

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah bagian dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian, dengan ciri-ciri dan keberadaan diharapkan mampu mewakili atau menggambarkan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) yang segar, berwarna coklat dan wangi, bebas dari penyakit, tidak busuk, bagian rimpang masih muda atau sudah tua, serta bersih.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah aroma minyak atsiri rimpang temulawak 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 yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam beberapa macam variabel antara lain: variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini merupakan variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel dalam penelitian ini adalah minyak atsiri rimpang temulawak dengan berbagai variasi konsentrasi.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini merupakan pusat persoalan yang merupakan pengaruh selain variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah efek antidepresan minyak atsiri rimpang temulawak dengan melihat pengamatan pada peningkatan aktivitas motorik dan daya konsentrasi mencit dalam uji antidepresan dengan metode ultrasonik modifikasi.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali dalam penelitian ini merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, maka perlu penetapan kualifikasinya agar dapat diulang dalam penelitian lain dengan tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi sampel, waktu pengamatan, kondisi peneliti, kondisi laboratorium, metode penelitian dan hewan uji, berupa mencit putih jantan (*Mus musculus*) berusia 2-3 bulan dengan berat badan bekisar 20-30 gram .

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, rimpang temulawak adalah rimpang yang diambil dari tanaman temulawak diperoleh secara acak dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah dengan ciri-ciri segar, berwarna coklat dan wangi, bebas dari penyakit, tidak busuk, bagian rimpang masih muda atau sudah tua, serta bersih.

Kedua, minyak atsiri rimpang temulawak adalah minyak atsiri hasil destilasi rimpang temulawak dengan metode destilasi uap dan air yang dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Ketiga, antidepresan adalah terapi untuk mengobati depresi menggunakan aroma dari minyak atsiri.

Keempat, metode ultrasonik modifikasi adalah metode yang digunakan dalam penelitian untuk membuat hewan uji menjadi depresi dengan gangguan suara dengan frekuensi tinggi, sebelum mencit depresi diberikan aroma minyak atsiri rimpang temulawak dengan variasi konsentrasi 0,5%, 1%, dan 2%, dan kontrol positif yang digunakan adalah minyak atsiri daun mint konsentrasi 1% yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kelima, waktu aktivitas motorik adalah waktu yang dibutuhkan oleh hewan uji dari keadaan bergerak bebas hingga hewan uji diam di suatu tempat selama 1 menit karena induksi suara ultrasonik yang diberikan. Aktivitas motorik yang dimaksud adalah perpindahan hewan uji dari bilik A ke bilik B atau sebaliknya.

Keenam, jumlah perpindahan merupakan parameter dari aktivitas motorik yang digunakan untuk melihat banyaknya perpindahan yang dilakukan hewan uji untuk berpindah dari bilik A ke bilik B atau sebaliknya dalam box selama pemberian induksi suara ultrasonik.

Ketujuh, daya konsentrasi adalah kemampuan hewan uji dalam berfikir dan fokus setelah di masukkan ke dalam labirin dengan adanya pemberian umpan sampai mencit keluar dari labirin dengan melihat parameter *latency time*.

Kedelapan, *latency time* adalah waktu yang dibutuhkan saat hewan uji di masukkan dalam labirin sampai keluar dari labirin dengan menemukan umpan yang ada di dalam labirin sebagai parameter daya konsentrasi.

Kesembilan, konsentrasi efektif adalah konsentrasi minyak atsiri rimpang temulawak yang memiliki aktivitas antidepresan paling besar dan sebanding dengan kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat destilasi uap dan air, Gc-Ms, kotak ultrasonik modifikasi, alat uji labirin, kamera, gelas ukur, botol kaca gelap, neraca analitik, pipet, kertas saring, refraktometer, piknometer dan peralatan pendukung lainnya.

Alat pengujian antidepresan adalah alat ultrasonik modifikasi dengan frekuensi 26.000 Hz. Alat ini berupa kotak (balok) 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 dan daya konsentrasi. Prinsip kerja alat ini adalah mengacaukan syaraf pendengaran sehingga hewan uji akan terganggu pada sistem limbik, hal ini menyebabkan terhambatnya pengeluaran neurotransmitter serotonin dan norepinefrin (Rusmalayanti 2007).

