

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan keseluruhan individu, subjek, atau objek yang memiliki karakteristik dan menjadi sarana penelitian, baik berupa orang, benda, institusi, dan peristiwa, yang dapat memberikan data untuk dianalisis. Populasi dari penelitian ini adalah biji pala (*Myristica fragrans* Houtt.).

Sampel merupakan bagian dari populasi yang dipilih dengan kriteria tertentu sehingga dapat mewakili keseluruhan populasi. Perbedaan mendasar antara populasi dan sampel terletak pada jumlahnya, di mana populasi mencakup seluruh objek penelitian, sedangkan sampel hanya sebagian yang diambil dari populasi. Pada penelitian ini, sedangkan yang digunakan adalah biji pala yang diambil secara acak dengan memperhatikan kondisi segar, cukup usia, dan sehat. Selanjutnya, sampel diolah melalui proses destilasi perwakilan sebagian dari populasi yang memiliki ciri serupa sebagai gambaran yang mewakili secara keseluruhan. Perbedaan antara populasi dan sampel adalah pada jumlahnya. Populasi adalah objek yang diteliti sementara sampel adalah sebagian kecil atau setengah dari objek penelitian. Jadi, sampel yang dimanfaatkan dalam studi ini adalah biji pala yang diambil secara acak dengan memperhatikan kondisi pada biji pala yang segar, cukup usia dan sehat, kemudian diolah melalui proses distilasi fraksinasi dengan suhu 170°C dengan dua kondisi tekanan, yaitu 760 mmHg dan 600 mmHg, sehingga diperoleh dua jenis fraksi minyak atsiri biji pala, yaitu MAP-F760 dan MAP-F600.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini meliputi minyak atsiri pala, yaitu MAP-F760 (minyak atsiri pala fraksi tekanan 760 mmHg), dan MAP-F600 (minyak atsiri pala fraksi tekanan 600 mmHg) yang di uji aktivitas antidepresan melalui variasi dosis. Aktivitas antidepresan dinilai berdasarkan parameter perilaku mencit putih jantan (*Mus musculus*) yang diinduksi depresi, khususnya melalui pengukuran waktu imobilitas dan aktivitas lokomotor.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi dapat dikelompokkan menjadi tiga jenis yakni variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung.

2.1 Variabel bebas. variabel bebas yaitu ketika ada suatu variabel yang kemungkinan akan mengalami perubahan dalam keragaman ketika berada bersama dengan variabel lain dalam suatu waktu. Variabel bebas yang diidentifikasi pada studi ini adalah variasi dari dosis fraksi MAP-F760 dan MAP-F600 mmHg yang akan diberikan pada hewan uji sebagai antidepresan.

2.2 Variabel tergantung. Adalah variabel inti dari suatu konteks permasalahan dimana variabel ini merupakan variabel yang menjadi kriteria dalam evaluasi. Variabel tergantung yang diidentifikasi dalam studi ini ialah mencangkup keadaan fisik dari hewan uji, alat dan bahan yang digunakan, sarana dan prasarana yang disebabkan oleh individu depresi pada hewan uji, serta lingkungan laboratorium yang digunakan pada saat penelitian.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali ialah variabel yang tidak mampu memenuhi tujuan penelitian tetapi memiliki memiliki dampak pada hasilnya. Sehingga variabel ini juga dapat digunakan untuk mengevaluasi hasil yang diperoleh pada penelitian selanjutnya. Variabel terkendali yang didefinisikan dalam studi ini yaitu mencangkup keadaan fisik dari hewan uji, alat dan bahan yang digunakan, sarana dan prasarana yang di gunakan, kondisi tempat perawatan hewan uji, kerusakan yang disebabkan oleh induksi depresi pada hewan uji, serta lingkungan laboratorium yang digunakan pada penelitian ini.

3. Definisi operasional

Pertama, fraksi MAP-F760 dan MAP-F600 adalah fraksi minyak atsiri pala yang diperoleh melalui proses fraksinasi berdasarkan rentang suhu destilasi.

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

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

Keempat, parameter pengujian aktivitas antidepresan dalam penelitian ini adalah imobilitas dan lokomotor.

