

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tanaman singkong (*Manihot esculenta* C.). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong yang dipilih dengan kondisi masih utuh, segar, daun yang muda di bagian atas yang diperoleh di Tawangmangu, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah aktivitas ekstrak daun singkong hasil soxhletasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% terhadap aktivitas lokomotor mencit akibat induksi depresi.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama merupakan variabel yang sudah diidentifikasi dan dapat digolongkan dengan beberapa variabel lain seperti variabel bebas, terkendali dan tergantung.

Variabel bebas merupakan jenis variabel yang dengan diubah guna mengetahui pengaruh yang terkait dengan variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu penetapan ekstrak etanol daun singkong dalam berbagai variasi dosis.

Variabel tergantung merupakan puncak permasalahan yaitu kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah turunnya waktu imobilitas terhadap mencit setelah perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dalam berbagai variasi dosis sebagai kelompok uji, kontrol negatif dan kontrol positif.

Variabel terkendali berkorelasi dengan variabel tergantung sehingga perlu dilakukan penetralisan kualifikasinya sehingga hasil yang ditemukan tidak tersebar dan dapat *re-make* oleh peneliti lain dengan tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu 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 singkong adalah daun segar yang diperoleh dari pohon tanaman singkong yang berasal dari desa Tawangmangu, Jawa

Tengah.

Kedua, serbuk daun singkong adalah serbuk yang diperoleh dari hasil tahapan pemanenan, pengeringan, penggilingan, dan pengayakan daun singkong.

Ketiga, ekstrak etanol daun singkong adalah ekstrak yang dihasilkan dari hasil penyarian dengan metode soxhletasi menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C.

Keempat, mencit putih jantan adalah hewan uji mencit putih jantan dengan model laboratorium berumur 2-3 minggu dengan berat badan $\pm 20-30$ gram.

Kelima, uji *immobility time* adalah uji dengan menggunakan metode *forced swimming test* untuk mengamati waktu mencit tidak bergerak atau dalam keadaan diam.

Keenam, dosis efektif adalah dosis terkecil dari ekstrak etanol daun singkong yang memberikan efek terapi setara atau tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif amitriptilin.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

1.1 Alat yang digunakan untuk pembuatan dan analisis sampel simplisia. Alat yang digunakan untuk pembuatan dan analisis sampel simplisia terdiri dari oven, timbangan analitik, blender, ayakan no 60, *sterling bidwell*, *moistur balance*.

1.2 Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak. Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak terdiri dari alat soxhletasi, *evaporator rotary*, *waterbath*, kertas saring khusus soxhletasi dan tali kasur.

1.3 Alat yang digunakan identifikasi kandungan senyawa. Alat yang digunakan identifikasi kandungan senyawa terdiri dari tabung reaksi, UV 254 nm, UV 366 nm, lempeng KLT, gelas ukur, rak tabung, pipet mikro.

1.4 Alat yang digunakan perlakuan hewan uji. Alat yang digunakan perlakuan hewan uji terdiri dari timbangan, spuit oral, kandang mencit, dan alat uji *immobility time* menggunakan metode *forced swimming test*.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan pada

penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Cranz) yang diperoleh dari desa Tawangmangu, Jawa Tengah.

2.2 Hewan Uji. Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan umur 2-3 bulan, dengan berat $\pm 20-30$ gram dan sehat.

2.3 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96%, amitriptilin tablet, aquadest dan Na CMC 0,5%, dan reagen pereaksi.

D. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih dengan jenis kelamin jantan, berusia 2-3 bulan. Selama dilaksanakan penelitian harus diperhatikan kebutuhan makanan dan minuman mencit guna mencegah kematian. Besarnya jumlah sampel mencit yang akan digunakan ditentukan dengan rumus *Federer*:

$$(t)(n-1) \geq 15$$

Arti (t) adalah jumlah kelompok perlakuan, dan (n) adalah jumlah ulangan pada masing-masing kelompok.

$$(t)(n-1) \geq 15$$

$$(5)(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Hewan yang dibutuhkan sejumlah 4 ekor mencit untuk tiap kelompok. Hewan uji pada penelitian ini menggunakan 5 perlakuan, maka dari itu jumlah sampelnya adalah sebanyak 20. Untuk menjaga kemungkinan *drop out* pada mencit maka dilakukan penambahan sebesar 25% sehingga keseluruhan total hewan yang digunakan adalah 25 ekor mencit.

