

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu penelitian eksperimen.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia, Teknologi Sediaan Farmasi, dan Farmakologi Program Studi Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari-Mei 2026

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah madu hutan Amfoang yang diperoleh dari tiga Wilayah, yaitu Amfoang Timur, Amfoang Tengah, dan Amfoang Selatan.

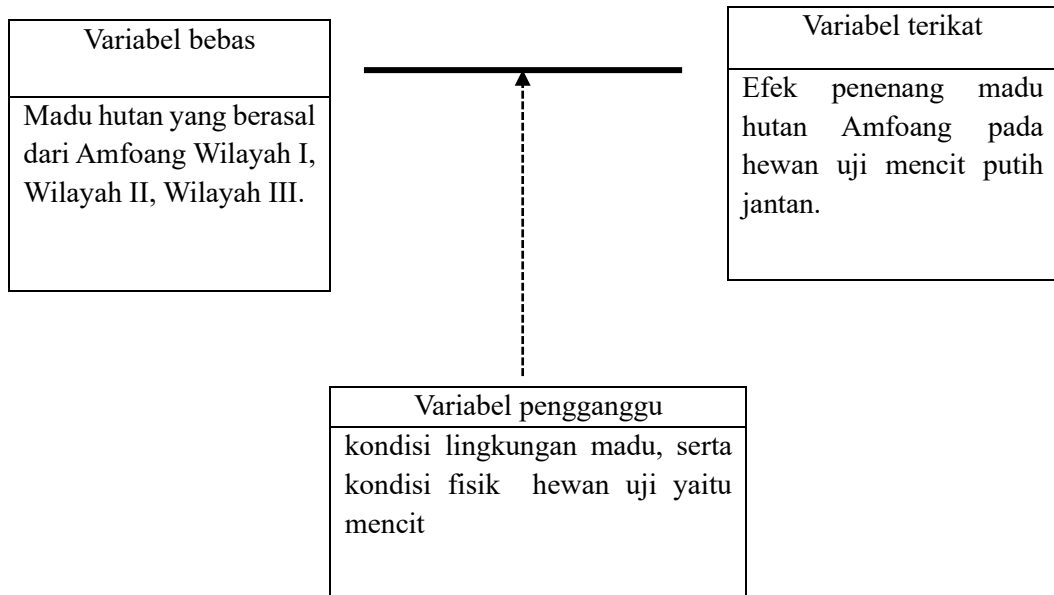
2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah efek penenang yang dihasilkan dari madu hutan Amfoang terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus L*).

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu dalam penelitian ini meliputi kondisi lingkungan madu serta kondisi fisik dari hewan uji, yaitu mencit putih Jantan (*Mus musculus L*).

D. Kerangka Konsep



Keterangan :

————— : Diteliti

- - - - -> : Tidak diteliti

E. Defenisi Operasional

Tabel 1. Defenisi Operasional

No	Variabel	Defenisi Operasional	Alat Ukur	Skala
1	Madu hutan Amfoang	Madu hutan yang diperoleh dari Amfoang Timur, Amfoang Tengah, Amfoang Selatan, Kabupaten Kupang, NTT. Wilayah I : Timur Wilayah II : Tengah Wilayah III : Selatan	Timbangan Analitik	Nominal
2	Dosis	Menggunakan faktor konversi dari manusia 70kg/BB ke mencit 20 gr/BB dengan dikalikan 0,0026	Kalkulator	Nominal
3	Hewan uji	Salah satu hewan uji yang digunakan untuk mengetahui aktivitas penenang madu hutan Amfoang. Mecit putih jantan (<i>Mus musculus L</i>) dengan berat berkisar 20-40 gram	Timbangan digital hewan uji	Rasio
4	Efek penenang	Kemampuan madu hutan yang berasal dari Amfoang Timur, Tengah, dan Selatan dalam memberi efek penenang pada mencit putih jantan (<i>Mus musculus L</i>)	Lembar observasi	Rasio
5.	<i>Tail Suspension Test</i> (TST)	<i>Tail Suspension Test</i> (TST) adalah metode induksi stres psikologis akut pada mencit putih jantan yang dilakukan dengan menggantungkan mencit pada bagian ekor menggunakan perekat pada penyangga horizontal setinggi 50 cm	<i>Stopwatch</i> dan lembar observasi	Rasio

sehingga tubuh mencit tidak bersentuhan dengan permukaan apa pun, yang memicu perubahan perilaku sebagai respons stres.

