

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan merupakan penelitian eksperimental untuk menganalisis aktivitas antiinflamasi sediaan gel ekstrak bunga cengkeh menggunakan metode uji karagenan pada kaki mencit putih jantan galur Balb/c. Selain itu dilakukan evaluasi pada sediaan gel ekstrak bunga cengkeh meliputi uji organoleptis, homogenitas, uji daya sebar, daya lekat, viskositas, dan uji pH.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

- a. Penentuan determinasi tanaman akan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik, Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Diponegoro (UNDIP).
- b. Pembuatan ekstrak bunga cengkeh akan dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Pengujian fitokimia dan pembuatan sediaan gel ekstrak bunga cengkeh akan dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
- d. Pengujian aktivitas antiinflamasi akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan pada Juni-Juli 2025.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pisau, blender (miyako), timbangan analitik (Fujitsu), ayakan nomor 40 (Maksindo), *moisture analyzer* (Ohaus), kertas saring, sendok panjang, tanur, *rotary evaporator* (RE 2000E), *waterbath*, cawan uap, batang pengaduk, beaker glass (iwaki), gelas ukur, pipet tetes, spatula, tabung reaksi (iwaki), dan rak tabung reaksi, pH meter (Ohaus), viscometer brookfield, kaca preparate, jangka sorong (Donwori), muffle furnace (Thermo) dan *stopwatch*.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain bunga cengkeh kering, etanol 96% (kualitas teknik), aquadest (kualitas teknik), asam asetat (kualitas teknik), asam sulfat (H₂SO₄) (kualitas teknik), larutan NaCl 0,9% (kualitas teknik), karagenan, carbopol (kualitas farmasetik), metil paraben (kualitas farmasetik), gliserin (kualitas farmasetik), TEA (kualitas farmasetik), serta pereaksi fitokimia seperti HCl (kualitas teknik), pereaksi Dragendorff (kualitas teknik), magnesium (kualitas teknik), FeCl₃ (kualitas teknik), eter (kualitas teknik), asam asetat anhidrat (kualitas teknik), dan asam sulfat pekat (kualitas teknik), diklofenak gel, mencit jantan galur Balb/c.

D. Definisi Operasional

Tabel 3, 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Indikator	Skala	Alat ukur
Mutu fisik gel ekstrak bunga cengkeh	Sediaan gel ekstrak bunga cengkeh dilakukan pengujian sifat fisiknya	pH Daya sebar Daya lekat Viskositas	Skala ordinal pH (4,5 - 6,5), Daya sebar (5-7 cm), Daya lekat (> 1 detik), Viskositas (2,000-50,000 cps)	pH meter Alat uji Alat uji daya sebar Alat uji daya lekat Viskometer Bookfield
Uji aktivitas antiinflamasi gel ekstrak bunga cengkeh		Persen udem penghambatan udem	Skala Nominal (%)	Jangka sorong

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Mutu fisik sediaan gel yang terdiri atas uji pH, homogenitas, daya sebar, daya lekat, viskositas serta gel ekstrak bunga cengkeh yang terdiri dari tiga tingkat konsentrasi, yaitu 2%, 2,5%, dan 3%.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pengaruh dari aktivitas antiinflamasi yang dihasilkan pada mencit dengan perlakuan yang kembali normal.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkendali dalam penelitian ini meliputi mencit, suhu, waktu, dan prosedur pembuatan ekstrak serta gel. Ketiga faktor ini dijaga konsistensinya untuk memastikan bahwa proses ekstraksi dan pembuatan gel berjalan sesuai prosedur dan tidak mempengaruhi hasil akhir penelitian.

F. Prosedur Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman akan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik, Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Diponegoro (UNDIP)

2. Pembuatan simplisia

Proses pembuatan simplisia bunga cengkeh dimulai dengan pengumpulan bahan baku bunga cengkeh yang diperoleh dari daerah Klaten. Setelah itu, dilakukan sortasi basah, Bunga yang telah disortasi kemudian dicuci hingga kotorannya hilang, kemudian ditiriskan. Dikeringkan dengan menggunakan matahari tidak langsung dan ditutup menggunakan kain berwarna hitam. Setelah pengeringan, bunga cengkeh disortasi kering, Bunga cengkeh yang telah kering kemudian dikemas dalam wadah kedap udara. Simplisia bunga cengkeh dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan mesh no 40 hingga menjadi serbuk halus (Arsyad *et al*, 2023).

