

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mengkudu yang diperoleh dari desa Legundi, Kecamatan Karangjati, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mengkudu yang dipilih secara acak dengan kondisi masih segar dan tidak rusak.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah aktivitas ekstrak daun mengkudu hasil maserasi dengan pelarut etanol 96% terhadap aktivitas waktu imobilitas serta kadar glukosa darah mencit akibat induksi depresi.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama memuat identifikasi semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama yang sudah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol daun mengkudu dalam berbagai dosis.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah turunya waktu imobilitas dan kadar gula darah mencit setelah perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L) dalam berbagai macam dosis sebagai kelompok uji, kontrol positif dan kontrol negatif.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel

terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, lingkungan tempat hidup, jenis kelamin, usia, galur, kondisi laboratorium dan peneliti sendiri.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun mengkudu adalah daun segar yang diperoleh dari pohon buah mengkudu yang berasal dari desa Legundi, Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun mengkudu adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan, penggilingan dan pengayakan daun mengkudu.

Ketiga, ekstrak etanol daun mengkudu adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dipisahkan di atas *rotary evaporator* pada suhu 50°C.

Keempat, *immobility time* adalah waktu dimana hewan uji direnangkan sampai terlihat diam mengapung yang diukur dalam waktu 8 menit.

Kelima, kadar gula darah adalah kadar yang menunjukkan penurunan gula darah pada mencit yang diinduksi depresi dengan FST.

Keenam, dosis efektif adalah dosis yang memberikan efek terapi setara dengan kontrol positif.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat untuk pembuatan sampel terdiri dari timbangan digital, oven, ayakan no. 40, bejana maserasi, kertas saring, kain flanel, evaporator, corong pisah dan alat-alat gelas.

Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji adalah timbangan, spuit oral, spuit injeksi, kandang mencit, glukometer dan alat uji waktu imobilitas menggunakan metode *forced swim test*.

### 2. Bahan

**2.1. Bahan Sampel.** Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tanaman mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang di peroleh dari desa Legundi, Kecamatan Karangjati, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur.

**2.2. Bahan Kimia.** Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, Amitriptyline, aquadest dan Na CMC 0,5%.

### 3. Hewan Percobaan

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih galur swiss dengan jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan. Selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman harus selalu terkontrol agar mencegah kematian mencit. Besarnya jumlah sampel mencit yang akan digunakan ditentukan dengan rumus Federer :

$$(t)(n-1) \geq 15$$

Dengan (t) adalah jumlah kelompok perlakuan, dan (n) adalah jumlah ulangan pada masing-masing kelompok.

$$(t)(n-1) \geq 15$$

$$(5)(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Dari perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 4 ekor mencit untuk tiap kelompok. Karena pada penelitian ini menggunakan 5 perlakuan, maka jumlah sampel seluruhnya adalah 20. Sampel ditambah 25% untuk menjaga kemungkinan *drop out* sehingga jumlah sampel seluruhnya adalah 25.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan melakukan determinasi. Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Jawa Tengah.

## **2. Pengumpulan dan pengeringan daun**

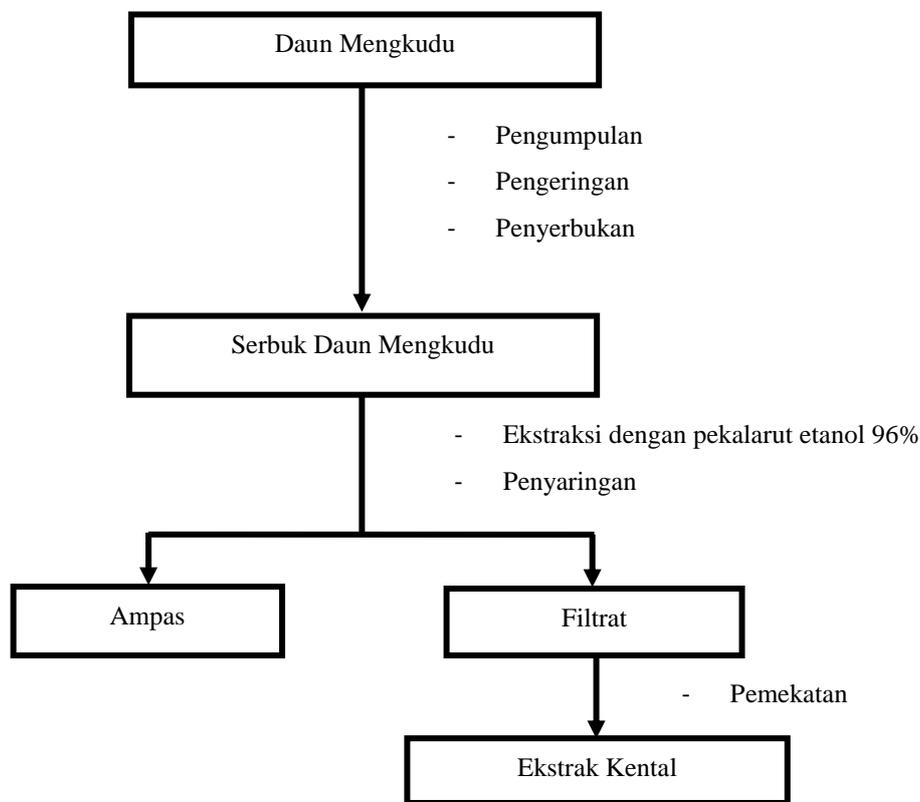
Bahan yang digunakan pada penelitian ini diambil di desa Legundi, Kecamatan Karangjati, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur. Bahan yang dimaksud adalah daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.).

