

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran dalam penelitian. Populasi dalam penelitian ini yaitu daun inggu (*Ruta angustifolia* [L.] *pers*) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sampel adalah bagian dari populasi yang diteliti, yang ciri-ciri dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili atau menggambarkan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun inggu segar, tidak busuk, berwarna hijau, dan bebas dari hama dapat diambil di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Desember 2018.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari : variabel bebas, variabel terkontrol, variabel tergantung. Variabel utama dari penelitian ini yaitu aroma minyak atsiri daun inggu dapat memberikan efek antidepresan terhadap mencit putih jantan dilihat dari peningkatan aktivitas motorik dan daya konsentrasi mencit dengan berbagai variasi konsentrasi minyak atsiri.

2. Klasifikasi variabel

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini minyak atsiri daun inggu dengan berbagai varian konsentrasi.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian ini dan memberikan respon jika dihubungkan dengan variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek antidepresan minyak atsiri daun inggu dengan pengamatan pada peningkatan aktivitas motorik dan daya konsentrasi mencit dalam uji antidepresan dengan metode ultrasonik.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar dapat diulang dalam penelitian lain dengan tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu kondisi sampel, waktu pengamatan, kondisi hewan uji seperti jenis kelamin, usia, dan kondisi penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun inggu adalah daun yang diambil dari tanaman inggu (*Ruta angustifolia* [L.] pers) diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah dengan ciri-ciri segar, tidak busuk, berwarna hijau, dan bebas dari hama.

Kedua, minyak atsiri daun inggu adalah minyak atsiri yang dihasilkan dari proses destilasi uap dan air bagian daun inggu yang dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Universitas Gadjah Mada.

Ketiga, antidepresan adalah golongan obat yang digunakan untuk mengobati depresi. Aroma minyak atsiri digunakan sebagai antidepresan alternatif.

Keempat, metode ultrasonik modifikasi adalah metode yang digunakan dalam penelitian untuk membuat hewan uji menjadi depresi dengan gangguan pada suara dengan frekuensi yang tinggi, setelah mencit depresi kemudian akan diberikan minyak atsiri herba daun inggu dengan varian konsentrasi 0,5%, 1%, dan 2% yang dilakukan di laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kelima, waktu aktivitas motorik adalah waktu yang dibutuhkan oleh mencit dari keadaan bergerak bebas hingga mengalami depresi yang ditandai

dengan hilangnya aktivitas motorik mencit yang berdiam diri dan tidak bergerak lagi pada sudut ruangan selama 1 menit karena induksi suara yang diberikan.

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

Ketujuh, daya konsentrasi adalah kemampuan mencit dalam memusatkan perhatian dan fokus setelah dimasukkan ke dalam labirin dengan menggunakan parameter *latency time*.

Kedelapan, *latency time* adalah parameter dari daya konsentrasi. *Latency time* adalah waktu yang dibutuhkan oleh mencit untuk bergerak dari titik awal masuk dalam labirin hingga menemukan umpan dan keluar dari dalam labirin.

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

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah daun inggu segar, tidak busuk, berwarna hijau, dan bebas dari hama dapat diambil di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

1.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah aquadestilata, Na_2SO_4 eksikatus dan etanol, produk minyak atsiri daun mint

1.3 Hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah menci jantan yang berumur 2-3 bulan metabolisme berjalan dengan baik dengan berat badan 20-30 gram yang diperoleh dari laboratorium farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas (Pyrex), botol kaca gelap, neraca analitik, alat modifikasi ultrasonik, alat uji labirin, pipet,

kamera, *stopwatch*, kertas saring, alat destilasi uap air, dan peralatan pendukung lainnya.

