

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah seluruh individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji pala (*Myristica fragrans* Houtt.). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi MAP-F300 dan MAP-F200.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang mencakup identifikasi dari semua sampel. Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah aktivitas antidepresan fraksi MAP-F300 dan MAP-F200 dalam berbagai variasi 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 dapat diklasifikasikan dalam beberapa macam variabel antara lain : variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkendali.

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas yaitu variabel yang variasinya akan mempengaruhi hasil dari variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi dosis fraksi MAP-F300 dan MAP-F200.

2.2. Variabel Terikat. Variabel terikat disajikan dalam penelitian ini yaitu variabel yang nilainya dapat dilihat karena adanya pengaruh dari variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antidepresan fraksi MAP-F300 dan MAP-F200 dengan melihat lama gerak dan stabilitas mencit.

2.3. Variabel Terkendali. Variabel terkendali pada penelitian ini merupakan variabel yang efeknya akan dikontrol agar tidak mempengaruhi variabel terikat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi sampel, waktu pengamatan, induksi stres, suasana laboratorium, berat badan dan jenis kelamin mencit.

3. Definisi Operasional

Pertama, fraksi MAP-F300 dan MAP-F200 adalah hasil proses destilasi fraksionasi pada suhu 170°C dengan masing-masing tekanan yaitu 300 mmHg dan 200 mmHg.

Kedua, antidepresan merupakan terapi yang dapat digunakan untuk mencegah dan mengobati depresi.

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

Keempat, parameter pengujian aktivitas antidepresan dalam penelitian adalah imobilitas dan *central square*.

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

Keenam, aktivitas lokomotor adalah aktivitas menggerakkan bagian tubuh atau memindahkan tubuh dari satu tempat ke tempat lain dilihat dari *central square*.

Ketujuh, *central square* adalah durasi hewan uji melintasi garis tengah atau berada di area tengah kotak.

Kedelapan, mencit putih adalah mencit putih galur swiss berkelamin jantan yang berusia 2-3 bulan.

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

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu kotak uji *Forced Swimming Test* terbuat dari kaca dengan ukuran 44 x 20,5 x 23 cm, kotak kaca uji *Open Field Test* berukuran 40 x 40 x 40 cm dengan garis hitam ditengah kotak sebagai *central square*. Timbangan, jarum suntik oral, kandang mencit, *stopwatch*, pengering rambut, labu ukur, pipet volume.

2. Bahan

Minyak atsiri pala 5 mL (Nabila *et al.*, 2024), fraksi MAP-F300 dan MAP-F200, hewan uji yang digunakan yaitu mencit putih jantan (*Mus musculus*) berumur 2-3 bulan, dengan berat 20-30 g. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tablet fluoxetine 20 mg sebagai kontrol positif, Propilen glikol 10% sebagai kontrol negatif.

D. Jalannya Penelitian

1. Penentuan Dosis

1.1. Dosis Fraksi MAP-F300 dan MAP-F200. Pada penelitian Nabila *et al.*, (2024) dosis minyak atsiri biji pala 5 mg/kg BB mencit memiliki aktivitas yang baik sebagai antidepresan. Sehingga dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2,5 mg/Kg BB dan 5 mg/Kg BB.

1.2. Dosis Fluoxetine. Obat antidepresan yang digunakan untuk kontrol positif pada penelitian ini adalah fluoxetine. Dosis lazim fluoxetine yang digunakan untuk manusia dewasa yaitu 20 mg. Faktor konversi dari manusia (70 kg) ke mencit (20 g) adalah 0,0026 maka dosis fluoxetine yang diberikan kepada mencit yaitu 0,052 mg/20 g BB atau 2,6 mg/Kg BB mencit.

2. Pembuatan Larutan Uji

2.1. Propilen glikol 10%. Propilen glikol sebanyak 1000 mL dilarutkan dalam labu tentukur 250 mL menggunakan aquadest sampai tanda batas 250 mL, sehingga didapatkan propilen glikol 10%. Minyak atsiri pala sebanyak 0,05 gram dilarutkan dalam labu tentukur 100 mL menggunakan propilen glikol 10%, sehingga didapatkan larutan minyak atsiri pala sebanyak 100 mL.

