

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3. 1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada Oktober 2019 hingga Januari 2020 yang bertempat di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia; Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya; Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Teknologi Farmasi, Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya.

3. 2 Alat dan Bahan

3. 2. 1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik *readability* 0,0001 g (Ohaus[®]), sentrifuge (Universal[®]), vortex (IKA[®]), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu[®] UV-1800), FTIR (Shimadzu[®]), peralatan SDS-PAGE (Bio-Rad[®]), pipet mikro (Socorex[®]), lemari pendingin, *freeze dryer* (Operon[®]), pH meter (Lutron[®]), viskometer *brookfield*, lumpang dan alu, alat-alat gelas (Pyrex[®] dan Iwaki[®]), dan stopwatch.

3. 2. 2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit ikan gabus, kantung dialysis (*Spectra/Por*[®]), NaOH, CH₃COOH, *Bovine Serum Albumin* (BSA), pereaksi Folin- Ciocalteu, pereaksi Lowry A, pereaksi Lowry B, pereaksi Lowry C, Kbr, HCl, kertas milipore, SDS, gel pemisah, gel penahan, gel akrilamid, larutan staining, larutan destaining, buffer sampel Laemmli, merkaptoetanol, *bromphenol blue*, HMPC-60SH, Carbopol[®]940, propilen glikol, metil paraben, propil paraben, trietanolamin, dan akuades.

3. 3 Prosedur Penelitian

3. 3. 1 Preparasi dan Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Gabus

3. 3. 1. 1 Preparasi Kulit Ikan Gabus

Kulit ikan gabus dikumpulkan dari hasil pembuangan limbah di pasar Indralaya. Kulit ikan gabus dibersihkan sisik, daging serta kotoran dengan pisau lalu dicuci hingga bersih dengan air mengalir. Sampel kulit ikan gabus dipotong dengan ukuran 2 x 1 cm. Sampel kulit kemudian disimpan dalam *freezer* lemari pendingin (15°C) sampai sampel tersebut akan digunakan.

3. 3. 1. 2 Ekstraksi Kolagen

Kulit ikan gabus yang telah dipotong direndam dalam larutan NaOH 0,1 N dengan perbandingan 1: 10 (b/v) dengan lama waktu perendaman selama 6 jam. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan protein non-kolagen. Setelah 6 jam, larutan sampel disaring menggunakan kain kassa dan dilanjutkan pencucian dengan dengan akuades dingin hingga mencapai pH netral. Kemudian kulit ikan gabus direndam dalam larutan butyl alkohol 10% selama 18 jam dengan setiap 6 jam larutan diganti. Setelah 18 jam, larutan sampel disaring menggunakan kain kassa dan dilanjutkan pencucian dengan dengan akuades dingin hingga mencapai pH netral. Ekstraksi kolagen dilakukan dengan merendam kulit dalam larutan CH₃COOH 0,5 M dengan perbandingan 1:15 (b/v) selama 24 jam disertai dengan pengadukan secara berkala. Setelah 24 jam, larutan disaring dan filtrat yang diperoleh dipresipitasi dengan penambahan NaCl hingga konsentrasi 0,9 M. Kemudian larutan disentrifus dengan kecepatan 9.000 rpm selama 1 jam pada suhu 4°C. Endapan yang dihasilkan kemudian dilarutkan dalam asam asetat 0,5 M dengan perbandingan 1:5 (b/v), kemudian di dialisis menggunakan kantong

dialisis 12 KDa selama 24 jam dengan akuades. Endapan kolagen yang diperoleh dikeringkan dengan *freeze drier*, kemudian kolagen kering ditimbang (Tabarestani *et al.*, 2012; Muyonga *et al.*, 2004)

3. 3. 2 Karakterisasi Kolagen

3. 3. 2. 1 Rendeman Kolagen

Rendemen kolagen ditentukan berdasarkan perbandingan antara berat kering kolagen yang dihasilkan terhadap berat basah sampel (yang telah dibersihkan) dihitung sesuai persamaan 1 (Shyni *et al.*, 2014).

