

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak yang diperoleh pada tanggal 1 Mei 2023 di Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak 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 fraksi daun sirsak 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 berbagai fraksi daun sirsak.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah turunnya waktu imobilitas mencit setelah perlakuan dengan pemberian fraksi daun sirsak (*Annona muricata* L.) 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 sirsak adalah daun segar yang diperoleh dari pohon sirsak pada tanggal 1 Mei 2023 yang berasal dari Tawangmangu,

Jawa Tengah. Daun yang digunakan yaitu daun sirsak segar, daun muda sampai tua, dan berwarna hijau.

Kedua, serbuk daun sirsak adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pemanenan, pengeringan, penggilingan dan pengayakan daun sirsak dengan ayakan no. 40.

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

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah fraksi yang diperoleh dari ekstrak etanol 96% daun sirsak ditambah dengan air yang difraksinasi *n*-heksan sebagai pelarut nonpolar.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu dari fraksi *n*-heksana yang difraksinasi dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar.

Keenam, fraksi air adalah residu dari hasil fraksinasi pelarut etil asetat dan air, kemudian dipekatkan.

Ketujuh, hewan uji adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang sehat dengan berat ± 20 gram dan berumur 2-3 bulan.

Kedelapan, *Forced Swimming Test* adalah metode yang paling umum digunakan untuk mengukur aktivitas antidepresan pada hewan uji dengan melihat *immobility time*.

Kesembilan, *immobility time* adalah waktu binatang mengapung dipermukaan air dan tidak melakukan pergerakan lagi, yang diukur dalam waktu delapan menit, dua menit pertama untuk adaptasi dan enam menit terakhir sebagai pengamatan.

Kesepuluh, efek antidepresan adalah efek yang bekerja dengan cara menyeimbangkan senyawa kimia alami di dalam otak yang disebut neurotransmitter. Cara kerja ini bisa membantu memperbaiki dan menyeimbangkan suasana hati dan emosi penderita depresi.

Kesebelas, fraksi yang paling aktif adalah fraksi yang memberikan aktivitas antidepresan yang 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, stopwatch, 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 sirsak (*Annona muricata* L.) yang di peroleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

2.2. Bahan Kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, etil asetat, *n*-heksana, reagen *Dragendroff*, reagen Mayer, reagen Wagner, HCl, FeCl₃, H₂SO₄ pekat, toluene, anisaldehyd asam sulfat pekat, *Lieberman Burchard*, 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. Dengan (t) adalah jumlah kelompok perlakuan, dan (n) adalah jumlah ulangan pada masing-masing kelompok.

Dari perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 4 ekor mencit untuk tiap kelompok. Karena pada penelitian ini menggunakan 6 perlakuan, maka jumlah sampel seluruhnya adalah 24. Sampel ditambah 25% untuk menjaga kemungkinan *drop out* sehingga jumlah sampel seluruhnya adalah 30.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada daun sirsak (*Annona muricata* 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

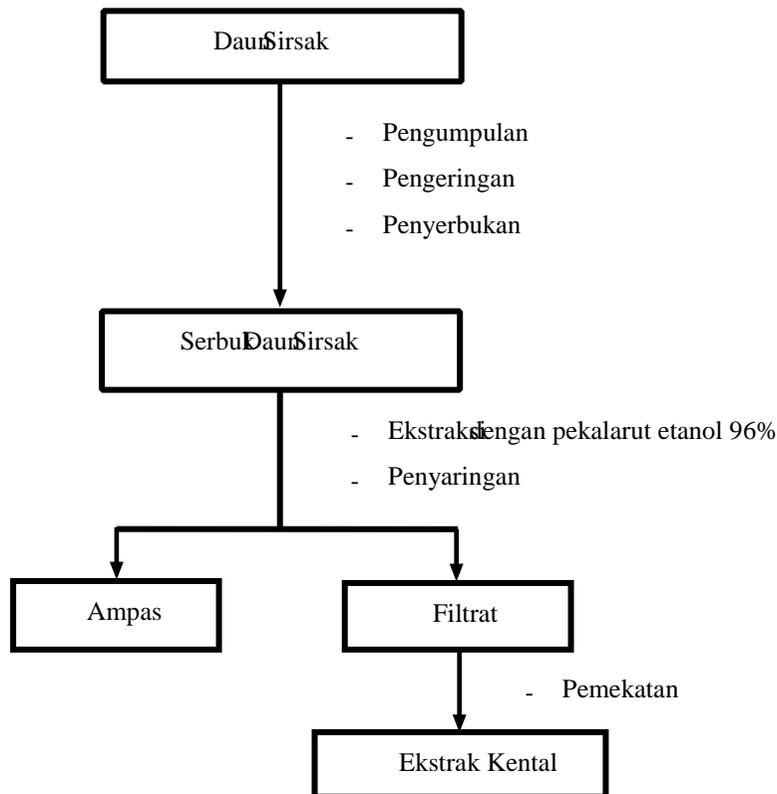
Bahan yang digunakan pada penelitian ini diambil di Tawangmangu, Jawa Tengah. Bahan yang dimaksud adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.)

