

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan di laboratorium.

B. Tempat Dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat penelitian akan dilakukan di laboratorium farmakologi Program Studi Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang

2. Waktu penelitian

Kegiatan penelitian ini dilakukan pada periode Mei 2026

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah madu Amfoang yang diambil dari 3 wilayah berbeda yakni, madu Amfoang Timur, madu Amfoang Tengah dan madu Amfoang Selatan yang diberikan pada mencit putih jantan (*Mus musculus L.*)

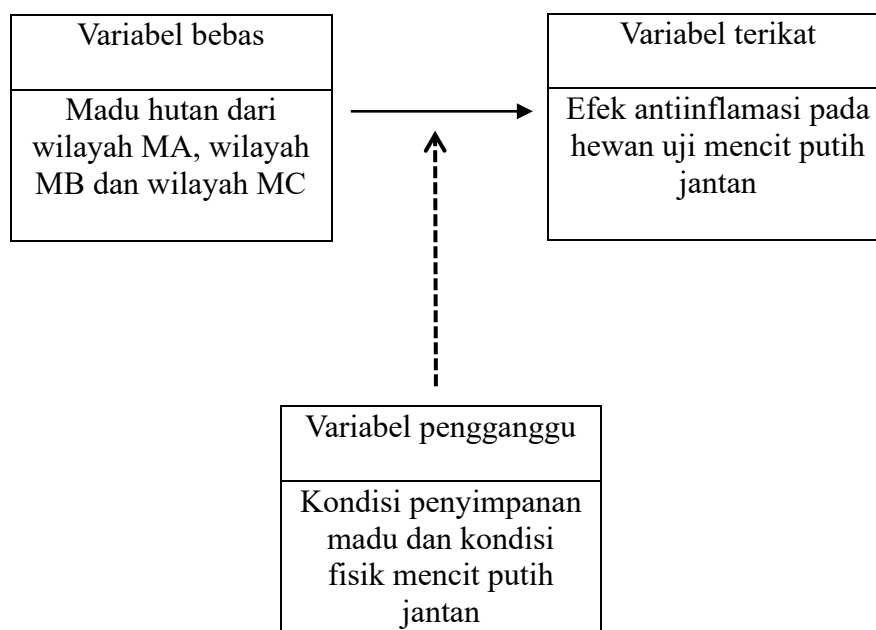
2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu adanya efek antiinflamasi yang didapat dari madu Amfoang, terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus L.*)

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah kondisi tempat penyimpanan madu, kondisi fisik dan biologis hewan uji yaitu dari mencit putih jantan (*Mus musculus L.*)

D. Kerangka Konsep



Keterangan: ————— Diteliti
: - - - - - Tidak diteliti

Gambar 3. Hubungan antar variabel

E. Definisi operasional

Tabel 1. Definisi operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Skala
1	Madu Amfoang	Produk alami yang dihasilkan dari lebah yang diperoleh dari daerah Amfoang Timur, Amfoang Tengah dan Amfoang Selatan Wilayah MA: Timur Wilayah MB: Tengah Wilayah MC: Selatan	Timbangan analitik	Nominal
2	Dosis	Perhitungan dosis madu untuk mencit putih jantan (<i>Mus musculus L.</i>) dengan faktor konversi dari dosis manusia 70 kg/BB ke mencit 20 g/BB sebesar 0,0026	Kalkulator	Rasio
3	Metode Induksi Subplantar	Penyuntikan pada telapak kaki mencit dengan menggunakan larutan putih telur 5% sehingga memicu inflamasi buatan	Sprit 1cc	Rasio
4	Antiinflamasi	Kemampuan madu Amfoang dalam mengurangi edema pada telapak kaki mencit putih jantan (<i>Mus musculus L.</i>), setelah diinduksi putih telur dan diukur menggunakan jangka sorong	Jangka sorong	Rasio
5	Mencit putih jantan (<i>Mus musculus L.</i>)	Sebagai hewan percobaan yang memiliki jaringan yang hampir mirip dengan manusia	Timbangan digital	Rasio

