

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk menganalisis evaluasi sediaan nanopartikel ekstrak bunga cengkeh, yang meliputi pengukuran distribusi partikel serta persen transmittan yang dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Selain itu, untuk menganalisis aktivitas analgetik dari sediaan tersebut, digunakan metode *writhing test*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Diponegoro (UNDIP) untuk mengetahui kebenaran bunga cengkeh.
- b. Ekstraksi, skrining fitokimia, standarisasi simplisia dan ekstrak dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Pembuatan nanopartikel ekstrak bunga cengkeh di Laboratorium Steril dan Laboratorium Kimia Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- d. Uji *writhing test* dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Juli 2025.

C. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan beberapa alat yaitu blender, ayakan No. 40, timbangan analitik (Ohaus), *Moisture analyzer* (Ohaus), tanur, toples kaca, kertas saring, corong, kain flannel, batang pengaduk, *Rotary evaporator* (RE100-Pro), cawan porselen, *waterbath* (Mettler), pipet tetes, tabung reaksi (Iwaki), rak tabung reaksi, *magnetic stirrer*, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), seperangkat alat gelas (Iwaki), PSA (*Particle Size Analyzer*), Sduit.

2. Bahan penelitian

Penelitian ini menggunakan beberapa bahan yaitu bunga cengkeh, etanol 96% (*Technical grade*), HCl pekat, magnesium, pereaksi Dragendroff dan Mayer, Aquadest, FeCl₃ 1% , Anhidrida asetat, H₂SO₄, Na CMC, Asam asetat glasial, Kitosan (*Food grade*), Na TPP (*Food grade*), Mencit galur Balb/c, natrium diklofenak (*Food grade*).

D. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Indikator	Skala pengukuran	Alat ukur
Simplisia bunga cengkeh	Bunga cengkeh segar yang sudah melewati proses pengeringan di bawah sinar matahari tidak langsung	Lama waktu pengeringan, karakteristik fisik bentuk simplisia, warna dan bau.	Kadar air, dan kadar abu	<i>Moisture analyzer</i> ; dan tanur
Ekstrak bunga cengkeh	Hasil dari proses penarikan metabolit sekunder yang dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96% melalui metode maserasi	Metode dan waktu ekstraksi, serta jenis pelarut	Kadar air	<i>Moisture analyzer</i>
Konsentrasi ekstrak bunga cengkeh	Variasi konsentrasi ekstrak bunga cengkeh yang digunakan (0,5%; 1%; 1,5%)	Presentase ekstrak	Persentase (%)	Timbangan analitik
Konsentrasi nanopartikel ekstrak bunga cengkeh	Variasi konsentrasi ekstrak bunga cengkeh yang digunakan (0,5%; 1%; 1,5%)	Presentase nanopartikel ekstrak	Persentase (%)	Timbangan analitik
Sifat fisik nanopartikel	PDI	Keseragaman ukuran partikel	Numerik desimal	<i>Particle Size Analyzer</i>
	% Transmitan	Kejernihan dan stabilitas dispersi	Persentase (%)	Spektrofotometer UV-Vis
	Ukuran partikel	Diameter rata-rata partikel	Nanometer (nm)	<i>Particle Size Analyzer</i>
Intensitas skala nyeri	Uji yang digunakan yaitu writhing test dengan melihat jumlah gerakan menggeliat yang ditunjukkan mencit setelah diberikan asam asetat	Jumlah gerakan geliat	Frekuensi geliat	Pemantauan visual
	% proteksi	Persentase penurunan	Persentase (%)	Rumus % proteksi

	jumlah geliat mencit		
Efektivitas analgetik	Kemampuan sediaan menurunkan respon nyeri yang ditunjukkan melalui % proteksi	Persentase (%)	Rumus % efektivitas analgetik

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi nanopartikel ekstrak bunga cengkeh dengan konsentrasi yaitu 0,5%, 1%, dan 1,5%.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah karakteristik fisik nanopartikel ekstrak bunga cengkeh dan intensitas skala nyeri.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol penelitian ini yaitu peralatan, suhu, dan waktu yang digunakan dalam prosedur yang dilakukan pada pembuatan nanopartikel ekstrak bunga cengkeh.