2.1 Alat modifikasi ultrasonik. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat ultrasonik modifikasi dengan rentang frekuensi 25.000 Hz. Alat pengujian ini adalah kotak yang berbentuk persegi panjang dengan ukuran panjang 85 cm, lebar 30 cm, dan tinggi 15 cm. Bahan dasar dari alat modifikasi ultrasonik ini adalah multipleks dan kaca. Kotak pengujian ini terdiri dari dua bagian yaitu 2 ruang penguapan minyak atsiri yang berada di samping kiri dan kanan dari ruang pengujian. Batas ruangan antara ruang penguapan minyak atsiri dan ruang pengujian diberikan lubang agar aroma minyak atsiri dapat masuk ke ruang pengujian. Ruangan yang utama adalah ruang pengujian yang digunakan untuk mengontrol gerak mencit yang telah diinduksi ultrasonik, ruangan ini dibuat dengan bahan kaca agar dapat mengawasi gerak-gerik mencit. Terdapat juga 2 bilik yang terbagi yang digunakan untuk pengujian yaitu bilik A dan juga bilik B.

Prinsip kerja alat ini adalah mengacaukan syaraf pendengaran sehingga hewan coba akan terganggu. Gelombang suara ultrasonik akan menekan saraf sentral, sehingga menyebabkan gangguan pada sistem limbik, hal ini menyebabkan terhambatnya pengeluaran neurotransmitter serotonin dan norepinefrin (Rusmalayanti 2007).



Gambar 6. Tampak depan alat modifikasi ultrasonik



Gambar 7. Tampak atas alat modifikasi ultrasonik

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun inggu yang berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis, serta mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman terhadap kepustakaan yang dilakukan di laboratorium Biologi MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Daun inggu yang segar, tidak busuk, berwarna hijau, bebas dari hama dapat diambil di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Desember 2018.

3. Perajangan

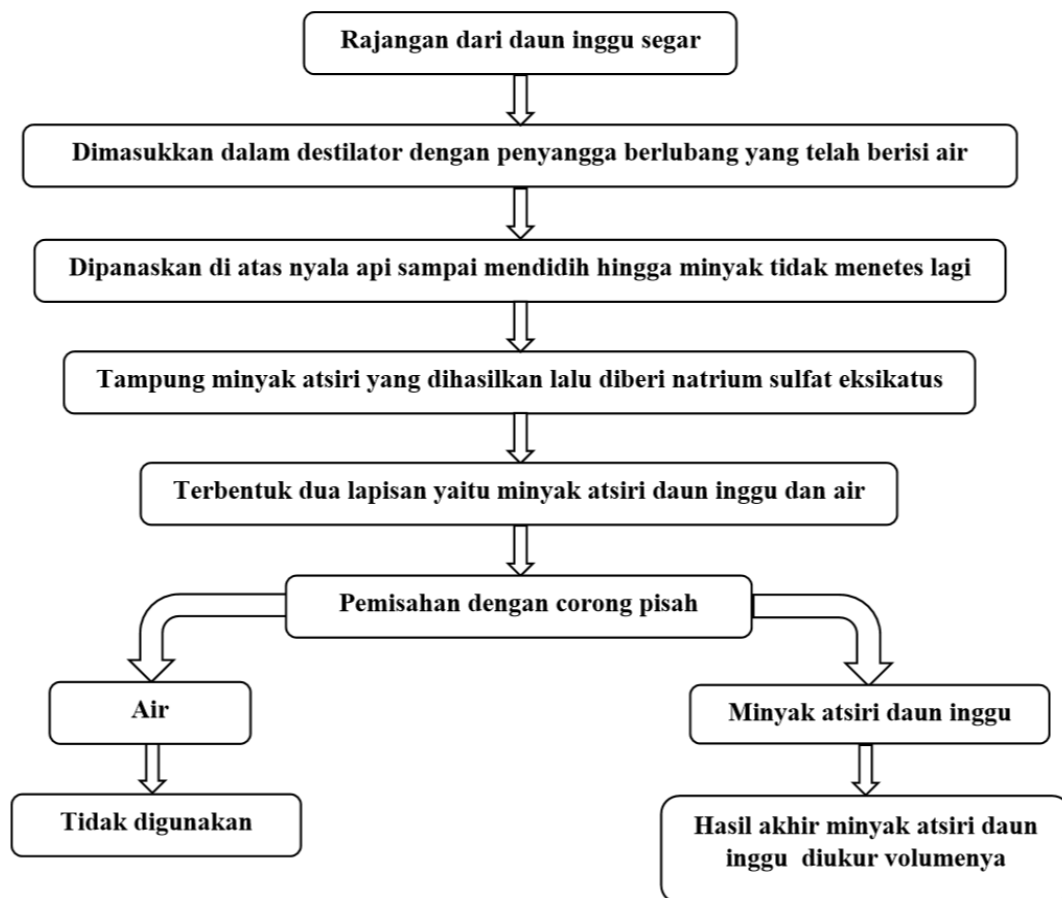
Daun inggu yang sudah dipanen sebanyak 7 kg dibersihkan dari kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dengan cara dicuci dengan air mengalir, kemudian tiriskan. Daun yang sudah kering kemudian dirajang hingga ukurannya menjadi sedikit lebih kecil agar mempermudah proses penguapan.