$$\text{Rendeman kolagen (\%)} = \frac{\text{Berat kolagen kering (g)}}{\text{Berat basah sampel setelah dibersihkan (g)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

3. 3. 2. 2 Analisis Kadar Protein dengan Metode Lowry

Analisis kadar protein total digunakan untuk mengukur jumlah (konsentrasi) total protein dari kolagen yang dihasilkan. Tahap awal analisis kadar potein total dilakukan dengan pembuatan larutan induk *bovine serum albumin* (BSA) dengan konsentrasi larutan stok BSA sebesar 200 µg/mL. Larutan standar dibuat dari larutan induk dengan berbagai macam konsentrasi 25; 50; 75; 100; 125; dan 150 µg/mL. Kemudian dilakukan pembuatan reagen Lowry yang terdiri dari reagen Lowry A (10% Na₂CO₃ dan NaOH 0,5 N), reagen Lowry B (1% CuSO₄.5H₂O), dan reagen Lowry C (Na-K Tartrat 2%), dengan perbandingan 3:1:1.

Larutan standar BSA pada berbagai konsentrasi tersebut diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 0,4 mL reagen Lowry lalu di-vortex dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Selajutnya ditambahkan 0,2 mL reagen Folin-Ciocalteu lalu di-vortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.

Blanko dibuat dengan mencampurkan 1 mL akuades dengan 0,4 mL reagen Lowry lalu di-vortex dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, kemudian ditambahkan 0,2 mL reagen Folin-Ciocalteu lalu di-vortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Sebanyak 1 mL supernatan ekstrak kolagen dimasukkan ke dalam labu takar, lalu ditambahkan 0,4 mL reagen Lowry lalu di-vortex dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, selanjutnya ditambahkan 0,2 mL reagen Folin-Ciocalteu lalu di-vortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.

Tiap-tiap larutan dengan tiga replikasi tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm. Kurva dibuat antara konsentrasi larutan BSA terhadap absorbansi dan persamaan garis yang diperoleh dapat digunakan pada perhitungan kadar protein (Modifikasi Komsa-Penkova *et al.*, 1996).

3. 3. 2. 3 Identifikasi Gugus Fungsi Kolagen

Analisis FTIR digunakan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi khas dari kolagen yang dihasilkan. Kolagen sebanyak 2 mg dihaluskan dengan 100 mg KBr dalam mortar hingga homogen kemudian dimasukkan ke dalam alat FTIR dan diukur pada panjang gelombang 650 – 4000 cm^{-1} . Gugus-gugus fungsi sampel uji ditentukan berdasarkan puncak serapan bilangan gelombang yang terdeteksi dengan wilayah serapan untuk gugus fungsi protein (Arumugam *et al.*, 2018).

3. 3. 2. 4 Penentuan Berat Molekul Kolagen

Penentuan berat molekul kolagen dilakukan menggunakan SDS-PAGE. Gel terdiri dari dua lapis yaitu *separating gel* (gel pemisah) dan *stacking gel* (gel penahan). Konsentrasi gel pemisah yang digunakan sebesar 12% dan gel penahan sebesar 4,5%. Sebanyak 0,5 gram sampel kolagen dilarutkan dalam 10 mL dapar

sampel kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 4 menit. Sebanyak 5 µL sampel dimasukkan ke dalam sumur gel akrilamid. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 150 volt selama 3 jam. Setelah elektroforesis, pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan staining selama 1,5 jam sambil digoyang konstan. Setelah itu, penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dengan larutan destaining selama 1 jam dan kemudian diamati pita-pita protein. Begitu juga pada larutan standar protein, dimasukkan sebanyak 5 µL marker protein dimasukkan ke dalam sumur gel akrilamid. Berat molekul protein sampel dapat ditentukan berdasarkan nilai migrasi pita protein sampel terhadap migrasi pita protein marker (Laemmli, 1970).