2.2. Larutan Fraksi MAP-F300 dan MAP-F200. Dilakukan dengan cara menimbang 0,05 g dari masing-masing fraksi lalu dimasukkan dalam labu tentukur 100 mL kemudian dilarutkan dengan propilen glikol sampai 100 mL.

2.3. Suspensi Fluoxetine. Menggerus tablet fluoxetine pada mortar, satu tablet dengan kandungan 20 mg digerus sampai halus kemudian timbang serbuk fluoxetine sebanyak 0,026 g, masukkan dalam labu tentukur 100 mL kemudian larutkan dengan propilen glikol 10% sampai tanda batas 100 mL.

3. Perlakuan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam ini adalah mencit jantan galur *swiss webster* dengan usia berkisar 2-3 bulan sebanyak 40 ekor mencit. 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 perlakuan yang berbeda-beda tiap harinya.

Hari ke 8-14 mencit diberi perlakuan secara oral pada masing-masing kelompok mencit :

Kelompok I	: Kontrol normal
Kelompok II	: Kontrol negatif (Propilen glikol 10%).
Kelompok III	: Kontrol positif (Fluoxetine 20 mg/kg BB).
Kelompok IV	: Minyak atsiri pala (dosis 5 mg/kg BB).
Kelompok V	: Fraksi MAP-F300 (dosis 2,5 mg/kg BB).
Kelompok VI	: Fraksi MAP-F300 (dosis 5 mg/kg BB).
Kelompok VII	: Fraksi MAP-F200 (dosis 2,5 mg/kg BB).
Kelompok VIII	: Fraksi MAP-F200 (dosis 5 mg/kg BB).

4. Induksi Depresi

Mencit yang sudah di aklimitasasi selama 7 hari selanjutnya diinduksi depresi. Induksi depresi dilakukan selama 7 hari dengan perbedaan perlakuan setiap harinya.

Tabel 2. Perlakuan beberapa stressor pada tikus (Syarifah *et al.*, 2024)

Perlakuan Hewan Uji	Hari ke-						
	1	2	3	4	5	6	7
Mengguncang kandang selama 15 menit	■						
Suara predator (rekaman) elang dan kucing (10 menit dan 30 menit) dengan frekuensi suara 100 Hz-18 kHz		■					
Mengotorkan kandang			■				
Puasa 12 jam				■	■		
Mengurangi sekam					■	■	
Membasahi sekam						■	
Gelap terang (2 x 12 jam)							■

Sesuai dengan informasi yang tertera dalam tabel sebelumnya, prosedur induksi depresi dilakukan selama periode tujuh hari dengan perlakuan berbeda pada setiap harinya. Pada hari pertama, mencit mengalami perlakuan depresi melalui goyangan pada kandang mencit selama 15 menit. Hari kedua, mencit terpapar suara predator seperti kucing dan elang masing-masing selama 10 menit dan 30 menit. Pada hari ketiga, mencit akan dihadapkan pada kondisi depresi akibat kandangnya yang dibiarkan kotor tanpa dibersihkan.

Pada hari keempat dan kelima, mencit akan dipaksa untuk berpuasa selama 12 jam setiap harinya. Di hari kelima, perlakuan juga diberikan dengan mengurangi dan membasahi sekam tempat tinggal mencit. Pada hari keenam dan ketujuh, mencit akan menjalani induksi depresi dengan cara menutup kandang menggunakan kain berwarna hitam selama dua sesi masing-masing 12 jam. Proses induksi depresi ini mengakibatkan penurunan kadar serotonin dalam otak, yang kemudian

membuat hewan percobaan cenderung menunjukkan perilaku diam, mirip dengan sikap pasrah pada manusia.