F. Prosedur Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Diponegoro (UNDIP) untuk mengetahui kebenaran bunga cengkeh.

2. Pembuatan simplisia

Bunga cengkeh diperoleh dari Kabupaten Pacitan, Jawa Timur. Bunga cengkeh yang diperoleh harus dalam kondisi segar dan hijau, setelah itu di sortasi basah. Bunga cengkeh selanjutnya dicuci dengan air mengalir sampai bersih. Bunga cengkeh yang sudah bersih dan airnya sudah ditiriskan tersebut kemudian dikeringkan dan dijemur dibawah sinar matahari tidak langsung dan ditutup kain hitam. Jika sudah kering, dilanjutkan ke tahapan sortasi kering. Bunga cengkeh yang sudah kering kemudian diserbukkan menggunakan blender sampai halus dan diayak menggunakan ayakan nomor 40 agar dihasilkan serbuk yang lebih halus (Arsyad *et al.*, 2023).

3. Uji standarisasi non spesifik simplisia

a. Uji kadar air

Kadar air dilakukan dengan meletakkan 2 gram simplisia pada piringan timbangan, dan menggunakan alat *moisture analyzer* sehingga dihasilkan persentase kadar air yang dapat dibaca pada layar alat (Nurhidajah *et al.*, 2021).

b. Uji kadar abu

Kadar abu dilakukan dengan terlebih dahulu membakar cawan pengabuan dalam tanur, didinginkan dan ditimbang. Cawan pengabuan dikeringkan dalam oven selama 1 jam dan di suhu 105°C, kemudian didinginkan selama 15 menit, dan ditimbang. Simplisia ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam cawan

pengabuan, dan diletakkan dalam tanur sampai diperoleh abu yang berbobot konstan. Pengabuan dilakukan pada suhu 600°C selama 3 jam, yang selanjutnya didinginkan dan ditimbang (Ndumuye *et al.*, 2022).

4. Proses ekstraksi simplisia

Simplisia bunga cengkeh yang sudah diserbukkan ditimbang sebanyak 500 gram dan dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:5. Simplisia tersebut dibiarkan selama 3x24 jam dan diaduk setiap 3 kali sehari. Maserat yang sudah jadi kemudian dipisahkan menggunakan kain flannel dan dilakukan remaserasi selama 1 hari menggunakan pelarut sebanyak 1.500 ml (1:3). Maserat yang sudah dikumpulkan tadi, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50 °C hingga didapatkan ekstrak semi kental. Tahap ini dilanjutkan lagi dengan dilakukannya pemekatan dan penguapan menggunakan *waterbath* sampai ekstrak yang dihasilkan adalah ekstrak kental (Kulla *et al.*, 2024).

5. Uji standarisasi non spesifik ekstrak

a. Uji kadar air

Uji kadar air yang dilakukan dimulai dengan menimbang 2 gram ekstrak dalam cawan, dan diukur menggunakan alat *moisture analyzer* (Nurhidajah *et al.*, 2021).

b. Uji kadar abu

Kadar abu dilakukan dengan terlebih dahulu membakar cawan

pengabuan dalam tanur, didinginkan dan ditimbang. Cawan pengabuan dikeringkan dalam oven selama 1 jam dan di suhu 105°C, kemudian didinginkan selama 15 menit, dan ditimbang. Ekstrak ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam cawan pengabuan, dan diletakkan dalam tanur sampai diperoleh abu yang berbobot konstan. Pengabuan dilakukan pada suhu 600°C selama 3 jam, yang selanjutnya didinginkan dan ditimbang (Ndumuye *et al.*, 2022).

Berikut merupakan perhitungan kadar abu:

$$\text{Kadar abu} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

Keterangan:

W0 = Berat cawan kosong (g)

W1 = Berat ekstrak awal (g)

W2 = Berat cawan + berat ekstrak setelah diabukan (g)

c. Uji Bebas Etanol

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dicampurkan dengan 2 mL asam asetat dan 2 mL asam sulfat, lalu campuran tersebut dipanaskan. Hasil positif untuk uji bebas etanol ditandai dengan tidak terdeteksinya aroma ester yang khas. Jika aroma ester masih tercium, hal ini menunjukkan bahwa etanol masih terdapat dalam sampel dan bereaksi membentuk ester (Priamsari *et al.*, 2020).

