

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun pepaya (*Carica pepaya* L.) diperoleh dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun pepaya dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah yang dipilih secara acak yaitu daun yang sudah tua dengan kondisi segar dan tidak rusak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun pepaya hasil maserasi dengan etanol 96% terhadap aktivitas *immobility time* mencit akibat induksi depresi yaitu *tail suspension test* dengan metode *forced swim test*.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel tergantung merupakan variabel akibat dari variabel utama, variabel tergantung dalam penelitian ini adalah turunnya waktu setelah perlakuan dengan pemberian ekstrak daun pepaya dalam berbagai 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 didapat tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah metode ekstraksi daun pepaya, kondisi fisik hewan, uji meliputi berat badan tikus, jenis kelamin, kondisi percobaan laboratorium, zat penginduksi, dan peneliti.

3. Definisi Operasional variabel utama

Pertama, daun pepaya adalah seluruh daun pada tanaman pepaya yang segar, berwarna hijau, tidak terlalu tua, dan tidak terlalu

muda, dan tidak rusak yang diperoleh dari Tawangmangu. Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun pepaya adalah serbuk yang dibuat dari daun pepaya yang telah dicuci bersih, dikeringkan dalam oven suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ diblender dan diayak dengan ayakan no 60.

Ketiga, ekstrak daun pepaya adalah cairan hasil penarikan sari dari daun pepaya dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian diuapkan dengan evaporator dan dilanjutkan dengan oven untuk mendapatkan ekstrak kental.

Keempat, mencit putih jantan (*Mus musculus*) adalah hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yang berumur 6-8 minggu dengan berat minimal 20 g.

Kelima, *immobility time* adalah waktu dimana mencit tidak mampu berenang dengan menggunakan metode *Forced Swim Test* yang diinduksi dengan *Tail Suspension test*.

Keenam, kontrol positif adalah kontrol ekperimental yang memberikan hasil positif efek antidepresan.

Ketujuh, dosis efektif adalah dosis yang memberikan efek antidepresan setara dengan kontrol positif.

Kedelapan, depresi adalah gangguan psikiatri yang menonjolkan *mood* sebagai masalahnya.

Kesembilan, maserasi adalah metode ekstraksi dengan proses perendaman bahan dengan pelarut yang sesuai dengan atau tanpa pemanasan.

Kesepuluh, *Forced Swim Test* adalah metode pengukuran *immobility time* dan penginduksi yang digunakan untuk membuat mencit stres.

Kesepuluh, *Tail Suspension Test* adalah metode uji dengan cara hewan yang digunakan dibuat stress dengan cara menggantung ekor hewan uji

C. Alat, Bahan dan Hewan Percobaan

1. Alat

Alat untuk membuat simplisia yaitu pisau untuk merajang, oven dengan suhu rendah dan konstan. Alat penyari yang digunakan adalah penggiling simplisia, evaporator, botol maserasi, kain flannel, neraca elektrik, pipet, tabung reaksi, beaker glass. Alat untuk perlakuan hewan

uji adalah timbangan analitik, jarum oral, spuit injeksi, gelas ukur beaker glass, stopwatch, kandang tikus, mortir dan stemper.

2. Bahan

2.1 Bahan Sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daun pepaya yang diperoleh dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2.2 Bahan Kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, *amitriptyline*, aquades, Na-CMC 0,5%.

3. Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus*) jantan yang berumur 6-8 minggu dengan berat badan 25-33 g.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan sampel

Daun pepaya diambil dalam keadaan segar dengan pengambilan secara acak, dicuci bersih dari kotoran, mikroba serta ulat, kemudian dilakukan perajangan menjadi bagian yang lebih kecil untuk mempercepat proses pengeringan, ditiriskan dan dikeringkan dalam alat pengering (oven) pada suhu 50⁰C-55⁰C sampai benar-benar kering. Kemudian diayak dengan ayakan no 60, sehingga diperoleh serbuk yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen (Depkes RI, 1985).

2. Determinasi tanaman

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman untuk menetapkan kebenaran sampel tanaman berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis, serta ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman terhadap pustaka yang dilakukan di UPT. Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Kabupaten Pasuruan Kota Malang.

3. Pembuatan ekstrak daun pepaya

Pembuatan ekstrak etanol daun pepaya dilakukan dengan metode maserasi menggunakan cairan penyari etanol 96% dengan cara mengambil daun pepaya yang telah diserbuk, kemudian ditimbang sebanyak 800 gram. Serbuk dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 8000 ml. Kemudian dikocok dan segera ditutup. Setelah itu botol didiamkan selama 4 hari sambil sering diaduk dan pengocokkan berulang. Setelah itu maserat

dipisahkan dengan cara disaring dengan kain flanel steril, ampas diperas. Ulangi proses penyarian dengan etanol 96% sebanyak 4000 ml untuk mencuci sisa ekstrak yang tertinggal dibotol. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan pada suhu 40-50 °C sampai diperoleh ekstrak kental (Depkes, 1986). Pelarut etanol 96% lebih awet dalam penyimpanan karena mengandung kadar air yang sedikit sehingga lebih kecil kemungkinan untuk tumbuh bakteri. Perhitungan rendemen:

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk}} \times 100\%$$



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak etanol 96% serbuk daun pepaya

4. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air daun pepaya dilakukan dengan alat *Sterling-Bidwell*, serbuk ditimbang sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat pada alat *Sterling-Bidwell*, kemudian ditambahkan xylene sebanyak 125 ml dan dipanaskan sampai tidak ada tetesan air lagi. Selanjutnya dilihat volume tetesan dan dihitung kadarnya dalam satuan persen dengan rumus:

$$\text{Persen kadar air} = \frac{V}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

V = volume air yang terdestilasi (ml)

W = jumlah sampel yang diambil (gram) (Apriyantono *et al.*, 1989)

5. Identifikasi senyawa kandungan kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam daun pepaya. Identifikasi senyawa meliputi senyawa flavonoid, tanin, saponin, steroid dan alkaloid.

5.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak daun pepaya sebanyak 1 g dilarutkan dalam 100 ml air panas kemudian didihkan 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, 2006).

5.2 Identifikasi alkaloid. Sebanyak 1 gram sampel dimasukan dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 5 tetes amonia pekat. Setelah itu, disaring kemudian ditambah 2 ml asam sulfat 2N dan dikocok hingga memberi hingga memberi lapisan atas dan bawah. Larutan dibagi menjadi 3 bagian, pada tabung pertama ditambahkan 1 tetes larutan mayer, adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih keruh, jika pada tabung kedua ditambah 1 tetes pereaksi Dragendorf dan terbentuknya endapan menandakan adanya alkaloid (Harborne, 1987).

5.3 Identifikasi saponin. Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan kedalam tabung reksi, ditambahkan 10 ml air panas kemudian didinginkan, dikocok kuat-kuat selama 10 detik, jika terbentuk buih yang menetap \pm 10 menit, setinggi 1-10 cm dan dengan penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Depkes, 1980).

5.4 Identifikasi tanin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak masing-masing di masukkan kedalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dengan 10 ml aquadest, saring dan filtrate ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman. (Setyowati *et al.*, 2014).

6. Pembuatan sediaan uji

6.1 Larutan Na-CMC 0,5%. Na-CMC konsentrasi 0,5% digunakan sebagai kontrol negatif, dibuat dengan cara serbuk CMC Na ditimbang sebanyak 500 mg kemudian dimasukkan ke dalam cawan penguap dan ditambahkan sedikit lalu dilarutkan dengan akuades panas sedikit demi sedikit sampai semua Na-CMC larut. Selanjutnya dipanaskan sampai mengembang kemudian dimasukkan ke dalam mortir dan menggerusnya dan menambahkan sedikit demi sedikit akuades hingga 100 ml, diaduk hingga homogen. Larutan Na-CMC (*Natrium Carboxi Methyl Celulose*) digunakan sebagai *suspending agent* dalam konsentrasi 0,25%-1,0% (Rowe *et al.*, 2009).

6.2 Suspensi Amitriptilin. Disiapkan alat dan bahan. Kemudian dikalibrasi botol 100 mL. Dimasukkan CMC Na dan tablet Amitriptilin ke dalam mortir gerus sampai membentuk mucilago.

Akuades hangat ditambahkan, kemudian disuspensikan dengan amitriptilin dalam botol sampai 100 mL.

6.3 Suspensi ekstrak daun pepaya. Disiapkan alat dan bahan, Setelah itu dikalibrasi botol 100 mL dimasukkan CMC ke dalam mortir kemudian ditambahkan akuades hangat gerus sampai membentuk mucilago. Ditambahkan ekstrak kental daun pepaya digerus sampai homogen. Dimasukkan ke dalam botol yang telah dikalibrasi, kemudian dimasukkan akuades ke dalam botol sampai 100 mL.

7. Penetapan dosis

7.1 Dosis amitriptilin. Dosis amitriptilin 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 $25 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,00325 \text{ g/kg BB mencit}$.

7.2 Dosis ekstrak etanol daun pepaya. Setiap kelompok mencit diberikan perlakuan per oral dengan tingkatan dosis yang berbeda:

Tabel 1. Dosis ekstrak daun pepaya

Perlakuan	Dosis mg/kg BB
Kelompok 1	100
Kelompok 2	200
Kelompok 3	400

8. Uji aktivitas antidepresan

Mencit yang digunakan sebanyak 30 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 25-33 gram. Mencit yang digunakan dibagi menjadi 6 kelompok:

Kelompok 1 : Kontrol negatif, CMC Na 0,5 %

Kelompok 2 : Kontrol positif, amitriptilin dosis 0,00325 g/kg BB mencit.