5. Pengujian Antidepresan

5.1. *Forced Swimming Test (FST)*. Mencit yang telah mengalami induksi depresi direnangkan dalam air, dan durasi imobilitasnya dihitung. Pengukuran waktu imobilitas dimulai saat hewan percobaan berhenti bergerak di dalam air dan tidak lagi berenang, tetap melayang di permukaan atau melakukan gerakan untuk tetap menjaga kepalanya di atas air.

Pengukuran durasi ini dilakukan pada tiga waktu: sebelum mencit diinduksi depresi (T0), mencit yang sudah diinduksi depresi (T1) dan setelah perlakuan diterapkan (T2). Tes berlangsung selama 8 menit dengan pengamatan waktu imobilitas dilakukan selama 6 menit terakhir. Analisis data ini akan dilakukan menggunakan *paired t-test* untuk mengeksplorasi perbedaan yang ada, sedangkan data dari T2 akan dianalisis menggunakan ANOVA diikuti oleh *post hoc* LSD untuk menganalisis perbedaan antar kelompok.

5.2. *Open Field Test (OFT)*. Mencit diletakkan dalam wadah terbuka dan diamati selama 5 menit. Aktivitas yang memiliki efek antidepresan diukur melalui durasi aktivitas *central square*. Pengukuran durasi ini dilakukan pada tiga waktu: sebelum induksi depresi (T0), mencit yang diinduksi depresi (T1), dan setelah perlakuan (T2).

Hewan percobaan melakukan eksplorasi secara aktif ketika berada dalam keadaan normal, tetapi akan mengalami penurunan aktivitas lokomotor saat mengalami depresi. Mencit yang telah diinduksi depresi menunjukkan durasi *central square* yang lebih sedikit dibandingkan sebelumnya, sementara lokomotor pasca perlakuan akan lebih meningkat dibandingkan setelah induksi. Data tersebut akan dianalisis menggunakan *paired t-test* untuk mengamati perbedaan, dan data di T2 akan dianalisis lewat ANOVA yang dilanjutkan dengan *post hoc* LSD untuk mendalami perbedaan di antara kelompok.

6. Prediksi Senyawa Fraksi MAP

Proses pemisahan fraksi pada penelitian ini didasarkan pada perbedaan sifat fisik senyawa, khususnya perbedaan tekanan uap dan titik didih. Hubungan antara tekanan uap dan suhu suatu zat selama perubahan fase cair menjadi uap dapat dijelaskan melalui persamaan *Clasius-Clapeyron*. Persamaan ini menggambarkan bahwa perubahan

tekanan uap suatu zat berbanding lurus dengan perubahan suhu dan entalpi penguapan.

Persamaan *Clasius-Clapeyron* dinyatakan sebagai berikut :

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

Keterangan :

