

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gigi rusak, lubang gigi dan sakit gigi termasuk di antara masalah kesehatan gigi dan mulut yang paling umum di Indonesia yang mempengaruhi 45,3% populasi negara. Selain itu, 14% penduduk Indonesia menderita abses atau gusi bengkak, yang merupakan masalah kesehatan mulut lainnya (Kemenkes, 2020). Penanganan terakhir terkait masalah kesehatan gigi apabila gigi pasien sudah tidak dapat dirawat lagi adalah pencabutan gigi, yaitu tindakan bedah minor yang melibatkan jaringan keras dan jaringan lunak pada rongga mulut (Motulo et al., 2024). Pencabutan gigi dapat menimbulkan keluhan berupa nyeri. Nyeri yang timbul akibat pencabutan gigi disebabkan oleh respon inflamasi yang terjadi pada lokasi trauma pencabutan gigi (Selvido dkk., 2021). Sebanyak 81,8% pasien dilaporkan mengalami nyeri lokal setelah menerima tindakan pencabutan gigi (Fathima dan Kumar, 2022). Hal ini mengakibatkan terjadinya gangguan tidur yang berdampak pada produktivitas dan psikologis pasien (Shinde et al., 2023; Xu dan Xia, 2020), dan juga telah dilaporkan pada tahun 2022 terdapat 66,7% pasien mengalami penurunan asupan makanan akibat nyeri pascapencabutan gigi (Taniguchi et al., 2022). Keadaan ini menjadikan penanganan nyeri pascapencabutan gigi sebagai tantangan klinis bagi dokter gigi, sehingga terapi farmakologis seperti nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) sering digunakan untuk mengatasi nyeri dan respon inflamasi (Shukla et al., 2024).

Kortikosteroid atau yang sering disebut sebagai obat steroid, adalah obat antiinflamasi paling efektif untuk mengobati berbagai penyakit inflamasi kronis. Namun, obat ini dapat meningkatkan kadar gula darah, tekanan intrakranial dan risiko infeksi internal. Saat ini, penggunaan analgesik telah beralih ke golongan *nonsteroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs), namun obat golongan ini juga berpotensi menyebabkan efek samping pada tiga sistem organ, yaitu saluran cerna, ginjal dan hati. Demikian mekanisme kerja obat ini yaitu menghambat enzim siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2) atau kedua enzim tersebut, dimana kedua enzim ini termasuk enzim oksidoreduktase yang berperan dalam jalur biosintesis prostaglandin dari asam arakidonat, sehingga memiliki peran penting dalam proses nyeri dan inflamasi (Khan et al., 2025; Pangemanan et al., 2025). COX-1 berperan pada perlindungan mukosa dalam kondisi normal atau fisiologis, sedangkan COX-2 berfungsi saat produksi prostaglandin akibat proses inflamasi. Sehingga, mekanisme kerja obat NSAIDs tidak selektif (Qorib et al., 2022). Obat ini juga teridentifikasi bersifat toksik terhadap nefron dengan efek akut dan kronis pada fungsi ginjal karena mempengaruhi hemodinamika ginjal (Klomjit dan Ungprasert, 2022). Studi terbaru membuktikan bahwa pasien yang mengonsumsi NSAIDs memiliki risiko tiga kali lebih besar terhadap penyakit kardiovaskular. Rute pemberiannya yang melalui oral juga berisiko merusak organ seperti lambung dan hati akibat *first pass effect* yang ditimbulkan saat proses metabolisme obat sehingga diperlukan alternatif analgesik yang lebih baik (Kang et al., 2020; Stanos, 2020).

Salah satu alternatif analgesik tanpa efek samping sistemik yang menjanjikan adalah senyawa eugenol (Sulaksana dan Soeginanto, 2022). Bunga cengkeh mengandung minyak atsiri dengan kadar tertinggi (12–15%), diikuti gagang (4–4,5%), dan daun (2–2,4%) (Amin dan Guspiana, 2025). Sebagai perbandingan, daun salam mengandung 12% eugenol (Nenadis et al., 2021), kayu manis sekitar 5–10% (Almatroodi et al., 2020), pala di bawah 5% (Al-Qahtani et al., 2022), sementara basil kurang dari 1% (Zhakipbekov et al., 2024). Eugenol memiliki struktur molekul yang terdiri atas tiga gugus fungsi berbeda yaitu satu hidroksi, satu metoksi dan satu alil yang terikat pada satu gugus benzena (Maahury et al., 2022). Ketiga gugus fungsi ini memungkinkan eugenol memiliki sifat farmakologis analgesik, antibakteri, antiinflamasi, dan neuroprotektif, sehingga berpotensi sebagai zat aktif obat (Aziz et al., 2023). Mekanisme kerja eugenol dalam meredakan nyeri melibatkan beberapa jalur, antara lain penghambatan mediator inflamasi dan modulasi reseptor nyeri. Secara farmakodinamik, eugenol menurunkan nyeri dengan menghambat pembentukan prostaglandin E2 melalui penekanan COX-2 serta menghambat transmisi impuls nyeri melalui modulasi kanal Na^+ dan Ca^{2+} pada saraf perifer (Mochtar, 2025; Husnah et al., 2024). Namun, menurut penelitian Sulaksana dan Soegitanto (2022), bentuk cairan dari sediaan eugenol yang diaplikasikan langsung ke mukosa berpotensi menyebabkan iritasi dan *chemical burn* yang dapat merusak protein sel dan memicu kematian jaringan di dalam rongga mulut. Sehingga diperlukan sediaan dalam bentuk lain yang lebih efektif.

