

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dari objek penelitian aktivitas antidepresan menggunakan biji pala (*Myristica fragrans* Houtt). Sampel yang digunakan dalam pengujian aktivitas antidepresan adalah fraksi MAP-F170/500 dan MAP-F170/400 yang dihasilkan dari destilasi fraksionasi dengan tekanan 500 mmHg dan 400 mmHg dengan suhu 170°C.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama mencakup identifikasi dari semua sampel. Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah fraksi MAP-F170/500 dan MAP-F170/400 dalam beberapa varian dosis yang sudah ditentukan. Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah lokomotor dan durasi imobilitas. Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus Musculus*).

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam beberapa macam variabel, antara lain: variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas yang terdapat dalam penelitian ini adalah variabel yang variasinya akan mempengaruhi terhadap hasil variabel tergantung. Variasi bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis fraksi MAP- F170/500 dan MAP-F170/400.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung yang terdapat pada penelitian ini merupakan variabel yang ingin dilihat nilainya akibat pengaruh dari variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antidepresan fraksi MAP-F170/500 dan MAP-F170/400 dengan melihat gerak lokomotor dan durasi imobilitas mencit.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali pada penelitian ini merupakan variabel yang efeknya akan dikontrol supaya tidak mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi sampel, waktu pengamatan, induksi stress, suasana laboratorium, berat badan dan jenis kelamin.

3. Definisi operasional

Pertama, fraksi MAP-F170/500 adalah hasil pemisahan senyawa fraksi dari tanaman pala yang melalui destilasi fraksionasi berdasarkan

tidik didih dan tekanan uap senyawa didalamnya yaitu pada tekanan 500 mmHg dan suhu 170°C.

Kedua, fraksi MAP-F170/400 adalah hasil pemisahan senyawa fraksi dari tanaman pala yang melalui destilasi fraksionasi berdasarkan titik didih dan tekanan uap senyawa didalamnya yaitu tekanan 400 mmHg dan suhu 170°C.

Ketiga, antidepresan adalah terapi yang digunakan untuk mencegah dan mengobati depresi.

Keempat, aktivitas antidepresan adalah kemampuan atau khasiat yang dimiliki oleh suatu senyawa untuk bertindak sebagai antidepresan dalam terapi depresi.

Kelima, parameter pengujian aktivitas antidepresan dalam penelitian ini adalah durasi imobilitas dan gerak lokomotor

Keenam, waktu imobilitas adalah durasi hewan uji dalam keadaan tidak bergerak yang ditandai dengan usaha mencit mempertahankan kepalanya berada diatas permukaan air namun anggota gerakanya tidak digerakkan untuk berenang.

Ketujuh, aktivitas lokomotor adalah aktivitas hewan uji aktif melakukan eksplorasi secara aktif pada setiap bagian kotak *open field test* selama 5 menit.

Kedelapan, mencit putih adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang berusia 2-3 bulan.

Kesembilan, dosis efektif adalah dosis yang mampu memberikan peningkatan aktivitas lokomotor dan penurunan imobilitas secara statistik dan memiliki persentase peningkatan aktivitas lokomotor dan penurunan imobilitas yang sebanding dengan kontrol positif.

C. Bahan dan alat

1. Bahan

Fraksi MAP-F170/500, fraksi MAP-F170/400, minyak atsiri pala sebagai pembanding, hewan uji yang digunakan yaitu mencit putih jantan (*Mus musculus*) berusia 2-3 bulan. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini tablet fluoxetine 20 mg sebagai kontrol positif, Propilen Glikol 10 % sebagai kontrol negatif.