Identifikasi dan analisis SDS-PAGE membandingkan antara pita protein yang telah dipisahkan sebelumnya dengan protein standar. Berat molekul dari masing-masing protein ditentukan dengan cara menghitung nilai Rf dari masing-masing pita protein yang tampak. Kurva standar yang dibuat yaitu hubungan antara log BM dengan Rf dari protein standar sehingga didapatkan persamaan garis yang akan digunakan untuk menghitung nilai BM protein sampel.

3. 3. 3 Formula Sediaan *Spray gel*

Formulasi sediaan *spray gel* yang mengandung kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*) dibuat menjadi empat formula. Konsentrasi kolagen diambil berdasarkan penelitian Widayanti dkk. (2016). Dimana konsentrasi kolagen kulit ikan tuna sebesar 2% dapat mempercepat penyembuhan luka bakar. Dengan konsentrasi Carbopol®940 sebesar 0,5-2% dan HPMC-60SH sebesar 0,5-2%. Formulasi sediaan *spray gel* kolagen kulit ikan gabus merupakan hasil modifikasi penelitian Suyudi (2014) yang ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 3. Susunan level faktor variabel bebas

<i>Gelling agent</i>	<i>Low level</i>	<i>High level</i>
Carbopol®940 (%)	0,5	2
HPMC-60SH (%)	0,5	2

Tabel 4 . Formula *spray gel* kolagen kulit ikan gabus

Bahan (b/v)	Fungsi	F1	F2	F3	F4
Kolagen kulit ikan gabus (%)	Zat aktif	2	2	2	2
Carbopol®940 (%)	<i>Gelling agent</i>	0,5	2	2	0,5
HPMC-60SH (%)	<i>Gelling agent</i>	2	2	0,5	0,5
TEA (tetes)	Agen pembasa	10	10	10	10
Propilen glikol (%)	Humektan	15	15	15	15
Metil paraben (%)	Antimikroba	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil paraben (%)	Antimikroba	0,2	0,2	0,2	0,2
Aquadest (gram)	Pelarut	Ad 20	Ad 20	Ad 20	Ad 20

3. 3. 4 Pembuatan *Spray gel*

Sediaan dibuat menjadi 4 formula seperti yang tertera pada Tabel 4. Pembuatan *spray gel* dilakukan diatas wadah yang berisi es dengan tujuan untuk mencegah terjadinya denaturasi kolagen. HPMC-60SH dikembangkan ke dalam akuades yang telah dipanaskan pada suhu 90°C sebanyak 20 kali dari bobotnya. Setelah mengembang digerus hingga membentuk gel yang transparan. Carbopol®940 pada lumpang yang berbeda dikembangkan dengan akuades yang telah dipanaskan pada suhu 90°C hingga terdispersi, kemudian ditambahkan trietanolamin, gerus homogen. Campurkan kedua basis tersebut, gerus hingga homogen. Metilparaben dan propilparaben dilarutkan dalam propilenglikol kemudian dicampurkan ke dalam basis dan digerus hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan serbuk kolagen kulit ikan gabus ke dalam campuran dan gerus hingga homogen. Sisa akuades ditambahkan hingga mencapai bobot 20 gram.

3.4 Evaluasi *Spray gel*

3.4.1 Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan dengan cara melakukan pengamatan terhadap warna, bau, dan tekstur dari sediaan (Djajadisastra dkk., 2009).

3.4.2 Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas *spray gel* dilakukan dengan mengoleskan hasil satu kali semprotan pada sekeping kaca preparat (transparan). Homogenitas sediaan *spray gel* yang baik adalah sediaan yang tidak memiliki partikel padat dan tidak adanya gel yang menggumpal (Suyudi, 2014).