Nanoemulgel merupakan sediaan yang menggabungkan manfaat gel dan nanoemulsi. Komponen gel dari nanoemulgel, yang merupakan sistem koloid dapat meningkatkan viskositas dan kemudahan penyebaran sementara nanoemulsi memiliki ukuran partikel yang sangat kecil dan stabilitas yang tinggi. Dengan demikian, nanoemulgel dapat meningkatkan penetrasi senyawa aktif dan mempertahankan konsentrasi obat yang efektif dalam jangka waktu yang lebih lama (Athallah et al., 2024; Chatzidaki dan Mitsou, 2025). Penelitian oleh Esmaeili et al. (2022) juga telah mengembangkan formulasi minyak cengkeh sebagai sistem penghantaran topikal berbasis nanoemulsi gel dan terbukti memiliki aktivitas analgesik yang signifikan. Namun, masih terbatas pada sediaan konvensional atau nanoemulsi tanpa sistem penghantaran berbasis polimer bioaktif.

Adapun menurut Khan et al. (2025), matriks gel dalam nanoemulgel dapat melepaskan obat secara terkendali dengan penambahan biopolimer. Biopolimer dari kulit udang dapat digunakan karena mengandung kitin. Kandungan kulit udang terdiri dari kitin (15–20%), karbonat kalsium (45%–50%) dan protein (25%–44%). Kitosan adalah polimer yang terbuat dari kitin setelah dihilangkan gugus asetilnya dan terikat oleh ikatan β -1,4-glikosidik. Kitosan dapat digunakan sebagai biopolimer alami yang ramah lingkungan karena sifatnya yang tidak beracun, biokompatibel dan biodegradable sehingga berperan dalam zat pembawa obat, membantu proses osteogenesis dan mempercepat penyembuhan luka (Setiati et al., 2021). Penambahan kitosan dalam formulasi nanoemulgel juga meningkatkan stabilitas sistem nanoemulsi serta memperpanjang waktu kontak sediaan dengan mukosa rongga mulut melalui sifat *mucoadhesive* kitosan. Muatan positif pada gugus amina

kitosan memungkinkan interaksi elektrostatik dengan mukosa yang bermuatan negatif, sehingga meningkatkan retensi sediaan dan mendukung penyerapan eugenol secara lebih efektif. Hal ini diperkuat oleh penelitian sebelumnya yang mengembangkan nanoemulgel berbasis kitosan sebagai sistem penghantaran topikal yang mampu meningkatkan stabilitas sediaan serta retensi zat aktif di kulit. Penambahan kitosan terbukti dapat mengontrol pelepasan dan meningkatkan adhesivitas formulasi tanpa menimbulkan iritasi (Nawa zet al., 2022).

Berdasarkan penjelasan tersebut, riset ini memformulasikan eugenol dari minyak cengkeh yang dikombinasikan dengan kitosan dari kulit udang dalam bentuk nanoemulgel, kemudian dilakukan analisis *in vitro* dan *in vivo* untuk mengevaluasi potensi sediaan sebagai alternatif analgesik pada nyeri pascapencabutan gigi. Analisis *in vitro* dilakukan untuk menilai profil pelepasan zat aktif (eugenol) dari nanoemulgel serta karakteristik fisikokimia sediaan. Sementara itu, analisis *in vivo* dilakukan untuk mengamati waktu mula kerja dan efektivitas analgesik nanoemulgel pada hewan uji yang mengalami kondisi nyeri menyerupai nyeri pascapencabutan gigi.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. bagaimana karakteristik fisikokimia dari nanoemulgel ekstrak minyak bunga cengkeh berbasis kitosan?
2. bagaimana aktivitas pelepasan secara *in vitro* nanoemulgel ekstrak minyak bunga cengkeh berbasis kitosan?
3. bagaimana waktu mulai efek kerja analgesik secara *in vivo* nanoemulgel ekstrak minyak bunga cengkeh berbasis kitosan untuk mengatasi nyeri pascapencabutan gigi?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. mengetahui karakteristik fisik dan kimiawi dari nanoemulgel ekstrak minyak bunga cengkeh
2. menganalisis uji pelepasan secara *in vitro* nanoemulgel ekstrak minyak bunga cengkeh berbasis kitosan
3. mengevaluasi waktu mulai kerja analgesik secara *in vivo* nanoemulgel analgesik dari ekstrak minyak bunga cengkeh berbasis kitosan untuk mengatasi nyeri pascapencabutan gigi