F. Alat dan bahan

1. Alat

Dalam penelitian ini, instrumen yang digunakan untuk menunjang kelancaran proses penelitian adalah timbangan analitik (BL Shimadzu), *Moisture Analyzer* (Sartorius MA150C), *hot plate* (MTOP MS-100) beaker glass (Iwaki), gelas ukur (Iwaki), erlenmeyer (Pyrex), *disposable syringe* (Onehealth), batang pengaduk (Iwaki), tabung reaksi (Pyrex), spidol

(Snowman), jangka sorong (XP-Tool), sonde mencit, kertas perkamen, stopwatch, kertas stiker, dan serbet.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah madu Amfoang dari tiga wilayah berbeda yaitu wilayah A, wilayah B, wilayah C, natrium diklofenak 50 mg (Kimia Farma) dan NaCl 0,9% (Satoria Pharma) reagen Dragendorff, mayer, wagner, reagen Lieberman-Burchad, Na CMC, H_2SO_4 , FeCl_3 , HCl, kloroform dan aquades.

G. Prosedur kerja

1. Persiapan bahan uji

Sampel madu diperoleh dari tiga wilayah berbeda yakni dari kawasan Amfoang Timur, Amfoang Tengah dan Amfoang Selatan, Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur. Madu yang digunakan dalam studi ini dipanen pada bulan September tahun 2024, kemudian dilakukan pengujian tahap awal yaitu pada bulan April 2025. Selanjutnya, sampel madu disimpan di dalam lemari besi, di ruangan ber-AC dan terhindar dari paparan sinar matahari langsung.

2. Identifikasi kandungan senyawa

1) Alkaloid

Sebanyak 0,5 g sampel madu ditambahkan 1mL HCl 2N dan 9 mL aquades kemudian dipanaskan di atas tangas air selama 2 menit setelah itu dipindahkan ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing 3-4 tetes. Ketiga tabung sampel dianalisis dengan pereaksi Mayer, Dragendorff,

dan Wagner sebanyak 2-3 tetes. Terbentuknya endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid. Reaksi dengan pereaksi Mayer akan menghasilkan endapan putih/kuning, pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan merah bata dan pereaksi Wagner menghasilkan endapan Cokelat -hitam (Marzoni & Saifuddin 2022).

2) Flavonoid

Sebanyak 1ml sampel madu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 2N dan digojok kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna yaitu munculnya warna merah, kuning atau coklat (Munte, Runtuwene & Citraningtyas 2015).

3) Tanin

Timbang sampel 0,5g dididihkan selama 3 menit dalam 10 mL air suling lalu dinginkan dan disaring. Filtrat diencerkan sampai hampir tidak berwarna. Hasil filtrat di pipet 2 mL dan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida, jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Marzoni & Saifuddin 2022).

4) Saponin

Sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan dan kemudian digojok kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang banyak selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1cm sampai 10 cm dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCl 2 N menunjukkan adanya saponin (Marzoni & Saifuddin 2022).

5) Triterpenoid dan Steroid

Sampel madu sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 2 mL kloroform, kemudian ditambahkan 10 tetes anhidrat asetat dan 3 tetes asam sulfat pekat (reaksi Liebermann Burchard). Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan warna merah atau ungu, sedangkan adanya steroid ditunjukkan dengan warna biru kehijauan (Shabira, Fadiah & Umami 2025).

3. Penetapan kadar air

Pengukuran kadar air dari madu menggunakan alat *moisture balance*. Ditimbang sebanyak 3gram madu dimasukkan ke dalam alat *moisture balance*, alat ditutup dan tekan tombol on. Sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) 8664:2024, madu dikatakan memenuhi standar apabila kadar airnya <22% (Badan Standardisasi Nasional 2024).