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

Keenam, aktivitas lokomotor adalah aktivitas menggerakkan bagian tubuh atau memindahkan tubuh dari satu tempat ketempat yang lain.

Ketujuh, *central square* adalah durasi mencit melintasi atau berada dalam daerah yang sudah diberi tanda di tengah-tengah kotak terbuka.

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

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

C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kotak uji *Forced Swimming Test* berbahan kaca dengan ukuran 44 x 20,5 x 23 cm, kotak kaca uji *Open Field Test* berukuran 40 x 40 x 40 cm yang diberi garis hitam di bagian tengah kotak sebagai area *Central square*. Timbangan digital, spuit oral, kandang mencit, stopwatch, pengering rambut (*hairdryer*), labu ukur, dan pipet volume.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi fraksi minyak atsiri biji pala yang diperoleh melalui destilasi fraksinasi pada tekanan atmosfer dengan suhu 170°C, yaitu fraksi MAP-F760 dan MAP-F600. Selain itu, digunakan tablet fluoxetine 20 mg sebagai kontrol positif serta Propilen glikol 10% sebagai kontrol negatif.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) dalam kondisi sehat, berusia 2-3 bulan, dengan berat badan sekitar 20-30 gram. Hewan uji diperoleh dari Laboratorium Universitas Setia Budi.

D. Jalanya Penelitian

1. Pembuatan *ethical clearance*

Menteri Kesehatan Republik Indonesia dalam Peraturan Nomor 7 Tahun 2016 terkait Komisi Etik Penelitian dan Pengembangan kesehatan yang melibatkan hewan dan manusia percobaan sebagai subjek harus mematuhi prinsip-prinsip etika yang relevan. Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit putih jantan (*Mus musculus* L.), sehingga dilakukan pengajuan *ethical clearance* kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi, Jebres, Surakarta, Jawa Tengah. Penelitian ini telah dinyatakan layak etik dengan Nomor Surat: 2.067/IX/HREC/2025, tertanggal 25 September 2025.

2. Prediksi Fraksi Minyak Atsiri Pala

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 *Clausius-Clapeyron*. Analisis persamaan *Clausius-Clapeyron* dilakukan menggunakan Microsoft Excel dengan memasukan nilai suhu, tekanan uap dan entalpi penguapan

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

Keterangan:

P_1 dan P_2	: tekanan uap pada suhu T_1 dan T_2
ΔH_{vap}	: entalpi penguapan
R	: konstanta gas umum (8,314 J/mol.K)
T	: suhu mutlak (k)

Data entalpi penguapan (ΔH_{vap}), tekanan (P_1 , P_2), dan suhu (T_1 , T_2) dimasukkan ke Microsoft Excel. Fungsi LN digunakan untuk menghitung $\ln(P_2/P_1)$, sedangkan $1/T_1$ dan $1/T_2$ dihitung menggunakan operasi pembagian. Satuan suhu konversi ke Kelvin, dan tekanan satuannya.

3. Penentuan Dosis

Pada penelitian Nabila *et al.*, (2024) dosis minyak atsiri pala 5 mg/KgBB mencit memiliki aktivitas yang baik sebagai antidepresan pada mencit putih jantan *Mus musculus*. MAP-F760 dan MAP-F600 merupakan fraksi dari minyak atsiri pala yang diperkirakan memiliki aktivitas farmakologi lebih tinggi, sehingga dilakukan uji orientasi dosis

untuk menentukan dosis efektif. Orientasi dilakukan pada variasi dosis MAP-F760 dosis 2,5 mg/KgBB, 5 mg/KgBB dan MAP-F600 dosis 2,5 mg/KgBB dan 5 mg/KgBB.

Obat antidepresan yang digunakan untuk kontrol positif pada penelitian ini adalah fluoxetine. Dosis lazim fluoxetine yang digunakan untuk manusia yaitu 10 mg-20 mg, aturan minumnya 1-2 kali sehari (Nurfahanum, 2022). Sedangkan untuk mencit yaitu $20 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,052 \text{ mg/KgBB}$ mencit.