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menemukan inovasi baru di bidang farmasi dan kimia, khususnya dalam pengembangan sistem penghantaran obat yaitu dalam bentuk nanoemulgel dengan bahan aktif alami seperti ekstrak minyak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dengan basis kitosan dari kulit udang sebagai alternatif pengobatan analgesik pascapencabutan dengan efek samping yang minim serta

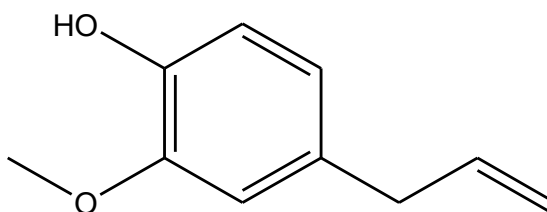
dapat berkontribusi dalam mendukung tercapainya poin ketiga *Sustainable Development Goals* (SDGs), terkhusus pada kesehatan gigi dan mulut yaitu pengobatan analgesik yang dapat mengurangi ketergantungan terhadap obat sintetis yang berpotensi memiliki efek samping.

1.5 Dasar-Dasar Teori

1.5.1 Eugenol

Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) adalah senyawa fenilpropanoid yang terbentuk secara alami dengan rumus molekul $C_{10}H_{12}O_2$ dan berat molekul 164,20 g/mol. Eugenol merupakan cairan berminyak berwarna kuning pucat dengan aroma seperti cengkeh, titik didih sekitar $254\text{ }^{\circ}\text{C}$, titik leleh $-7,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan densitas $1,06\text{ g/cm}^3$ pada $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Eugenol sedikit larut dalam air tetapi mudah larut dalam pelarut organik seperti etanol, eter dan kloroform. Secara struktural, eugenol memiliki cincin benzena yang disubstitusi dengan tiga kelompok fungsional yang berbeda, yaitu kelompok hidroksil ($-\text{OH}$), kelompok metoksil ($-\text{OCH}_3$), dan rantai samping alil ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$). Konformasi struktural berperan penting dalam aktivitas biologisnya. Kelompok hidroksil yang terletak pada posisi orto relatif terhadap kelompok metoksil berkontribusi signifikan terhadap sifat antioksidannya, sementara rantai alil meningkatkan lipofilitas, permeabilitas membran, dan membantu efektivitas biologisnya. Eugenol menunjukkan permeabilitas yang baik melalui membran lipid yang berkontribusi pada waktu penyerapan dan pendistribusian dalam sistem biologis (Faruq dan Ibrahim, 2025).

Sifat farmakologis eugenol sangat beragam, termasuk aktivitas antimikroba, antiinflamasi, analgesik, neuroprotektif, antidiabetes, dan antitumor, yang menjadikannya bahan alami serbaguna yang membantu dalam pencegahan dan pengobatan berbagai penyakit. Eugenol sangat efektif dalam meredakan nyeri dengan mengurangi respons yang terkait dengan nyeri dengan cara menekan beberapa respons terhadap histamin, norepinefrin, dan stimulasi saraf simpatik periarterial serta menghambat sintesis prostaglandin, sehingga umum digunakan sebagai analgesik dan antiseptik gigi. Efek analgesiknya terkait dengan penghambatan kanal Na^+ , K^+ , dan Ca^{2+} yang bergantung pada tegangan (Nisar et al., 2021).



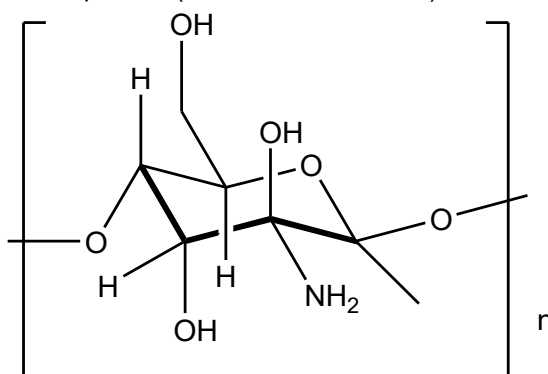
Gambar 1. Struktur molekul eugenol (Nisat et al., 2021).

