

## **BAB III METODE PENELITIAN**

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

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga marigold (*Tagetes erecta* L.) yang diperoleh dari pembudidaya di desa Nglurah, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bunga marigold (*Tagetes erecta* L.) yang diambil secara acak (*random*) dengan pemilihan bunga yang berumur 45-55 hari dan memiliki bunga yang berwarna orange hingga kuning keemasan.

### **B. Variabel Penelitian**

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

Variabel utama dari penelitian ini menggunakan aktivitas ekstrak bunga marigold (*Tagetes erecta* L.).

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

Variabel utama terdiri atas identifikasi seluruh variabel pada penelitian ini. Variabel utama yang akan diidentifikasi antara lain yaitu, variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

**2.1. Variabel bebas.** Merupakan variabel yang telah direncanakan untuk dilakukan penelitian serta dilihat pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak bunga marigold dalam berbagai dosis.

**2.2. Variabel terkendali.** Merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditentukan kualifikasinya agar hasilnya tidak menyebar dan penelitian ini dapat direplikasi oleh peneliti lain, variabel terkendali pada penelitian ini yaitu meliputi : berat badan, jenis kelamin, umur, imobilitas mencit, lingkungan hidup, kondisi pada saat percobaan, laboratorium, kualitas bahan, parameter yang diamati, serta peneliti itu sendiri.

**2.3. Variabel tergantung.** Merupakan variabel yang dapat dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu efek antidepresan ekstrak bunga marigold dengan mengamati *immobility time* pada mencit yang digantung pada kotak khusus uji *tail suspension test* dan pengamatan perilaku yang diberikan oleh mencit.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, bunga marigold adalah bunga yang berasal dari bunga segar yang diperoleh dari pembudidaya di desa Nglurah, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk bunga marigold adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan, penggilingan, dan pengayakan bunga marigold.

Ketiga, hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit *Swiss Webster* jantan berwarna putih, umur 2 hingga 3 bulan dengan berat badan 20 hingga 30 gram.

Keempat, efek antidepresi adalah efek yang dilihat dari pergerakan mencit yang digantungkan ditandai dengan mencit tidak bergerak.

Kelima, *tail suspension test* merupakan salah satu metode untuk mengukur efek antidepresan pada hewan uji yang dilakukan dengan cara menggantungkan hewan uji pada kotak khusus uji *tail suspension test* dengan durasi pengamatan selama 6 menit dan diamati *immobility time* nya.

Keenam, *immobility time* adalah waktu dimana hewan uji mengalami stress jangka pendek karena penggantungan kemudian hewan uji tidak lagi bergerak pada saat digantungkan sebelum dan sesudah diberikan perlakuan.

Ketujuh, pengamatan dari perilaku yang diberikan oleh mencit sebelum dan setelah perlakuan meliputi ; *Platform, Straub, Piloerection, Ptoxis, Pineal reflect, Corneal reflect, Lacrimation, Catalepsy, Hanging, Retablismen, Flexi, Hafner, Grooming, Defecation, Urination, Saliva, Vocalization, Convulsions, Tremor, Writhing, Platform, Straub, Piloerection, Ptoxis, Pineal reflect, Corneal reflect, Lacrimation, Catalepsy, Hanging, Retablismen, Flexi, Hafner, Grooming, Defecation, Urination, Saliva, Vocalization, Convulsions, Tremor, Writhing.*

Kedelapan, dosis efektif ekstrak bunga marigold (*Tagetes erecta* L.) yang merupakan dosis terkecil yang mempunyai efek antidepresan sebanding dengan kontrol positif.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari timbangan analitik, cawan, kertas saring, blender, kaca arloji, tabung reaksi,

bunsen, gelas ukur, erlenmeyer pyrex, pipet tetes, stopwatch, oven, corong, panci label, beaker glass, batang pengaduk, ayakan no 40, spet oral, kain flanel, kertas saring, bejana, corong pisah, alat detilasi, sterling bidwell, moisture balance, SPSS. Alat yang digunakan pada hewan uji meliputi kandang, tempat makanan dan minuman, tali, selotip, dan pipa penggantung untuk *tail suspension test*.