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang temulawak yang segar, berwarna coklat dan wangi, bebas dari penyakit, tidak busuk, bagian rimpang masih muda atau sudah tua, serta bebas dari pirogen. Diambil secara acak dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah air (pembawa), natrium sulfat eksikatus, dan produk minyak atsiri daun mint.

2.3 Hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan yang sehat, berumur 2-3 bulan, dan memiliki berat badan 20-30 gram, yang diperoleh dari laboratorium farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

D. Jalan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah determinasi tanaman bertujuan untuk mendapatkan kebenaran sampel rimpang temulawak yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mencocokkan morfologi yang ada pada tanaman yang dilakukan dilaboratorium biologi MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta (UNS).

2. Pengambilan rimpang temulawak

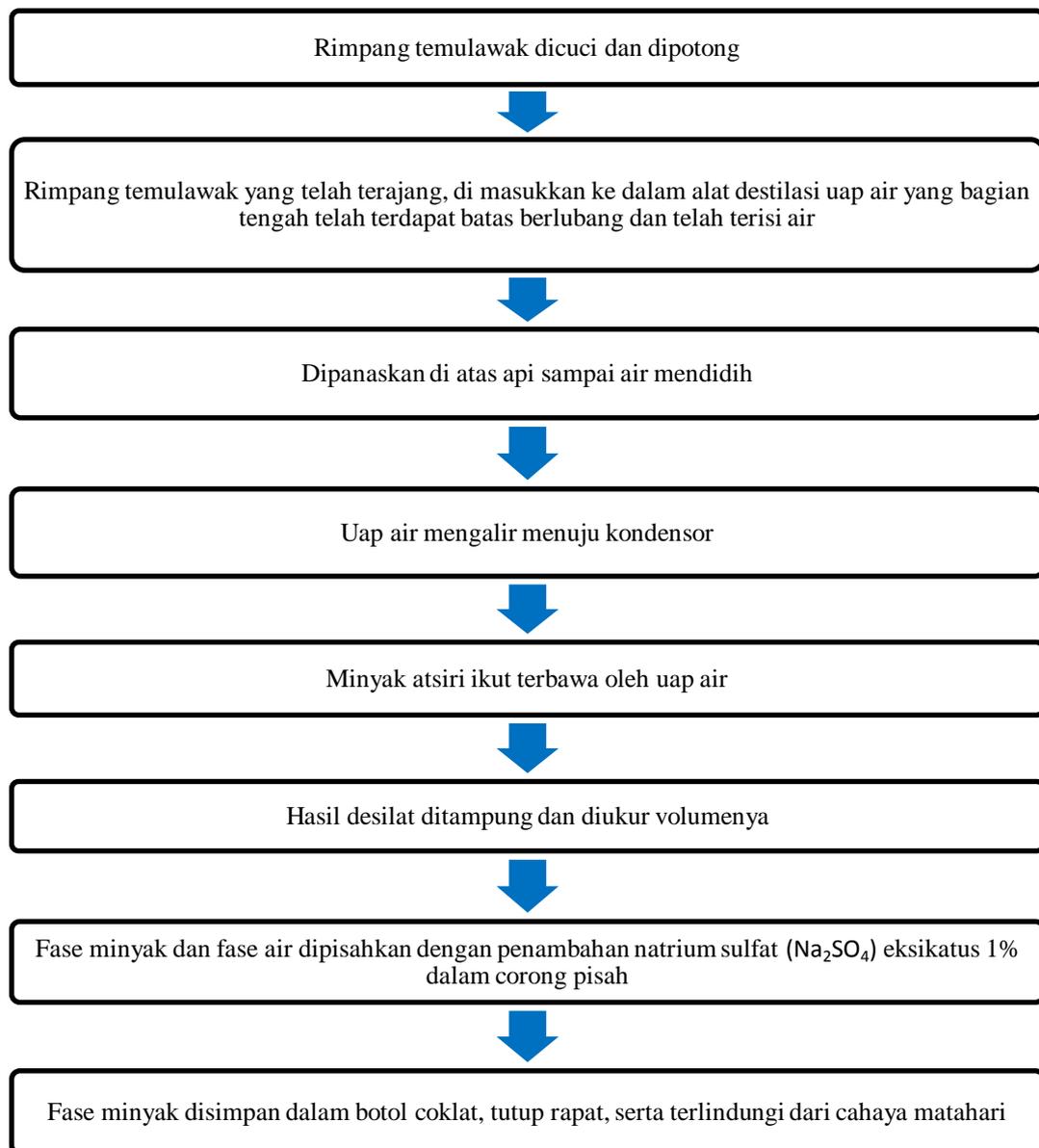
Rimpang temulawak yang segar, berwarna coklat kekuningan dan wangi, bebas dari penyakit, tidak busuk, bagian rimpang masih muda atau sudah tua, serta bersih. Diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Rimpang temulawak digunakan dalam keadaan segar tanpa pengeringan