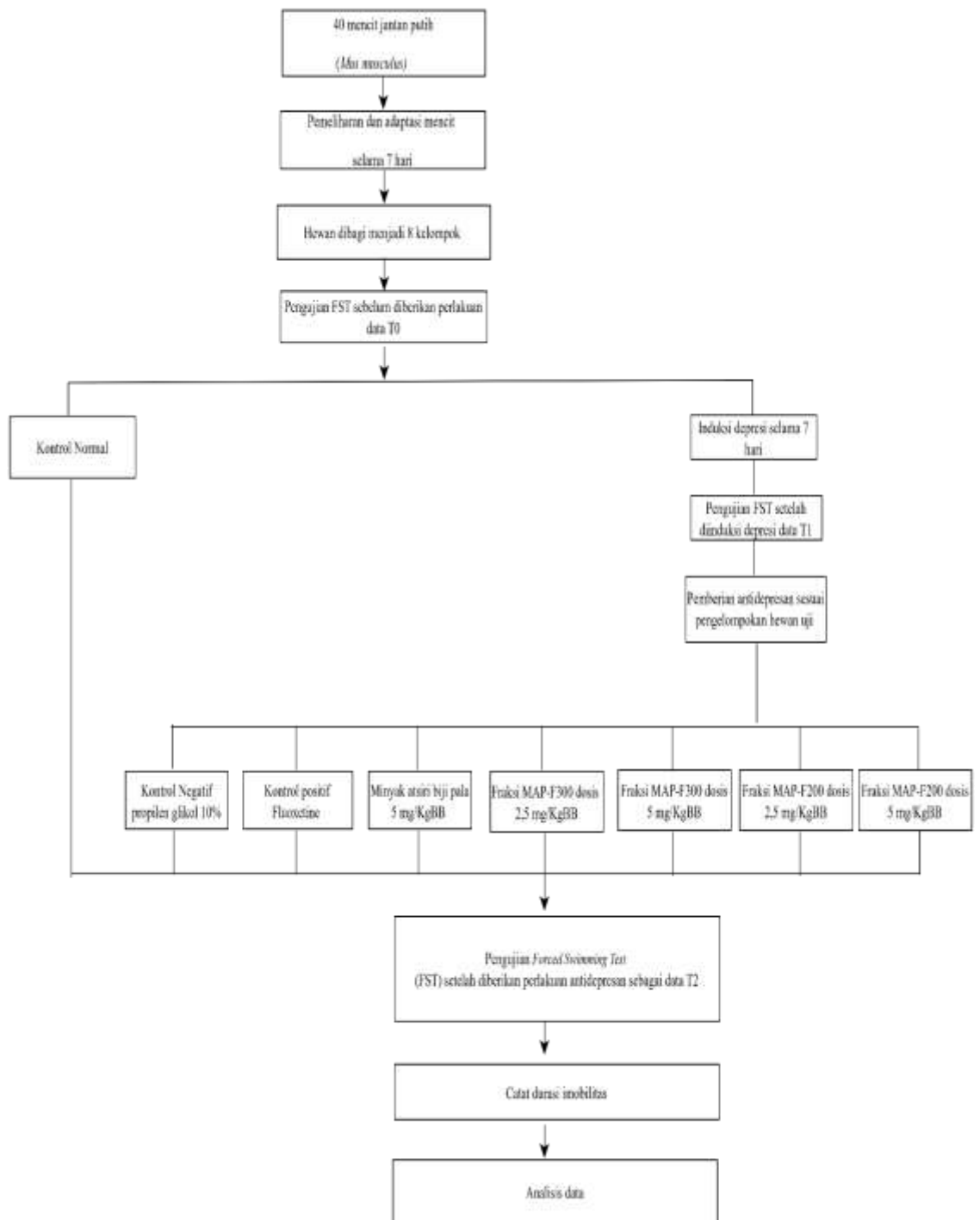
P_1 dan P_2 : tekanan uap (atm)

T_1 dan T_2 : suhu (K)