2. Alat

Kotak uji *forced swimming test* yang terbuat dari kaca dengan ukuran 44 x 20,5 x 23 cm, kotak kaca uji *open field test* ukuran 40 x 40 x 40 cm dengan garis hitam ditengah kotak. Timbangan, spuit oral,

mortir, kandang mencit, stopwatch, pengering rambut, pipet volume, labu ukur 100 ml

D. Jalannya penelitian

1. Perhitungan prediksi senyawa dengan persamaan *Clausius clapeyron*.

Fraksinasi senyawa dalam minyak atsiri pala yaitu MAP-F170/500 dan fraksi MAP-F170/400 didasarkan pada perhitungan senyawa dengan persamaan *Clausius clapeyron*. Persamaan *Clausius clapeyron* merupakan rumus termodinamika yang menjelaskan hubungan antara tekanan uap suatu zat dengan suhu saat zat tersebut mengalami perubahan fase. Rumus umum yang digunakan yaitu :

$$\ln\left(\frac{P_2}{P_1}\right) = \frac{\Delta H_{vap}}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)$$

Keterangan :

P_1 : tekanan awal (1 atm = 760 mmHg)

P_2 : tekanan baru (mmHg)

T_1 : titik didih normal (dalam Kelvin)

T_2 : titik didih pada tekanan (yang akan dicari)

ΔH_{vap} : entalpi penguapan (dalam J/mol)

R : konstanta gas = 8,314 J/mol·K

2. Penentuan dosis

2.1 Dosis fluoxetine. Fluoxetine merupakan obat antidepresan yang digunakan sebagai kontrol positif. Dosis fluoxetine yang digunakan pada manusia yaitu 10 - 20 mg/Kg BB manusia, aturan minumnya 1 – 2 kali sehari (Nurfahanum, 2022). Faktor konversi ke mencit yaitu 0,0026 . Sehingga digunakan fluoxetine 20 mg x 0,0026 = 0,052 mg/kg BB mencit.

2.2 Dosis minyak atsiri pala (*Myristica Fragrans Houtt*). Menurut (Nabila *et al.*, 2024) menyatakan bahwa dosis 5 mg/kg BB mencit pada minyak atsiri biji pala merupakan dosis optimal dalam memberikan efek antidepresan terhadap peningkatan lokomotor dan penurunan durasi imobilitas pada mencit putih jantan. Sehingga dosis minyak atsiri pala yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 mg/kgBB.

2.3 Dosis fraksi MAP-F170/500 dan fraksi MAP-F170/400. Pada penelitian ini variasi dosis pada masing-masing fraksi MAP-F yang digunakan yaitu 2,5 mg dan 5 mg/kg BB mencit.

3. Pembuatan larutan uji

3.1 Larutan fluoxetine. Menyiapkan alat dan bahan. Timbang Fluoxetine sebanyak 0,02 gram lalu masukkan kedalam labu ukur 100 ml. Masukkan larutan Propilen glikol 10% ke dalam labu ukur hingga mencapai volume 100 ml.

3.2 Dosis Propilen Glikol 10%. Pemberian propilen glikol digunakan untuk pelarut minyak atsiri pala dan fraksi pala, sebagai eksipien yang berfungsi sebagai agen penstabil, humektan, dan co-solven. Proses pembuatan propilen glikol 10% dilakukan dengan cara memasukkan 10 g propilen glikol 10% kedalam labu ukur 100 ml, kemudian menambahkan aquadest sampai 100 ml.

3.3 Larutan fraksi MAP-F170/500. Menyiapkan alat dan bahan. Menimbang fraksi MAP-F170/500 sebanyak 0,05 g, kemudian masukkan kedalam labu ukur 100 ml dan tambahkan Propilen glikol 10% hingga mencapai volume 100 ml.

3.4 Larutan fraksi MAP-F170/400. Menyiapkan alat dan bahan. Menimbang fraksi MAP-F170/400 sebanyak 0,05 g, kemudian masukkan kedalam labu ukur 100 ml dan tambahkan propilen glikol 10% hingga mencapai volume 100 ml.