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi merupakan tahapan untuk memvalidasi kebenaran suatu tanaman. yang meliputi ciri-ciri morfologi tanaman pada tanaman daun singkong (*Manihot esculenta* C.). Determinasi dilaksanakan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), yang berlokasi di Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan dan pengeringan daun

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

3. Pembuatan serbuk

Daun singkong (*Manihot esculenta* C.) diperoleh dalam keadaan baik dan segar, lalu dicuci dengan air bersih dan mengalir hingga terbebas dari kotoran kemudian tiriskan dan timbang. Daun yang sudah bersih kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven dalam suhu 40-50°C sampai kering. Hasil pengeringan dengan oven tersebut diserbuk dengan alat penyerbuk dan diayak dengan menggunakan *mesh* no.60 sehingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan yang relatif homogen. Hasil dari serbuk yang sudah diayak kemudian disimpan dalam wadah kering dengan tutup rapat.

4. Pengujian organoleptis

Pada penelitian ini dilakukan uji organoleptik yang meliputi bau, rasa, dan warna.

5. Penetapan susut pengeringan

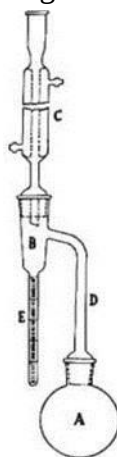
Susut pengeringan yaitu suatu proses yang dilakukan dengan tujuan mengurangi berat bahan dari bahan yang telah dikeringkan. Simplisia wajib dalam bentuk serbuk dengan rentang derajat kehalusan sampai nomor 8, dikeringkan menggunakan *moisture balance* dengan suhu 105°C. Susut pengeringan dilakukan dengan cara menimbang dengan seksama 2 gram serbuk simplisia dengan melakukan replikasi sebanyak 3x sampai mencapai bobot konstan.

6. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air dapat dilakukan dengan dua metode yang berbeda, berikut adalah metode penetapan kadar air :

6.1 Metode Azeotropi. Metode azeotropi dilakukan dengan menggunakan alat berupa labu destilasi toluene. Awalnya pada bagian (A) alat labu 500 mL dihubungkan terlebih dahulu dengan pendingin balik di bagian (C) dengan melalui alat penampung (B) dilengkapi dengan tabung penerima 5 mL (E) dengan jumlah skala sebesar 0,1 mL. Labu dipanaskan terlebih dahulu menggunakan pemanas listrik yang suhunya dapat diatur. Bagian (D) lebih baik dibungkus dengan menggunakan asbes. Membersihkan tabung penerima dan pendingin dengan asam pencuci, bilas menggunakan air dan keringkan dalam lemari pengering. Timbang dan perkirakan bahan yang terkandung sebesar 1 sampai 4 mL air dan dimasukkan dalam labu kering. Bila zat

yang dihasilkan berupa pasta, maka timbang menggunakan logam yang berukuran sebesar leher labu. Penambahan batu didih dilakukan untuk mengatasi gejolak pada zat yang bisa menyebabkan gejolak. Masukkan kurang lebih sebanyak 200 mL toluene jenuh air ke dalam labu dan pasanglah rangkaian alatnya. Toluene jenuh air dimasukkan pada bagian (E) dengan melalui pendingin sampai leher penampung (B) selama 15 menit dengan hati-hati. Aturlah penyulingan dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes tiap detik sampai sebagian besar air sudah tersuling, lalu naikan kecepatan hingga 4 tetes per detiknya. Bersihkan alat dan lakukan penyulingan lanjutan selama 5 menit. Volume air setelah air dan toluene memisah sempurna sudah dapat dibaca dan kadar air dapat dihitung dalam %v/b (Courtney, 2012).



Gambar 5. *Sterling Bidwell* (Courtney, 2012).

6.2 Metode Gravimetri. Metode gravimetri ini jauh lebih mudah dalam proses pengerjaannya dengan tahapan awalnya menimbang kurang lebih sampel sebanyak 10 gram lalu dimasukkan ke dalam wadah yang sudah ditara, lalu melalui proses pengeringan dengan suhu 105°C pada durasi waktu selama satu jam sampai tercipta perbedaan yang berturut-turut yang tidak lebih dari 0,25% (Courtney, 2012).