## **2. Bahan**

Pada penelitian ini menggunakan bahan diantaranya spiritus, larutan CMC 0,5% sebagai kontrol negatif, obat amitriptilin sebagai kontrol positif, dan bahan sampel menggunakan ekstrak bunga marigold. Untuk bahan uji identifikasi senyawa kimia pada penelitian ini diantaranya yaitu etanol 70%, toluene, HCl 2N, pereaksi dragendorf, pereaksi mayer, pereaksi wagner, serbuk magnesium, HCl pekat, amyl alcohol, HCl 1%, FeCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, AlCl<sub>3</sub>, Butanol, Asam asetat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, kloroform, metanol. Bahan untuk perlakuan hewan uji meliputi pakan standard dan air *ad libitum*.

## **D. Metode Percobaan**

### **1. Determinasi tanaman**

Pada tahap awal penelitian ini, langkah pertama yang diambil adalah melakukan determinasi terhadap bunga marigold. Penentuan ini bertujuan untuk memvalidasi sampel yang akan digunakan dalam penelitian. Proses determinasi ini dilaksanakan di Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional (B2P2TOOT).

### **2. Pengambilan bahan**

Pengambilan bahan bunga marigold ini diambil dari pembudidaya di desa Nglurah, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Bunga marigold ini diambil dalam keadaan bunga masih segar sehingga bunga masih tampak halus dengan warna orange.

### **3. Pembuatan serbuk**

Bunga marigold dicuci terlebih dahulu menggunakan air mengalir hingga bersih hingga terbebas dari kotoran. Setelah di cuci hingga bersih kemudian ditiriskan. Kemudian bunga yang sudah bersih dijemur, setelah itu bunga marigold dioven pada suhu 40-50°C sampai kering. Setelah kering lalu haluskan menggunakan blender dan diayak pada ayakan no 40 sampai serbuk halus diperoleh (Depkes RI, 2017). Setelah simplisia ini menjadi serbuk kemudian dimasukkan ke dalam

wadah yang kering dan tertutup rapat yang kemudian akan digunakan saat penelitian.

#### **4. Pengujian susut pengeringan serbuk**

Penetapan susut pengeringan bunga marigold (*Tagetes erecta* L.) dilakukan dengan alat *moisture balance*. Serbuk bunga marigold (*Tagetes erecte* L.) ditimbang 2 gram setelah itu dimasukan pada *moisture balance* pada suhu 105°C dan ditunggu hingga pemanasan selesai. Nilai susut pengeringan dinyatakan dalam satuan persen yang tertera pada *moisture balance* (Setyawati, 2019).

#### **5. Pembuatan ekstrak etanol bunga marigold**

Ekstrak bunga marigold diproduksi dengan cara mencelupkan. Timbangan sebanyak 500 gram serbuk bunga marigold digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol. Serbuk tersebut dimasukkan ke dalam wadah yang tidak tembus cahaya, lalu ditambahkan pelarut etanol 70% dalam perbandingan 1:10, dan wadah ditutup rapat untuk menghindari paparan langsung sinar matahari. Proses perendaman berlangsung selama 24 jam dengan pengadukan setiap 6 jam. Setelah itu, campuran simplisia disaring menggunakan kain flanel dan kertas saring. Ampas yang tersisa kemudian dimasukkan ke dalam wadah gelap, dilakukan remaserasi dengan menambahkan 2,5 L pelarut etanol 70%, dan didiamkan selama 24 jam sebelum disaring kembali. Ekstrak cair yang terkumpul kemudian dipekatkan menggunakan retory evaporator dengan suhu 50°C dan kecepatan 45 rpm, menghasilkan ekstrak yang kental (Depkes RI, 2017). Rendemen ekstrak dihitung dengan membagi berat ekstrak kental dengan berat serbuk bunga marigold yang dimaserasi, lalu dikalikan 100%.

#### **6. Penetapan kadar air serbuk bunga marigold**

Pentapan kadar air pada ekstrak bunga marigold (*Tagetes erecta* L.) menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Ekstrak ditimbang 5 gram dan masukan dalam labu alas bulat *Sterling-Bidwell* setelah itu tambahkan pelarut toluen 50 ml kemudian panaskan hingga tetes air habis. Kemudian volume tetesan dihitung dan dilihat kadarnya dalam satuan % v/b (Depkes RI, 2017).

#### **7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol bunga marigold (*Tegates erecta* L.)**

**7.1. Identifikasi alkaloid.** Masukkan sebanyak 2 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan HCl 2N tetes demi tetes. HCl kemudian dibagi menjadi beberapa tabung. Reagen ditambahkan

ke setiap tabung. Selain pereaksi ini, jika terbentuk endapan putih atau kuning menggunakan pereaksi Mayer positif, jika terbentuknya endapan berwarna coklat muda sampai kuning menggunakan pereaksi Wagner positif, dan jika terbentuk endapan jingga menggunakan pereaksi Dragendrof hasil positif mengandung alkaloid (Lestari, 2019).