- | | | |
|--------------------------------------|--|---|
| 6. <i>Forced Swimming Test (FST)</i> | <i>Forced Swimming Test (FST)</i> adalah metode uji perilaku pada mencit putih jantan dengan cara memaksa mencit berenang selama 6 menit dalam wadah berisi air pada kedalaman tertentu, Parameter yang diamati adalah <i>immobility time</i> , yaitu durasi perilaku pasif mencit yang dihitung selama 4 menit terakhir dari 6 menit pengujian untuk mengevaluasi respons stres dan efek perlakuan uji melalui pengamatan perilaku. | <i>Stopwatch</i> dan Rasio lembar observasi |
|--------------------------------------|--|---|
-

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit, gelas silinder erlemeyer (*pyrex*) 1000 mL, gunting, tali perekat, tiang penyangga (statif), *stopwatch*, *Moisture balance (Sartorius)*, erlemeyer 250 mL (*pyrex*), gelas kimia 250 mL (*pyrex*), gelas ukur 10 mL (*herma*), sonde oral, timbangan digital (*Shimadzu*), pipet tetes, kertas perkamen, mortir, stamper, dan disposable syringe 1 mL.

2. Bahan

Madu hutan Amfoang yang berasal dari Amfoang Timur, Amfoang Tengah, Amfoang Selatan, kapsul pegagan (PT. Herba Indo Utama), aquades, HCl 2 N, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorf, FeCl₃ 1%, H₂SO₄, dan pereaksi Lieberman-Burchard

G. Prosedur Penelitian

1. Persiapan bahan uji

Penelitian ini menggunakan madu yang berasal dari tiga Wilayah yang berbeda yaitu, Amfoang Timur, Amfoang Tengah, dan Amfoang Selatan, Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur.

2. Uji kadar air

Pengujian kadar air pada madu memakai alat *moisture balance* yang dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 1 gram madu, dan meletakkannya kedalam *moisture balance*. Setelah itu alat di tutup, suhu diatur 105°C dan dinyalakan dengan menekan tombol *on*. setelah itu, proses pengukuran dimulai saat lampu menyala sampai dengan selesai ketika lampu telah mati (Hasan et al. 2020). Kadar air madu hutan memenuhi syarat diperbolehkan maksimal 22% (SNI 2024)

3. Identifikasi kandungan senyawa

a) identifikasi alkaloid

Diukur 2 mL madu lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 6 mL aquades. Dipipet 5 mL ke dalam tabung reaksi lain tambahkan 5 mL HCl 2 N dan di panaskan selama 2 menit,

dinginkan, disaring. Sampel kemudian di bagi dalam 3 tabung reaksi berbeda, masing-masing 1 mL. tambahkan 2 tetes pereaksi mayer, wagner, dragendorf ke masing-masing tabung reaksi. Hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih atau kuning dengan pereaksi mayer, endapan merah kecoklatan dengan pereaksi wagner, dan endapan jingga-merah bata dengan pereaksi dragendorf (Harborne, 1998).

b) identifikasi flavonoid

Diukur sebanyak 2 mL madu dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu tambahkan 6 mL aquades. Dipipet 5 mL sampel kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan beberapa tetes H_2SO_4 , sampel yang ditambahkan asam sulfat pekat menunjukkan hasil positif terhadap keberadaan senyawa flavonoid, yang ditandai dengan perubahan warna menjadi oranye- merah (Ferdinan & Natasa 2024).

