

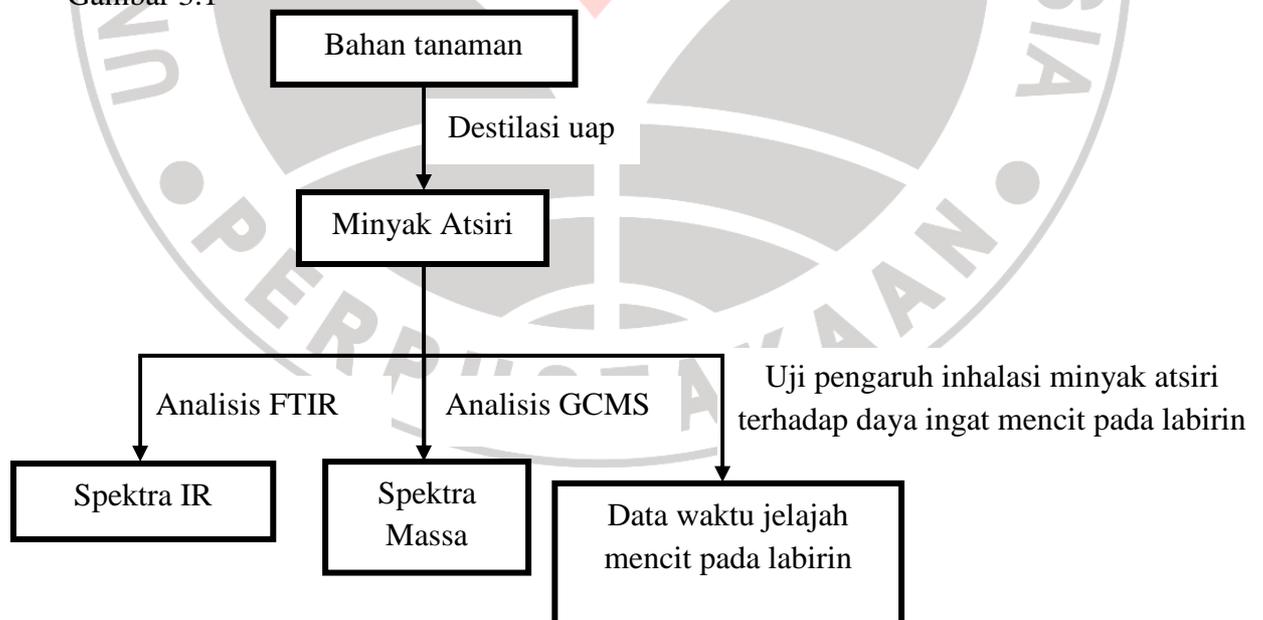
## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Deskripsi Penelitian

Penelitian yang dilakukan berjenis penelitian eksperimental. Penelitian eksperimental adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nasir, 1999). Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap yaitu tahap pertama adalah isolasi minyak atsiri dari sampel bahan tanaman menggunakan pelarut air. Tahap kedua adalah analisis spektrum GC-MS, FTIR dan uji manfaat dari minyak atsiri terhadap daya ingat mencit pada labirin.

Tahap penelitian di atas sesuai dengan bagan alir yang ditunjukkan pada Gambar 3.1



**Gambar 3.1** Desain Penelitian Isolasi Minyak Atsiri dan Analisis Hasil Isolasi

## **3.2 Alat dan Bahan**

### **3.2.1 Alat penelitian**

Pada penelitian ini peralatan yang digunakan adalah satu set destilasi uap, FTIR (Fourier Transform Infrared) Shimadzu 8400, spektrometer GCMS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometer*) Shimadzu QP5050A, inhalator, mikropipet, kamera digital Canon ixus 105, kertas saring Whatman, set labirin dan seperangkat alat gelas lainnya.

### **3.2.2 Bahan Penelitian**

Pada penelitian ini bahan tanaman yang digunakan berupa kemangi yang diperoleh dari pasar Atas Cimahi, sedangkan serai dapur/lemongrass, dan rosemary diperoleh dari kebun percobaan Manoko Lembang. Bahan-bahan lain yang digunakan diantaranya minyak Nilam dan minyak Akar wangi dari Manoko Lembang, air dan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat. Hewan uji berupa Mencit didapat dari Rumah Hewan Departemen Biologi ITB.

