

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah buah dari tanaman mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) diperoleh dari desa Legundi, Kecamatan Karangjati, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah buah mengkudu dalam kondisi mengkal, tidak terlalu muda atau masak, segar, bersih dan tidak busuk diperoleh dari desa Legundi, Kecamatan Karangjati, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah aktivitas ekstrak buah mengkudu hasil maserasi dengan pelarut etanol 96% terhadap aktivitas lokomotor 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 terkontrol.

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

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

Variabel terkontrol 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, buah mengkudu adalah buah yang diperoleh dari pohon buah mengkudu yang berasal dari desa Legundi, kec. Karangjati, Ngawi, Jawa Timur.

Kedua, serbuk buah mengkudu adalah serbuk yang diperoleh dengan pemanenan, pengeringan, penggilingan, dan pengayakan buah mengkudu.

Ketiga, ekstrak etanol buah mengkudu adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode re-maserasi menggunakan pelarut etanol 96% perbandingan 1:10, kemudian dipekatkan di atas *rotary evaporator* pada suhu 50°C.

Keempat, mencit putih jantan adalah hewan model laboratorium yang digunakan dalam penelitian berumur 6-8 minggu dengan berat badan \pm 30 gram.

Kelima, *immobility time* adalah waktu dimana binatang mengapung di permukaan dan hanya membuat gerakan untuk tetap bertahan, yang diukur dalam durasi waktu 8 menit, 2 menit awal untuk adaptasi 6 menit terakhir pengamatan.

Keenam, penurunan *immobility time* adalah kemampuan ekstrak etanol buah mengkudu dalam menurunkan durasi IT sehingga menjadi lebih pendek.

Ketujuh, penurunan kadar gula darah adalah kemampuan bahan uji dalam penurunan kadar gula darah pada mencit yang diinduksi depresi dengan FST.

Kedelapan, dosis efektif adalah dosis ekstrak etanol buah mengkudu yang memberikan efek terapi setara atau tidak berbeda signifikan 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 *immobility time* menggunakan metode FST.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah 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%, Amitriptiline, dan CMC 1%.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan dan Pengeringan buah

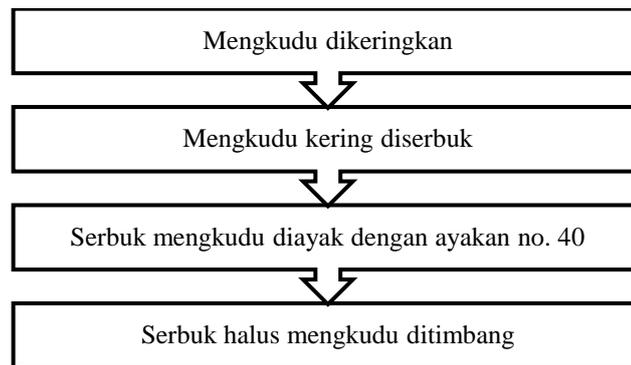
Bahan yang digunakan pada penelitian ini diambil di desa Legundi, kec. Karangjati, kab. Ngawi, Jawa Timur. Bahan yang dimaksud yaitu buah mengkudu.

2. Determinasi Tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan melakukan determinasi. Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT), Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

3. Pembuatan Serbuk

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



Gambar 1. Pembuatan serbuk buah mengkudu.

4. Penetapan Susut Pengeringan

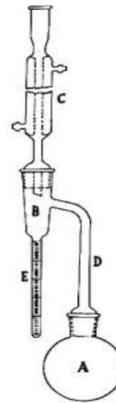
Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan dengan cara yang telah ditetapkan. Simplisia harus dalam bentuk serbuk dengan derajat halus nomor 8, suhu pengeringan 105°C. Susut pengeringan ditetapkan dengan cara alat dikalibrasi terlebih dahulu, plat aluminium ditara dan ditimbang, kemudian sampel dimasukkan ke dalam plat sebanyak 5 g. Alat diset dengan suhu 105°C selama 4 menit atau sampai bobot tetap (DepKes 2000).