1.5.2 Kitosan

Kitosan adalah polimer yang bersifat biokompatibel, biodegradable, dan minim

toksisitas yang diperoleh melalui hasil deasetilasi kitin. Secara struktural, kitosan terdiri dari unit β -(1 $\rightarrow$ 4)-linked 2-amino-2-deoxy-D glukosa (D-glukosamin). Sifat fisikokimia dari kitosan yaitu muatan permukaan positif, kemampuan menempel pada mukosa, dan mudah dimodifikasi secara kimia sehingga membuatnya sangat cocok untuk berbagai aplikasi farmakologis. Selain perannya sebagai pembawa obat, kitosan juga menunjukkan aktivitas farmakologis intrinsik seperti efek antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan dan antidiabetes (Dambuza et al., 2025). Studi oleh Putri dan Darmawan (2022) juga membuktikan bahwa kitosan memiliki sifat analgesik yang mampu menurunkan respon nyeri secara signifikan dibandingkan kontrol negatifnya. Dengan demikian, kitosan berpotensi digunakan sebagai bahan aktif alami atau pembawa bioaktif dalam formulasi topikal atau sistem penghantaran obat yang ditujukan untuk mengatasi nyeri dan inflamasi.

Kitosan umumnya diekstraksi dari cangkang udang dan kepiting atau cangkang crustacea yang terdiri dari 30%–50% karbonat kalsium dan 20%–30% kitin. Proses ekstraksi melibatkan tahap demineralisasi, deproteinisasi, dan deasetilasi. Kitosan tidak larut dalam air tetapi larut dalam asam seperti asam klorida dan asam asetat. Kelarutan kitosan dipengaruhi oleh derajat deasetilasi (DD) yang berkisar antara 70 hingga 95% untuk kitosan komersial dimana peningkatan DD secara signifikan dapat mengurangi degradasi kitosan. Struktur kimia kitosan memberikan biokompatibilitas dan biodegradabilitas serta menunjukkan sifat mukoadhesif, yang memungkinkannya melekat pada permukaan mukosa gastrointestinal sehingga pelepasan obat atau penyembuhan ulkus/luka yang lebih lama. Sifat biokompatibilitas kitosan telah dipelajari secara luas untuk aplikasi pengiriman obat dengan rute pemberian yang berbeda, oral, topikal, dan parenteral sehingga dapat memfasilitasi pelepasan obat yang berkelanjutan/terkendali serta mencegah molekul obat terurai melalui enkapsulasi (Gonciarz et al., 2025).

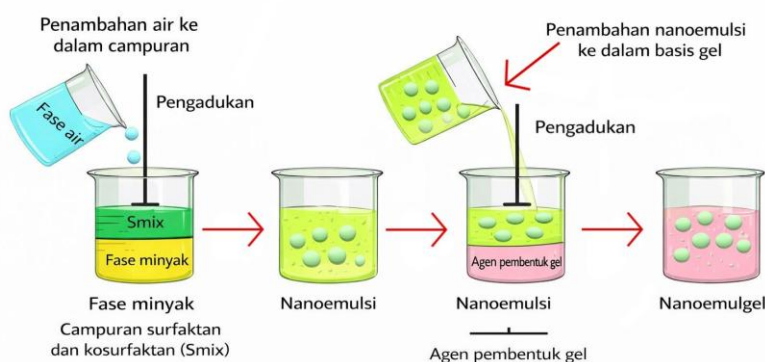


Gambar 2. Struktur molekul kitosan (Dambuza et al., 2025).

1.5.3 Nanoemulgel

Nanoemulgel adalah formulasi inovatif yang menggabungkan keunggulan nanoemulsi dan gel. Nanoemulsi merupakan sistem dispersi koloid termodinamika stabil, yang terdiri dari campuran surfaktan dan kosurfaktan. Ukuran partikel kecil dari

nanoemulsi meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas bahan aktif yang terkandung dalam minyak sehingga dapat masuk ke dalam sistem biologis secara efisien (Ramadhan et al., 2024). Nanoemulsi memiliki viskositas rendah yang terbatas dalam penggunaannya, sehingga alternatif penggunaannya dengan cara dikombinasikan dengan matriks gel dan mengubahnya menjadi nanoemulgel. Sedangkan matriks gel dapat meningkatkan waktu kontak penghantaran obat secara lokal seperti kitosan yang bersifat biokompatibilitas pada mukosa mulut (Donthi et al., 2023). Beberapa keunggulan kitosan lainnya seperti kemampuan untuk memperbaiki sel, bersifat hidrofilik, dapat terurai secara alami, kompatibilitas biologis, nontoksik, dan memiliki aktivitas antimikroba yang luas terhadap bakteri, baik gram positif maupun gram negatif. Kitosan berperan sebagai biopolimer yang digunakan dalam berbagai aplikasi, seperti pengantar obat, bahan pelindung atau pelapis dalam kemasan makanan, pengolahan air limbah dan lain-lain (Widyastuti, 2023).