7. Pembuatan ekstrak etanol daun singkong

Soxhlet adalah suatu metode analisis lemak dengan prinsip kerja sebagai berikut. Proses soxhletasi menggunakan pelarut pengeksrak yang ada dalam labu soxhlet yang dipanaskan sesuai dengan titik didihnya sehingga menguap. Uap pelarut ini naik melalui pipa pendingin balik sehingga mengembun dan menetes pada bahan yang diekstraksi. Pelarut ini merendam bahan dan jika tingginya sudah

melampaui tinggi pipa pengalir pelarut maka ekstrak akan mengalir ke labu soxhlet. Ekstrak yang terkumpul dipanaskan lagi sehingga pelarutnya akan menguap kembali dan lemak akan tertinggal pada labu. Terjadi daur ulang pelarut sehingga setiap kali bahan diekstraksi dengan pelarut baru (Hermanto *et al.*, 2019).

Simplisia yang sudah menjadi serbuk dan sudah ditimbang, siapkan timbel yang merupakan wadah simplisia. Timbal diukur panjangnya sesuai dengan selongsong soxhlet dan potong sesuai batas yang telah ditentukan. Masukkan serbuk ke dalam timbal dan ikat dengan tali kasur. Masukkan pelarut dalam labu destilasi, diikuti dengan memasukkan timbal ke dalam selongsong soxhlet. Pasang kondensor lalu keratkan. Nyalakan aliran air pada kondensor lalu perhatikan arahnya dari bawah ke atas, dan nyalakan penangas. Ulangi beberapa kali siklus hingga diperoleh ekstrak. Pelarut yang sudah tidak berwarna maka diganti timbal berisi simplisia baru.

8. Pengujian bebas etanol ekstrak daun singkong

Metode bebas etanol dilakukan dengan memasukkan ekstrak dalam tabung reaksi kemudian menambahkan CH_3COOH dan H_2SO_4 pekat yang dipanaskan. Ketika hasil negatif tidak muncul bau ester pada ekstrak (Kurniawati, 2015).

9. Uji kandungan senyawa kimia pada ekstrak daun singkong

9.1 Uji flavonoid. Uji flavonoid dilakukan dengan mengambil hasil filtrat sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk Mg secukupnya, lalu 1 mL asam klorida dan 2 mL amil alkohol, dilakukan dengan cara dikocok-kocok dengan kuat kemudian dibiarkan memisah. Positif mengandung flavonoid dapat dilihat dengan munculnya warna merah/ jingga /kuning pada lapisan amil alkohol (Sarker *et al.*, 2006).

9.2 Uji tanin. Uji tanin dilakukan dengan Larutan uji sebanyak 1 mL direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%, jika terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin (Artini *et al.*, 2008).

9.3 Uji saponin. Uji saponin dilakukan dengan cara sebanyak 1 g ditambahkan dengan air hangat di dalam tabung reaksi, dikocok kuat-kuat secara vertikal selama 10 detik. Pembentukan busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit menunjukkan adanya saponin. Penambahan 1 tetes HCl 2N dilihat ketika busa tidak hilang (Artini *et al.*, 2008).

9.4 Uji alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 gram ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air suling, dilakukan pemanasan dengan alat pemanas di atas penangas air selama 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang dihasilkan akan digunakan untuk percobaan berikut:

Filtrat sebanyak 3 tetes lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, kemudian dilihat perubahan yang terjadi. Munculnya endapan maka dinyatakan sampel positif mengandung alkaloid, akan tetapi apabila endapan tidak muncul maka sampel negatif mengandung alkaloid.

Filtrat sebanyak 3 tetes lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat, kemudian dilihat perubahan yang terjadi. Munculnya endapan maka dinyatakan sampel positif mengandung alkaloid, akan tetapi apabila endapan tidak muncul maka sampel negatif mengandung alkaloid.

Filtrat sebanyak 3 tetes lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, kemudian dilihat perubahan yang terjadi. Munculnya endapan maka sampel dinyatakan positif terdapat senyawa alkaloid, akan tetapi apabila endapan tidak muncul maka sampel dinyatakan negatif tanpa mengandung alkaloid.

Percobaan ulang dilakukan sebanyak dua kali dari tiga kali percobaan kemudian menunjukkan adanya endapan maka dapat dinyatakan positif mengandung senyawa alkaloid. Percobaan uji sebanyak dua kali dari tiga kali percobaan dan tidak menunjukkan adanya endapan maka dinyatakan negatif mengandung alkaloid (DepKes 1995).

9.5 Uji steroid/triterpenoid. Uji steroid/ triterpenoid dilakukan dengan Sampel ekstrak dicampur dengan kloroform kemudian ditambah asam asetat glasial dan H_2SO_4 pekat. Perubahan warna hijau-biru menunjukkan adanya steroid dan jika perubahan warna merah ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Yuliastuti *et al.*, 2017).