## **3.3 Langkah Kerja Penelitian**

### **3.3.1 Preparasi Bahan Tanaman**

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini diantaranya kemangi (*Ocimum americanum*), serai (*Cymbopogon citratus*), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L), nilam (*Pogostemon cablin*), akar wangi (*Vetiveria zizanioides* L.) dan kayu putih (*Melaleuca leucadendra* L.). Bahan-bahan tanaman tersebut yang masih basah ditimbang. Selanjutnya kemangi dikeringkan tanpa terkena matahari

langsung  $\pm$  2 minggu, setelah cukup kering, lalu ditimbang dan dilakukan destilasi uap untuk mendapatkan minyak atsirinya. begitupun untuk rosemary, serai dapur, nilam dan akar wangi dan kayu putih.

### 3.3.2 Isolasi Minyak Atsiri

Bahan tanaman kemangi kering dimasukkan kedalam sebuah panci bertekanan yang telah diisi air, panci tersebut langsung terhubung ke kondensor serta penampung minyak atsiri. Kemudian dihidrodestilasi selama kurang lebih 3 jam. Suhu dijaga sekitar 120-130 °C. Dilakukan hal yang sama terhadap bahan tanaman lainnya. Set alat destilasi uap ditunjukkan pada Gambar 3.2



**Gambar 3.2** Set Alat destilasi uap

### 3.3.3 Pemisahan Hasil Hidrodestilasi

Minyak atsiri hasil perkolasi ditampung dalam botol, dimasukan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat. Kemudian minyak atsiri kemangi didekantasi kedalam botol coklat. Botol disimpan dalam lemari yang tidak terkena cahaya.

### 3.3.4 Analisis Senyawa yang Terkandung dalam Minyak Atsiri

Analisis dilakukan dengan FTIR dan GCMS. Dari analisis ini diperoleh spektrum berupa puncak bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) dan massa senyawa yang terdapat pada minyak atsiri hasil perkolasi. Adapun kondisi yang digunakan pada saat analisis GCMS yaitu sebagai berikut:

Metode : Terprogram

Detektor : DB 5 MS

Suhu kolom :  $60^{\circ}\text{C}$

Suhu detektor :  $300^{\circ}\text{C}$

Waktu analisa : 29 menit

Volume injeksi:  $0,2 \mu\text{L}$

## 3.4 Uji Minyak Atsiri Terhadap Daya Ingat Mencit pada Labirin

### 3.4.1 Desain Eksperimen

Secara acak mencit-mencit dikelompokkan pada setiap kelompok perlakuan. Tiap kelompok berjumlah 5 ekor mencit. Adapun kelompok perlakuan dibagi dalam sembilan belas kelompok perlakuan yaitu:

1. Tiga kelompok perlakuan dengan sampel minyak rosemary disingkat MRO ( MRO 0,1 mL ; MRO 0,3 mL ; MRO 0,5 mL)
2. Tiga kelompok perlakuan dengan sampel minyak kemangi disingkat MKM ( MKM 0,1 mL ; MKM 0,3 mL ; MKM 0,5 mL)
3. Tiga kelompok perlakuan dengan sampel minyak serai dapur/lemongrass disingkat MLG ( MLG 0,1 mL ; MLG 0,3 mL ; MLG 0,5 mL)

4. Tiga kelompok perlakuan dengan sampel minyak akar wangi disingkat MAW ( MAW 0,1 mL ; MAW 0,3 mL ; MAW 0,5 mL)
5. Tiga kelompok perlakuan dengan sampel minyak kayu Putih disingkat MKP ( MKP 0,1 mL ; MKP 0,3 mL ; MKP 0,5 mL)
6. Tiga kelompok perlakuan dengan sampel minyak nilam disingkat MNL ( MNL 0,1 mL ; MNL 0,3 mL ; MNL 0,5 mL)
7. Satu kelompok kontrol tanpa perlakuan minyak atsiri.