Gambar 3. Proses pembuatan nanoemulgel (Azeez dan Alkotaji, 2022).

1.5.4 Uji Karakterisasi *In Vitro*

In vitro berasal dari bahasa Latin yaitu 'di dalam gelas', yang artinya yaitu studi atau eksperimen yang dilakukan di dalam laboratorium menggunakan tube laboratorium khusus. Pengujian secara *in vitro* berarti bahwa bagian dari pengujian diambil dari asal material yang diteliti, lalu ditempatkan di dalam alat laboratorium. Pengujian laboratorium dapat dilakukan dengan pengujian secara nondestruktif maupun destruktif terhadap spesimen uji. Pengujian *in vitro* untuk mengembangkan material terbagi dalam beberapa uji, yaitu uji kimiawi, fisis, mekanis serta biologis (Mangunsong et al., 2025; Siswomihardjo et al., 2025).

Pada dasarnya, uji *in vitro* merupakan jenis metode yang dilakukan dalam tabung reaksi, piring kultur sel atau di luar tubuh organisme hidup. Penelitian *in vitro* membutuhkan interaksi antara suatu bahan atau sediaan bahan dengan sel, enzim, atau isolasi dari suatu sistem biologis. Interaksi terjadi secara langsung, dimana bahan langsung berkontak dengan sistem sel tanpa adanya penghalang atau dengan menggunakan penghalang. Uji *in vitro* dapat digunakan untuk mengetahui sitotoksitas atau pertumbuhan sel. Beberapa manfaat uji *in vitro* dibandingkan dengan jenis pengujian biokompatibilitas lainnya yaitu, membutuhkan waktu yang

lebih singkat, biaya yang relatif rendah, dapat dilakukan standarisasi dan dapat dikontrol (Dewata dan Danhas, 2023).

1.5.5 Uji Karakterisasi *In Vivo*

Metode uji *in vivo* adalah suatu pengujian pengembangan obat yang menggunakan organisme hidup seperti hewan percobaan untuk mengevaluasi efek farmakologis, toksikologi, serta farmakokinetik dari sediaan sebelum masuk ke tahap uji klinis pada manusia. Metode *in vivo* dilakukan untuk mengetahui respons biologis terhadap obat dalam organisme hidup secara menyeluruh, dimana tujuan utamanya adalah untuk memahami efek farmakodinamik dan farmakokinetik. Metode *in vivo* mampu memberikan data yang relevan secara biologis yang mendekati kondisi klinis pada manusia. Adapun prosedur pengujian *in vivo* melalui beberapa tahapan yaitu pemilihan model hewan, pemberian dosis, pemantauan dan pengukuran serta analisis data (Parisa et al., 2024).

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cengkeh (*Syzygium aromaticum*), kulit udang, n-Heksana (C_6H_{10}), tween 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$), PEG 400, hidrogen klorida (HCl), natrium hidroksida (NaOH), natrium hipoklorit (NaOCl), karbopol 940, metilparaben ($C_8H_8O_3$), trietanolamin ($C_6H_{15}NO_3$), gliserin ($C_3H_8O_3$), kertas saring Japan 58×58 cm, akuades, *aluminium foil*, kertas saring *Whatman* no. 42, kertas pH universal, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4, hewan coba (tikus galur wistar Jantan), masker, *handscoon*, dan *tissue*.

2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat gelas yang umum digunakan di laboratorium, neraca analitik, *blender*, *soxhlet apparatus extractor* (Pyrex), *rotary evaporator* (Heidolph), cawan porselen, *waterbath* (Memmert WNB14), GC-MS 2010 QP Ultra (Shimadzu), *magnetic stirrer* (DLAB MS-H280 Pro), *magnetic stirrer bar*, *ultrasonic cleaner* (GT-SONIC), vorteks, *zetasizer* (Malvern Instruments ver. 7.11), spektrofotometer UV-Vis (Dynamica HALO XB-10), kuvet, *oven*, corong, pot kecil, batang pengaduk, sendok tanduk, *micropipette* dan *tips*, labu semprot, FTIR (IRPrestige 21 Shimadzu), *ultra-turrax* (IKA 9024222 T-25), botol coklat, pot urin, pH meter (PL-700PV), viskometer Brookfield (NDJ-8S), rotor 4, spindel, *object glass*, *cover glass*, vial bening, lempeng kaca, *orbital shaker* (Optima OS 725), *scalpel*, *spoid onemed*, *stopwatch*, kandang tikus, *pet drinking bottle*, kanula tikus, dan *underpad*.