4. Pembuatan larutan uji

4.1 Propilen Glikol. Propilen glikol sebanyak 1000 mL dilarutkan dalam labu tentukur 250 mL menggunakan aquades sampai tanda batas 250 mL, sehingga didapatkan larutan propilen glikol 10%. Ditimbang 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.

4.2 Larutan fraksi MAP-F760 dan MAP-F600. Menyiapkan alat dan bahan terlebih dahulu. Masing-masing fraksi (MAP-F760 dan MAP-F600) dibuat secara terpisah setiap fraksi ditimbang, fraksi MAP-F760 ditimbang menggunakan kaca arloji sebanyak 0,05 gram dan MAP-F600 di timbang menggunakan kaca arloji sebanyak 0,1 gram fraksi yang sudah ditimbang kemudian setiap fraksi di masukan kedalam labu tentukur 25 mL dan dilarutkan menggunakan propilen glikol 10% sedikit demi sedikit digojok hingga homogen selanjutnya ditambahkan propilen glikol 10% hingga volume ahir 25 mL lalu di gojok hingga homogen. hasil dari proses ini yaitu larutan fraksi MAP-F760 dan MAP-F600 yang kemudian digunakan sesuai perlakuan hewan uji.

5. Perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) berusia 2–3 bulan dengan berat badan relatif homogen. Jumlah hewan uji yang digunakan sebanyak 48 ekor, yang sebelum perlakuan diadaptasi selama 7 hari dengan pemberian pakan standar dan air minum. Setelah masa adaptasi, mencit ditimbang dan dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan, masing-masing terdiri dari 6 ekor mencit per kelompok ($n = 6$). Pembagian kelompok dilakukan menggunakan metode simple randomization untuk meminimalkan bias antar kelompok.

Kelompok perlakuan terdiri atas kelompok kontrol normal, kontrol negatif (propilen glikol 10%), kontrol positif (fluoxetine),

kelompok perlakuan minyak atsiri biji pala dosis 5 mg/KgBB, serta kelompok fraksi MAP-F760 dan MAP-F600. Seluruh kelompok, kecuali kontrol normal, selanjutnya diinduksi stres selama 7 hari menggunakan protokol induksi stres ringan dengan variasi stresor harian.

Kriteria hewan uji meliputi mencit jantan yang sehat secara klinis, aktif, tidak menunjukkan kelainan fisik, serta memiliki berat badan stabil selama masa adaptasi. Kriteria meliputi mencit yang mengalami sakit, cedera, penurunan berat badan ekstrem ($>20\%$), atau kematian selama masa penelitian. Hewan uji yang memenuhi kriteria eksklusi dikeluarkan dari penelitian dan dicatat sebagai drop-out. Humane endpoints diterapkan dengan menghentikan perlakuan apabila mencit menunjukkan tanda penderitaan berat seperti tidak responsif, tidak mampu bergerak, atau penurunan kondisi fisik yang signifikan, sesuai dengan prinsip kesejahteraan hewan percobaan. Tiap masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit.

Kelompok I : Normal

Kelompok II : Propilen glikol 10%

Kelompok III : Fluoxetine dosis 20 mg/KgBB

Kelompok IV : Minyak atsiri pala 5 mg/KgBB

Kelompok V : Fraksi MAP-F760 2,5 mg/KgBB

Kelompok VI : Fraksi MAP-F760 5 mg/KgBB

Kelompok VII : Fraksi MAP-F600 2,5 mg/KgBB

Kelompok VIII : Fraksi MAP-F600 5 mg/KgBB

6. Induksi depresi

Semua kelompok akan diinduksi depresi menggunakan metode *stressor* selama 7 hari setelah diadaptasi. Metode induksi depresi ini menggunakan beberapa jenis perlakuan depresi yang berbeda setiap harinya. Berikut makna % biologis imobilitas dan aktivitas lokomotor menurut berbagai literatur.