Parameter yang diukur dalam uji Labirin adalah waktu tempuh mencit di dalam Labirin mulai dari pintu masuk (*start*) hingga berhasil menemukan hadiah (makanan) pada pintu keluar (*goal*) dalam satuan detik. Variabel terikat adalah waktu tempuh (detik). Variabel bebas adalah (a) perlakuan dan (b) jumlah pengamatan yaitu pengamatan awal ( $t_0$ ) sebelum inhalasi, kesatu (setelah 30 menit inhalasi), pengamatan kedua (15 menit setelah pengamatan pertama) dan pengamatan ketiga (15 menit setelah pengamatan kedua).

#### **3.4.2 Populasi dan Sampel**

Populasi yang dijadikan objek dalam penelitian ini adalah seluruh mencit jantan berumur sekitar 2-3 bulan dengan kisaran berat badan antara 30-35 gram yang diaklimatisasi di Laboratorium Riset Kimia Lingkungan UPI. Sampel yang digunakan dalam pengujian sebanyak 95 ekor yang didapat dari Rumah Hewan Departemen Biologi FMIPA ITB.

### 3.4.3 Pemeliharaan Hewan Uji

Mencit dipelihara di dalam kandang beralas sekam dengan kepadatan 5 ekor tiap kandang. Kandang dilengkapi dengan botol air minum dan makanan disimpan diatas penutup kandang. Kandang dibersihkan dan alasnya diganti dua kali seminggu. Setiap hari mencit diberi air minum dan pakan. Pakan yang diberikan berupa butiran untuk anak babi yang diproduksi oleh P.T Charoen Popkhan Indonesia dan air PDAM sebagai air minumannya. Kandang-kandang mencit ditempatkan dalam ruangan laboratorium dengan kondisi siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap.

### 3.4.4 Cara Kerja

Cara kerja pada pengujian ini meliputi cara kerja tahap pra pengujian dan tahap pengujian.

#### 3.4.4.1 Tahap Pra Pengujian

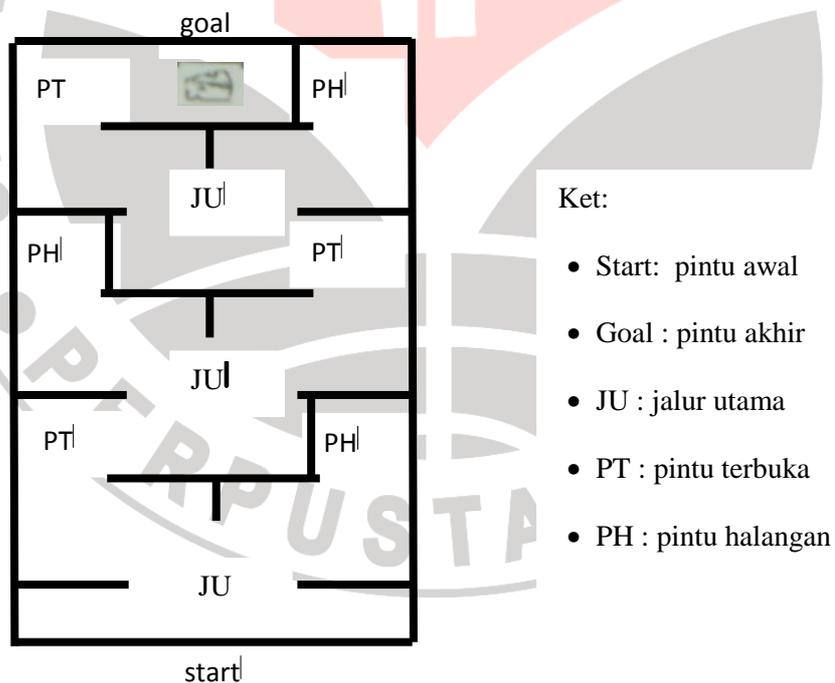
Tahap pra pengujian meliputi:

##### 3.4.4.1.1 Persiapan Alat Uji

Untuk melihat penampilan dari suatu proses belajar dan mengingat, digunakan *maze* yang merupakan perangkat uji yang umum digunakan (Anne, 2004). Sebagai motivator untuk mencapai sasaran digunakan makanan, dan diharapkan hewan uji akan berusaha untuk menempuh jalur yang tepat untuk mencapai sasaran dengan waktu tempuh dan jumlah kesalahan yang dilakukan. *Maze* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *maze* yang merupakan

modifikasi dari *maze* Lashley (Stellar, 1996), dan telah dicoba oleh Nuraini (2002). Pada *maze* ini, hewan uji dihadapkan pada tiga kali *trial and error*, yaitu berupa tiga ruang yang didalamnya masing-masing terdapat simpangan jalur yang harus dipilih untuk mencapai sasaran.