3. Pembuatan serbuk

Daun sirsak (*Annona muricata* 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

Pembuatan 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 Skema pembuatan ekstrak etanol serbuk daun

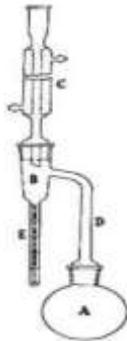
5. Penetapan susut pengeringan

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. Moisture Balance adalah metode pengukuran kelembaban yang menggunakan prinsip pengukuran kelembaban gravimetrik, juga disebut sebagai thermogravimetri atau kehilangan pengeringan (LOD). 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

Proses uji kadar dengan sterling bidwel prinsipnya adalah bahan dilakukan dengan menggunakan pelarut yang bersifat immiscible yaitu jenis pelarut yang tidak dapat bercampur dengan air. Selama proses destilasi, pelarut tersebut bersama air dalam bahan akan menguap pada

suhu lebih rendah dari suhu didih air. Uap yang terbentuk mengalami kondensasi yang ditampung dalam labu penampung destilat. Dalam labu penampung destilat, pelarut dan air terpisah sesuai berat jenisnya. Bila berat jenis pelarut yang digunakan lebih ringan dari berat jenis air maka air akan berada di bagian bawah labu dan sebaliknya air berada di bagian atas labu. Bila air berada di bagian bawah labu maka akan memudahkan pembacaan satu meniskus dan lebih akurat. Tetapi bila air berada di bagian atas labu destilat maka akan lebih sulit dalam pembacaan dua meniskus pada labu dan mengurangi ketelitian data.



Gambar 5. *Bidwell-Sterling Moisture Trap Vapor* (Kemenkes 2009).

7. Fraksinasi

Timbang 10 gram ekstrak daun sirsak dan larutkan dengan sedikit etanol untuk fraksinasi, lakukan fraksinasi cair-cair menggunakan 75 ml air dan 75 ml *n*-heksana sebanyak 3 kali, gunakan corong pisah untuk ekstraksi, dan gunakan vacuum rotary evaporator suhu 40°C untuk memekatkan sari hasil fraksinasi sehingga didapat fraksi *n*-heksana. Lapisan fasa air difraksinasi lagi sebanyak tiga kali dengan 75 ml etil asetat menggunakan corong pisah. Sari yang diperoleh dipekatkan dengan vacuum rotary evaporator pada suhu 40°C untuk mendapatkan fraksi etil asetat. Kumpulkan sisa fraksinasi dalam wadah dan diuapkan diatas waterbath untuk mendapatkan fraksi air (Rochma et al., 2022).

8. Identifikasi senyawa kimia berdasarkan reaksi warna

8.1 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).

8.2 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).

8.3 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. 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. 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. 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).

8.4 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).

9. Uji kromatografi lapis tipis (KLT)

9.1. Identifikasi senyawa flavonoid. Baku pembanding kuarsetin, ekstrak dan seluruh fraksi dilakukan identifikasi senyawa flavonoid dengan KLT. Sampel dan baku ditotolkan pada fase diam lempeng KLT silica gel GF₂₅₄ dengan fase gerak kloroform – etil asetat (6:4). Pada UV 254 nm noda memberikan peredaman, dan UV 366 nm berfluoresensi biru, kuning, ungu. Hasil positif diberikan ketika muncul noda kuning kehijauan setelah diberi pereaksi semprot alumunium (III)

Klorida 5% dalam etanol. Bila dibawah lampu UV 366 nm, flavonoid akan berfluoresensi biru, kuning atau hijau (Yanty *et al*, 2019).