## **3. Pembuatan serbuk**

Daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) diperoleh dalam keadaan segar, kemudian dicuci dengan air bersih yang mengalir hingga bersih dan terbebas dari kotoran, ditiriskan, dan ditimbang. Daun bersih kemudian dikeringkan dalam oven suhu 40-50°C sampai kering. Daun yang sudah kering diserbuk dengan alat penyerbuk kemudian diayak dengan ayakan no. 40 sehingga diperoleh serbuk yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen. Hasil serbuk kering dimasukkan dalam wadah kering dan tertutup rapat yang selanjutnya digunakan untuk penelitian.

## **4. Pembuatan ekstrak etanol**

Buat ekstrak dari serbuk kering simplisia dengan cara maserasi menggunakan pelarut sesuai, bila tidak dinyatakan lain gunakan etanol 70%. Masukkan satu bagian serbuk simplisia kering ke dalam maserator, tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat, ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental. Hitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada monografi ekstrak (Kemenkes 2013).



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol serbuk daun mengkudu

## 5. Penetapan susut pengeringan

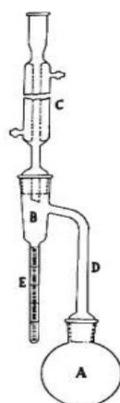
Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan dengan cara yang telah ditetapkan. Kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, simplisia harus dalam bentuk serbuk dengan derajat halus nomor 8, suhu pengeringan 105°C dan susut pengeringan ditetapkan sebagai berikut: alat dikalibrasi terlebih dahulu, krus silikat ditara dan ditimbang, kemudian sampel dimasukkan ke dalam krus silikat sebanyak 2 g. Alat di set dengan suhu 105°C selama 4 menit atau sampai bobot tetap (DepKes 2000).

## 6. Penetapan kadar air

Alat labu 500 mL (A) dihubungkan dengan pendingin air balik melalui alat balik (C) melalui alat penampung (B) yang dilengkapi dengan tabung penerima 5 mL (E) yang berskala 0,1 mL. Panaskan menggunakan pemanas listrik yang suhunya dapat diatur atau tangas minyak. Bagian atas labu tabung penyambung (D) sebaiknya dibungkus dengan asbes. Bersihkan tabung penerima dan pendingin dengan *asam pencuci*, bilas dengan air, kemudian keringkan dalam lemari

pengering. Timbang saksama sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1 sampai 4 mL air, masukkan ke dalam labu kering. Jika zat berupa pasta, timbang dalam sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu. Untuk zat yang dapat menyebabkan gejolak saat mendidih, tambahkan batu didih secukupnya. Masukkan lebih kurang 200 mL toluen jenuh air ke dalam labu, pasang rangkaian alat. Masukkan toluen jenuh air ke dalam tabung penerima (E) melalui pendingin sampai leher alat penampung (B). Panaskan labu hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mulai mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen jenuh air, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluen jenuh air. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima hingga suhu ruang. Jika ada tetes air yang melekat, gosok tabung pendingin dan tabung penerima dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen jenuh air hingga tetesan air turun. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (Kemenkes 2011).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$



**Gambar 2.** *Bidwell-Sterling Moisture Trap Vapor* (Kemenkes 2009).

## 7. Identifikasi senyawa kimia berdasarkan reaksi warna

**7.1. Flavonoid.** Sejumlah tertentu ekstrak ditambahkan dengan 100 mL air panas kemudian dididihkan selama 5 menit, disaring dan diambil filtratnya 5 mL dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk magnesium secukupnya, 1 mL asam klorida dan 2 mL amil alkohol, dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan positif flavonoid (Sarker *et al.* 2006).