5. 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. Zat yang berupa pasta, timbang dalam sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu. 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 naikan kecepatan

penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Semua air akan 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. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima hingga suhu ruang. Gosok tabung pendingin dan tabung penerima dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen jenuh air hingga tetesan air turun, jika tetes air masih melekat. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (Kemenkes 2011).

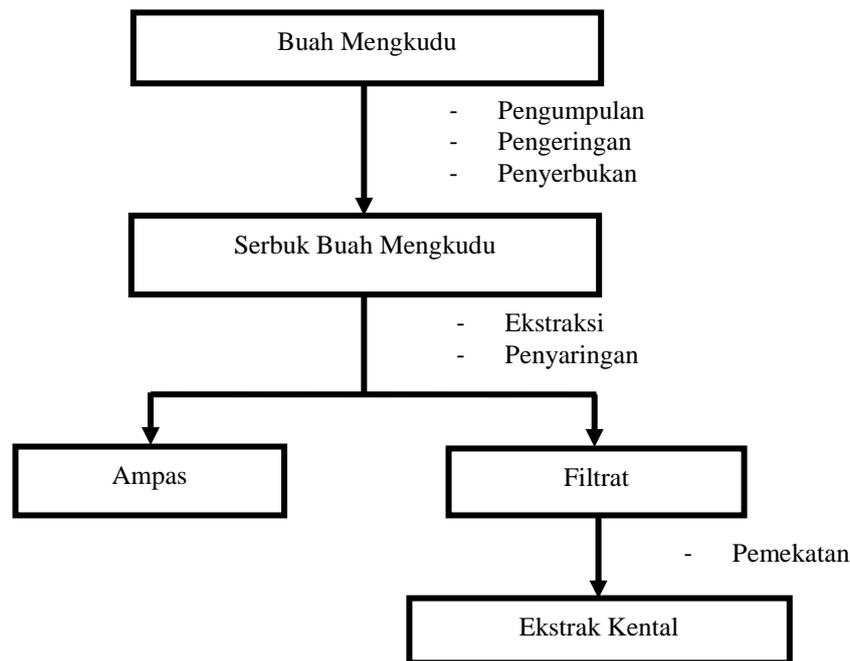
$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$



Gambar 2. *Sterling-bidwell* (Kemenkes 2009).

6. Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Mengkudu

Masukkan 500 g serbuk kering buah mengkudu, tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama 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 3. Pembuatan ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

7. Identifikasi Kandungan Senyawa

7.1. Identifikasi flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan 0,5 g ekstrak etanol buah mengkudu dilarutkan dalam 10 ml air dipanaskan 15 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat ditambahkan serbuk Mg, 2 mL etanol, HCL, dan pelarut amil alkohol. Campuran dikocok kuat, kemudian dibiarkan beberapa saat agar memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harborne 2006).

7.2. Identifikasi saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan 0,5 g ekstrak etanol buah mengkudu dilarutkan dalam 10 mL air dan dipanaskan. Sebanyak 5 mL filtrat diambil dikocok kuat selama 10 menit, apabila terbentuk buih setinggi 1-10 cm dan ditambah 1 tetes HCL 2 N jika selama \pm 10 menit buih tidak hilang maka hasilnya positif (Depkes 1995).

7.3. Identifikasi alkaloid. Larutan uji hasil ekstraksi dibasakan dengan larutan amonia 10%, larutan basa di sari dengan kloroform, ekstrak kloroform diasamkan dengan HCl 1 N, kemudian asam dipisahkan dan filtrat diuji dengan pereaksi dragendorf. Hasil positif apabila terbentuk kekeruhan atau endapan jingga kecoklatan. Filtrat jika ditambahkan dengan pereaksi mayer menunjukkan adanya endapan putih kekuningan maka hasil positif alkaloid (Harborne 1987).