9.2. Identifikasi senyawa alkaloid. Baku pembanding piperin dan seluruh sampel dilakukan identifikasi senyawa alkaloid dengan KLT. Sampel dan baku ditotolkan pada fase diam lempeng KLT silica gel GF₂₅₄ dengan fase gerak toluen – etil asetat – dietilamina (7:2:1). Hasil positif diberikan ketika muncul warna coklat atau jingga setelah penyemprotan preaksi *Dragendorff*. Bila dibawah lampu UV 365 nm, alkaloid akan berfluoresens biru, biru-hijau, atau ungu (Yanty *et al*, 2019).

9.3. Identifikasi senyawa saponin. Baku pembanding Sapogenin dan seluruh sampel dilakukan identifikasi senyawa saponin dengan KLT. Sampel dan baku ditotolkan pada fase diam lempeng KLT silica gel GF₂₅₄ dengan fase gerak CHCl₃ – methanol – air (6:3:1). Lempeng KLT yang telah diberi pereaksi semprot FeCl₃ dipanaskan suhu 100°C selama 5 menit. Hasil positif diberikan ketika timbul warna biru atau violet (Yanty *et al*, 2019).

9.4. Identifikasi senyawa tanin. Baku pembanding katekin dan seluruh sampel dilakukan identifikasi senyawa tanin dengan KLT. Sampel dan baku ditotolkan pada fase diam lempeng KLT silica gel GF₂₅₄ dengan fase gerak toluen – acetone – as. Formiat (3:3:0,5). Hasil positif diberikan ketika muncul warna hijau atau biru setelah penyemprotan preaksi FeCl₃ (Yanty *et al*, 2019).

10. Penentuan dosis

10.1. 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. Dosis Amitriptyline 75 mg/hari (Arozal, *et al.*, 2009). Konversi dosis ke mencit = $75 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,195 \text{ mg}/20 \text{ gram BB mencit}$.

10.2. Dosis Ekstrak Daun Sirsak. Dosis sediaan yang diberikan mengacu pada penelitian Praja, S., *et al.*, (2016) 12,5, 25, 50 mg/kg BB mencit.

11. Pembuatan larutan uji

11.1. Suspensi Amitriptyline.

R/ Amitriptyline 25 mg
Na CMC 0,5%
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.

11.2. 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.