4. Perlakuan hewan uji

Perlakuan hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) dengan usia sekitar 2 – 3 bulan, masing-masing metode pengujian menggunakan sebanyak 40 ekor mencit yang terbagi atas 8 kelompok perlakuan. Mencit sebelumnya diadaptasikan selama 7 hari dengan diberi pakan dan air minum, kemudian mencit ditimbang dan dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan, setiap kelompok terdiri dari 5 ekor, kemudian mencit diinduksi selama 7 hari dengan menggunakan metode *stressor* yang bermacam-macam modifikasi setiap harinya dan diamati perubahan perilaku pada mencit. Dibawah ini adalah perlakuan setiap kelompok pada hewan uji.

Kelompok I : Kontrol normal

Kelompok II : Kontrol positif fluoxetine 0,052 mg/kg BB mencit

Kelompok III : Kontrol negatif Propilen glikol 10 %

Kelompok IV : Dosis minyak atsiri pala 5 mg/kgBB mencit

Kelompok V : Dosis fraksi MAP-F170/500 2,5mg/kg BB mencit

Kelompok VI : Dosis fraksi MAP-F170/500 5 mg/kg BB mencit

Kelompok VII : Dosis fraksi MAP-F170/400 2,5 mg/kg BB mencit

Kelompok VIII : Dosis fraksi MAP-F170/400 5 mg/kg BB mencit

5. Induksi depresi pada mencit

Mencit yang sudah diadaptasi selama 7 hari selanjutnya akan diinduksi dengan menggunakan metode *stressor*, yang bermacam-macam modifikasinya. Pada setiap kelompok hewan uji diinduksi dengan *stressor* selama 7 hari dan dengan perlakuan yang berbeda-beda setiap harinya. Tahapan pemberian induksi *stressor* dilakukan dengan beberapa metode berikut ini: Hari pertama induksi depresi dilakukan guncangan kandang mencit selama 15 menit. Hari kedua yaitu menyalakan rekaman suara predator elang selama 10 menit dan kucing selama 30 menit. Hari ketiga mencit akan mendapatkan perlakuan depresi dengan dibiarkannya kandang menjadi kotor dan tidak dibersihkan. Hari keempat dan kelima mencit akan tidak diberi makan dan minum selama 12 jam perharinya. Hari kelima dan keenam mencit juga akan mendapatkan perlakuan pada tempat tinggalnya dengan mengurangi sekam dan membasahinya. Hari keenam dan ketujuh, mencit akan mendapatkan induksi depresi dengan pergantian siklus gelap terang yaitu dengan memberikan siklus gelap pada pagi hari hingga sore hari, dan memberikan siklus terang pada sore hari hingga pagi hari selama 2 hari tersebut. Induksi depresi ini akan menyebabkan penurunan kadar serotonin dalam otak sehingga hewan uji cenderung berperilaku diam dan bersikap pasrah pada manusia (Pamilutsih, 2017).

Perlakuan stress	Hari ke						
	1	2	3	4	5	6	7
Mengguncang kandang selama 15 menit	■						
Rekaman suara predator elang dan kucing (10 menit dan 30 menit) dengan frekuensi suara 100 Hz – 18 kHz		■					
Mengotorkan kandang			■				
Puasa 12 jam				■	■	■	
Mengurangi sekam					■	■	
Membasahi sekam						■	■
Pergantian siklus gelap terang						■	■

Tabel 2. Induksi depresi (Pamilutsih, 2017)

6. Pengujian aktivitas antidepresan

Tahapan – tahapan dalam melakukan pengujian antidepresan setelah dilakukan adaptasi pada mencit yaitu mencit dikelompokkan menjadi 7 kelompok perlakuan. Mencit yang sudah dikelompokkan maka akan dilakukan pengujian *Forced Swimming Test*, dan *Open Field Test* sebagai hasil data T0. Setelah mendapatkan T0, mencit diinduksi menggunakan metode *Stressor* selama 7 hari. Setelah mencit depresi, mencit kembali dilakukan pengujian FST, dan OFT untuk mendapatkan hasil data T1. Setelah mencit depresi, maka dilakukan terapi atau

perlakuan antidepresan pada mencit sesuai dengan kelompok perlakuan dan masing-masing dosis yang sudah ditentukan. Setelah pemberian dosis terakhir, mencit akan kembali diuji dengan FST, dan OFT untuk mendapatkan hasil T2 yang menunjukkan bahwa terjadi penurunan depresi pada mencit.