Tabel 2. Makna % Imobilitas

% Imobilitas	Makna	Pustaka
20-40	Perilaku normal (kontrol sehat)	(Ueno <i>et al.</i> , 2022) < 40 Imobilitas ini dipandang sebagai respons baseline hewan sehat
50-70	Transisi Perilaku depresi	Transisi dari perilaku normal pada fase depresi dengan nilai imobilitas 50-70 % (Yahav <i>et al.</i> , 2015)
>80	Depresi-like kuat/berat	>80 dikategorikan sebagai depresi kuat atau berat (Ueno <i>et al.</i> , 2022)
Menurun Setelah Terapi	Efek antidepresan	Perilaku penurunan imobilitas (hewan aktif serta menunjukkan kondisi non-depresi (Yahav <i>et al.</i> , 2015)

Tabel 3. Pengujian Aktivitas Lokomotor

Tes	Penilaian	Durasi Tes	Pustaka
<i>Open Field Test</i> (OFT),	- Aktivitas lokomotor ↑ : aktivitas motorik dan eksplorasi baik serta tidak memiliki gejala depresi - Aktivitas lokomotor ↓ : aktivitas motorik terganggu dan kecemasan tinggi yang menekan perilaku eksploratif.	(Ueno et al., 2022) 5 menit (300 detik)	Penurunan total aktivitas lokomotor sering diinterpretasikan sebagai penurunan kemampuan motorik atau peningkatan kecemasan (Sestakova et al. 2013)

Tabel 4. Induksi stress

Perlakuan stress	Hari ke						
	1	2	3	4	5	6	7
Mengguncangkan 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						■	
Siklus yang selalu berganti gelap dan terang							■

Berdasarkan tabel di atas, Semua kelompok perlakuan, kecuali kelompok kontrol normal, diinduksi kondisi menyerupai depresi menggunakan protokol induksi stres selama 7 hari setelah masa adaptasi. Protokol ini menggunakan berbagai jenis stresor ringan dengan durasi dan urutan yang berbeda setiap harinya untuk mencegah terjadinya adaptasi hewan uji terhadap stresor yang diberikan. Stresor yang digunakan meliputi pengguncangan kandang, paparan suara predator, pengotoran kandang, puasa, pengurangan dan pembasahan sekam, serta gangguan siklus gelap–terang. Protokol ini merupakan modifikasi dari metode *Chronic Mild Stress* (CMS) dengan durasi yang lebih singkat, sehingga tidak diklasifikasikan sebagai CMS klasik yang umumnya dilakukan dalam periode waktu yang lebih panjang.

Pelaksanaan induksi stres dilakukan secara bertahap dan bervariasi. Pada hari pertama, mencit diberikan perlakuan berupa pengguncangan kandang selama 15 menit. Hari kedua, mencit dipaparkan suara predator berupa rekaman suara elang dan kucing masing-masing selama 10 dan 30 menit. Hari ketiga, kandang dibiarkan

dalam kondisi kotor tanpa dibersihkan. Pada hari keempat, mencit dipuaskan selama 12 jam dengan kondisi kandang bersih. Hari kelima, selain dipuaskan selama 12 jam, sekam kandang dikurangi jumlahnya dan dibasahi. Selanjutnya, pada hari keenam dan ketujuh, mencit dipaparkan pada siklus gelap–terang yang tidak teratur dengan cara menutup kandang menggunakan kain gelap berlubang selama 12 jam dan memaparkannya kembali ke cahaya selama 12 jam berikutnya. Paparan stresor ringan yang bervariasi ini dilaporkan dapat memengaruhi sistem neurobiologis, termasuk menurunkan kadar serotonin di otak, sehingga memicu munculnya perilaku menyerupai depresi seperti penurunan aktivitas dan sikap pasrah (Pamilutsih, 2017).

Keberhasilan induksi stres dievaluasi menggunakan parameter perilaku yang mencerminkan gejala *depresi-like*. Parameter utama yang digunakan adalah *anhedonia*, yang dinilai melalui uji preferensi sukrosa sebagai indikator menurunnya respons terhadap stimulus menyenangkan. Selain itu, parameter pendukung berupa peningkatan waktu imobilitas pada *Forced Swimming Test* (FST) digunakan untuk menilai perilaku keputusasaan. Induksi stres dinyatakan berhasil apabila terjadi penurunan signifikan preferensi sukrosa serta peningkatan waktu imobilitas dibandingkan dengan kelompok kontrol normal (Antoniuk *et al.*, 2018; Seung *et al.*, 2024).