4. Isolasi minyak atsiri daun inggu

Isolasi minyak atsiri pada daun inggu dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Universitas Gadjah Mada dengan menggunakan destilasi uap air. Daun inggu yang telah dirajang sebanyak 7 kg dimasukkan ke dalam alat penyulingan minyak dan air yang menyerupai dandang dengan penyangga

berlubang yang telah diisi air. Penyulingan dilakukan diatas api sampai air mendidih. Uap air yang dihasilkan akan dialirkan pada pipa kondensor dan akan mengalami proses kondensasi, sehingga minyak atsiri daun inggu akan ikut terbawa oleh uap air. Pemanasan dilakukan dengan api sampai penyulingan selesai yang ditandai dengan tidak ada lagi penambahan minyak, kemudian hasil minyak atsiri ditampung dan diukur volumenya.

Hasil yang diperoleh kemudian dipisahkan antara fase minyak dan fase air dengan menggunakan corong pisah dengan penambahan Na_2SO_4 eksikatus sebanyak 1% dari volume minyak atsiri sehingga didapatkan hasil sulingan minyak atsiri daun inggu yang murni. Minyak yang diperoleh kemudian ditutup rapat serta simpan di ruangan yang terlindung dari cahaya (Gunawan 2004).



Gambar 8. Skema isolasi minyak atsiri daun inggu

5. Analisa minyak atsiri

5.1 Pengamatan organoleptik. Pengamatan organoleptik pada minyak atsiri meliputi warna, aroma, bentuk dan rasa minyak. Hasil destilasi minyak atsiri kemudian dimasukkan ke dalam wadah berbahan kaca yang bersih dan bening kemudian dilakukan pengamatan pada warna dan kejernihan minyak atsiri. Bau dan rasa minyak atsiri haruslah sesuai dengan tanaman asalnya (Gunawan 2004).

5.2 Identifikasi minyak atsiri. Identifikasi minyak atsiri dilakukan seperti identifikasi minyak atsiri pada umumnya. Pertama, teteskan minyak atsiri pada permukaan air, minyak atsiri akan menyebar dan permukaan air akan tampak jernih dan tidak keruh. Kedua, teteskan 1 tetes minyak atsiri pada kertas saring dan diamkan beberapa menit. Minyak atsiri akan terbukti murni jika minyak yang ditetaskan menguap dengan sempurna tanpa meninggalkan noda (Guenther 1990).

5.3 Penetapan indeks bias minyak atsiri. Penetapan indeks bias ditetapkan dengan alat *refractometer* dan diulang minimal sebanyak tiga kali percobaan. Awalnya bagian prisma dibuka kemudian dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol. Refraktrometer diatur sehingga garis dan skala tampak jelas, kemudian catat suhu ruang tempat bekerja lalu teteskan cairan minyak atsiri yang diukur pada prisma dan kemudian alat ditutup kembali. Gerakan pemutar di bagian sebelah kanan alat kemudian atur sehingga batas gelap dan terang tepat pada garis. Skala yang ada pada alat kemudian dicatat sebagai indeks biasnya (Guenther 1987).