6. Perhitungan rendemen ekstrak

Rendemen menurut Senduk *et al.*, (2020) dihitung dengan rumus

berikut:

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

7. Uji standarisasi spesifik ekstrak

a. Uji organoleptis

Penentuan organoleptik ekstrak dilakukan untuk menggambarkan karakteristik seperti bentuk, warna, bau, dan rasa dengan menggunakan indra manusia (Dayanti *et al.*, 2022).

b. Skrining fitokimia

1) Uji flavonoid

Ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambahkan dengan 10 ml aquadest, dipanaskan dalam penangas air, disaring. Kemudian melarutkan 1 ml etanol 95% dengan 3 butir magnesium. Ekstrak mengandung flavonoid jika terbentuk warna jingga sampai merah.

2) Uji alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan memasukkan ekstrak sebanyak 0,5 gram, aquadest 9 ml, dan HCl 2N 1 ml dipanaskan selama 2 menit di penangas air, didinginkan dan disaring. Setelah itu diberikan 2 tetes reagen dragendroff dan mayer masing-masing ke dalam tabung reaksi yang didalamnya berisi 0,5 ml filtrat. Jika diperoleh endapan atau berwarna keruh maka ekstrak mengandung alkaloid.

3) Uji tannin

Ekstrak sebanyak 5 gram ditambahkan 10 ml aquadest panas, kemudian disaring dan diencerkan dengan aquadest hingga tidak berwarna. Campuran dibagi menjadi 2 tabung reaksi yang masing-masing berisi 2 ml larutan ekstrak dan selanjutnya ditambahkan 3 tetes FeCl_3 . Jika hasilnya berwarna biru kehitaman maka positif mengandung tannin.

4) Uji saponin

Ekstrak 10 mg dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 20 ml air panas, diaduk. Akan terbentuk buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama 30 menit dan tidak hilang setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N. Dinyatakan positif jika terdapat busa yang stabil.

5) Uji fenolik

Uji senyawa fenolik pada ekstrak dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi FeCl_3 (besi (III) klorida). Sejumlah kecil ekstrak diteteskan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 1%. Jika dalam ekstrak terdapat senyawa fenolik, akan terjadi perubahan warna menjadi biru tua, hijau, ungu, atau hitam tergantung pada jenis fenol yang terkandung. Perubahan warna ini menunjukkan adanya gugus fenol yang bereaksi dengan ion besi (III) membentuk kompleks berwarna.

6) Uji steroid

Sebanyak 0,5 gram sampel dilarutkan dalam etanol, ditambahkan eter dan diuapkan hingga kering. Kemudian ditambahkan sekitar 3 tetes anhidrida asetat. Setelah itu, diteteskan 5 tetes asam sulfat (H_2SO_4). Reaksi ini akan menghasilkan perubahan warna larutan menjadi hijau (Tuldjanah *et al.*, 2024).

8. Pembuatan nanopartikel ekstrak bunga cengkeh

a. Pembuatan asam asetat glasial 1%

Larutan asam asetat 1% dapat dibuat dengan cara mengencerkan asam asetat glasial menggunakan air suling atau aquadest. Untuk membuat larutan 1% v/v, sebanyak 1 mL asam asetat glasial ditambahkan ke dalam wadah berisi sebagian aquadest, lalu ditambahkan lagi aquadest hingga mencapai volume total 100 mL (Amaliyah *et al.*, 2018).

b. Pembuatan larutan kitosan 0,2%

0,2 gram kitosan dilarutkan kedalam 100 ml asam asetat glacial 1% dan diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai larut (Arifin *et al.*, 2022).

c. Pembuatan larutan natrium tripolifosfat 0,1%

0,1 gram natrium tripolifosfat dilarutkan dalam 100 ml aquades dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut (Arifin *et al.*, 2022).