**7.2. Tanin.** Untuk pengujian tanin sebanyak 0,5 g serbuk simplisia disari dengan 10 mL air suling, disaring lalu filtratnya diencerkan dengan air suling sampai tidak berwarna. Diambil 2 mL larutan lalu ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Apabila timbul warna biru atau kehitaman berarti menunjukkan positif (+) adanya tanin. Akan tetapi apabila warna biru atau kehitaman tidak muncul, maka sampel menunjukkan hasil negatif (-) untuk senyawa tanin (DepKes 1995).

**7.3. Alkaloid.** Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia ditimbang kemudian ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut:

- a. Diambil 3 tetes filtrat lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, kemudian dilihat perubahan yang terjadi. Jika muncul endapan maka sampel positif mengandung alkaloid, akan tetapi apabila endapan tidak muncul maka sampel negatif mengandung alkaloid.
- b. Diambil 3 tetes filtrat lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat, kemudian dilihat perubahan yang terjadi. Jika muncul endapan maka sampel positif mengandung alkaloid, akan tetapi apabila endapan tidak muncul maka sampel negatif mengandung alkaloid.
- c. Diambil 3 tetes filtrat lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, kemudian dilihat perubahan yang terjadi. Jika muncul endapan maka sampel positif mengandung alkaloid, akan tetapi apabila endapan tidak muncul maka sampel negatif mengandung alkaloid.

Apabila terjadi endapan paling sedikit dua dari tiga percobaan di atas, maka positif (+) mengandung senyawa alkaloid, akan tetapi apabila endapan tersebut tidak muncul, maka sampel menunjukkan hasil negatif (-) untuk senyawa alkaloid (DepKes 1995).

**7.4. Saponin.** Sebanyak 0,05 g ekstrak ditambah air kemudian dididihkan selama beberapa menit. Larutan disaring dan filtratnya dikocok kuat-kuat. Timbulnya buih yang stabil selama 10 menit setelah pengocokan menunjukkan terdapatnya saponin (DepKes 1995).

## 8. Penentuan dosis

**8.1. Dosis Amitriptyline.** Dosis Amitriptyline yang digunakan pada manusia adalah 1 tablet (25 mg/70 kg BB) untuk 1 kali minum 2-3 kali sehari. Faktor konversi manusia berat badan 70 kg ke mencit dengan berat badan 20 g adalah 0,0026. Maka dosis untuk mencit 20 g adalah  $25 \text{ mg} \times 0.0026 = 0.065 \text{ mg}/20 \text{ g BB Mencit}$ .

**8.2. Dosis ekstrak etanol daun mengkudu.** Dosis sediaan yang diberikan mengacu pada penelitian Serafini *et al.* (2011) 100, 200, dan 400 mg/kg BB mencit.

## 9. Pembuatan larutan uji

### 9.1. Suspensi Amitriptyline.

R/ Amitriptyline	25 mg
Na CMC	2%
Aquadest sampai	100 mL

Menimbang masing-masing bahan, kemudian kalibrasi botol 100 mL. Memasukkan Na CMC dan aquadest hangat ke dalam mortir gerus sampai membentuk mucilago. Kemudian menambahkan Amitriptyline ke dalam mortir gerus sampai homogen. Dimasukkan ke dalam botol dan tambahkan aquadest sampai 100 mL.

### 9.2. Suspensi Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

Suspensi ekstrak daun mengkudu dengan larutan stok 2%

R/ Ekstrak daun mengkudu	2%
Na CMC	1%
Aquadest sampai	100 mL

Menyiapkan alat dan bahan, kemudian menimbang masing-masing bahan dan kalibrasi botol 100 mL. Memasukkan Na CMC ke dalam mortir kemudian tambahkan aquadest hangat gerus sampai membentuk mucilago dan tambahkan ekstrak kental daun mengkudu gerus sampai homogen, kemudian dimasukkan ke dalam botol dan tambahkan aquadest ke dalam botol sampai 100 mL.

### **9.3. Na CMC 0,5%.**

Menimbang serbuk Na CMC 0,5 gram kemudian disuspensikan dengan aquadest panas ad 100 mL sampai homogen. Suspensi ini digunakan sebagai kontrol negatif dan suspending agent.