5.4 Penetapan bobot jenis minyak atsiri. Penetapan bobot jenis minyak atsiri ditetapkan dengan cara keringkan botol kosong dengan cara dioven, kemudian botol kosong ditimbang dan dicatat hasilnya. Botol kosong yang telah ditimbang kemudian dimasukan minyak atsiri daun inggu kedalamnya lalu timbang botol dan catat hasilnya. Penimbangan ini harus dilakukan minimal tiga kali percobaan. Data hasil penimbangan diolah dengan pengurangan antara berat botol berisi minyak atsiri dan berat botol kosong, dari hasil penimbangan ini akan dihasilkan bobot minyak atsiri. Hasil bobot minyak atsiri kemudian dibagi dengan

volume piknometer yang digunakan hingga berat jenis minyak atsiri daun inggu akan didapatkan.

$$\text{Berat Jenis Minyak Atsiri} = \frac{\text{berat piknometer isi} - \text{berat piknometer kosong}}{\text{volume piknometer}}$$

5.5 Karakterisasi komponen senyawa penyusun minyak atsiri dengan Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS). Pengujian komponen senyawa penyusun minyak atsiri daun inggu menggunakan GC-MS Shimadzu GCMS-QP2010S (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). GC-MS Shimadzu GCMS-QP2010S (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) dilengkapi dengan Capillary Coloum: Nonpolar RTX-5MS, Fase diam yaitu *Phenyl methylpolyciloxane* (diameter 0,25 mm, panjang kolom 30 meter, dan ketebalan film 0,25 μm), detektor yang digunakan FTD. Kondisi GC: suhu awal 60⁰C dinaikkan sampai 300⁰C, fase gerak (gas pembawa) yaitu helium dengan kecepatan aliran 0,75 mL/min. Kondisi MS: mulai m/z 30 dan akhir m/z 400. Senyawa diidentifikasi dengan membandingkan *retention index* dan membandingkan massa spectra dengan yang ada di database *library wiley*.

6. Persiapan hewan uji

Penelitian ini dilakukan menggunakan 20 mencit dengan kriteria pertama, mencit dengan jenis kelamin jantan dan berumur sekitar 2-3 bulan. Kedua, bulu mencit kelihatan sehat tampak bersih, halus dan mengkilat, bola mata tampak kemerahan jernih, dan sehat. Ketiga, berat badan berkisar 20-30 gram. Keempat, mencit tidak dalam keadaan depresi atau tertekan, hewan tampak aktif dan selalu bergerak ingin tahu. Mencit yang akan diorientasi selama seminggu (7 hari) diberikan makan secara teratur agar mencit sehat, diharapkan bobot badan mencit tidak boleh berkurang 10%, dan konsistensi fesesnya normal dan padat, tidak cair atau diare dan juga suhu optimum rata-rata 37⁰C. Mencit juga diadaptasi selama 3 hari berturut-turut dalam labirin sebelum dilakukan pengujian antidepresan pada alat ultrasonik hal ini bertujuan agar mencit terbiasa dengan suasana labirin.

7. Membuat konsentrasi minyak atsiri dan membagi kelompok uji

Mencit yang telah diadaptasi selama 1 minggu sebanyak 20 ekor dibagi menjadi 5 kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit.

Kelompok pertama adalah kelompok kontrol negatif, kelompok ini tidak diberikan perlakuan, hanya mengamati keadaan mencit yang dibuat depresi dalam alat ultrasonik tanpa pemberian minyak atsiri sebagai antidepresan.

Kelompok kedua adalah kelompok kontrol positif, kelompok ini hewan uji diberikan perlakuan dengan memberi minyak atsiri yang telah terbukti aktivitasnya yaitu produk minyak atsiri daun mint konsentrasi 1% yang telah diuji efektivitasnya pada mencit putih jantan dan telah dipasarkan. Kualitas minyak atsiri dapat dilihat pada Lampiran 19.

Kelompok ketiga adalah kelompok perlakuan minyak asiri daun inggu dengan konsentrasi 0,5%, pada kelompok inilah uji aktivitas minyak atsiri dilakukan, hewan uji diberikan perlakuan dengan memberi aroma minyak atsiri sebesar 0,5% pada hewan uji yang telah dibuat depresi. Pembuatan sediaan dilakukan dengan meneteskan minyak atsiri daun inggu sebanyak 1 tetes dalam 10 mL aquadestilata.

Kelompok keempat adalah kelompok perlakuan minyak asiri daun inggu dengan konsentrasi 1% dengan perlakuan yang sama dengan kelompok tiga dan lima. Pembuatan sediaan dilakukan dengan meneteskan minyak atsiri daun inggu sebanyak 2 tetes dalam 10 mL aquadestilata.