untuk menghasilkan minyak atsiri yang lebih maksimal karena pengeringan menyebabkan minyak atsiri dalam rimpang menguap.

3. Isolasi minyak atsiri rimpang temulawak

Rimpang temulawak yang masih segar sudah dipanen dikumpulkan, dibersihkan dari kotoran-kotoran yang melekat dan dicuci dengan air mengalir agar terbebas dari debu dan pengotor, kemudian rimpang temulawak dipotong-potong dan ditimbang. Rimpang dipotong kecil-kecil agar mempermudah proses penguapan, kemudian melakukan destilasi uap air sampai dihasilkan tetesan minyak atsiri rimpang temulawak hingga tidak menetes lagi. Pada proses ini tidak dilakukan pengeringan pada rimpang temulawak, agar menghasilkan minyak atsiri yang maksimal karena apabila dilakukan pengeringan maka banyak minyak atsiri yang terkandung dalam rimpang temulawak akan menguap. Rimpang temulawak yang digunakan pada isolasi ini sebanyak 20 kg yang terbagi dalam 4 kali destilasi.

Destilasi dilakukan pada air mendidih, uap air akan melalui pipa kondensor. Hasil yang diperoleh berupa minyak atsiri yang masih tercampur antara fase air dan fase minyak. Pemisahan fase tersebut dapat dilakukan dengan corong pisah dan menambah natrium sulfat (Na_2SO_4) eksikatus sebanyak 1% dari volume minyak atsiri, maka akan diperoleh minyak atsiri rimpang temulawak murni, minyak tersebut kemudian disimpan dalam botol gelap tertutup rapat dan terlindung dari cahaya matahari.



Gambar 4. Skema isolasi minyak atsiri rimpang temulawak

4. Pemeriksaan organoleptis minyak atsiri rimpang temulawak

Minyak atsiri hasil destilasi diambil dengan volume yang cukup untuk pengamatan dan ditempatkan dalam wadah berbahan kaca bersih dan bening kemudian diamati aspek bentuk, warna, kejernihan, aroma, dan rasa (Gunawan dan Mulyani 2004)

5. Identifikasi minyak atsiri

Identifikasi minyak atsiri rimpang temulawak dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu :

Pertama, meneteskan 1 tetes minyak atsiri pada kertas saring dan didiamkan beberapa menit. Apabila kertas saring tidak ada noda yang tertinggal sama sekali, maka minyak atsiri tersebut terbukti kemurniannya.

Kedua, meneteskan minyak atsiri pada permukaan air, maka minyak atsiri rimpang temulawak akan menyebar dan permukaan air akan tampak jernih (Guenther 1990).

6. Penetapan bobot jenis minyak atsiri

Menimbang pikno kosong bersih dan kering dalam suhu ruang. Menimbang pikno kosong tersebut dengan teliti dan cermat. Memasukkan air pada pikno tersebut kemudian menimbang dengan teliti, dan mengganti air tersebut dengan minyak atsiri dan menimbang pikno berisi minyak atsiri tersebut. Dari data penimbangan tersebut dapat diketahui bobot jenis minyak atsiri dengan cara berat pikno beserta minyak atsiri dikurangi dengan berat pikno kosong, kemudian dibagi dengan berat pikno berisi air yang telah dikurangi berat pikno kosong. Penimbangan harus dilakukan sebanyak 3 kali (Ansel 1989).

