atsiri herba seledri yang murni. Minyak murni yang diperoleh kemudian disimpan dalam botol gelap berwarna coklat, kemudian tutup rapat serta simpan dalam ruangan yang terlindungi dari cahaya matahari.



Gambar 5. Skema isolasi minyak atsiri herba seledri (*Apium graveolens* L.)

4. Analisa minyak atsiri

4.1 Pengamatan organoleptik. Pengamatan organoleptik terhadap minyak atsiri dapat berupa pengamatan warna, bentuk, bau, dan rasa dari minyak atsiri. Minyak atsiri hasil destilat diambil dan masukkan ke dalam wadah berbahan kaca yang bening dan bersih, kemudian amati warna dan kejernihan minyak atsiri. Bau dari minyak atsiri haruslah sesuai dengan tanaman asalnya.

4.2 Identifikasi minyak atsiri. Identifikasi terhadap minyak atsiri dapat dilakukan dengan cara: pertama, minyak atsiri ditetaskan pada permukaan air maka minyak atsiri akan menyebar dan permukaan air akan tampak jernih serta tidak keruh. Kedua, sebanyak 1 tetes minyak atsiri ditetaskan pada kertas saring

dan diamankan beberapa menit. Minyak atsiri terbukti murni apabila minyak yang ditetaskan pada kertas saring menguap dengan sempurna tanpa meninggalkan noda.

4.3 Penetapan indeks bias minyak atsiri. Penetapan indeks bias dilakukan dengan menggunakan alat refraktometer. Mulanya badan prisma dibuka kemudian dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol. Refraktometer diatur sehingga garis dan skala tampak dengan jelas, kemudian suhu ruangan dicatat, dan cairan minyak atsiri yang diukur ditetaskan pada prisma kemudian tutup kembali. Pemutar yang dibagian sebelah kanan alat diatur sehingga batas gelap dan terang tepat pada garis. Indeks bias minyak atsiri dapat diperoleh dari pencatatan skala yang ada pada alat.

4.4 Penetapan bobot jenis minyak atsiri. Bobot jenis minyak atsiri merupakan perbandingan antara bobot jenis minyak atsiri dengan bobot air pada suhu dan volume yang sama. Sehingga, penetapan bobot jenis minyak atsiri dilakukan dengan cara: pertama, mengeringkan botol kosong dengan oven, kemudian botol kosong tersebut ditimbang dan dicatat hasilnya. Kedua, memasukkan minyak atsiri herba seledri ke dalam botol kosong tersebut, kemudian ditimbang dan dicatat hasilnya. Kemudian dilakukan perhitungan penetapan bobot jenis minyak atsiri dengan rumus:

$$\text{Bobot jenis minyak atsiri} = \frac{\text{Berat piknometer minyak} - \text{Berat piknometer kosong}}{\text{Berat piknometer air} - \text{Berat piknometer kosong}}$$

4.5 Karakteristik komponen senyawa penyusun minyak atsiri dengan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Pengujian komponen senyawa penyusun minyak atsiri herba seledri dilakukan dengan menggunakan GC-MS Shimadzu GCMS-QP2010S (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Alat ini dilengkapi dengan *Capillary Column*: Non polar RTX-5MS dengan fase diam yaitu *Phenyl methylpolcioxane* (diameter 0,25 mm, panjang kolom 30 m, dan ketebalan film 0,25 μm) dan detektor yang digunakan yaitu FTD. Kondisi GC: suhu awal 60°C dinaikkan sampai 300°C kemudian pada saat suhu sudah mencapai 300°C, suhu dipertahankan selama 20 menit. Gas

pembawa (fase gerak) yang digunakan yaitu Helium dengan kecepatan alir 0,75 mL/min. Kondisi MS: mulai m/z 30 dan akhir m/z 400. Senyawa penyusun minyak atsiri diidentifikasi dengan membandingkan *retention index* dan membandingkan *mass spectra* dengan yang ada di database *wiley library*.

5. Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit putih jantan (*Mus musculus*) sebanyak 20 ekor. Mencit yang digunakan harus memenuhi kriteria antara lain: pertama, mencit harus berjenis kelamin jantan dan berumur sekitar 2-3 bulan. Kedua, mencit harus memiliki bulu yang sehat, bersih, halus, dan mengkilat, bola mata tampak kemerahan jernih, serta sehat. Ketiga, berat badan mencit berkisar 20-30 gram. Keempat, mencit sedang tidak dalam keadaan depresi atau tertekan dan tampak selalu aktif bergerak. Setelah mencit dipilih sebanyak 20 ekor selanjutnya mencit diadaptasikan selama seminggu (7 hari) pada lingkungan dan 3 hari sebelum pengujian diadaptasikan dalam labirin serta diadaptasikan terhadap induksi suara ultrasonik dengan tetap diberikan makan dan minum secara teratur agar mencit sehat dan diharapkan berat badan mencit tidak berkurang melebihi 10%, serta konsistensi feses mencit normal dan padat, tidak cair atau diare dengan suhu tubuh mencit optimum rata-rata 37°C.