Kelompok kelima adalah kelompok perlakuan minyak asiri daun inggu dengan konsentrasi 2%. Pembuatan sediaan dilakukan dengan meneteskan minyak atsiri daun inggu sebanyak 4 tetes dalam 10 mL aquadestilata.

Beberapa cara yang dipakai untuk mendapatkan efek aroma dari minyak atsiri dengan inhalsi yaitu dengan pengusapan langsung di tangan, alat penguap, rendaman, botol penyemprotan dan *diffuser* (Siahaan 2013). Metode aplikasi minyak atsiri dalam *diffuser* yang digunakan dalam praktek sehari-hari yaitu dengan meneteskan minyak ke dalam wadah yang berisi aquadesilata dengan konsentrasi tertentu. Sebagai pedoman Siahaan (2013) merekomendasikan

perhitungan konsentrasi dengan 20 tetes dalam 50 mL air untuk konsentrasi 2%.

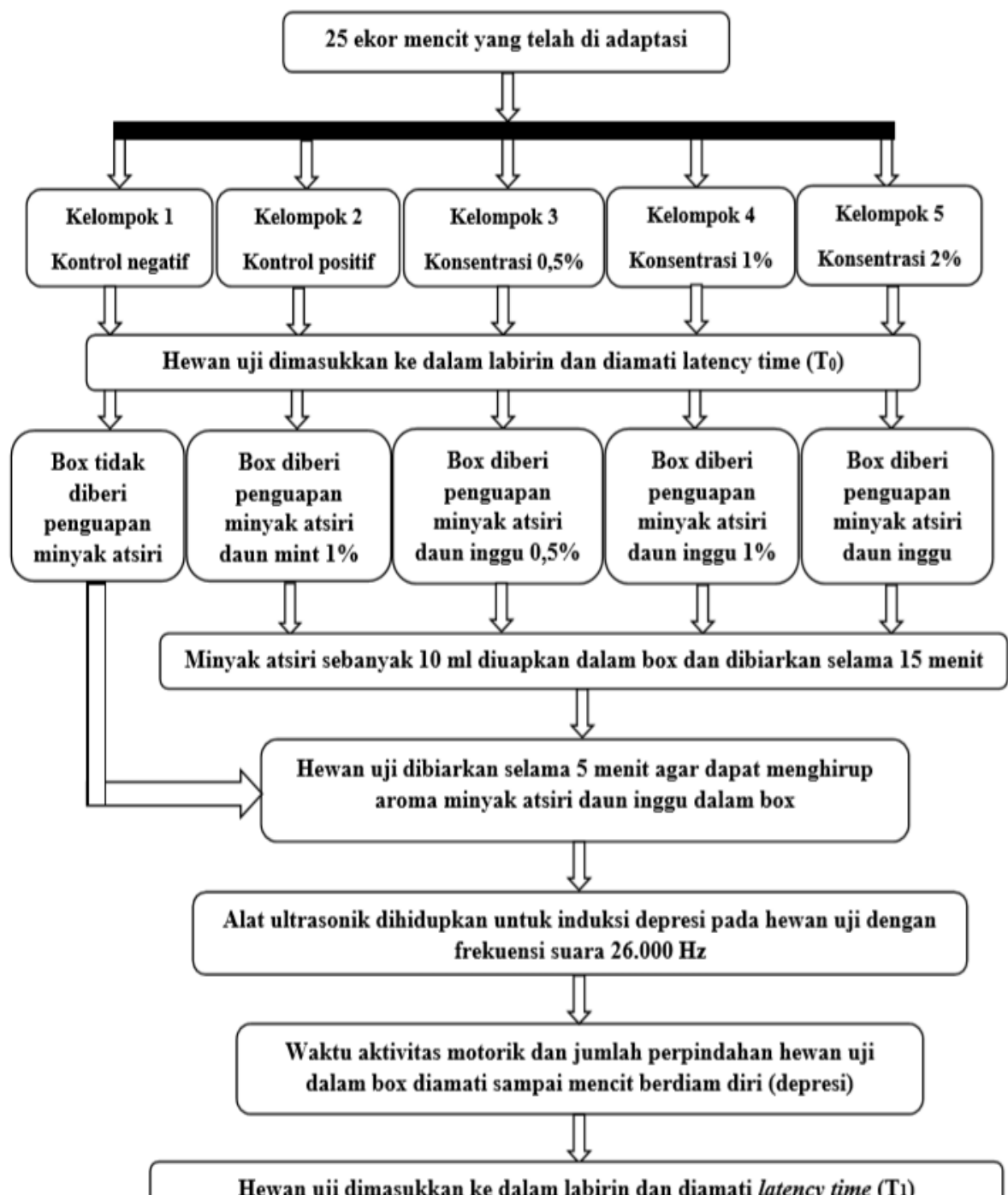
8. Tahap percobaan dalam penelitian

Percobaan ini dilakukan dengan tahap-tahap sebagai berikut: Pertama, mencit ditimbang satu per satu kemudian dikelompokkan mencit sesuai dengan rata-rata ukuran berat badan. Mencit yang telah dikelompokkan kemudian diadaptasi selama seminggu dan tiga hari berturut-turut sebelum pengujian antidepresi, adapasi hewan uji di dalam labirin. Pengujian dimulai dengan memasukkan mencit ke dalam labirin untuk uji daya konsentrasi sebelum pemberian aroma minyak atsiri dengan mengamati *latency time* (T_0).

Kedua, uapkan minyak atsiri sebanyak 10 mL di dalam box ultrasonik selama 15 menit kemudian masukkan mencit dalam box dan biarkan mencit selama 5 menit agar dapat menghirup aroma minyak atsiri daun inggu dalam box, perlakuan ini dilakukan untuk tiap-tiap mencit sesuai dengan konsentrasi minyak atsiri daun inggu sesuai dengan kelompok perlakuan yaitu konsentrasi 0,5%, 1%, dan 2%. Kelompok kontrol negatif tidak perlu dilakukan penguapan minyak atsiri sedangkan untuk kelompok kontrol positif box akan diuapkan dengan minyak atsiri daun mint dengan konsentrasi 1% sebanyak 10 mL selama 15 menit.