7. Penetapan indeks bias minyak atsiri

Minyak atsiri dari rimpang temulawak diperiksa indeks bias dengan satu kali pengulangan, dengan menggunakan *refractometer* dengan cara badan prisma dibuka kemudian dibersihkan dengan kapas yang sudah terbasahi dengan alkohol. Mengatur refraktometer sehingga skala nampak jelas, mencatat temperatur ruangan tempat bekerja kemudian meneteskan cairan yang diukur pada prisma dan menutup kembali. Pemutar sebelah kanan diputar hingga batas gelap dan terang tepat pada satu garis silang kemudian membaca skala dan mencatat sebagai indeks bias (Guenther 1987).

8. Penetapan kelarutan dalam alkohol, n-heksan, dan etil asetat

Uji kelarutan minyak atsiri dalam pelarut (etanol 70%, n-heksan, dan etil asetat) dilakukan dengan cara memipet 1 mL minyak ke dalam gelas ukur 10 mL ditambahkan pelarut dengan cara bertahap, pada setiap menambahkan alkohol kocok dan amati kejernihannya (Badan Standart Nasional Indonesia 2001).

9. Karakterisasi komponen senyawa penyusun minyak atsiri rimpang temulawak secara GC-MS

Pengujian komponen senyawa penyusun minyak atsiri rimpang temulawak menggunakan GC-MC Shimadzu GCMS-QPZOLOS (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Alat ini dilengkapi dengan *Capillary Column*: Nonpolar 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 *data base wiley library* (Mughtaridi dan Moelyono 2015).

10. Persiapan hewan uji

Mencit putih jantan merupakan hewan uji yang digunakan pada penelitian ini. Hewan uji yang digunakan penelitian ini adalah sebanyak 25 ekor. 25 ekor mencit tersebut kemudian diadaptasikan selama seminggu (7 hari) dengan merawat dengan baik dengan cara memberi makan dan minum secara teratur agar mencit sehat dan berat badan tidak berkurang, serta mencit tidak mengalami diare dengan suhu tubuh mencit optimum rata-rata 37°C. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini harus mencit yang jantan, sehat, berumur 2-3 bulan, bulu sehat, bersih, dan berat badan mencit 20-30 gram, serta mencit tersebut tidak mengalami stress dengan ciri-ciri aktif bergerak. Mencit yang terlalu diam juga tidak digunakan dalam penelitian ini dikuatkan mencit tersebut sedang sakit. Mencit juga diadaptasikan selama 3 hari berturut-turut dalam labirin sebelum pengujian antidepresan pada alat ultrasonik, hal ini bertujuan agar mencit terbiasa dalam suasana labirin.

11. Pembuatan konsentrasi minyak atsiri

Konsentrasi minyak atsiri rimpang temulawak dalam penelitian ini adalah 0,5%, 1% dan 2%. Dalam setiap konsentrasi akan dibuat sebanyak 10 mL dari

minyak atsiri rimpang temulawak. Memerlukan pengenceran untuk pembuatan variasi konsentrasi tersebut dengan menambah air (pembawa). Untuk pembuatan konsentrasi 0,5% dilakukan dengan melakukan pengenceran minyak atsiri rimpang temulawak sebanyak 1 tetes (0,05 mL) dalam 10 mL air. Pembuatan konsentrasi 1% dilakukan dengan pengenceran minyak atsiri rimpang temulawak sebanyak 2 tetes (0,1 mL) dalam 10 mL air. Sedangkan konsentrasi 2% dilakukan dengan mengencerkan minyak atsiri rimpang temulawak sebanyak 4 tetes (0,2 mL) yang akan dilarutkan dalam air sampai 10 mL.