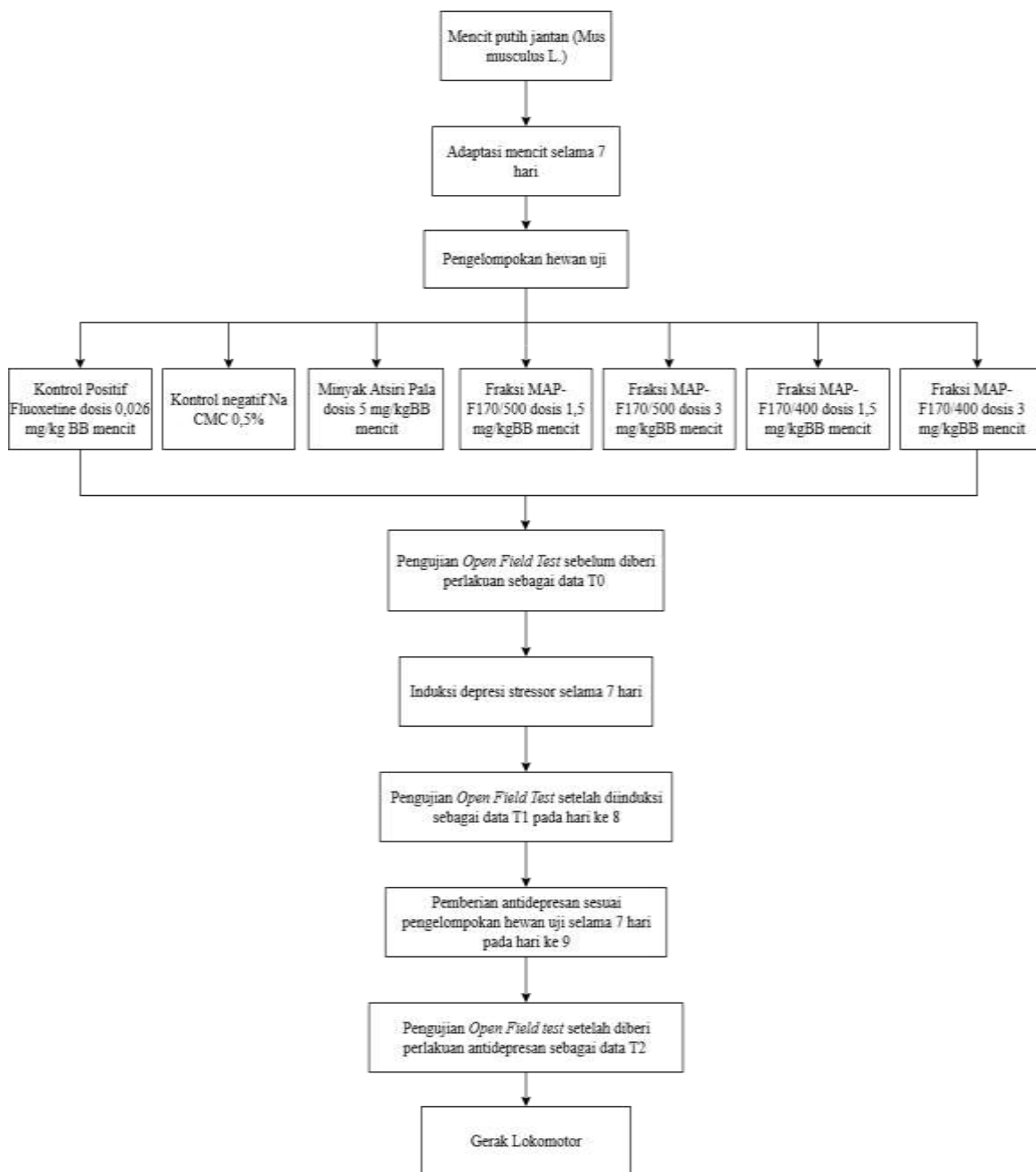
6.1 *Open Field Test (OFT)*. Pengujian OFT dilakukan dengan memasukkan mencit kedalam kotak tanpa penutup selama 5 menit dengan parameter uji aktivitas lokomotor pada mencit. Pengujian ini dilakukan sebelum mencit diinduksi depresi (T0), sebelum mencit diberi perlakuan (T1), dan setelah mencit diberi perlakuan (T2). Mencit dikatakan normal jika cenderung berperilaku aktif dan mengeksplor bagian pada kotak. Dan dikategorikan sudah depresi jika mencit tidak mengeksplorasi pada kotak tersebut. Cara pengukuran aktivitas lokomotor pada metode ini adalah dengan mencatat durasi aktivitas hewan uji saat melakukan eksplorasi pada bagian garis dalam kotak (*central*) selama 5 menit dan waktu yang didapatkan dalam satuan detik. Waktu yang dicatat adalah waktu selama hewan uji masuk dan melintasi garis bagian dalam kotak hingga hewan uji melintasi keluar garis tersebut. Gerak lokomotor pada pengujian ini ditandai dengan melintasnya hewan uji pada area *central square*.