d. Pembuatan nanopartikel ekstrak bunga cengkeh

Ekstrak ditimbang 50 mg, 100 mg, dan 150 mg. Selanjutnya, ketiga bobot ekstrak tersebut dilarutkan masing-masing dalam 10 ml pelarut etanol 96% sehingga diperoleh konsentrasi 0,5%, 1%, dan 1,5%. Larutan tersebut kemudian dicampurkan dengan 60 ml larutan kitosan 0,2% dan diaduk pada 300 rpm selama 10 menit, ditambahkan 30 ml larutan Na-TPP 0,1% sehingga didapatkan perbandingan kitosan:NaTPP yaitu 2:1, kemudian diaduk pada kecepatan 300 rpm selama 1 jam hingga homogen (Arifin *et al.*, 2022).

e. Karakterisasi nanopartikel bunga cengkeh

1) Ukuran dan distribusi partikel

Sampel nanopartikel dari ekstrak bunga cengkeh diukur menggunakan metode *Full Range* dengan cara dimasukkan ke dalam *chamber wet dispersion* unit yang telah diisi aquadest, hingga indikator pada komputer menunjukkan warna hijau secara stabil pada rentang skala 10–12, kemudian didiamkan selama beberapa menit hingga proses selesai.

2) Persen transmittan

Sebanyak 1 ml larutan nanopartikel dari ekstrak bunga cengkeh diencerkan menggunakan aquadest hingga mencapai volume total 50 ml. Campuran tersebut

dihomogenkan selama 30 detik menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya, transmitansi nanopartikel dari ekstrak bunga cengkeh dianalisis menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm.

f. Kelompok Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur Balb/c berumur 2–3 bulan dengan berat badan 20–30 gram, yang dibagi secara acak menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kontrol negatif (CMC-Na 1%), kontrol positif (natrium diklofenak), serta tiga kelompok uji yang masing-masing menerima sediaan nanopartikel ekstrak bunga cengkeh dengan konsentrasi 0,5%, 1%, dan 1,5%. Kelompok perlakuan hewan uji dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3. 2 Perlakuan Kelompok Hewan Uji

No.	Kelompok Uji	Perlakuan
1.	Kontrol negatif	CMC Na 0,5%
2.	Kontrol positif	Natrium diklofenak 6,5 mg/kg BB
3.	Kelompok uji 1	Nanopartikel ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 0,5% dengan volume pemberian 1 ml/20 gram BB mencit
4.	Kelompok uji 2	Nanopartikel ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 1% dengan volume pemberian 1 ml/20 gram BB mencit
5.	Kelompok uji 3	Nanopartikel ekstrak bunga cengkeh konsentrasi 1,5% dengan volume pemberian 1 ml/20 gram BB mencit

g. Perhitungan Hewan Coba

Jumlah hewan uji ditentukan menggunakan rumus

Federer, yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$. Berikut merupakan jumlah minimal sampel pada penelitian ini yang dihitung menggunakan rumus Federer (Toemon *et al.*, 2019):

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

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah hewan coba yang dibutuhkan

Berdasarkan rumus diatas, diperoleh jumlah minimal hewan coba setiap kelompok yaitu 5 ekor mencit. Sehingga, total keseluruhan minimal hewan coba yang digunakan sejumlah 25 ekor mencit.

Teknik yang digunakan dalam pengambilan sampel hewan coba menggunakan teknik randomisasi, yaitu dilakukan secara acak. Setelah dibagi secara acak, kemudian mencit akan diberikan label sesuai dengan kategori kelompok.

h. Metode Pengujian Analgetik

1) Pembuatan larutan Na CMC 1%

Larutan Na CMC 1% dibuat dengan melarutkan 1 gram Na CMC ke dalam 100 mL aquadest panas sambil diaduk hingga terbentuk larutan kental yang homogen, sehingga diperoleh larutan Na CMC dengan konsentrasi 1% (Nurfitri *et al.*, 2021).