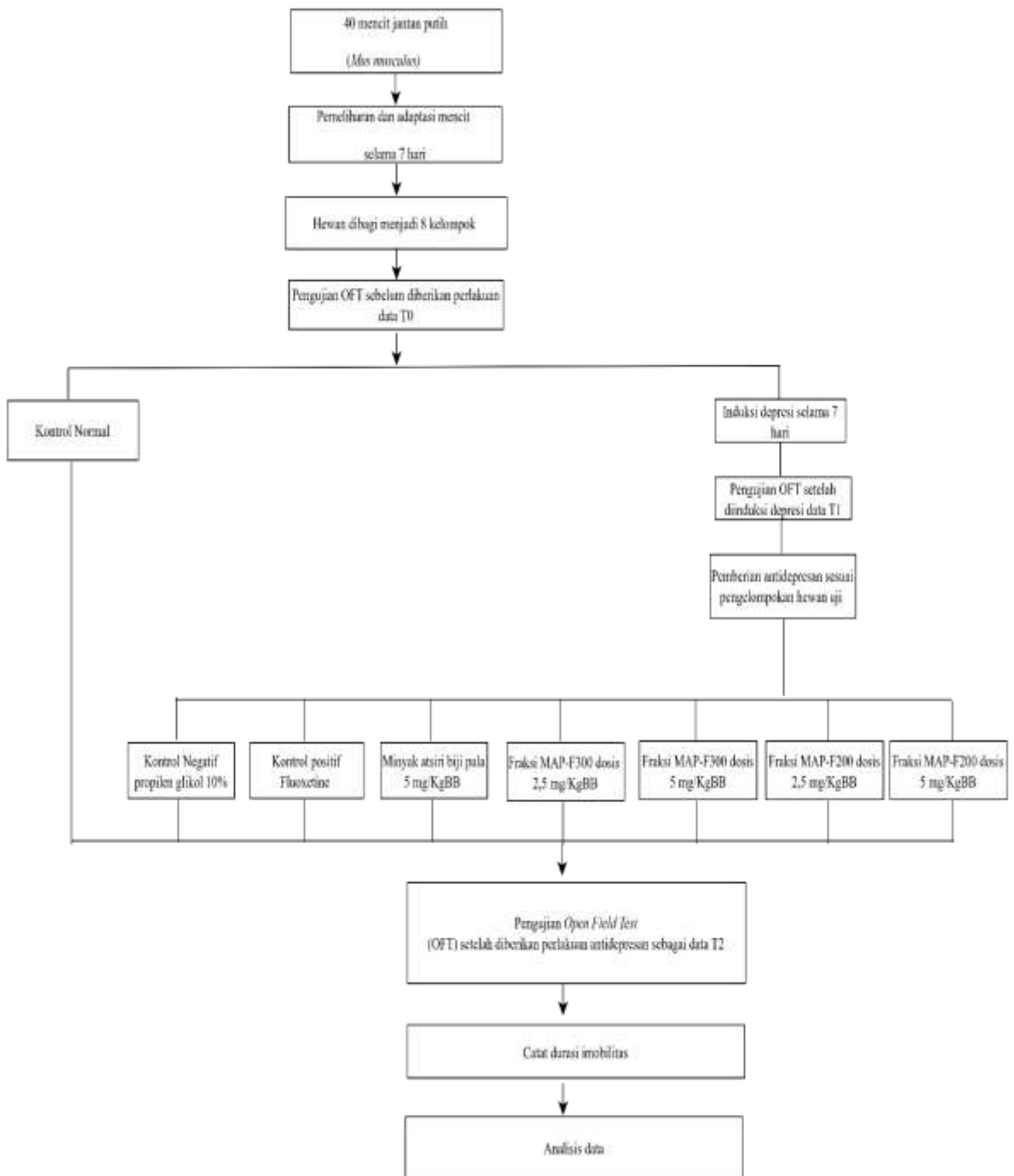
ΔH_{vap} : entalpi penguapan (J/mol)

R : konstanta gas (8,314 J/mol·K)

E. Alur Penelitian



Gambar 5. Skema Alur Penelitian Durasi Imobilitas



Gambar 6. Skema Alur Penelitian Antidepresan Gerakan Lokomotor

F. Analisis Data

Data yang didapat dari Pengujian Aktivitas Antidepresan Fraksi MAP-F300 dan Fraksi MAP-F200 diolah dengan menggunakan SPSS versi 25. Tujuan dari analisis ini adalah untuk mengeksplorasi aktivitas dari berbagai dosis fraksi biji pala. Penelitian ini juga melaksanakan pengujian distribusi normal menggunakan uji *Shapiro Wilk* untuk menilai apakah data mengikuti distribusi normal. Hasil analisis memperlihatkan bahwa data terdistribusi secara normal ($p > 0,05$), selanjutnya dilakukan analisis T pasangan untuk memberikan gambaran apakah terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara data dari setiap kelompok sebelum induksi, setelah induksi dan setelah perlakuan diberikan. Dilakukan *one-way* ANOVA dengan nilai signifikan ($p < 0,05$) untuk menentukan apakah terdapat variasi data yang signifikan di antara kelompok penelitian. Kemudian, analisis diteruskan dengan uji *post hoc* LSD untuk menemukan kelompok perlakuan yang berbeda secara nyata.