6.2 *Forced Swimming Test (FST)*. Pengujian FST dilakukan dengan cara mencit direnangkan dalam kotak kaca dengan ukuran 44 x 20,5 x 23 cm yang berisi air didalamnya. Pengukuran dilakukan setelah 2 jam pemberian sediaan uji berdurasi 8 menit dengan dimulainya pengujian imobilitas yaitu 6 menit terakhir. Pengujian ini dilakukan sebelum mencit diinduksi depresi (T0), sebelum mencit diberi perlakuan (T1), dan setelah mencit diberi perlakuan (T2). Mencit dikatakan normal jika memiliki mobilitas dengan aktif berenang dan memanjat. Sedangkan mencit dikatakan depresi apabila mencit hanya bergerak untuk menjaga kepalanya tetap diatas air. Cara pengukuran immobility time pada metode ini adalah dengan cara mencatat berapa lama hewan uji terlihat berdiam diri dan berusaha kepalanya tetap diatas air, tidak aktif berenang dan memanjat selama 6 menit hasil yang didapatkan kemudian ditambah (dalam satuan detik).

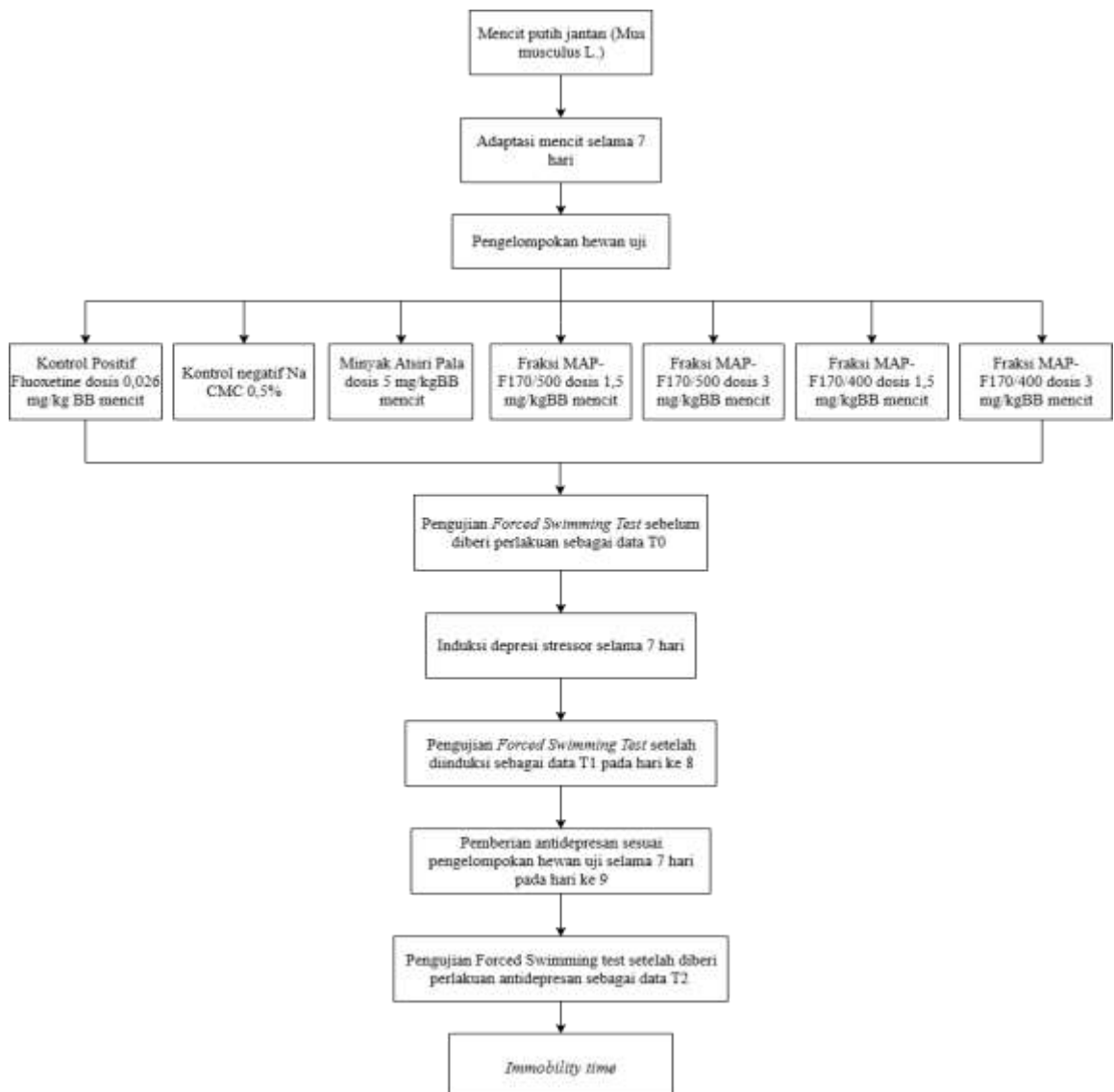
E. Analisis data

Data pada hasil yang didapatkan dari penelitian aktivitas antidepresan pada fraksi MAP-F170/500 dan fraksi MAP-F170/400 dianalisis menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) versi 26. Analisis pada aktivitas antidepresan fraksi MAP-F170/500 dan fraksi MAP-F170/400 ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas variasi dosis fraksi MAP-F170/500 dan fraksi MAP-F170/400 yang digunakan. Uji distribusi normalitas dilakukan menggunakan uji *Shapiro wilk* dalam penelitian ini untuk melihat data terdistribusi normal atau tidak. Data yang terdistribusi normal ($p > 0,05$), maka dilanjutkan dengan analisis uji parametrik *paired T test* untuk melihat data pada masing-masing kelompok yang terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$), yaitu antara sebelum diinduksi dan setelah diinduksi atau sebelum diberi perlakuan dan setelah diberi perlakuan. Selanjutnya, untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang nyata data antar kelompok penelitian, maka dilakukan uji *One Way ANOVA* dengan nilai signifikan ($p < 0,05$). Analisis dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Least Significant Differens Test* untuk mengetahui perlakuan yang berbeda secara signifikan. Namun, jika hasil uji distribusi tidak normal ($p < 0,05$), uji ANOVA digantikan dengan uji non parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Sedangkan uji *paired T test* digantikan dengan uji non parametrik *Wilcoxon*.

F. Alur penelitian



Gambar 4. Alur penelitian *Open Field Test*



Gambar 5. Alur penelitian *Forced Swimming Test*