3. Standarisasi Non Spesifik Serbuk Simplisia

a. Kadar air

Uji kadar air dilakukan dengan menimbang sebanyak 2 gram serbuk simplisia menggunakan *moisture analyzer*, yang mengukur penurunan berat sampel setelah dipanaskan untuk menguapkan kandungan airnya. Hasil uji ini memberikan informasi tentang kadar air dalam sampel, yang penting untuk menentukan kualitas dan kestabilan bahan (Ndumuye *et al.*, 2022).

b. Kadar abu

Proses uji abu dimulai dengan menimbang 2 gram serbuk simplisia, kemudian dimasukkan ke dalam cawan pengabuan dan dipanaskan dalam tanur pada suhu 600°C hingga bahan organik terbakar habis. Pembakaran dilanjutkan hingga abu berwarna abu-abu dan berat cawan serta abu tetap konstan (Ndumuye *et al.*, 2022).

4. Ekstraksi

Proses pembuatan ekstrak kental bunga cengkeh dimulai dengan menyiapkan bunga cengkeh yang telah dikeringkan dan digiling menjadi serbuk halus, Sebanyak 500 gram serbuk bunga cengkeh kemudian dilarutkan menggunakan pelarut etanol 96% dalam perbandingan 1:5 (serbuk : pelarut). Campuran ini dibiarkan dalam wadah tertutup selama 3 × 24 jam dalam proses ekstraksi menggunakan metode maserasi, Setelah proses maserasi selesai, larutan disaring. Seluruh filtrat hasil maserasi kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, dan

akan dihasilkan sediaan ekstrak semi kental. Ekstrak semi kental tersebut selanjutnya diuapkan kembali menggunakan *waterbath* dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental bunga cengkeh (Saerang *et al.*, 2023),

5. Standarisasi Non Spesifik Ekstrak

a. Kadar air

Uji kadar air dilakukan dengan menimbang ekstrak sebanyak 2 gram menggunakan *moisture analyzer*, yang akan mengukur penurunan berat ekstrak setelah dipanaskan untuk menguapkan kandungan air yang ada (Ndumuye *et al.*, 2022).

b. Uji Bebas Etanol

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dicampurkan dengan 2 mL asam asetat dan 2 mL asam sulfat (H₂SO₄), lalu dipanaskan, Hasil uji dinyatakan positif bebas etanol apabila tidak tercium aroma khas ester yang harum. Jika aroma ester masih tercium, hal ini menandakan bahwa etanol masih terdapat dalam ekstrak dan telah bereaksi membentuk ester (Priamsari *et al.*, 2020).

6. Rendemen Ekstrak

Ekstrak yang telah diperoleh selanjutnya ditimbang, dan rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus berikut (Saerang *et al.*, 2023):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

7. Standarisasi Spesifik Ekstrak

a. Organoleptik

Uji organoleptis ekstrak adalah pengujian yang dilakukan untuk mengevaluasi sifat-sifat fisik ekstrak berdasarkan panca indera manusia, seperti rasa, bau, warna, dan tekstur (Saerang *et al.*, 2023).

b. Skrinning Fitokimia

1) Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak bunga cengkeh dicampurkan dengan 10 ml air suling dan 1 ml larutan HCl 2 N, kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit. Setelah proses pemanasan, larutan didinginkan dan disaring. Filtrat sebanyak 0,5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff. Hasil pengujian diamati berdasarkan perubahan warna yang terjadi.

2) Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak bunga cengkeh ditimbang, lalu dilarutkan dalam 10 ml air suling. Campuran dipanaskan menggunakan penangas air, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dicampur dengan 1 ml etanol 95%, kemudian ditambahkan bubuk magnesium P. Jika larutan menunjukkan warna ungu kemerahan, maka menunjukkan adanya flavonoid. Sebaliknya, munculnya warna kuning, merah, atau jingga menandakan tidak adanya flavonoid.

3) Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak bunga cengkeh diekstraksi menggunakan 10 ml air suling, lalu disaring dan diencerkan hingga larutan menjadi bening. Sebanyak 2 ml larutan tersebut ditetesi 1-2 tetes larutan FeCl_3 . Terbentuknya perubahan warna menjadi indikator keberadaan senyawa tanin.

4) Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak bunga cengkeh dilarutkan ke dalam 10 ml air panas, kemudian larutan didinginkan dan dikocok kuat selama sekitar 10 detik hingga menghasilkan buih. Selanjutnya, ditambahkan satu tetes HCl 2 N untuk mengevaluasi stabilitas buih. Kehadiran buih yang stabil menunjukkan adanya senyawa saponin.

5) Terpenoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak bunga cengkeh dilarutkan dalam etanol, lalu dipindahkan ke cawan dan dicampurkan dengan eter. Campuran kemudian diuapkan hingga kering, Setelah itu, ditambahkan 3 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (H_2SO_4). Jika warna yang terbentuk adalah merah atau ungu, maka menandakan adanya triterpenoid.

6) Steroid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak bunga cengkeh dilarutkan dalam etanol, lalu dipindahkan ke cawan dan dicampurkan dengan eter.

Campuran kemudian diuapkan hingga kering, Setelah itu, ditambahkan 3 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (H₂SO₄). Jika warna yang muncul adalah biru atau hijau, maka menunjukkan adanya steroid (Tuldjanah *et al.*, 2024).

8. Pembuatan Sediaan Gel Ekstrak Bunga Cengkeh

Formulasi sediaan gel pada penelitian ini terdiri atas 3 formula, formula yang digunakan disajikan pada tabel 3,2,

**Tabel 3, 2 Formulasi Gel Ekstrak Bunga Cengkeh
(Warsito & Santoso, 2021)**

Bahan	Konsentrasi (%)				Kegunaan
	F0	F1	F2	F3	
Ekstrak bunga cengkeh	-	2	2,5	3	Zat aktif
Carbopol	1,2	1,2	1,2	1,2	<i>Gelling agent</i>
Metil paraben	0,25	0,25	0,25	0,25	Pengawet
Gliserin	10	10	10	10	Humektan
TEA	2	2	2	2	Humektan
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	pelarut

Gel ekstrak bunga cengkeh dibuat dalam tiga formula dengan variasi jumlah ekstrak sebagai zat aktif. Basis gel dibuat dengan mengembangkan carbopol di dalam lumpang menggunakan aquadest panas sebanyak 20 kali berat carbopol, selama 15 menit. Metil paraben terlebih dahulu dilarutkan dalam gliserin, kemudian campuran tersebut ditambahkan ke dalam basis gel dan diaduk hingga merata. Setelah itu, sebanyak tiga perempat bagian dari total aquadest ditambahkan dan diaduk kembali hingga homogen, Di lumpang yang berbeda, TEA dicampurkan dengan ekstrak bunga cengkeh dan diaduk sampai rata. Seluruh bahan kemudian digabungkan dan diaduk hingga homogeny. Terakhir, sisa aquadest ditambahkan ke dalam

campuran, lalu diaduk hingga terbentuk gel ekstrak bunga cengkeh yang seragam dan stabil (Warsito & Santoso, 2021).

9. Evaluasi Sediaan Gel Ekstrak Bunga Cengkeh

a. Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan mengamati secara visual karakteristik bentuk, tekstur, warna, serta aroma dari sediaan (Saerang *et al.*, 2023).

b. pH

Sediaan gel yang telah dibuat ditimbang sebanyak 1 gram, kemudian dilarutkan dalam aquadest dengan perbandingan 1:10 (b/v) antara gel dan aquadest. Pengukuran pH dilakukan dengan mencelupkan elektroda pH meter hingga terendam sempurna dalam larutan. Nilai pH yang ditampilkan oleh alat kemudian dicatat, Rentang pH yang sesuai untuk sediaan topikal adalah antara 4,5 hingga 6,5, agar sejalan dengan pH fisiologis kulit (Saerang *et al.*, 2023).

c. Homogenitas

Uji homogenitas pada sediaan krim dilakukan dengan cara mengoleskan krim ke permukaan kaca preparat, kemudian ditutup menggunakan kaca preparat lainnya. Selanjutnya, diamati apakah permukaan sediaan tersebut menunjukkan tekstur yang halus dan penyebaran yang merata (Saerang *et al.*, 2023).

d. Daya sebar

Kertas milimeter blok diletakkan di bawah kaca transparan sebagai alas, kemudian sediaan krim seberat 0,5 gram ditempatkan di atas permukaan kaca tersebut. Selanjutnya, kaca transparan kedua ditimpa di atas sediaan selama 1 menit dan diamati diameter penyebarannya, Penambahan beban dilakukan secara bertahap setiap 1 menit hingga total beban mencapai 250 gram. Setelah proses selesai, diameter sebar yang terbentuk diukur menggunakan penggaris Daya sebar memenuhi syarat bila 5-7cm (Saerang *et al.*, 2023).