7. Pengujian aktivitas antidepresan

Pengujian aktivitas antidepresan dimulai dengan proses adaptasi mencit putih jantan (*Mus musculus*) selama 7 hari. Setelah dilakukan adaptasi, mencit dibagi secara acak menjadi 8 kelompok perlakuan. masing-masing kelompok kemudian dilakukan pengujian awal menggunakan metode *Open Field Test* (OFT), dan *Forced Swimming Test* (FST) untuk mendapatkan data T0. Setelah itu mencit diberikan induksi stress menggunakan metode *Stressor* selama 7 hari untuk memicu kondisi depresi. Setelah masa induksi selesai, dilakukan kembali pengujian menggunakan metode OFT, dan FST untuk memperoleh data T1. Setelah mencit mengalami kondisi depresi, masing-masing kelompok mencit diberikan perlakuan antidepresan sesuai dengan kelompok perlakuan dan dosis yang telah ditentukan. Setelah itu mencit kembali diuji menggunakan metode OFT, dan FST untuk memperoleh data T2. Hasil data T2 digunakan untuk melihat pengaruh pemberian antidepresan terhadap mencit yang telah mengalami depresi.

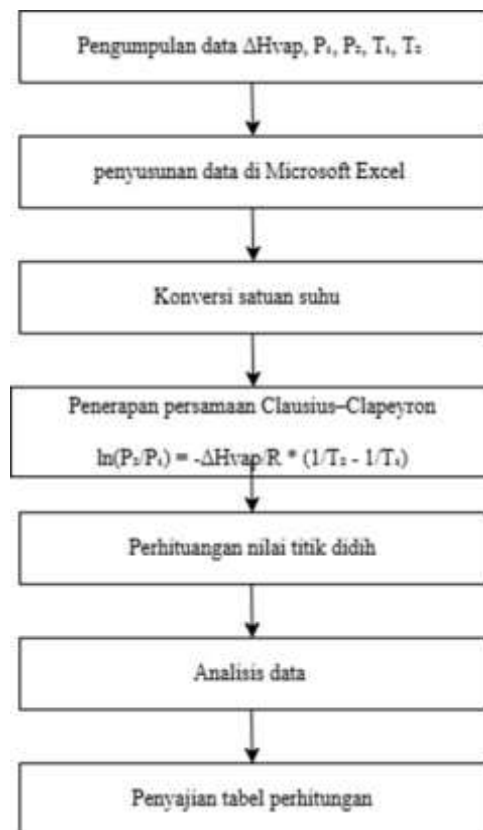
8. Pengujian *Open Field Test* (OFT)

Open Field Test (OFT) dilakukan dengan menempatkan mencit ke dalam kotak tanpa penutup selama 5 menit untuk mengamati parameter aktivitas lokomotor. Pengujian ini dilakukan dalam tiga tahap waktu pengamatan, yaitu sebelum induksi depresi T0, setelah induksi depresi sebelum pemberian perlakuan T1, dan setelah pemberian perlakuan T2. Mencit dalam kondisi normal apabila menunjukkan perilaku aktif dan melakukan eksplorasi ke seluruh area kotak. Mencit dinyatakan depresi apabila lebih banyak diam dan tidak melakukan eksplorasi di area kotak. Aktivitas lokomotor diukur dengan mencatat durasi waktu mencit melakukan eksplorasi di area garis selama 5 menit. Waktu yang di catat adalah total waktu saat mencit melintas masuk ke area garis dalam, hingga keluar dari area tersebut. Gerakan lokomotor dalam pengujian ini ditandai dengan aktivitas *Central square*, yaitu pergerakan mencit melintasi garis pembatas area di dalam kotak.