4. Pengelompokan hewan uji

Pada penelitian ini hewan uji akan dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor hewan uji

- a. Kelompok I sebagai kontrol negatif dengan pemberian suspensi Na CMC 0,2 mL/20gBB mencit
- b. Kelompok II sebagai kontrol positif diberikan natrium diklofenak dengan dosis 6,5 mg/kgBB mencit
- c. Kelompok III adalah kelompok mencit putih jantan yang diberikan madu hutan Amfoang dari wilayah MA dengan dosis 1.300 mg/kgBB mencit

- d. Kelompok IV adalah kelompok mencit putih jantan yang diberikan madu hutan Amfoang dari wilayah MB dengan dosis 1.300 mg/kgBB mencit
- e. Kelompok V adalah kelompok mencit putih jantan yang diberikan madu hutan Amfoang dari wilayah MC dengan dosis 1.300 mg/kgBB mencit

Dalam penentuan jumlah sampel hewan uji dilakukan melalui perhitungan statistik menggunakan rumus Federer: $(n - 1)(t - 1) \geq 15$

Keterangan:

n = jumlah hewan yang diperlukan

t = jumlah kelompok perlakuan

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

$$(n - 1)(4) \geq 15$$

$$n - 1 \geq \frac{15}{4}$$

$$n \geq 3,75 + 1$$

$$n \geq 4,75$$

Dari perhitungan yang sudah dilakukan, menunjukkan bahwa jumlah hewan uji yang dibutuhkan dalam penelitian ini minimal tiap kelompok perlakuan berjumlah 5 ekor hewan uji, dengan mempertimbangkan angka kematian. Sehingga total hewan uji yang dibutuhkan dalam penelitian adalah 25 ekor.

5. Pembuatan kontrol negatif

Na CMC dengan konsentrasi 1% dibuat dengan cara 1 gram Na CMC dimasukkan ke dalam mortar dan ditambahkan 50 mL air panas kemudian

diaduk sampai membentuk koloidal yang homogen dan dicukupkan dengan air suling hingga 100 mL. Na CMC akan dioralkan sebanyak 0,2 mL (Prayitno, Juwaeni & Asri 2022).

6. Pembuatan kontrol positif

Kontrol pembanding yang digunakan dalam penelitian ini adalah natrium diklofenak dalam bentuk suspensi. Dosis natrium diklofenak yang umumnya dikonsumsi oleh orang dewasa dengan berat badan 70 kg adalah sebesar 50 mg/hari. Berdasarkan faktor konversi dosis dari manusia berat badan 70 kg ke hewan uji mencit dengan berat badan 20 g sebesar 0,0026, sehingga dosis natrium diklofenak untuk mencit dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned}\text{Konversi dosis ke mencit} &= \text{Dosis Manusia} \times \text{Faktor Konversi} \\ &= 50 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,13 \text{ mg/20gBB}\end{aligned}$$

Dosis kg/BB mencit adalah =

$$\frac{1000 \text{ g} \times 0,13 \text{ mg}}{20 \text{ gBB}} = 6,5 \text{ mg/KgBB}$$

Untuk memperoleh sediaan cair yang dapat diberikan secara oral, natrium diklofenak dibuat dalam bentuk suspensi dengan menggunakan suspending agent Na CMC 1% hingga 10 mL

$$\frac{0,13 \text{ mg} \times 10 \text{ mL}}{6,5 \text{ mg}} = 0,2 \text{ mL/20gBB}$$

Untuk membuat suspensi natrium diklofenak yaitu dimasukkan ke dalam mortir 0,1 gram Na CMC kemudian ditambahkan air panas secukupnya dan didiamkan selama 15 menit hingga mengembang setelah itu aduk

hingga merata dan tambahkan natrium diklofenak 6,5 mg selanjutnya ditambahkan aquades hingga volume total mencapai 10 mL.

7. Perhitungan larutan sediaan

Dalam perhitungan dosis, satu sendok makan madu setara dengan 15 mL dengan berat 10 g. Menurut Larance & Bacharach menyatakan bahwa faktor konversi dari manusia ke mencit yaitu dengan BB manusia (70 kg) ke mencit putih jantan dengan BB (20 g) adalah 0,0026.