10. Uji KLT

Proses dilakukan uji KLT dengan menggunakan fase gerak butanol:asam asetat:air dengan perbandingan (6:1:3). Baku pembanding yang digunakan adalah rutin, yang kemudian disemprot dengan sitroborat. Hasil dapat diamati pada UV 254 nm dan UV 366 nm.

11. Pembuatan sediaan oral

11.1 Suspensi ekstrak daun singkong. Suspensi ekstrak daun singkong dibuat dengan cara menimbang ekstrak daun singkong sebanyak 2 g yang kemudian dicampurkan pada larutan CMC Na 0,5% dengan volume larutan 100 mL.

11.2 Suspensi amitripilin. Suspensi amitriptilin dilakukan dengan cara menggerus amitriptilin dalam mortir sampai homogen. Air hangat dan juga larutan CMC Na dicampurkan sampai homogen. Botol yang telah dikalibrasi dan diberi aquadest ad 100 mL.

11.3 Suspensi CMC Na. Suspensi CMC Na dilakukan dengan cara memasukkan 0,5 gram Na CMC dan 20 mL aquadest hangat ke dalam mortir kemudian digerus sampai membentuk mucilago. Botol yang telah dikalibrasi dan menambahkan sisa aquades ke dalam botol sampai 100 mL.

12. Penentuan dosis

12.1 Dosis amitripilin. Dosis amitriptilin yang digunakan pada manusia adalah sebanyak 1 tablet atau setara dengan (25 mg/70 kg BB) untuk 1 kali minum 2-3 kali dalam sehari. Faktor konversi manusia berat badan 70 kg ke mencit dengan berat badan 20 gram adalah 0,0026. Maka dihasilkan dosis untuk penggunaan pada mencit 20 gram adalah $25 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,065 \text{ mg/20 gramBb Mencit}$.

12.2 Dosis ekstrak etanol daun singkong. Dosis sediaan yang diberikan sebanyak 125, 250, 500 mg/kgBb manusia atau hasil dosis setelah dikonversi diberi sebanyak 2,5, 5, 10 mg/20gBb mencit.

13. Pembagian kelompok uji dan perlakuan hewan uji

Pada penelitian ini digunakan hewan uji mencit sebanyak 25 ekor. Mencit ditimbang dan diberi tanda telebih dahulu untuk memudahkan dalam proses pemberian dosis. Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan dengan bobot rata-rata 20-30 gram. Mencit yang digunakan dibagi menjadi 5 kelompok dan beri perlakuan secara per oral, dengan pembagian kelompok :

Kelompok 1: Kontrol positif diberi amitripiline dengan dosis 25 mg/KgBb.

Kelompok 2: Kontrol negatif diberi CMC Na 0,5%

Kelompok 3: Diberi ekstrak etanol daun singkong dosis 125 mg/KgBb.

Kelompok 4: Diberi ekstrak etanol daun singkong dosis 250 mg/KgBb.

Kelompok 5: Diberi ekstrak etanol daun singkong dosis 500 mg/KgBb.