**7.2. Identifikasi tannin.** Ekstrak kental ditimbang sebanyak 0,5 gram yang kemudian dilarutkan menggunakan air aqua destillata sebanyak 10 ml lalu panaskan setelah itu disaring. Filtrat yang diperoleh diambil sebanyak 5 mL kemudian di masukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 0,1 gram  $\text{FeCl}_3$  apabila ekstrak mengandung senyawa tanin maka akan timbul larutan berwarna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Lestari, 2019).

**7.3. Identifikasi flavonoid.** Masukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi, lalu campurkan dengan 10 ml air panas hingga larut. Filtrat yang diperoleh dilarutkan dalam 5 ml dan dicampur dengan serbuk magnesium, dicampur dengan 1 ml HCl pekat dan amyl alkohol, kemudian diaduk kuat-kuat sampai pemisahan. Jika ekstrak mengandung flavonoid, maka akan berubah menjadi merah, oranye atau kuning (Wiwik *et al.*, 2023).

**7.4. Identifikasi Saponin.** Proses pengujian saponin pada sampel dimulai dengan menempatkan ekstrak ke dalam tabung reaksi, diikuti dengan pencampuran dengan 10 ml aquades. Campuran tersebut dikocok dan kemudian diberi satu tetes larutan asam klorida 2 N. Tabung reaksi selanjutnya dibiarkan diam, dan pengamatan dilakukan terhadap keberadaan atau ketiadaan busa yang stabil. Sampel dianggap mengandung saponin apabila terbentuk busa yang stabil dengan ketinggian 1-3 cm dalam rentang waktu 30 detik (Sangi *et al.*, 2019)

**7.5. Identifikasi kuersetin.** Identifikasi kuersetin dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Langkah utama yang dilakukan yaitu mengambil ekstrak kental yang telah di dapat dari hasil ekstraksi kemudian dilarutkan menggunakan pelarut metanol. Setelah itu dilakukan penotolan di area plat menggunakan mikro pipet yang diberikan jarak 1 cm dari garis bawah. Setelah itu dilakukan elusi dengan menggunakan eluen Butanol : Asam asetat : Air dengan perbandingan 4:1:5. Tunggu hingga totalan terelusi semua. Setelah terelusi lempeng diangkat lalu di keringkan dan di lakukan penyemprotan menggunakan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%. Langkah yang terakhir yaitu

dilakukan pengamatan menggunakan lampu UV 254nm dan UV 366nm. (Wirdiningsih & Legowo, 2023).

## **8. Pembedaan dan pemberian dosis**

**8.1. Dosis CMC Na.** Serbuk CMC ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian serbuk dimasukkan kedalam mortar panas lalu ditambahkan aquadest sebanyak 20 ml dituangkan sedikit demi sedikit aquadest hingga terbantuknya mucilage. Kemudian serbuk dimasukkan dalam botol yang telah ditara. Setelah dimasukkan pada botol kemudian ditambahkan aquadest ad 100 ml sehingga didapatkan konsentrasi CMC Na 0,5%.

**8.2. Dosis Obat amitriptilin.** Dosis Amitriptyline yang akan digunakan sebagai kontrol positif pada pengujian ini. Dosis pada Amitriptyline yaitu 25 mg, karena akan dilakukan uji pada mencit maka dosis dikonversikan dari manusia ke mencit dengan faktor konversi 0,0026 menjadi 0,065 mg/20g bb mencit atau 3,25 mg/kg bb mencit. Amitriptyline diberikan dalam bentuk suspensi dengan tata cara pembuatan yang utama yaitu dengan menimbang setiap bahan dan kalibrasi botol. Amitriptyline digerus menggunakan mortir hingga homogen lalu sisihkan dengan ditimbang sebanyak 25mg. Setelah disisihkan, tambahkan suspensi CMC Na 0,025% ad 100 ml.

**8.3. Dosis ekstrak bunga marigold.** Dosis bunga marigold yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan beberapa variasi dosis yaitu 12,5; 25; 50 mg/kg bb mencit. Pada penelitian ini ekstrak dibuat dalam 2 larutan stock 0,1% dan 0,5%, dengan cara menimbang ekstrak sebanyak 0,1 gram dan 0,5 gram. Setelah itu masing-masing dilarutkan dengan CMC Na ad 100 ml.