c) identifikasi Tanin

sebanyak 1 mL madu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 3 mL aquades. Dipipet 3 mL sampel kedalam tabung reaksi, selanjutnya tambahkan 2-3 tetes $FeCl_3$ 1%. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru tua atau hijau kehitaman (Harborne, 1998).

d) identifikasi saponin

Diukur sebanyak 2 mL madu dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu tambahkan 6 mL aquades, dinginkan lalu digojok dan didinginkan

selama 15 menit. Jika positif mengandung saponin akan terbentuk busa yang stabil setinggi 1-10 cm (Harborne, 1998).

e) Uji terpenoid dan steroid

Diukur sebanyak 2 mL madu dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu tambahkan 6 mL aquades. Dipipet 1 mL larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain kemudian tambahkan 10 tetes pereaksi Lieberman-Burchard. Hasil positif ditunjukkan dengan warna merah, hijau, atau biru (Hendro Hitijahubessy 2025)

4. Pembuatan Na CMC 1%

Sebanyak 100 mL aquades dipanaskan hingga mendidih, lalu ditimbang Na CMC 1 gram kedalam mortir lalu tambahkan 50 mL aquades panas setelah itu digerus sampai merata dan memiliki tekstur yang seragam dan merata merata dan bertekstur menyerupai gel dan diencerkan sedikit demi sedikit menggunakan aquades, kemudian tuang kedalam labu ukur 100 mL hingga batas kalibrasi.

5. Pembuatan larutan sediaan

Sebanyak 10 g madu hutan Amfoang setara dengan 1 sendok makan (15 mL), yang disesuaikan dosis untuk manusia dengan berat badan 70 kg, dikonversikan menjadi dosis untuk mencit dengan berat badan 20 g. Dengan menggunakan faktor konversi 0,0026 g, diperoleh takaran untuk mencit sebesar:

$$10 \text{ g} \times 0,0026 = 0,026 \text{ g}/20 \text{ g BB} \longrightarrow 26 \text{ mg}/20 \text{ g BB}$$

Dosis kg/BB mencit adalah:

$$\frac{1000 \text{ g} \times 26 \text{ mg}}{20 \text{ g/BB}} = 1.300 \text{ mg/kgBB} \longrightarrow 1,3 \text{ g/kg BB}$$

karena madu memiliki konsistensi yang sangat kental sehingga sulit diberikan secara oral kepada mencit. Oleh karena itu, sebanyak 1,3 g di larutkan dalam 10 mL air mengurangi viskositas, sehingga larutan lebih mudah ditakar dan diberikan menggunakan sonde oral tanpa menimbulkan risiko tersendak pada hewan uji.

Volume pemberian madu yang diberikan pada setiap ekor mencit dengan dosis kg/BB mencit adalah :

$$\frac{26 \text{ mg} \times 10 \text{ mL}}{1.300 \text{ mg}} = 0,2 \text{ mL/kgBB}$$

Jadi volume madu yang diberikan pada setiap ekor mencit adalah 0,2 mL

6. Pembuatan suspensi kapsul pegagan

kontrol pembanding yang digunakan adalah kapsul pegagan dalam bentuk suspensi. Dengan dosis orang dewasa 500 mg. untuk mengonversi dosis tersebut dari manusia dengan berat badan 70 kg ke mencit jantan 20 gram digunakan faktor konversi 0,0026. Dengan demikian dosis kapsul pegagan yang diberikan kepada mencit putih Jantan dengan berat badan 20 g adalah: $500 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,3 \text{ mg/20 gBB}$.

Dosis mg/kgBB mencit =

$$\frac{1000 \text{ g} \times 1,3 \text{ mg}}{20 \text{ gBB}} = 65 \text{ mg/kgBB}$$

Ditimbang kapsul yang mengandung 65 mg ekstrak pegagan kemudian disuspensikan dengan 1% Na CMC hingga 10 mL.

$$\frac{1,3 \text{ mg} \times 10 \text{ mL}}{65 \text{ mg}} = 0,2 \text{ mL/kgBB}$$

Jadi, volume pemberian yang diberikan kepada mencit sebesar 0,2 mL.