Pengaplikasian aroma dari minyak atsiri, dalam penelitian ini menggunakan metode inhalasi. Metode inhalasi bekerja dengan membebaskan molekul minyak atsiri yang paling ringan kemudian molekul yang lebih berat dengan media pembawa air secara berurutan. Pengaturan suhu sangat penting untuk mencegah agar minyak atsiri terlalu panas, karena apabila terlalu panas minyak atsiri tersebut cepat habis dan molekul-molekul berat akan terbakar sehingga menimbulkan bau hangus. Metode aplikasi untuk mendapatkan efek aroma minyak atsiri secara inhalasi ada beberapa cara yaitu pengusapan langsung di tangan, alat penguap, rendaman, botol penyemprotan dan *diffuser*. *Diffuser* merupakan metode yang digunakan dalam praktek sehari-hari yaitu dengan meneteskan minyak ke dalam wadah yang berisi aquades dengan konsentrasi tertentu. Konsentrasi yang direkomendasikan yaitu 20 tetes dalam 50 mL air untuk konsentrasi 2% (Siahaan 2013).

12. Pembagian kelompok uji

Pengujian dalam penelitian ini menggunakan 25 mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang telah mengalami perlakuan adaptasi selama 7 hari. Pembagian kelompok uji dibuat menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit putih jantan.

Kelompok pertama adalah kelompok kontrol negatif. Kelompok kontrol negatif yang dilakukan tanpa pemberian perlakuan minyak atsiri terhadap mencit putih jantan, hanya mengamati keadaan mencit yang dibuat depresi dalam box ultrasonik modifikasi.

Kelompok kedua adalah kelompok kontrol positif. Kelompok kontrol positif ini digunakan produk minyak atsiri daun mint dengan konsentrasi 1% yang telah diuji efektivitasnya terhadap mencit putih jantan dan telah dipasarkan.

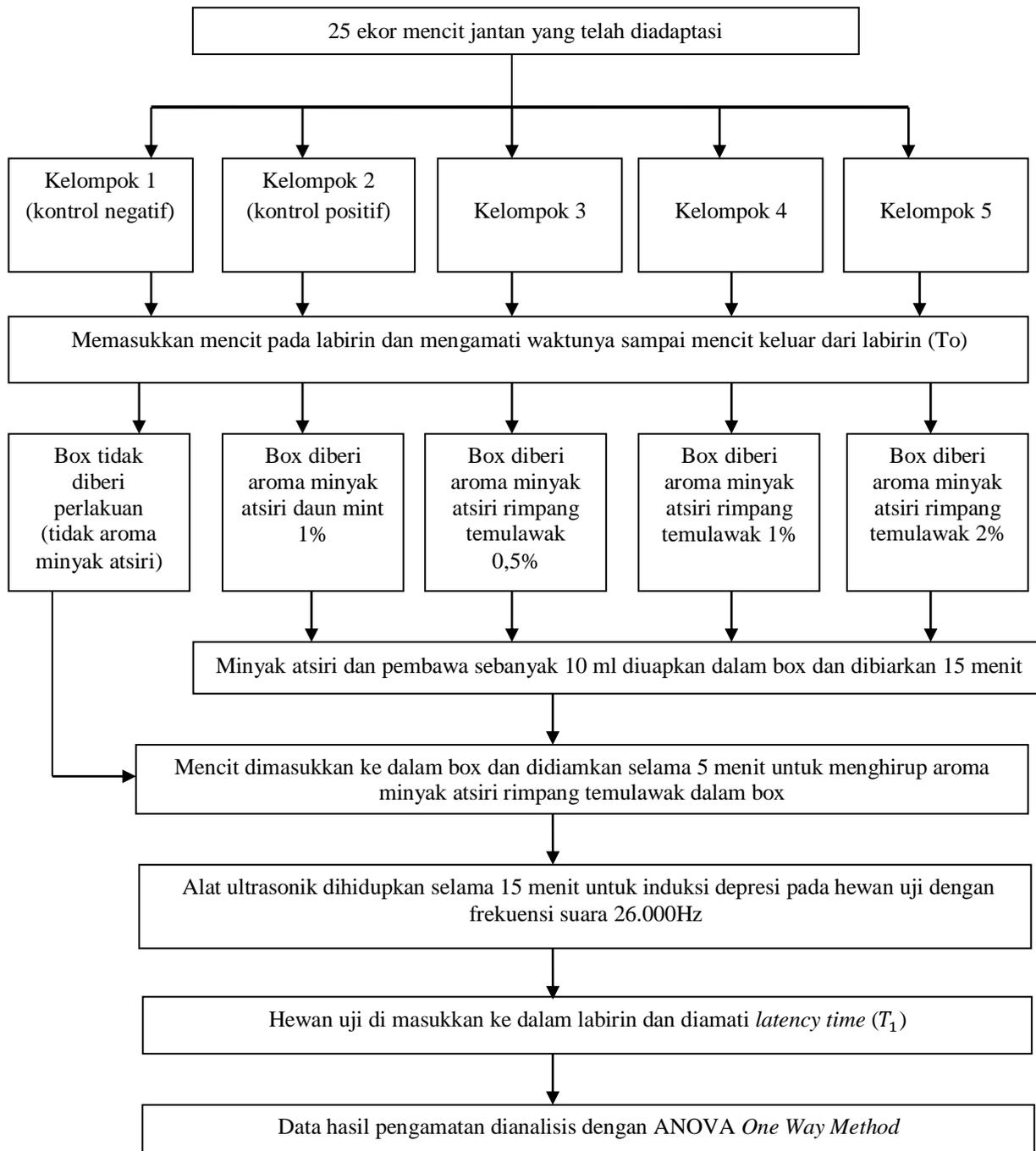
Kelompok ketiga adalah kelompok perlakuan aroma minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 0,5% terhadap mencit putih jantan yang telah dibuat depresi.