*Maze* yang digunakan berupa kotak yang terbuat dari papan kayu berukuran 1 m x 0,5 m yang terbagi menjadi tiga ruang yang masing-masing berukuran 0,3 m x 0,5 m, dalam setiap ruang terdapat sekat yang berbentuk huruf "T" yang terdiri atas tiga jalur, yaitu jalur tepi yang benar, jalur tepi yang salah, serta jalur utama dengan lebar masing-masing jalur adalah 15 cm. Bagian atas *maze* ditutup dengan plastik mika agar mencit tidak memanjat keluar dari *maze*.



**Gambar 3.3** Denah *Maze*

#### 3.4.4.1.2 Aklimasi Mencit

Periode ini dilaksanakan selama satu minggu dengan tujuan mengaklimasi mencit uji ke kondisi percobaan. Mencit-mencit dikelompokkan dalam kandang berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan 5 ekor setiap kandang. Mencit diletakan dalam ruang laboratorium dengan kondisi siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Aklimasi biasanya dilakukan untuk menghadapi faktor-faktor yang terjadi dalam lingkungan terkontrol di laboratorium (Kramadibrata, 1995).

#### 3.4.4.2 Tahap Pengujian

Pada tahap pengujian ini meliputi Tahap pengamatan *Maze Learning Test*. Pada tahap ini mencit ditempatkan dalam *maze learning test* untuk dilakukan pengukuran terhadap parameter waktu tempuh mencit dalam *maze*. Parameter tersebut mencerminkan kemampuan mengingat pada mencit pada labirin (Maruo, 2001).

Berikut ini adalah penjelasan dari parameter tersebut:

Parameter waktu tempuh/jelajah adalah waktu tempuh yang diperlukan oleh mencit untuk menempuh jalur *maze* ketika dilepaskan dari pintu masuk (*start*) hingga memperoleh makanan pada pintu (*goal*). Waktu yang diukur dengan satuan detik menggunakan *stopwatch*.

Pengujian mencit di dalam *maze* dilakukan dengan cara menempatkan mencit sambil merapatkan ujung ekornya pada tepi muka pintu masuk (*start*), kemudian mencit dilepas dengan cepat. Waktu yang diperlukan untuk mencapai sasaran dicatat. Untuk setiap pengujian dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali

untuk setiap mencit. Waktu tempuh untuk setiap kelompok pengujian dihitung rata-rata yang diperoleh dari tiga kali ulangan untuk setiap mencit pada masing-masing kelompok perlakuan.

Sebelum memulai pengamatan *maze learning test*, terlebih dahulu mencit dikondisikan untuk mengenali jalur-jalur yang seharusnya dilalui untuk mencapai tempat pemberian makanan sebagai sasarannya (uji awal) tahap ini bisa diartikan juga sebagai tahap *pretest*. Pengujian ini dilakukan di ruang laboratorium dengan kondisi sepi, diusahakan tidak ada bunyi yang akan mengganggu mencit. Mencit sangat sensitif terhadap frekuensi suara yang kecil (Biofarma, 2000). Uji awal ( $t_0$ ) dilakukan sebanyak satu kali dengan 3 kali pengulangan untuk setiap mencit, setelah uji pengkondisian dilakukan tahap inhalasi minyak atsiri selama 30 menit dalam ihhalator dan selanjutnya dilakukan pengamatan *maze learning test* dilakukan sebanyak tiga kali, uji kesatu setelah mencit selesai di inhalasi, uji kedua dilakukan 15 menit setelah uji kesatu, dan uji ketiga dilakukan 15 menit setelah uji kedua. Semua uji dilakukan dengan 3 kali ulangan dan data waktu tempuh diambil dari rata-ratanya. Ketika akan dilakukan tahap pengujian ini, terlebih dahulu mencit dipuaskan selama 24 jam.

### **3.5 Tahap Pengolahan Data**

Data hasil pengamatan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Untuk mengetahui perbedaan pengaruh antara setiap kelompok perlakuan dan setiap waktu pengamatan terhadap parameter waktu tempuh yang diukur.