6. Metode aplikasi dan pembuatan konsentrasi minyak atsiri

Konsentrasi minyak atsiri herba seledri (*Apium graveolens* L.) yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 0,5%, 1% dan 2%. Konsentrasi ini diperoleh dari pengenceran minyak atsiri herba seledri yang murni. Pengenceran untuk pembuatan variasi konsentrasi tersebut dilakukan dengan pembawa air. Yang mana masing-masing konsentrasi tersebut akan dibuat sebanyak 10 mL.

Pembuatan konsentrasi 0,5% dilakukan dengan melakukan pengenceran minyak atsiri herba seledri (*Apium graveolens* L.) sebanyak 1 tetes dalam 10 mL air. Pembuatan konsentrasi 1% juga dilakukan dengan melakukan pengenceran minyak atsiri herba seledri dalam 10 mL air sebanyak 2 tetes. Sedangkan

pembuatan konsentrasi 2% dilakukan dengan melakukan pengenceran minyak atsiri herba seledri sebanyak 4 tetes dalam 10 mL air.

Dalam pengaplikasian aroma dari minyak atsiri secara inhalasi dalam penelitian ini menggunakan metode penguapan. Metode ini mengubah molekul di dalam keadaan cair dengan spontan menjadi gas. Sebagai pedoman Siahaan (2013) merekomendasikan perhitungan konsentrasi pengenceran minyak atsiri dengan 20 tetes dalam 50 mL air untuk konsentrasi 2%.

7. Pembagian kelompok uji

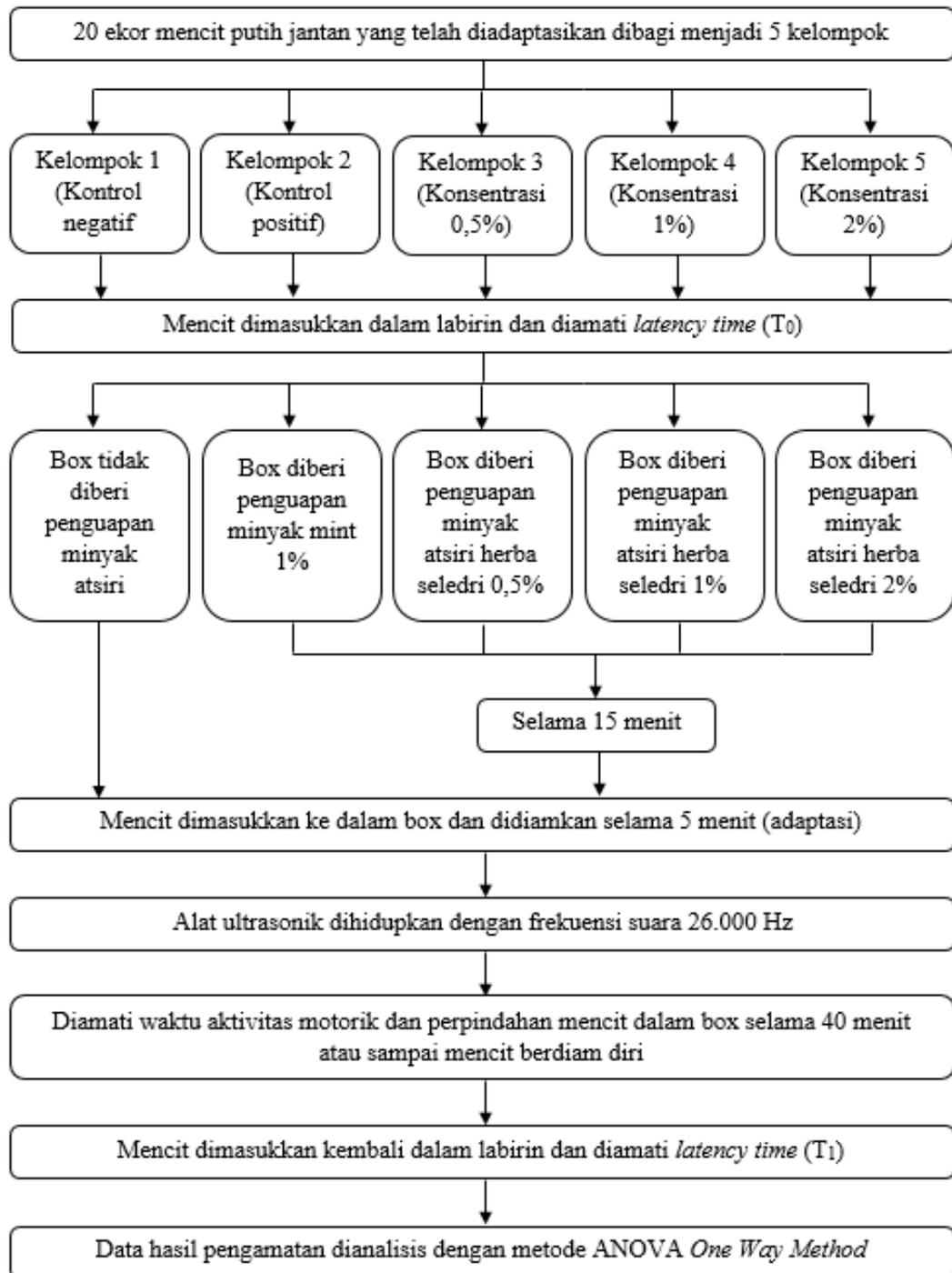
Pengujian dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 20 ekor mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang telah diadaptasikan selama seminggu. Pembagian kelompok uji dibuat menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 4 ekor mencit putih jantan.