Perhitungan dosis madu adalah:

$$= 10.000 \text{ mg} \times 0,0026 = 26 \text{ mg}/20\text{g BB}$$

Dosis kg/BB mencit adalah:

$$\frac{1000 \text{ g} \times 26 \text{ mg}}{20 \text{ gBB}} = 1.300/\text{kgBB} \text{ atau } 1,3 \text{ gr/kgBB}$$

Hasil perhitungan menunjukkan dosis madu yang diperlukan untuk mencit dengan berat badan 20 g adalah 26 mg/20gBB. Agar mempermudah pemberian secara oral madu harus di encerkan untuk mengurangi viskositas dari madu.

$$\frac{26 \text{ mg}}{1300 \text{ mg}} \times 10 \text{ mL} = 0,2 \text{ mL}/20\text{gBB}$$

Mencit putih jantan diberi madu dengan volume 0,2 mL/20gBB yang diberikan secara oral.

8. Pembuatan larutan induksi putih telur 5%

Putih telur 5% b/v yang diinduksi pada hewan uji secara subplantar dibuat dengan menimbang 1 gram putih telur dicampur dengan larutan (NaCl 0,9%) aduk sampai homogen dan dicukupkan sampai 20 mL. Larutan

induksi yang telah dibuat diberikan pada masing-masing mencit dengan volume 0,1 mL (Rizki, Hidayat & Agusta 2025).

9. Pengujian aktivitas antiinflamasi

Sebelum dilakukan pengujian aktivitas antiinflamasi dari madu Amfoang, hewan uji terlebih dahulu dipuasakan selama 8 jam tetapi minumnya tetap diberikan. Pada tahap awal hewan uji di timbang berat badan dengan kisaran 20-35 gram, kemudian dikelompokkan menjadi 5 kelompok secara acak, yang terdiri dari kontrol positif, kontrol negatif, serta tiga kelompok madu Amfoang dari wilayah berbeda dan setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit putih jantan. Tahap selanjutnya adalah menandai bagian kaki hewan uji di sisi kiri sebatas mata kaki menggunakan spidol, lalu mengukur volume kaki dengan jangka sorong sebagai volume kaki awal (V_0). Selanjutnya setiap kelompok hewan uji diberikan larutan uji dan larutan pembanding secara oral dengan menggunakan alat sonde oral sesuai dengan kelompok perlakuan. Setelah pemberian bahan uji selama 30 menit, kemudian semua hewan uji diinduksi larutan putih telur 5% sebanyak 0,1 mL yang disuntikkan secara intraplantar pada telapak kaki belakang mencit, 30 menit kemudian dilakukan pengukuran volume kaki tiap 15 menit selama 2 jam dengan alat bantu jangka sorong. Hasil perlakuan dicatat diameter kaki mencit (V_t) sebagai diameter kaki setelah diberi larutan uji dan diinduksi putih telur 5% (Anistisia & PH 2018).

H. Cara Pengolahan dan Analisis Data

Data yang di dapat berupa diameter telapak kaki mencit, yang merupakan selisih kaki mencit sebelum dan sesudah radang. Persen radang dapat dihitung dengan rumus di bawah ini:

$$\% \text{Radang} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100\%$$

Keterangan: V_t : Volume peradangan pada kaki mencit setelah perlakuan
 V_0 : Volume awal kaki mencit

Selanjutnya nilai persen radang yang didapat, akan digunakan dalam menghitung AUC (*Area Under the Curve*). Nilai AUC dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$AUC_{tn-1}^{tn} = \frac{V_{tn-1} + V_{tn}}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

Keterangan: V_{tn-1} : Rata-rata volume edema pada (t_{n-1})
 V_{tn} : Rata-rata volume edema pada (t_n)
 $(t_n - t_{n-1})$: Selisih waktu pengamatan

Menghitung % daya antiinflamasi (%DAI) dapat menggunakan rumus:

$$\% \text{Daya Antiinflamasi} = \frac{AUC_k - AUC_P}{AUC_k} \times 100\%$$

Keterangan: AUC_K : % AUC pada kelompok kontrol negatif
 AUC_P : % AUC pada kelompok kontrol pembanding

Data dikumpulkan kemudian diuji normalitas (*Test of Normality*) untuk mengetahui apakah data yang dihasilkan terdistribusi normal. Selanjutnya, nilai AUC yang dihasilkan akan dilakukan uji *one way* ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95% dan akan dilakukan uji lanjutan yaitu uji *post hoc* LSD untuk melihat apakah ada perbedaan yang signifikan antara kelompok.