2.3 Waktu dan Tempat

2.3.1 Waktu dan Tempat Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan April 2024, sampel cengkeh (*Syzygium aromaticum*) diambil di PT. Berkah Arfah Alaisyah (Jual-Beli Hasil 7 Bumi) yang berada di Jl. Kubis No.39, Wajo Baru, Kecamatan Bontoala, Kota Makassar, Sulawesi Selatan, 90151. Sedangkan sampel kulit udang diambil di PT. BOMAR (Shrimp Manufacturing Company) yang berada di Jl. Kima Raya II Kav. N4, Blok B1, Daya, Biringkanaya, Kota Makassar, Sulawesi Selatan, 90241.

2.3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Juli 2024 bertempat di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia, Laboratorium Farmasetika, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin; Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Bioteknologi Pangan, Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin; dan Laboratorium Hewan, Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Ekstraksi Minyak Bunga Cengkeh (Aziz et al., 2023; Tuslinah et al., 2023)

Bunga cengkeh dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Sampel yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 50 g. Kemudian, *soxhlet apparatus extractor* dirangkai dan diekstraksi menggunakan pelarut n-heksana dengan perbandingan 1:10. Ekstraksi dilakukan hingga 15 siklus atau hingga tetesan pelarut tampak jernih. Selanjutnya, ekstrak minyak bunga cengkeh (eMBC) dipisahkan dari pelarutnya menggunakan alat *rotary evaporator* dan disimpan pada *waterbath* untuk menghasilkan ekstrak kental kemudian dianalisis menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS), dengan menginjektikan sebanyak 2 μL yang akan dideteksi oleh alat sehingga menghasilkan data berupa spektrum. Rendemen kemudian dihitung dengan rumus:

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Volume ekstrak yang dihasilkan}}{\text{Berat simplisia yang diekstraksi}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4.2 Formulasi Nanoemulsi (Dimodifikasi dari Azzahro et al., 2022)

Nanoemulsi dibuat dengan memodifikasi riset Azzahro et al (2022) menggunakan metode gom kering yang terdiri atas konsentrasi eMBC 2,5%, 5%, dan 7,5% seperti pada Tabel 1. Nanoemulsi dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* pada kecepatan 500 rpm dan kemudian disonikasi menggunakan *ultrasonic cleaner*.

Tabel 1. Formulasi nanoemulsi eMBC (Azzahro et al., 2022).

Bahan	Konsentrasi (%)		
	NE1	NE2	NE3
eMBC	2,5	5	7,5
Tween 80	30	30	30
PEG 400	15	15	15
Akuades	ad 100	ad 100	ad 100

2.4.3 Karakterisasi Nanoemulsi

Uji Particle Size Analyzer (PSA) dan Polidispersity Index (PDI). Preparasi sampel dilakukan dengan mencampurkan 1 mL preparat nanoemulsi dengan 10 mL akuades menggunakan vorteks selama 1 menit sampai 9 menit hingga homogen. Setiap formula dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Sediaan kemudian diuji dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) (Ma'arif et al., 2023).

Uji Zeta Potential. Sebanyak 2 mL nanoemulsi dimasukan ke dalam kuvet, lalu kuvet yang berisi sampel dimasukan ke dalam holder dan dipilih menu zetapotensial (mV) lalu dibaca nilai zetapotensialnya pada alat *zetasiser* (Andini, 2023).

Uji Persen Transmitan. Sampel nanoemulsi diambil sebanyak 100 μL kemudian diencerkan dengan 5 mL akuades. Campuran divorteks selama 1 menit hingga homogen. Setelah homogen dimasukkan ke dalam kuvet untuk diamati

transmitansinya menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang yang digunakan yaitu 650 nm. Buffer fosfat digunakan sebagai larutan blanko (Ma'arif et al., 2023).

2.4.4 Isolasi dan Karakterisasi Kitosan dari Kulit Udang

Preparasi sampel. Kulit udang dicuci bersih untuk menghilangkan kotorannya, kemudian dikeringkan dengan sinar matahari. Kulit udang yang telah kering kemudian dihaluskan dengan blender dan diayak dengan ayakan berukuran 100 mesh. Kulit udang yang sudah lolos dari ayakan 100 *mesh* kemudian dikeringkan dengan *oven* pada suhu 60 °C selama 24 jam (Pribadi et al., 2022).

Pembuatan Larutan HCl 1,5 M. Akuades dimasukkan ke dalam labu ukur 1 liter sebanyak 250 mL, kemudian tambahkan HCl 37% sebanyak 125 mL secara perlahan. Kocok sebentar kemudian tambahkan akuades sampai tanda batas.

Pembuatan Larutan NaOH 3,5%. Padatan NaOH ditimbang sebanyak 35 g dalam gelas kimia, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga homogen. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 1 liter dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

Pembuatan Larutan NaOCl 0,315%. Larutan NaOCl 10% dimasukkan ke dalam labu ukur 500 mL sebanyak 15,75 mL kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan.