7. Pengelompokan hewan uji

Pada pengelompokan hewan uji ini digunakan rumus Federer $(n-1)(t-1) \geq 15$, dengan n adalah jumlah sampel per kelompok dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.

Penentuan jumlah sampel digunakan rumus Federer:

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

n = jumlah sampel per kelompok

t = jumlah kelompok perlakuan

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

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75$$

Hewan uji minimum yang digunakan yaitu 5 ekor pada masing-masing kelompok, dengan 5 kelompok perlakuan. Sehingga jumlah hewan uji yang diperlukan dalam penelitian sebanyak 25 ekor.

- a. Kelompok I kontrol negatif diberikan Na CMC 1% 0,2 mL/20gBB.
- b. Kelompok II kontrol positif diberikan suspensi kapsul pegagan dengan dosis 65 mg/kgBB.

- c. Kelompok III perlakuan madu hutan dari wilyah Amfoang Timur diberikan dengan dosis 1.300 mg/kgBB.
- d. Kelompok IV perlakuan madu hutan dari wilyah Amfoang Tengah diberikan dengan dosis 1.300 mg/kgBB
- e. Kelompok V perlakuan madu hutan dari wilyah Amfoang Selatan diberikan dengan dosis 1.300 mg/kgBB

8. Induksi stres

Semua kelompok uji diberi perlakuan stres dengan menggunakan metode penggantungan ekor mencit (*Tail Suspension Test*). Ekor mencit digantung menggunakan tali yang direkatkan dengan perekat ke tiang horizontal setinggi 50 cm, dengan jarak 1 cm antara ujung ekor dan tiang horizontal. Induksi stress ini dilakukan selama 3 hari, dengan durasi 3 menit setiap harinya. Kondisi mencit yang menunjukkan sikap pasrah dan tidak bergerak diartikan sebagai keadaan stres, yang dinyatakan sebagai *immobility time* (Indah Safitri, Febriasti & Studi Farmasi Universitas Malahayati Bandar Lampung Abstract 2024).

9. Pengujian *Forced Swim Test* (FST)

Metode *Forced Swim Test* (FST) dilakukan dengan memaparkan mencit pada kondisi berenang paksa dalam gelas kimia berisi air bersuhu 25°C dengan diameter wadah 12,5 cm dan kedalaman air 12 cm selama enam menit, dengan Parameter yang diamati adalah *immobility time*, yang diukur dalam empat menit terakhir dari enam menit, pengujian berdasarkan durasi gerakan pasif yang ditunjukkan oleh mencit (Singh, Kumar Jalwal &

Sharma 2022). Pengujian dilakukan tiga kali pada setiap ekor mencit: Pengujian pertama sebelum induksi stres (T0), pengujian kedua setelah induksi stres (T1), dan pengujian ketiga dua jam setelah pemberian sediaan uji (T2) (Maharani, Ansory & Hanifah 2023b).

10. Pengujian efek penenang

Semua kelompok mencit diinduksi stres menggunakan metode penggantungan ekor selama tiga hari berturut-turut, masing-masing berlangsung selama tiga menit. Pada hari keempat, tes berenang paksa dilakukan selama enam menit. Waktu tidak bergerak dicatat selama empat menit terakhir sebagai parameter pengamatan. Pengujian FST dilakukan sebelum induksi stres (T0), setelah induksi stres (T1), dan dua jam setelah pemberian sediaan uji (T2). waktu imobilitas diukur untuk menilai efek penenang berdasarkan perubahan durasi perilaku pasif (Indah Safitri, Febriasti & Studi Farmasi Universitas Malahayati Bandar Lampung Abstract 2024).

H. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Uji *Wilcoxon Signed-Rank*, sedangkan perbedaan antar kelompok dianalisis menggunakan Uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *post hoc Mann-Whitney* dengan tingkat signifikan $p < 0,05$