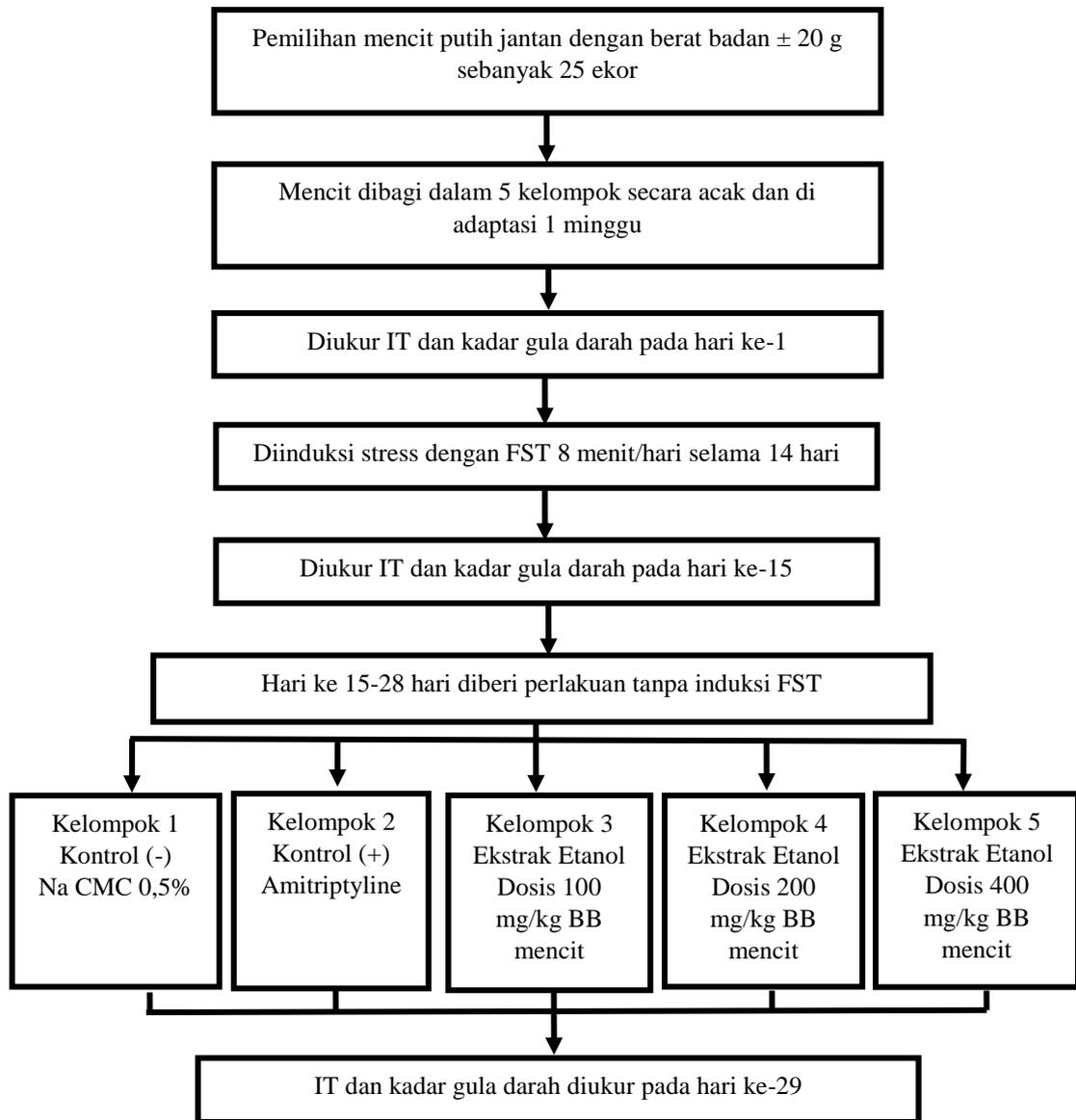
## **10. Perlakuan depresi terhadap hewan uji**

Mencit putih jantan diadaptasi selama 1 minggu dibuat depresi dengan metode *forced swimming test* selama 14 hari dengan durasi 8 menit, perlakuan ini bertujuan untuk membuat mencit depresi (Artyani 2014).

## **E. Analisis Data**

Analisis statistik yang digunakan pertama dalam penelitian ini untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji distribusi normal dengan uji *Saphiro Wilk*, mengingat jumlah data <50. Jika data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ), analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Jika hasil uji *One Way ANOVA* terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) dilanjutkan dengan *Post Hoc Scheffe Test* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Namun, jika hasil uji distribusi tidak normal ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji non parametrik menggunakan uji *Mann-Whitney U* dilanjutkan dengan uji beda antar perlakuan dengan uji *Kruskal Wallis* ( $p < 0,05$ ).

### F. Alur Penelitian



Gambar 3. Skema alur penelitian.