Pembuatan Larutan NaOH 40%. Padatan NaOH ditimbang sebanyak 200 g dalam gelas kimia, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga homogen. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Homogenkan.

Demineralisasi. Demineralisasi serbuk kulit udang ditimbang sebanyak 200 g di dalam gelas kimia lalu ditambahkan dengan larutan HCl 1,5 M perbandingan 1:5 (b/v), dipanaskan pada suhu 75°C di atas *magnetic stirrer hotplate* selama 4 jam, larutan disaring. Residu yang diperoleh dicuci dengan air suling beberapa kali sampai pH netral. Residu dikeringkan dalam *oven* pada suhu 60°C selama 1 jam hingga kering, kemudian didinginkan lalu ditimbang (Ahmad et al., 2020).

Deproteinasi. Deproteinasi kulit udang hasil demineralisasi disimpan di dalam gelas kimia lalu ditambahkan larutan NaOH 3,5% dengan perbandingan 1:10 (b/v), dipanaskan di atas *magnetic stirrer hotplate* pada suhu 70°C selama 4 jam, larutan disaring. Residu yang diperoleh dicuci dengan air suling sampai pH netral, dikeringkan di dalam *oven* pada suhu 70°C selama 1 jam hingga kering, kemudian didinginkan lalu ditimbang (Ahmad et al., 2020).

Depigmentasi. Depigmentasi kulit udang hasil deproteinasi direaksikan dengan NaOCl 0,315% dengan perbandingan 1:10 (b/v) selama 1 jam pada suhu 40°C.

Selanjutnya, disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan akuades hingga pH netral lalu dikeringkan di oven pada suhu 80°C hingga kering kemudian ditimbang (Ridwanto et al., 2023).

Deasetilasi. Deasetilasi kitin hasil deproteinasi dimasukkan ke dalam gelas kimia lalu ditambahkan larutan NaOH 40% dengan perbandingan 1:10 (b/v), dipanaskan pada suhu 40°C di atas *magnetic stirrer hotplate* selama 1 jam, larutan disaring. Residu yang diperoleh dicuci dengan air suling sampai pH netral dan dikeringkan di dalam oven 80°C hingga kering lalu ditimbang (Ridwanto et al., 2023).

Analisis Gugus Fungsi dengan FTIR. Sebanyak 2 mg sampel kitosan, ditambahkan 200 mg KBr (1:100) lalu digerus sampai halus. Campuran sampel dan KBr dimasukan dalam alat pencetak pellet dan ditekan. Film yang terbentuk kemudian dibaca dengan alat FTIR pada panjang gelombang 450-4000 cm (Mardiani et al., 2025).

2.4.5 Formula Basis Gel Kitosan (Dimodifikasi dari Andini et al., 2023)

Formulasi ini dimulai dengan mendispersikan karbopol 940 ke dalam akuades pada suhu 80-100°C menggunakan *ultra-turrax* lalu didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya, ditambahkan metilparaben, trietanolamin (TEA), gliserin dan kitosan kulit udang yang telah dilarutkan pada asam asetat 1% dengan perbandingan 1:10 hingga pH mencapai 5. Campuran kemudian dimasukkan ke dalam basis gel dan diaduk hingga terbentuk massa gel homogen. Formulasi ini dimodifikasi dari riset sebelumnya dengan menambahkan larutan kitosan kulit udang sebagai kombinasi *gelling agent* seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi basis gel kitosan (Andini et al., 2023).

Bahan	Konsentrasi (%)
Karbopol	1,25
TEA	0,6
Metil paraben	0,2
Gliserin	5
Larutan kitosan	5
Akuades	ad 100

2.4.6 Formulasi Nanoemulgel (Indalifiany et al., 2021)

Formulasi nanoemulgel dilakukan dengan menginkorporasi nanoemulsi ke dalam basis gel dengan perbandingan 1:1 seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Formulasi nanoemulgel (Indalifiany et al., 2021).

Formula	Formula NE	Konsentrasi NE (%)	NE : Basis Gel
NEG1	NE1	2,5	1 : 1
NEG2	NE2	5	1 : 1
NEG3	NE3	7,5	1 : 1

2.4.7 Karakterisasi Sediaan Nanoemulgel

Uji Organoleptis. Uji organoleptis dilakukan dengan pengamatan kualitatif yaitu mengamati tampilan fisik sediaan yang meliputi warna, aroma, dan tekstur dari sediaan yang telah dibuat (Wardani et al., 2023).