2) Pengujian aktivitas nanopartikel

Pengujian aktivitas analgetik ekstrak bunga cengkeh dan nanopartikel ekstrak bunga cengkeh dilakukan menggunakan metode *writhing test* menggunakan mencit jantan galur Balb/c dengan kriteria umur 35-60 hari, dalam kondisi sehat, tidak stress (aktivitas normal) dan memiliki berat badan 18-35 gram. Masing-masing kelompok digunakan 5 ekor mencit. Seluruh hewan uji menjalani masa adaptasi selama 7 hari dengan tetap diberikan pakan dan air minum, guna menyesuaikan diri dengan lingkungan percobaan. Pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol negatif: mencit diberi larutan Na CMC 1% secara oral (Dewi *et al.*, 2023).
- b) Kelompok kontrol positif: mencit diberi Natrium diklofenak 6,5 mg/kg BB secara oral (Turnip &

Panjaitan, 2022).

- c) Kelompok uji 1: mencit diberi nanopartikel ekstrak bunga cengkeh 0,5% secara oral dengan volume pemberian 1 ml/20 gram BB.
- d) Kelompok uji 2: mencit diberi nanopartikel ekstrak bunga cengkeh 1% secara oral dengan volume pemberian 1 ml/20 gram BB.
- e) Kelompok uji 3: mencit diberi nanopartikel ekstrak bunga cengkeh 1,5% secara oral dengan volume pemberian 1 ml/20 gram BB.

Dalam penelitian ini, mencit diberi perlakuan berupa injeksi intraperitoneal larutan asam asetat 0,6% dengan dosis 10 ml/kg BB untuk memicu respons nyeri (Delisma *et al.*, 2017). Sebelum pengujian dilakukan, mencit dipuaskan selama kurang lebih 18 jam dengan tetap diberikan air minum. Pada hari pengujian, setiap mencit ditimbang untuk menentukan dosis, lalu dibagi secara acak ke dalam lima kelompok, masing-masing terdiri dari lima ekor. Kelompok-kelompok tersebut meliputi: kontrol negatif yang diberi larutan Na CMC 1%, kontrol positif yang diberi natrium diklofenak dengan dosis 6,5 mg/kg BB, kelompok uji 1 dengan nanopartikel ekstrak bunga cengkeh 0,5%, kelompok uji 2 dengan nanopartikel ekstrak bunga

cengkeh 1%, dan kelompok uji 3 dengan nanopartikel ekstrak bunga cengkeh 1,5%. Semua perlakuan diberikan secara oral. Kemudian setelah 5 menit pemberian larutan uji atau kontrol, seluruh mencit diinduksi dengan larutan asam asetat 0,6% melalui injeksi intraperitoneal untuk menimbulkan nyeri. Setelah itu, jumlah geliat (*writhing*) dihitung selama 60 menit dengan mencatat respon setiap 10 menit untuk mengevaluasi efek analgesik dari masing-masing perlakuan (Amilia *et al.*, 2020).

Adanya respon geliat yang sudah diperoleh, kemudian dihitung menggunakan rumus:

a) % Proteksi geliat

$$\% \text{ Proteksi} = 100 - (P/K \times 100\%)$$

Keterangan:

K = Rata-rata jumlah geliat kontrol negative

P = Rata-rata jumlah geliat perlakuan

b) % Efektivitas analgetik

$$\% \text{ Efektivitas analgetik} = P/KP \times 100\%$$

Keterangan:

P = Persentase proteksi geliat setiap kelompok perlakuan

KP = Persentase proteksi geliat kontrol positif (Pertiwi *et al.*, 2024).

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengamatan, mencakup karakteristik fisik nanopartikel ekstrak bunga cengkeh yang dianalisis menggunakan uji ukuran dan distribusi partikel serta persen transmittan, dan jumlah respon geliat (*writhing*) pada masing-masing kelompok perlakuan dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk*, homogenitas, *One-Way ANOVA* untuk membandingkan nilai rata-rata antar kelompok perlakuan. Jika ditemukan perbedaan signifikan, analisis dilanjutkan dengan uji *post-hoc bonferroni* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda. Semua data diolah menggunakan perangkat lunak statistik seperti SPSS.