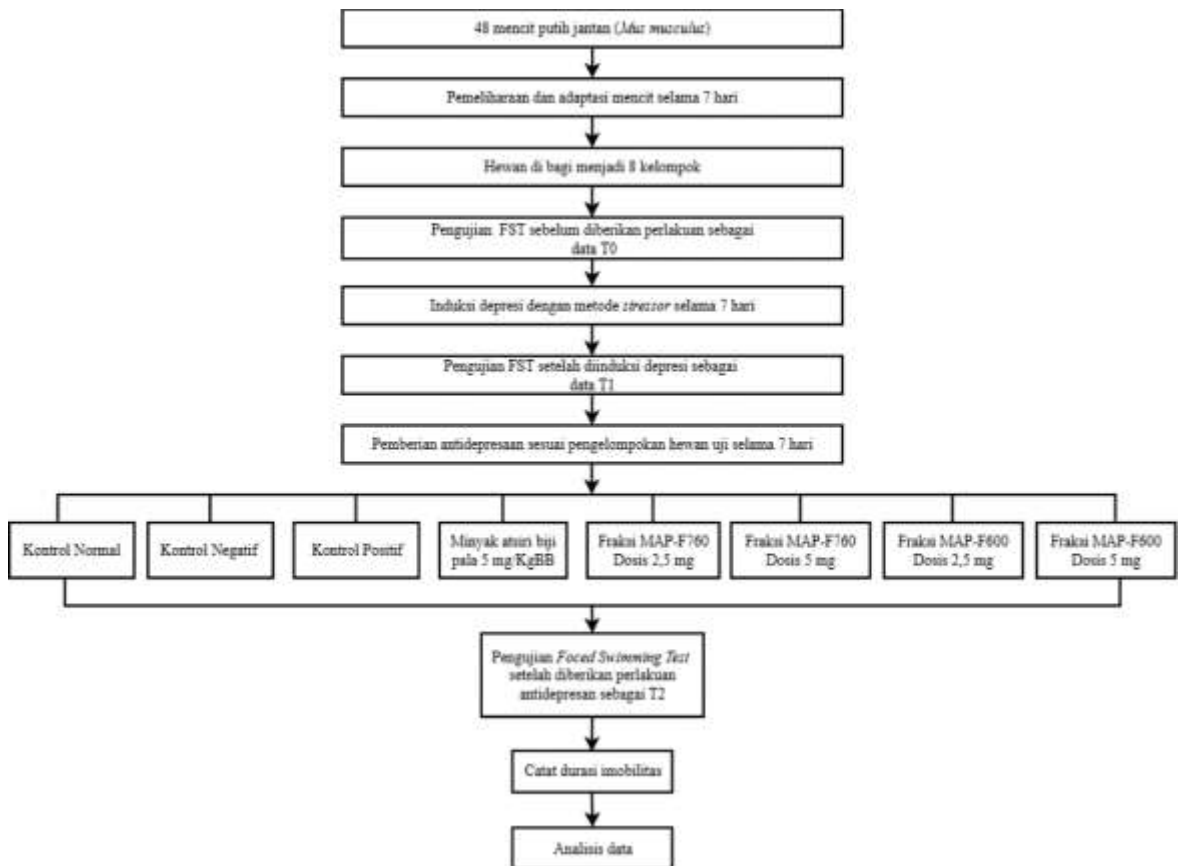
9. Pengujian *Forced Swimming Test* (FST)

Forced Swim Test (FST) dilakukan dengan memasukan mencit ke dalam wadah berisi air selama 6 menit. Pengamatan dilakukan pada tiga waktu, yaitu sebelum induksi depresi T0, setelah induksi depresi T1, dan setelah pemberian perlakuan T2. Mencit dinyatakan normal jika aktif berenang dan memanjat, mencit yang dianggap depresi jika hanya melakukan gerakan minimal untuk menjaga kepalanya agar tetap di atas air. Waktu imobilitas diukur dengan mencatat total waktu mencit diam tanpa berenang atau memanjat selama 6 menit, dan hasilnya dihitung dalam satuan detik.