Kelompok keempat adalah kelompok perlakuan aroma minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 1% dengan perlakuan sama dengan kelompok tiga dan lima.

Kelompok kelima adalah kelompok perlakuan aroma minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 2% terhadap mencit putih jantan.

13. Tahap percobaan dalam penelitian

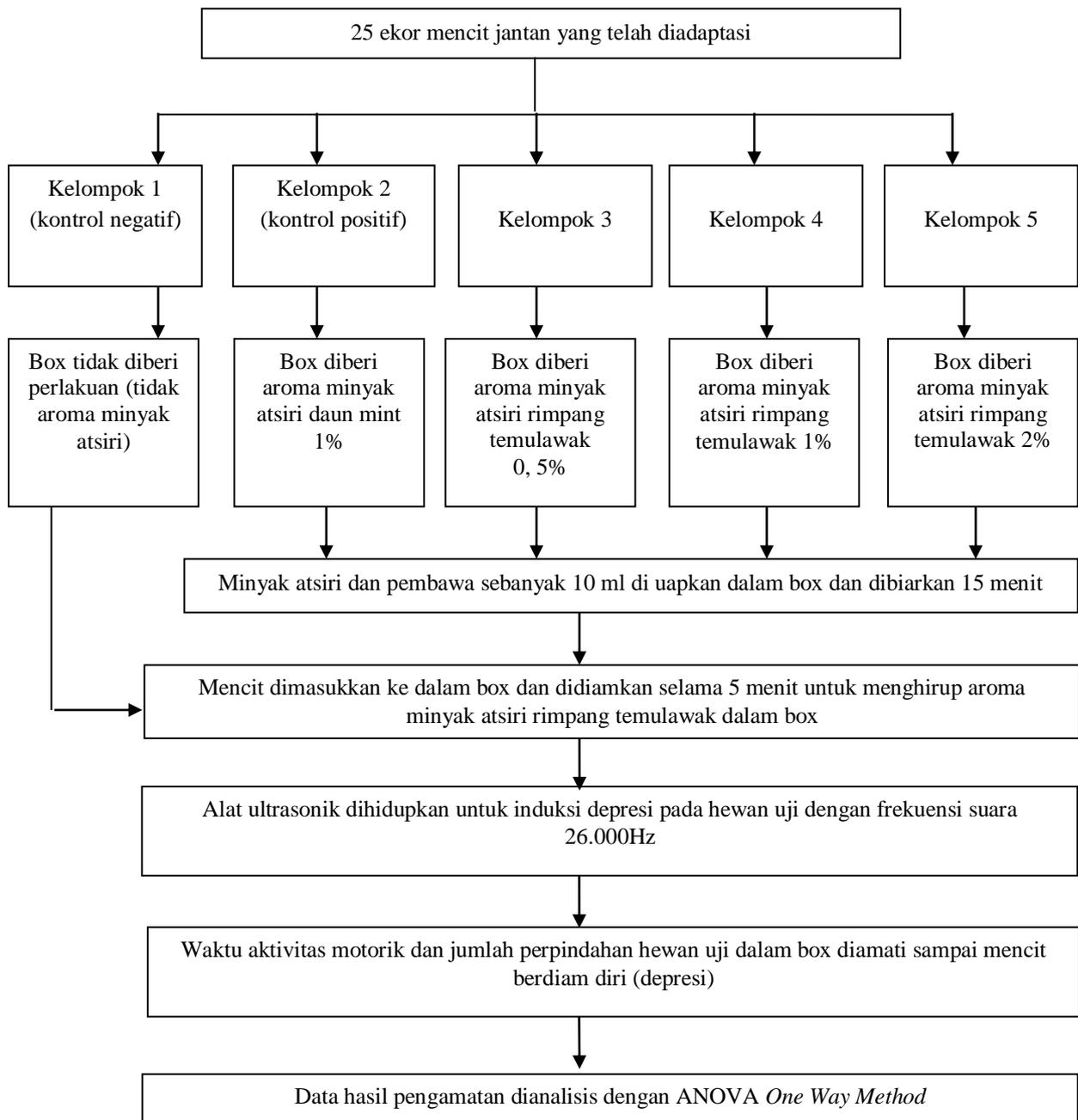
13.1. Daya konsentrasi. Pembagian kelompok uji terhadap 25 ekor mencit putih jantan yang telah diadaptasikan menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu mencit dimasukkan ke dalam labirin untuk pengujian daya konsentrasi sebelum pemberian aroma minyak atsiri, kemudian mengamati waktu yang dibutuhkan mencit sampai mencit keluar dari labirin dengan menggunakan makanan yang diletakkan pada pintu keluar labirin. Kemudian dilakukan penjenjuran box (alat ultrasonik), aroma minyak atsiri daun mint konsentrasi 1% untuk kontrol positif dan aroma minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 0,5%, 1%, dan 2% untuk kelompok perlakuan 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 sebagai penginduksi depresi terhadap mencit putih jantan selama 15 menit. Kelima, mencit dimasukkan kembali dalam labirin untuk pengujian daya konsentrasi setelah pemberian aroma minyak atsiri, kemudian amati waktu yang dibutuhkan mencit sampai mencit keluar dari labirin dengan menggunakan umpan yang diletakkan pada pintu keluar labirin. Kemudian, melakukan analisis data dengan menggunakan ANOVA *One way method*.