Ketiga, atur ultrasonik untuk mengeluarkan suara dengan frekuensi 26.000 Hz agar dapat bekerja sebagai penginduksi depresi mencit. Keempat, amati waktu aktivitas motorik dari mencit dengan kurun waktu paling lama hingga 40 menit. Amati dan mencatat lama mencit beraktivitas didalam ruangan A-B. Catat total waktu aktivitas motorik mencit sampai pada akhirnya mengalami depresi. Mencit yang mengalami depresi akan ditandai dengan hilangnya aktivitas motorik mencit, yaitu mencit berdiam diri dan tidak bergerak lagi pada sudut ruangan.

Kelima, mencit kemudian dimasukan kembali dalam labirin untuk diuji daya konsentrasinya setelah pemberian aroma minyak atsiri dengan mengamati waktu yang dibutuhkan mencit sampai keluar dari labirin dengan menggunakan umpan yang disimpan dipintu keluar labirin (T_1). Terakhir, setelah data didapatkan lakukan analisis dengan menggunakan metode Analisis Varian (ANOVA) *One Way Method* untuk membandingkan antara kelompok perlakuan.



Gambar 9. Skema perlakuan uji antidepresan

E. Analisis data

Pada hasil uji efektivitas antidepresan terhadap mencit dilakukan analisa menggunakan metode Analisis Varian (ANOVA) dengan program SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) 15.0 for windows Evaluation Version. Analisis ini bertujuan untuk membandingkan efektivitas variasi konsentrasi dari minyak atsiri daun inggu 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 menggunakan analisis *One Way Method* untuk membandingkan antara kelompok perlakuan.

Rumusan hipotesis:

H_0 : tidak ada perbedaan efektivitas antara variasi konsentrasi minyak atsiri daun inggu terhadap efektivitas antidepresan terhadap mencit jantan

H_a : ada perbedaan efektivitas antara variasi konsentrasi minyak atsiri daun inggu terhadap efektivitas antidepresan terhadap mencit 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.