## **9. Perlakuan terhadap hewan uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan berumur 2 sampai 3 bulan, dengan berat sekitar 20 sampai 30 gram, dalam kondisi sehat, normal, dan mendapatkan perawatan yang baik. Sebelum dimulainya penelitian, hewan-hewan tersebut menjalani periode aklimatisasi di laboratorium selama tujuh hari, dimulai dari hari ke-1 hingga hari ke-7. Mereka diberikan pakan standar dan air minum secara bebas setiap hari, hingga kebutuhan makanan terpenuhi. Setelah itu, hewan-hewan tersebut ditimbang, dan jika bobotnya memenuhi syarat untuk menjadi subjek penelitian, mereka secara acak dibagi menjadi kelompok negatif, kelompok positif, dan tiga kelompok uji, masing-masing terdiri dari 5 ekor

mencit. Setiap kelompok diberi tanda khusus. Pada hari ke-8 hingga hari ke-14, hewan uji menerima perlakuan harian berupa penggantungan selama 6 menit, dengan tujuan menginduksi kondisi depresi pada hewan. Tanda-tanda stres pada hewan uji dapat diamati dari perubahan perilaku, seperti perilaku menyendiri, lebih pendiam, dan perubahan pola buang air besar yang tidak normal. Pada periode hari ke-15 hingga hari ke-21, masing-masing hewan uji menerima perlakuan peroral sesuai dengan kelompoknya, yaitu :

Kelompok I : Kontrol negatif (CMC 0,5%)

Kelompok II : Kontrol positif Amitriptyline (3,25 mg/kg bb mencit)

Kelompok III : Ekstrak bunga marigold dosis 12,5 mg/kg bb

Kelompok IV : Ekstrak bunga marigold dosis 25 mg/kg bb

Kelompok V : Ekstrak bunga marigold dosis 50 mg/kg bb

Pemberian perlakuan secara oral dilakukan sehari sekali selama 7 hari, kemudian mencit diinduksi depresi dengan metode *Tail Suspension Test* (TST) durasi pengamatan selama 6 menit. Pengambilan data imobilitas mencit dilakukan sebanyak 3 kali yaitu setelah aklimatisasi (T0), setelah induksi depresi (T7), dan setelah perlakuan (T14). Kemudian diperoleh data *immobility time* serta perilaku yang diberikan oleh mencit, data *immobility time* tersebut selanjutnya dianalisis dengan SPSS.

#### **10. Pengukuran waktu imobilitas mencit**

Pengukuran waktu imobilitas mencit ini dilakukan dengan cara menggantungkan hewan uji dengan metode *Tail Suspension* dengan durasi pengamatan selama 6 menit, dan melihat pada menit beberapa mencit tidak bergerak atau *immobility time*. Tes berlangsung selama  $\pm 6$  menit dan waktu imobilitas biasanya diukur selama 4 menit terakhir karena hampir semua tikus mencoba melarikan diri dalam 2 menit pertama, tetapi skor imobilitas dapat dilaporkan selama waktu suspensi. Jumlah total waktu imobilitas (didefinisikan sebagai waktu selama hewan tergantung secara pasif dan tidak bergerak) diukur untuk setiap hewan, dan dianggap sebagai indeks perilaku "mirip depresi" (Novelni, *et al.*, 2022)