7.4. Identifikasi tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan 0,5 g ekstrak etanol buah mengkudu dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan kalsium besi (III) klorida (FeCl_3) dan amoniak, akan terbentuk warna biru kehitaman (tanin galat) atau hijau (tanin katekol) (Harborne 2006).

8. Pembuatan Sediaan Oral

8.1. Suspensi ekstrak buah mengkudu. Menyiapkan alat, dan kemudian masing-masing bahan, kemudian kalibrasi botol 100 mL. Memasukkan CMC ke dalam mortir kemudian menambahkan aquadest hangat gerus sampai membentuk mucilago. Menambahkan ekstrak kental buah mengkudu gerus sampai homogen. Memasukkan ke dalam botol, menambahkan aquadest sampai 100 mL.

8.2. Suspensi amitriptilin. Menimbang masing-masing bahan, kemudian kalibrasi botol. Menggerus amitriptilin pada mortir sampai homogen, sisihkan. Memasukkan CMC Na dan aquadest hangat ke dalam mortir gerus sampai homogen. Menambahkan amitriptilin ke dalam mortir, aduk sampai homogen. Memasukkan ke dalam botol, menambahkan aquadest sampai 100 mL.

8.3. Suspensi CMC Na. Menyiapkan alat dan menimbang bahan, kemudian kalibrasi botol 100 mL. Memasukkan 0,5 g Na CMC dan 20 mL aquadest hangat ke dalam mortir gerus sampai membentuk mucilago. Memasukkan ke dalam botol dan menambahkan sisa aquadest ke dalam botol sampai 100 mL.

9. Perlakuan Hewan Uji

Mencit yang digunakan sebanyak 25 ekor. Mencit ditimbang dan diberi tanda. Mencit diadaptasi terlebih dahulu untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan. Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan dengan bobot rata-rata 20-25 g. Mencit yang digunakan dibagi menjadi 5 kelompok kontrol:

- Kelompok 1 : Kontrol negatif (CMC Na 0,5 %)
- Kelompok 2 : Kontrol positif (amitriptilin dosis 25 mg/kg BB)
- Kelompok 3 : Ekstrak etanol buah mengkudu dosis 25 mg/kg BB
- Kelompok 4 : Ekstrak etanol buah mengkudu dosis 50 mg/kg BB
- Kelompok 5 : Ekstrak etanol buah mengkudu 100 mg/kg BB

10. Prosedur Uji *Immobility Time*

Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode *forced swim test* dan dilihat *immobility time*, dengan cara mencit dimasukkan ke dalam silinder kaca (diameter 25 cm, tinggi 23 cm) berisi air ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) dengan ketinggian air 12 cm. Pengujian dilakukan selama 8 menit, 2 menit pertama diizinkan untuk akomodasi. Durasi imobilitas dalam sesi 6 menit dicatat sebagai skor imobilitas. Periode pengujian berakhir, mencit dikeringkan dengan handuk dan dikembalikan ke kondisi perumahannya (Mahmoud 2016; Porsolt 1977). *Immobility time* adalah jumlah waktu tidak bergerak seluruh bagian tubuh mencit yang diukur selama mencit berenang pada metode *forced swim test* (Praja 2016; Nuzband 2014).