Kelompok 3 : Ekstrak etanol daun pepaya dosis 0,1 g/kg BB

Kelompok 4 : Ekstrak etanol daun pepaya dosis 0,2 g/kg BB

Kelompok 5 : Ekstrak etanol daun pepaya dosis 0,4 g/kg BB

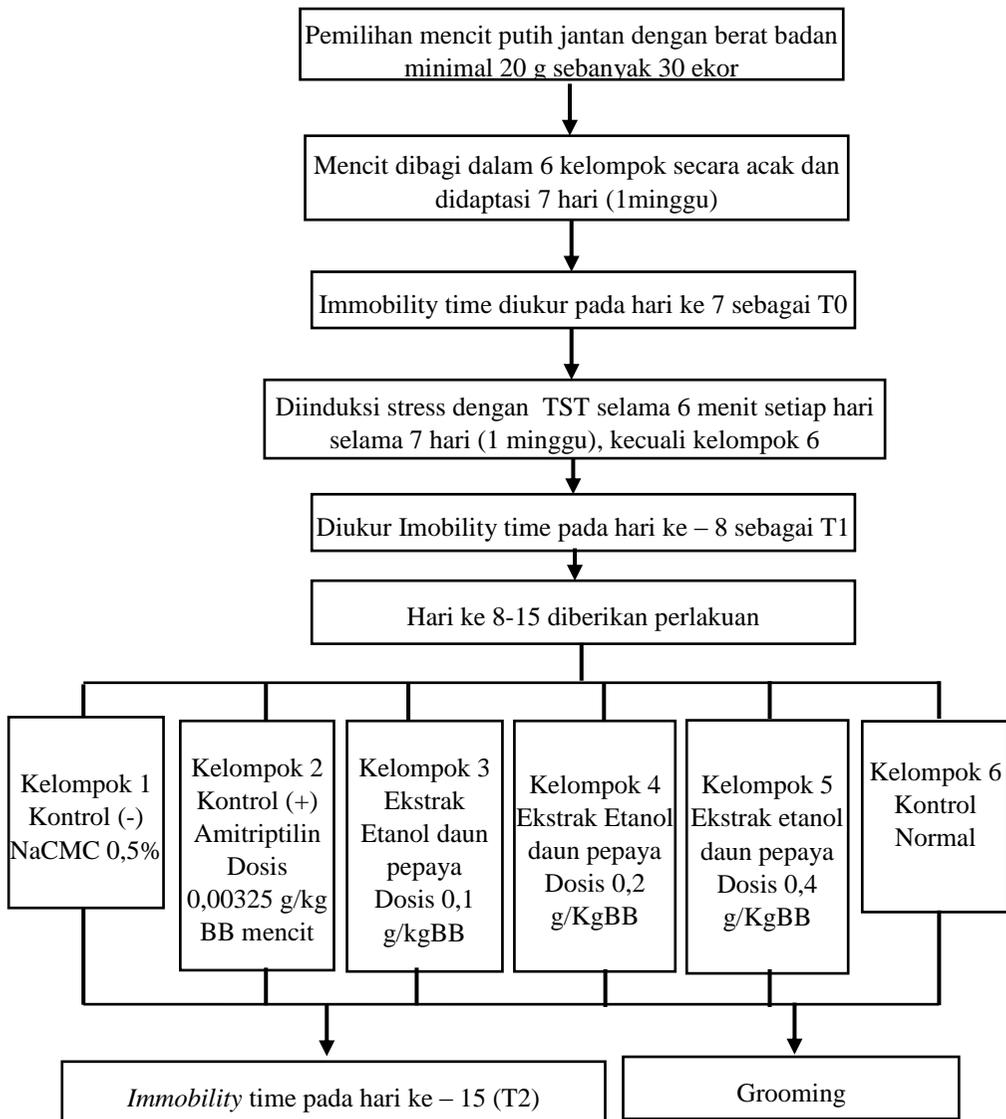
Kelompok 6 : Tanpa perlakuan stress/kontrol normal

9. Prosedur uji *immobility time*

Mencit ditimbang dan diberi tanda untuk masing-masing kelompok. Mencit yang digunakan sebanyak 30 ekor dengan berat rata-rata 25-33 gram yang secara acak dibagi dalam 5 kelompok. Setelah itu

mencit diadaptasi selama 7 hari. Kemudian, diukur immobility time. Mencit diinduksi stres dengan *Tail Suspension* dengan menggantung ekor mencit pada tiang gantung 50 cm dilakukan 3 menit setiap hari kemudian dilanjutkan *forced swim test* 8 menit/hari selama 7 hari. Kemudian, diukur immobility time. Pada hari ke 8 mencit diberi perlakuan tanpa induksi FST dan TST. Pada hari ke 15 diukur kembali *immobility time* (Gunawan, 2019).

E. Alur Penelitian



Gambar 5. Skema Alur Penelitian

F. 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, analisis data dilanjutkan dengan uji *One Way* ANOVA untuk mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Dilanjutkan dengan uji tukey HSD untuk mengamati perbedaan antar kelompok perlakuan.