Kelompok 1: kelompok kontrol negatif, yaitu kelompok uji yang dilakukan tanpa pemberian perlakuan minyak atsiri terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*). Kelompok 2: kelompok kontrol positif, dalam kelompok ini digunakan minyak mint (*Mentha arvensis*) dengan konsentrasi 1% terhadap mencit putih jantan. Kelompok 3: kelompok perlakuan minyak atsiri herba seledri (*Apium graveolens* L.) konsentrasi 0,5% terhadap mencit putih jantan. Kelompok 4: kelompok perlakuan minyak atsiri herba seledri konsentrasi 1% terhadap mencit putih jantan. Kelompok 5: kelompok perlakuan minyak atsiri herba seledri konsentrasi 2% terhadap mencit putih jantan.

8. Tahap percobaan dalam penelitian

Tahapan setelah pembagian kelompok uji terhadap 20 ekor mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang telah diadaptasikan menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu mencit dimasukkan ke dalam labirin untuk pengujian daya konsentrasi sebelum pemberian induksi suara ultrasonik dan minyak atsiri, kemudian amati waktu latensi yang dibutuhkan mencit sampai mencit keluar dari labirin dengan menggunakan umpan yang diletakkan pada pintu keluar labirin. Kemudian dilakukan penguapan minyak atsiri di dalam box (alat ultrasonik), minyak atsiri

daun mint konsentrasi 1% untuk kontrol positif dan minyak atsiri herba seledri (*Apium graveolens* L.) konsentrasi 0,5%, 1%, dan 2% untuk kelompok perlakuan sebanyak 10 ml selama 15 menit. Selanjutnya, mencit putih jantan dimasukkan ke dalam alat ultrasonik dan didiamkan selama 5 menit untuk beradaptasi terhadap lingkungan. Kemudian, menghidupkan alat ultrasonik dengan frekuensi suara 26.000 Hz agar mampu bekerja sebagai penginduksi depresi terhadap mencit putih jantan selama 40 menit atau sampai mencit mengalami depresi. Mencit depresi ditandai dengan berdiam diri disuatu tempat atau tidak melakukan pergerakan apapun selama 1 menit. Kelima, lakukan pengamatan terhadap aktivitas motorik dengan melihat waktu bertahan sampai mencit mengalami depresi dan jumlah perpindahan pada mencit putih jantan. Keenam, catat waktu aktivitas motorik dan banyaknya jumlah perpindahan mencit. Keenam, mencit dimasukkan kembali dalam labirin untuk pengujian daya konsentrasi setelah pemberian induksi suara ultrasonik dan minyak atsiri, kemudian amati waktu latensi yang dibutuhkan mencit sampai mencit keluar dari labirin dengan menggunakan umpan yang diletakkan pada pintu keluar labirin. Dan terakhir, lakukan analisis data dengan menggunakan ANOVA *One way method*.



Gambar 6. Skema perlakuan uji antidepresan

E. Analisis Data

Pada hasil uji efektivitas antidepresan terhadap mencit putih jantan dilakukan analisis data hasil menggunakan metode Analisis Varian (ANOVA)

dengan program SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) 15.0 for windows Evaluation Version. Analisis ini bertujuan untuk membandingkan efektivitas variasi konsentrasi minyak atsiri herba seledri (*Apium graveolens* L.) dengan tingkat kepercayaan 95%. Data hasil pengamatan efek antidepresan dan perlakuan ditampilkan dalam mean sebagai ukuran pemusatan dan standar deviasi dari tiap kelompok. Hasil data yang telah terkumpul selanjutnya dianalisis dengan menggunakan metode statistik Varian Satuan Arah dengan *One Way Method* untuk membandingkan antara kelompok perlakuan.

Rumusan hipotesis:

H_0 : tidak ada perbedaan efektivitas antara variasi konsentrasi minyak atsiri herba seledri terhadap efektivitas antidepresan terhadap mencit putih jantan.

H_a : ada perbedaan efektivitas antara variasi konsentrasi minyak atsiri herba seledri terhadap efektivitas antidepresan terhadap mencit putih jantan.

Dasar pengambilan keputusan

Jika $F_{hitung} < F_{tabel}$ atau jika probabilitas $> 0,05$ maka H_0 diterima.

Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ atau jika probabilitas $< 0,05$ maka H_0 ditolak.