#### **11. Pengamatan perilaku sebelum dan setelah perlakuan**

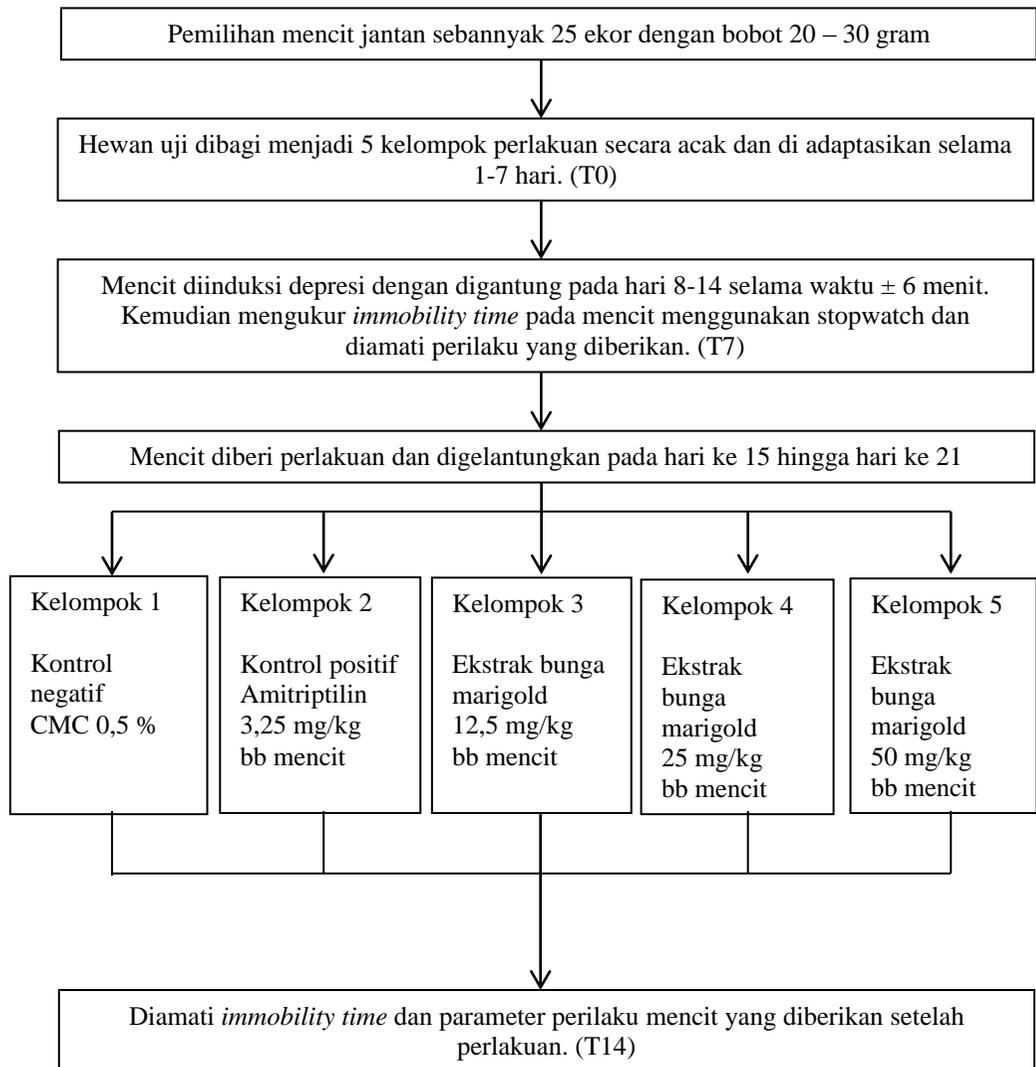
Pengamatan perilaku hewan uji secara seksama pada waktu tertentu yaitu pada saat sebelum dan setelah pemberian bahan uji. Untuk pengamatan perilaku antara lain yaitu *platform*, *straub*, *piloerection*, *ptosis*, *pineal reflect*, *corneal reflect*, *lacrimation*,

*catalepsy, hanging, retblismen, flexi, hafner, grooming, defecation, urination, saliva, vocalization, convulsions, tremor, writhing.*

### **E. Analisis Data**

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dinyatakan dalam bentuk *imobillity time* dan parameter perilaku pada mencit jantan. Data *imobillity time* dianalisis menggunakan software SPSS untuk menganalisis hasil waktu imobilitas menggunakan uji *sapiro wilk* untuk mengetahui apakah data yang diperoleh sesuai dengan distribusi normal atau tidak. Data yang terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dianalisis dengan uji parametik *paired T test* untuk melihat apakah data setiap kelompok terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) sebelum diinduksi. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang nyata data antar kelompok penelitian, dilakukan pengujian ANOVA menggunakan *one way* untuk nilai yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Apabila dalam uji ANOVA menunjukkan nilai  $p < 0,05$  maka terdapat perbedan diantara mnasing-masing perlakuan dan apabila hasil yang didapat menunjukkan  $p > 0,05$  maka tidak ada perbedaan yang bermakna diantara masing-masing perlakuan. Lalu uji terakhir yang dilakukan adalah *Post Hoc Test* dengan *Turkey* untuk mengetahui perlakuan mana yang paling efektif.

## F. Skema Penelitian



**Gambar 4. Skema Penelitian**