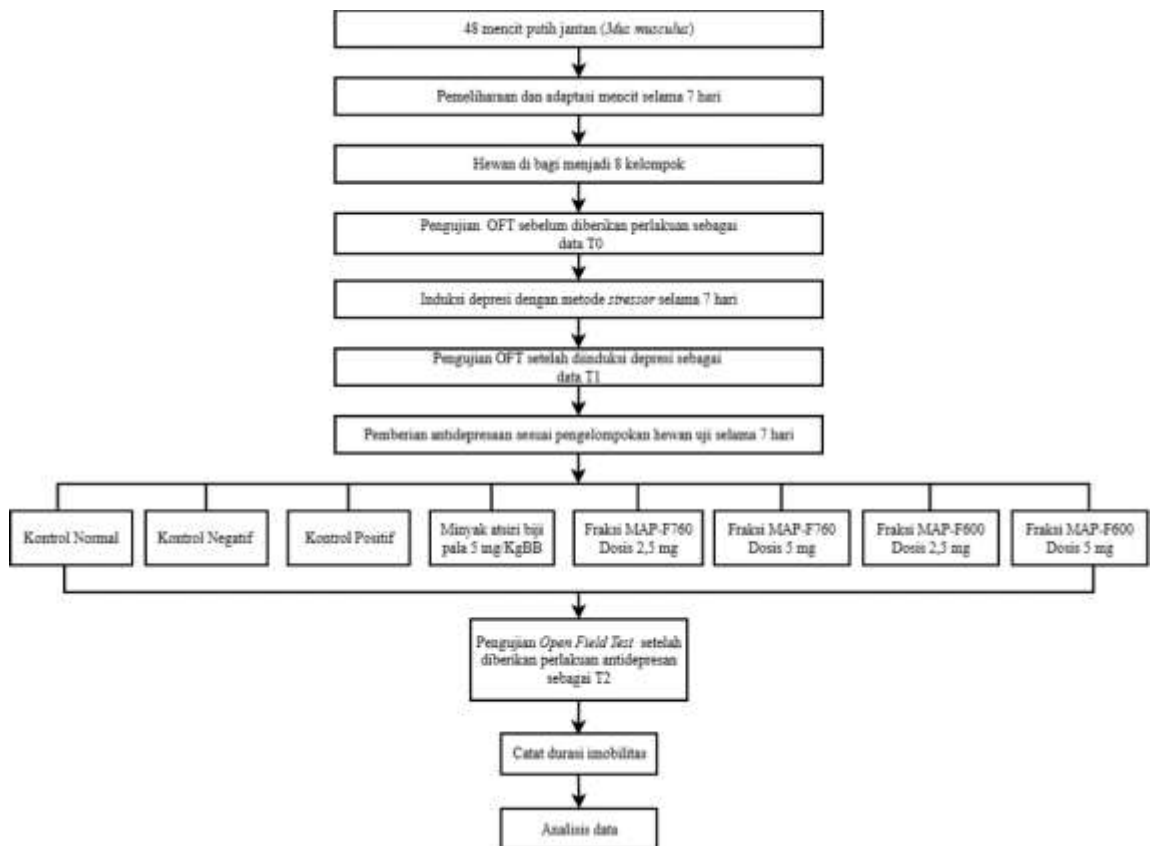
E. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur perhitungan *Clausius-Clapeyron*



Gambar 5. Alur Penelitian antidepresan aktivitas *imobilitas*



Gambar 6. Alur Penelitian antidepressan aktivitas lokomotor

F. Analisis Data

Penelitian ini menghasilkan tiga titik data, yaitu T0, T1, dan T2. T0 adalah data dasar sebelum mencit diberikan perlakuan atau diinduksi depresi, T1 adalah data setelah mencit menjalani induksi depresi selama 7 hari, T2 adalah data setelah pemberian perlakuan antidepresan selama 7 hari. Parameter yang diamati meliputi *Immobility time*, yang diukur melalui *Forced Swimming Test* (FST). Aktivitas lokomotor yang dinilai melalui *Open Field Test* (OFT).

Data yang diperoleh akan dihitung nilai rata-rata $\pm$ standar deviasi (SD) untuk masing-masing kelompok. Untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan, data dianalisis menggunakan perangkat SPSS versi 26,0 for Windows dengan metode One-Way ANOVA. Jika hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), maka akan dilanjutkan dengan uji *post hoc* (misalnya Tukey HSD) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok secara spesifik. Persentase aktivitas antidepresan fraksi MAP-F760 dan MAP-F600 juga akan dihitung dengan membandingkan nilai parameter terhadap kelompok kontrol positif (fluoxetine 0,052 mg/KgBB) untuk melihat efektivitas relatif perlakuan terhadap standar terapi antidepresan.