Uji pH. Uji pH dimulai dengan mengkalibrasi alat pH meter. Larutan standar dengan nilai pH 4 dan 7 digunakan untuk mengkalibrasi alat. Setelah kalibrasi, elektroda direndam dalam campuran nanoemulgel yang telah dilarutkan dengan perbandingan 1:10 menggunakan air suling dan dibiarkan hingga nilai pH yang ditampilkan pada alat tetap konstan (Wardani et al., 2023).

Uji Viskositas. Pengujian viskositas menggunakan alat viskometer, pertama viskometer, sebanyak 50 mL sediaan nanoemulgel dimasukkan ke dalam wadah berbentuk tabung lalu dipasang spindel yang sesuai. Spindel harus terendam di dalam sediaan uji, pastikan sampel tersebar merata pada permukaan cup dan tidak ada gelembung. Kemudian, viskometer dinyalakan dan diatur kecepatan viskometer. Catat pembacaan viskositas yang tertera pada *display* (Andini et al., 2023).

Uji Daya Sebar. Uji daya sebar dilakukan dengan menimbang 0,5 g sediaan kemudian diletakkan di tengah lempeng kaca, ditutup dengan lempeng kaca lainnya dan dibiarkan selama 1 menit. Kemudian diukur diameter penyebaran gel dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari berbagai sisi. Selanjutnya, ditambahkan masing-masing beban seberat 50, 100, 150 dan 300 g lalu ditiadakan selama 1 menit. Dicatat diameter penyebaran gel dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali pengukuran (Wardani et al., 2023).

Uji Daya Lekat. Uji daya lekat dilakukan dengan cara menimbang 0,5 g sediaan kemudian diletakkan di atas kaca objek dan ditempelkan pada kaca objek yang lain kemudian diberi beban sebesar 1 kg selama 5 menit. Kaca objek tersebut dipasang pada alat uji yang diberi beban 80 g dan dihitung waktu yang diperlukan agar kedua kaca objek terlepas. Pengujian dilakukan dengan replikasi hingga diperoleh 3 data pengukuran (Wardani et al., 2023).

2.4.8 Uji Pelepasan Obat secara *In Vitro*

Pembuatan Larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4. Larutan PBS pH 7.4 dibuat dengan KH_2PO_4 sebanyak 1,179 gram, Na_2HPO_4 sebanyak 4,303 gram, dan 9 gram NaCl ke dalam 500 mL akuades. Larutan tersebut dihomogenkan ke dalam gelas kimia 1000 mL, kemudian pH larutan diatur menggunakan pH meter hingga mencapai 7,4 dengan larutan NaOH 0,1 M dan larutan tersebut dipindahkan serta ditambahkan hingga tanda batas pada labu ukur 1000 mL.

Uji Pelepasan Obat. Uji *in vitro* dilakukan menggunakan *orbital shaker* pada 100 rpm dan suhu $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5$ sesuai kondisi fisiologis tubuh. Sampel sebanyak

0,5 g dimasukkan ke dalam membran dialisis dan dimasukkan ke dalam 100 mL PBS pH 7,4 sebagai media. Pencuplikan kemudian dilakukan pada interval tertentu. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui jumlah zat aktif yang terlepas dari sediaan nanoemulgel (Elim et al., 2024).

2.4.9 Uji Analgesik secara *In Vivo* (Liu et al., 2023; Parra et al., 2021)

Hewan coba tikus galur Wistar jantan 9 ekor dengan berat badan sekitar 150-200 g dan usia 2-3 bulan dibagi secara acak ke dalam 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (+) diberikan NSAIDs oral, kelompok kontrol (-) tanpa perlakuan dan kelompok percobaan diberikan formula terbaik nanoemulgel. Tahap ini diawali dengan pembiusan inhalasi menggunakan dietil eter selama 5 menit. Stimulasi nyeri berupa luka insisi sepanjang 7 mm dengan kedalaman mencapai tulang pada punggung tikus yang telah dicukur, diberi luka menggunakan *scalpel*. Reaksi nyeri pada hewan coba seperti *grimace scale* berupa mata berkedut dan *behavior assesment* berupa berkurangnya pergerakan dan punggung meringkuk diamati. Waktu yang dibutuhkan hewan coba untuk bereaksi dicatat sebagai waktu respon terhadap nyeri.

2.4.10 Analisis Data (Zulfikar dkk., 2021)

Riset ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) tiga kali ulangan. Analisis data uji dikerjakan dengan menggunakan metode *Analysis of Variances* (ANOVA). Analisis ini bertujuan untuk memverifikasi variabel-variabel yang berpengaruh secara signifikan. Analisis ini dikerjakan berdasarkan nilai rata-rata data hasil uji yang diperoleh. Analisis statistik dilakukan dengan tingkat ketelitian 95%, dimana perbedaan hasil dinyatakan signifikan apabila *p-value* < 0,05.