3.4.3 Uji Daya Lekat

Uji daya lekat terdiri dari dua cara, cara pertama dilakukan dengan meletakkan kertas saring yang telah direndam dalam larutan NaCl fisiologis pada bidang dengan kemiringan 40°. Sediaan disemprotkan dengan jarak 3 cm ke arah tengah kertas saring. Dihitung waktu yang dibutuhkan hingga tetesan turun. Cara kedua, uji daya lekat dilakukan dengan menyemprotkan sediaan pada kulit bagian lengan atas manusia dari jarak 3 cm. Setelah disemprotkan dihitung selama 10 detik untuk melihat apakah sediaan menempel atau tetesan dari hasil semprot menetes ke bawah (Kamishita *et al.*, 1992).

3.4.4 Uji Viskositas

Pengukuran viskositas sediaan dengan menggunakan viskometer. Cup yang berisi 30 mL sediaan *spray gel* kolagen kulit ikan gabus diletakkan di alat viskometer dengan memasukkan rotor alat ke dalam gelas beker. Kecepatan alat 62,5 rpm dan amati jarum penunjuk pada alat yang mengarah ke angka pada skala

viskositas. Nilai viskositas ditandai dengan pergerakan jarum yang stabil dan dinyatakan dalam satuan Cp (Febrisiantosa *et al.*, 2013).

3.4.5 Uji *Pump Delivery*

Sediaan disemprotkan ke bagian permukaan kaca arloji yang telah ditimbang bobotnya sebanyak satu kali semprotan, kemudian dihitung berat gel yang keluar. Pengujian dilakukan sebanyak 10 kali, selanjutnya dihitung %CV. Nilai %CV yang diperbolehkan adalah $\leq 5\%$ (Pawar *and* Chaudhary, 2015).

3.4.6 Uji PH

Sediaan spray gel diukur dengan menggunakan pH meter. Sebanyak 1 g sampel gel yang telah diencerkan ke dalam 100 mL aquadest diukur dengan pH meter. Sediaan spray gel yang baik adalah sediaan yang memenuhi kriteria pH kulit yaitu dalam interval 4,5–6,5 (Tranggono dan Latifa, 2007).

3.4.7 Uji Pola Penyemprotan

Sediaan disemprotkan pada selembar plastik yang sudah diukur beratnya, dengan jarak 5 cm. Pada uji ini yang diamati adalah pola pembentukan semprotan, diameter dari pola semprot yang terbentuk (Suyudi, 2014).

3.4.8 Uji Daya Tercuci

Sediaan disemprotkan sebanyak satu kali semprot pada permukaan tangan manusia, kemudian ratakan lalu aliri air hingga noda-noda sediaan hilang. Catat volume air yang digunakan sehingga noda-noda sediaan hilang (Niyogi *et al.*, 2012)

3. 5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengujian sifat fisis gel kemudian akan dianalisis dengan menggunakan aplikasi *Design Expert* dengan metode desain faktorial

sehingga akan diperoleh persamaan interaksi dan *countour plot*. Persamaan interaksi digunakan untuk mengetahui besarnya efek HPMC-60SH, efek Carbopol®940, dan efek interaksinya, sehingga dapat diketahui efek yang dominan dalam menentukan sifat fisis *spray gel*. *Contour plot* sifat fisik spray gel ekstrak kolagen kulit ikan gabus dapat dibuat dari persamaan yang didapat $Y=b_0+b_1X_A+b_2X_B+b_{12}X_AX_B$. Masing-masing *contour plot* digabungkan menjadi *contour plot superimposed* untuk mengetahui area komposisi optimal HPMC-60SH dan Carbopol®940 pada level yang diteliti sehingga diketahui komposisi formula yang optimum.

Tahapan analisis data adalah uji normalitas dan ANOVA. Uji ANOVA bertujuan untuk mengetahui signifikansi efek dari masing-masing faktor yaitu HPMC-60SH dan Carbopol®940 serta interaksi keduanya sehingga dapat diketahui faktor dominan yang mempengaruhi sifat fisis *spray gel* kolagen kulit ikan gabus. Faktor dikatakan memiliki pengaruh signifikan terhadap sifat fisis bila memiliki *p-value* <0,05.