12. Perlakuan depresi terhadap hewan uji

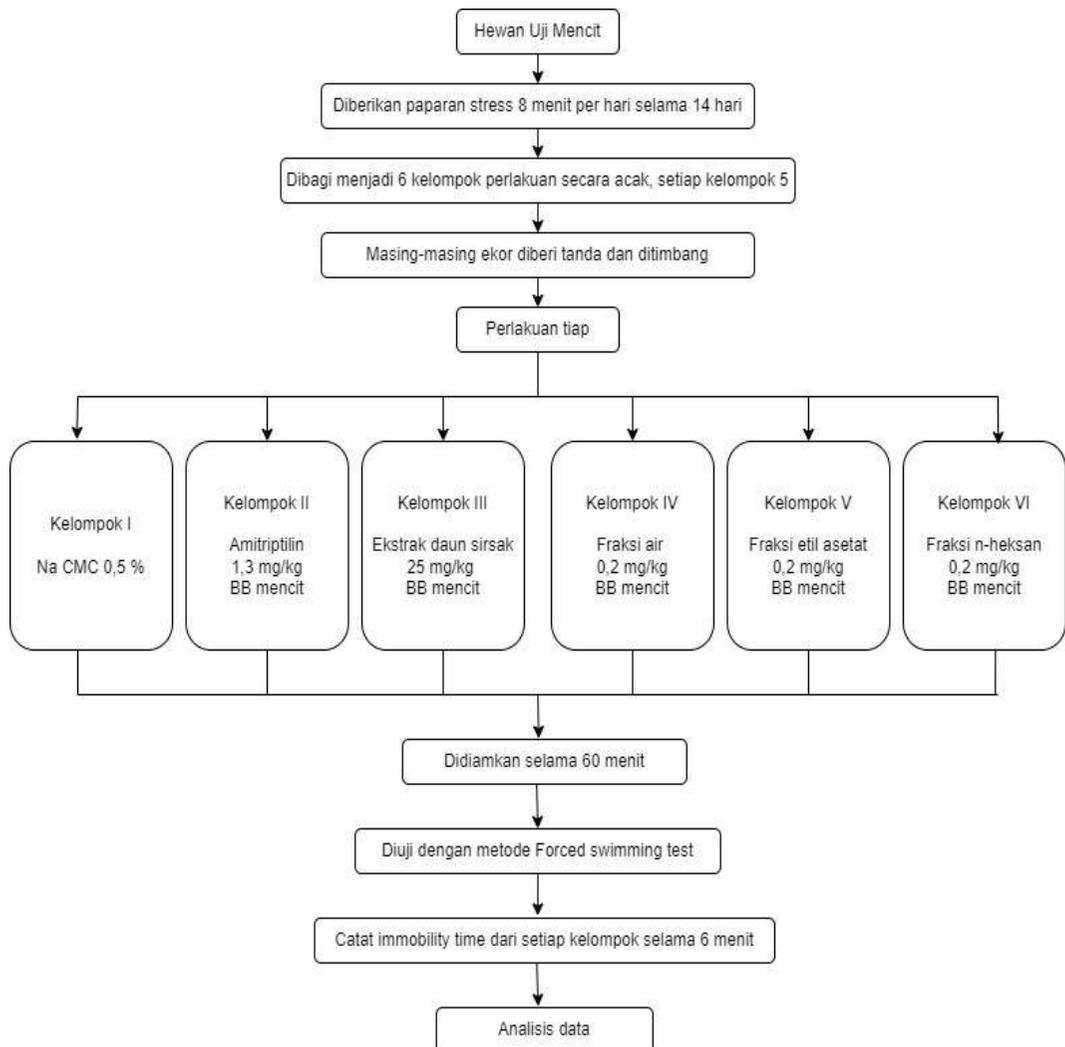
Mencit putih jantan diadaptasi selama 1 minggu dibuat depresi dengan metode *forced swimming test* selama 14 hari dengan durasi 8 menit, perlakuan ini bertujuan untuk membuat mencit depresi (Artyani, 2014). Sebanyak 30 ekor mencit dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, tiap kelompok terdiri dari 5 ekor hewan percobaan. Beri kode dan timbang semua hewan percobaan. Hewan dipuasakan selama 18 jam dan hanya minum air putih. Fraksi daun sirsak, larutan Na CMC dan suspensi Amitriptilin diberikan secara oral dengan menggunakan sonde oral. Efektivitas antidepresan diuji dengan menggunakan metode *Forced Swimming Test*, di mana hewan uji terlebih dahulu diadaptasi dengan direnangkan selama 14 hari sebelum menjalani *Forced Swimming Test* (FST) selama 8 menit selama periode pengujian. Pada hari ke-15 mencit ditempatkan pada kotak berisi air dengan ketinggian 12 cm (1 jam setelah pemberian formulasi uji secara oral) (Burdah *et al.*, 2021). Catat durasi *immobility time* setelah 2 menit awal dari total 6 menit selama pengujian. Mencit dikatakan mengalami *immobility time* jika tidak bergerak dan hanya bergerak untuk menjaga kepalanya tetap berada di atas air.

E. Analisis Data

Analisis statistik yang digunakan pertama dalam penelitian ini untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak diolah menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) memakai uji *Saphiro Wilk*. 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* ($P < 0,05$). Jika data terdistribusi normal ($P > 0,05$), analisis data dilanjutkan uji parametrik, yaitu dengan uji homogenitas varian (uji *Levene Test*) untuk mengetahui ada tau tidaknya kesamaan varian data. Varian data tidak sama ($P < 0,05$) maka langsung dilakukan uji non parametrik, namun jika varian data sama ($P > 0,05$) dilanjutkan uji parametrik menggunakan *One Way ANOVA* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar kelompok perlakuan. Jika hasil uji *One Way ANOVA* terdapat perbedaan signifikan ($P < 0,05$) dilanjutkan dengan *Post Hoc Scheffe Test* untuk mengetahui mana saja kelompok perlakuan yang berbeda.

Jadi syarat untuk uji statistik parametrik adalah data yang dipakai harus terdistribusi normal dan homogen. Apabila data terdistribusi normal namun tidak homogen langsung dilakukan dengan uji non parametrik.

F. Alur Penelitian



Gambar 6. Skema alur penelitian.