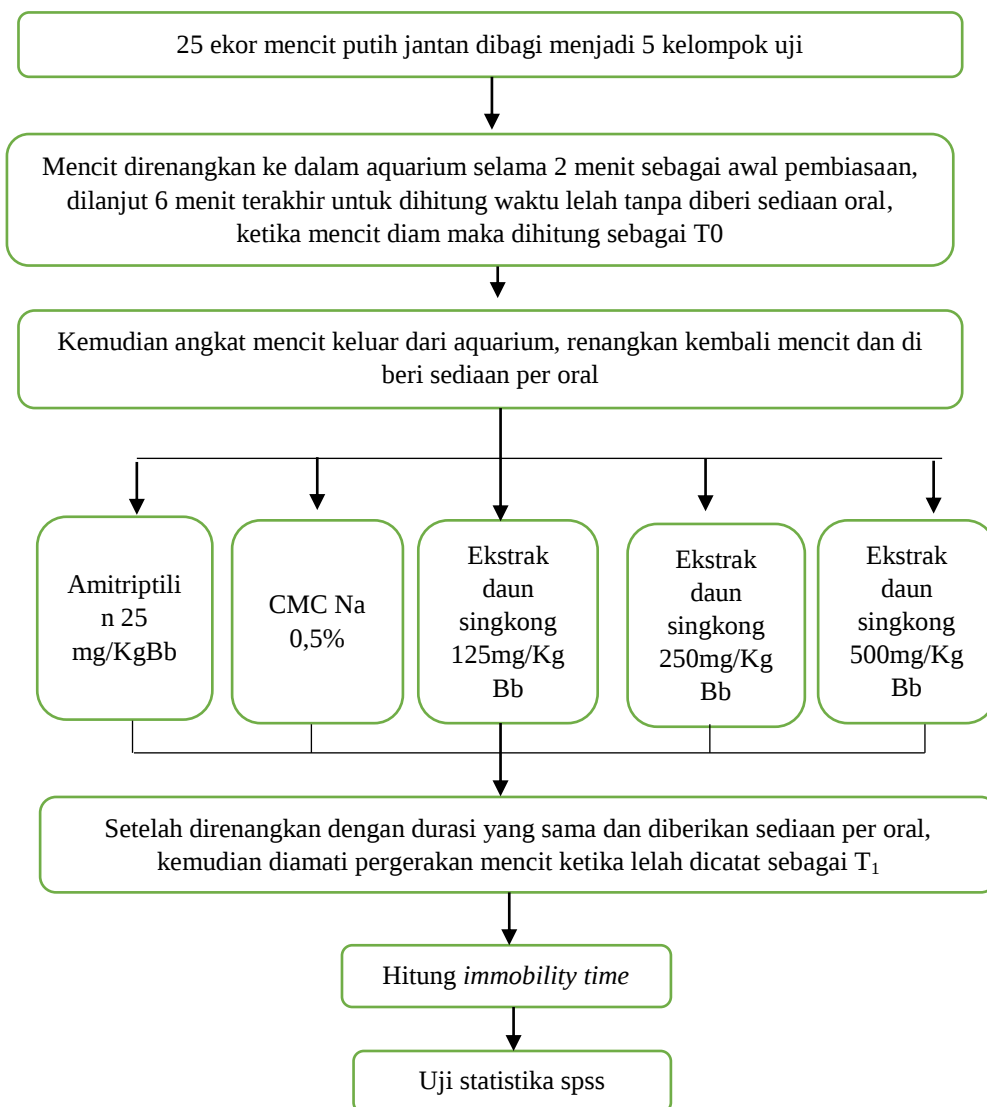
14. Prosedur uji *immobility time*

Penelitian ini menggunakan metode *forced swimming test*. Siapkan wadah kaca berbentuk silinder transparan (batasan jumlah wadah hanya terbatas pada tempat yang tersedia) berukuran tinggi 50 cm dan diameter 20 cm. Isi silinder dengan air ledeng pada suhu 25°C dan atur ke dalaman air sesuai dengan ukuran mencit, sehingga tidak dapat menyentuh dasar wadah dengan kaki belakangnya. Tandai silinder dengan nomor hewan untuk tujuan identifikasi hewan (Yankelevitch-Yahav *et al.*, 2015). Mencit direnangkan terlebih dahulu selama 8 menit yaitu dengan rincian total waktu 2 menit dibiarkan berenang untuk membiasakan mencit, kemudian 6 menit selanjutnya untuk mengamati pengujian terhadap mencit sebelum diberi sediaan oral (Kurama *et al.*, 2013). Mencit yang sudah berdiam diri maka dapat dicatat sebagai waktu T_0 . Direnangkan kembali dengan proses yang sama namun telah diberi sediaan oral dan mulai diamati ketika mencit berdiam diri maka dicatat sebagai T_1 . Data sebagai antidepresan dapat dilihat dari waktu sebelum diberi sediaan dan waktu setelah diberi sediaan. Hal itu dapat dilihat dari %*immobility time* dimana semakin tinggi persentase *immobility time* maka semakin kuat efek antidepresan yang dihasilkan.

F. Analisis Data

Menurut analisis statistik pada penelitian ini dapat dinyatakan metode yang digunakan adalah uji *saphiro-wilk* dikarenakan jumlah data sampel <50 dan upaya melihat perkembangan data yang terprogres dengan baik. Ketika nilai $p > 0,05$ maka dapat dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan metode *One Way Anova*, ketika hasilnya menunjukkan prevalensi angka normal ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD* untuk melihat perbedaan antar kelompok. Nilai ketika dinyatakan tidak normal maka dilanjutkan dengan pengujian pengujian non-parametrik menggunakan metode *Kruskal-wallis*.

G. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 6. Skema jalannya penelitian.