Gambar 5. Skema perlakuan uji antidepresan berdasarkan *latency time*

13.2. Aktivitas motorik. Mencit yang terbagi menjadi 5 kelompok, di masukkan dalam box ultrasonik yang sebelumnya telah diuapkan minyak atsiri dan pembawa 10 mL selama 15 menit. Mencit di masukkan ke dalam box dan didiamkan selama 5 menit untuk menghirup aroma minyak atsiri rimpang temulawak dalam box. Kemudian menghidupkan alat ultrasonik untuk induksi

depresi pada hewan uji dengan frekuensi suara 26.000 Hz. Melakukan pengamatan terhadap aktivitas motorik dengan cara melihat waktu bertahan sampai depresi dan banyaknya jumlah perpindahan mencit putih jantan. Mencatat waktu dan banyaknya perpindahan mencit sampai mencit berdiam diri (depresi). Kemudian, melakukan analisis data dengan menggunakan ANOVA *One way method*.



Gambar 6. Skema perlakuan uji antidepresan berdasarkan aktivitas motorik

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*) 21.0 for windows Evaluation Version. Analisis ini bertujuan untuk membandingkan efektivitas variasi konsentrasi minyak atsiri rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) 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 rimpang temulawak terhadap efektivitas antidepresan terhadap mencit putih jantan.

H_a : ada perbedaan efektivitas antara variasi konsentrasi minyak atsiri rimpang temulawak 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.