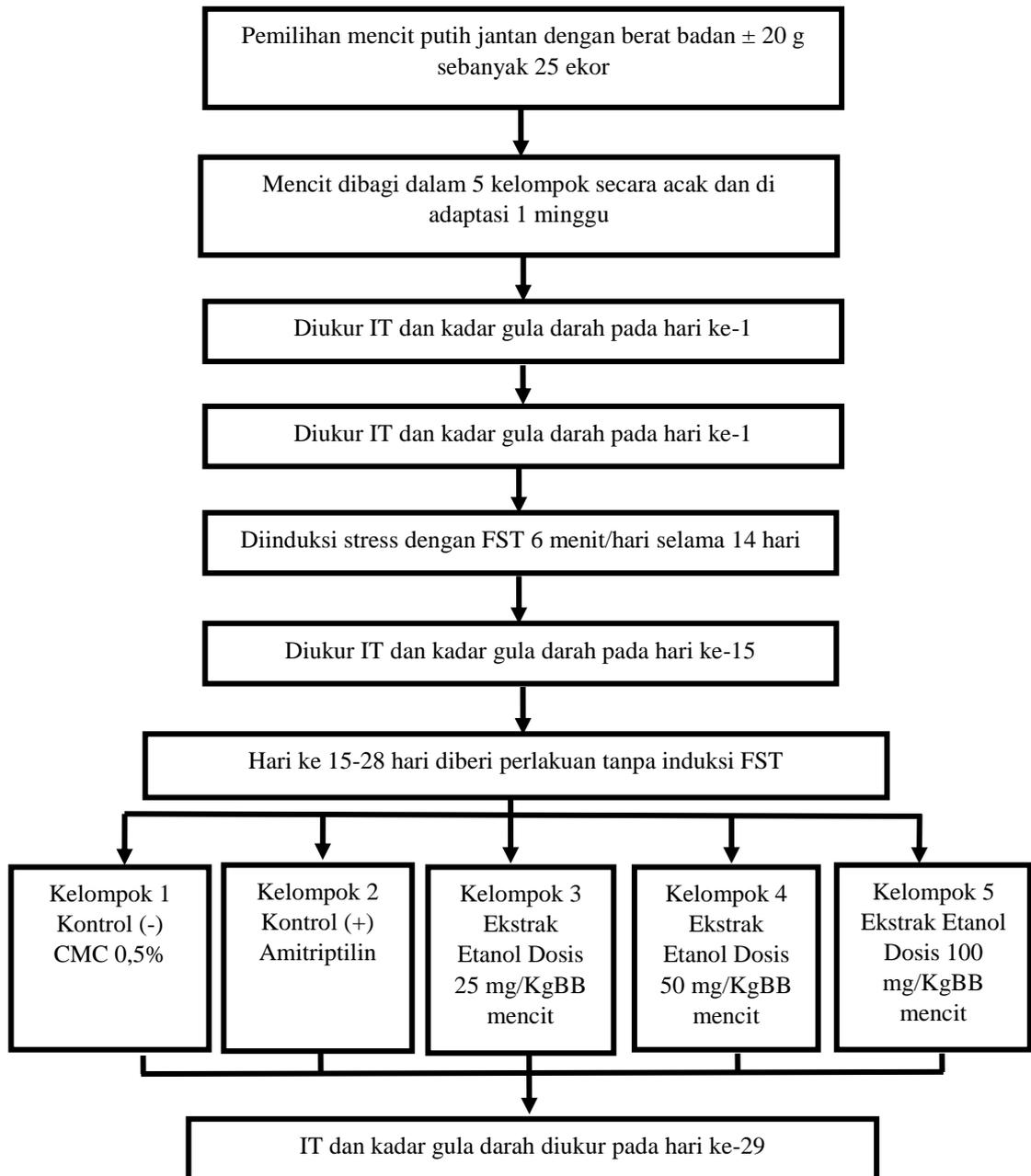
11. Prosedur Uji Kadar Gula Darah

Prosedur penggunaan glukometer adalah *test strip* dimasukkan ke lubang alat *GlucoDr test meter*, ambil sampel darah dengan *GlucoDr lancing device*, tempelkan darah pada *test strip*, maka darah akan terserap ke dalam strip, pastikan *test strip* terisi penuh. Layar pada alat memunculkan angka 11 yang kemudian menghitung mundur sampai keluar hasil pengukuran glukosa darah.

E. Analisis Statistik

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 . Data terdistribusi normal ($p > 0,05$), analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) dan uji homogenitas varians melalui uji *levene statistic* menunjukkan adanya *homogeneity of varians* ($p > 0,05$).

F. Skema Penelitian



Gambar 4. Prosedur penelitian uji aktivitas antidepresan ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)