e. Viskositas

Sebanyak 100g gel ekstrak bunga cengkeh digunakan untuk pengujian viskositas. Viskometer dinyalakan dan spindle (batang pengaduk) yang sesuai dipasang, kemudian dicelupkan ke dalam sediaan hingga batas yang ditentukan. Alat dijalankan pada kecepatan putar tertentu (misalnya 12 rpm), dan dibiarkan hingga pembacaan stabil. Nilai viskositas yang ditunjukkan oleh layar viskometer, dalam satuan *centipoise* (cP), kemudian dicatat sebagai hasil pengujian viskositas memenuhi syarat bila 2.000-50.000cps (Saerang *et al.*, 2023).

10. Perhitungan Penggunaan Hewan Coba

Mencit dikelompokkan menjadi 5 yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3. Berikut

merupakan jumlah minimum penggunaan hewan coba yang dihitung menggunakan rumus Federer (Nafi'ah *et al.*, 2020):

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

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

11. Uji Aktivitas Antiinflamasi

a. Pembuatan Larutan Induksi

Sebanyak 0,1 gram karagenan ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml NaCl, kemudian larutan tersebut disuntikkan secara intraplantar dengan volume 0,1 ml ke telapak kaki kiri mencit (Wardani, 2020).

b. Perlakuan Hewan Uji

Uji efektivitas antiinflamasi dilakukan dengan metode induksi edema menggunakan karagenan pada mencit, Hewan percobaan dibagi menjadi lima kelompok:

- 1) Kelompok kontrol negatif yang diberikan basis gel tanpa ekstrak sebagai perlakuan.
- 2) Kelompok kontrol positif yang diberikan gel diklofenak 100 mg.

- 3) Kelompok perlakuan 1 yang diberikan gel ekstrak bunga cengkeh dengan konsentrasi 2% sebanyak 100 mg yang dioleskan sekali pemakaian.
- 4) Kelompok perlakuan 2 yang menerima gel ekstrak bunga cengkeh dengan konsentrasi 2,5% sebanyak 100 mg yang dioleskan sekali pemakaian.
- 5) Kelompok perlakuan 3 yang menerima gel ekstrak bunga cengkeh dengan konsentrasi 3% sebanyak 100 mg yang dioleskan sekali pemakaian.

Setiap mencit disuntik dengan suspensi karagenan sebanyak 0,1 ml secara intraplantar pada telapak kaki kiri untuk menginduksi pembentukan edema. Setelah satu jam, perlakuan topikal diberikan sesuai dengan kelompok masing-masing. Pengukuran volume edema dilakukan secara berkala setiap 1 jam selama 6 jam untuk mengevaluasi efek antiinflamasi dari setiap perlakuan.

Pengukuran tebal lipatan kulit dilakukan setiap satu jam selama enam jam untuk memantau perubahan pembengkakan (Tt). Persentase penurunan pembengkakan dihitung dari perbedaan tebal awal dan tebal setelah perlakuan.

$$\text{Persen Udem} = \frac{Tt - T_0}{T_0} \times 100\%$$

Tt : Presentase Udem

To : Pembengkakan Awal

Selanjutnya, persentase penghambatan udem dihitung dengan membandingkan penurunan pembengkakan antara kelompok kontrol

negatif (a) dan kelompok perlakuan gel (b), Presentase inhibisi menggunakan rumus:

$$\text{Persen Penghambat Udem} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

A: Kontrol Negatif

B: Kontrol Positif F1, F2, F3

c. Analisis SPSS Anova

Pada penelitian ini menghasilkan data berupa analisis deskriptif yaitu hasil uji mutu fisik gel ekstrak bunga cengkeh, serta uji aktivitas antiinflamasi yang mencakup persen udem dan persen inhibisi udem. Hasil pengujian rata-rata penghambatam udem dilakukan analisis data menggunakan SPSS untuk menguji homogenitas dan Anova (Septiadi & Ramadhani, 2020), Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiinflamasi dari gel ekstrak bunga cengkeh. Normalitas data diuji menggunakan uji Shapiro-Wilk, sedangkan homogenitas data diuji menggunakan uji levene. Apabila data normal dan homogen maka dilakukan analisis menggunakan parametrik, namun apabila data tidak normal atau homogen maka dilakukan analisis menggunakan analisis non parametrik yaitu uji Kruskal-Wallis.