

Formulasi Serum sebagai Penyembuh Luka Bakar Berbahan Baku Utama Serbuk Konsentrat Ikan Gabus (*Channa striatus*)

(Serum Formulation for Burn Wound Healing with The Main Raw Material is Concentrate Powder of Snakehead Fish (*Channa striatus*))

SITI MARDIYANTI*, EFFIONORA ANWAR¹, FADLINA CHANY SAPUTRI²

¹Departemen Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok.

²Departemen Farmakologi, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok.

Diterima 8 Januari 2016, Disetujui 19 Agustus 2016

Abstrak: Ikan gabus (*Channa striatus*) diketahui dapat menyembuhkan luka karena mengandung kadar tinggi protein, asam amino esensial dan asam lemak yang berperan dalam proses penyembuhan luka. Tujuan dari penelitian ini adalah membuat serum sebagai penyembuh luka bakar yang mengandung serbuk konsentrat ikan gabus (*Channa striatus*) yang telah dibuat gelasi ionik dengan kitosan dan natrium tripolifosfat sebagai zat aktif. Serbuk konsentrat ikan gabus dengan konsentrasi 7,5% (formula 1), 10% (formula 2) dan 12,5% (formula 3). Selanjutnya dibuat menjadi serum dengan menggunakan kolagen dan gelatin sebagai bahan pengental. Sediaan serum yang dihasilkan dikarakterisasi *in vitro* dan dievaluasi secara *in vivo* penyembuhan luka bakar derajat dua (*deep partial thickness*) pada kelinci. Suspensi dan serum yang dihasilkan dikarakterisasi secara fisik maupun kimia. Hasil pengukuran suspensi formula 1, 2 dan 3 adalah sebagai berikut: ukuran partikel berturut-turut 42,67-204,23 nm, 70,81-257,11 nm, 128,86-323,68 nm; nilai potensial zeta (+)16,9 mV, (+)18,3 mV, (+)8,4 mV; ketiga formula memiliki partikel berbentuk sferis. Dari hasil uji *in vivo* dan analisa histologi sediaan serum serbuk konsentrat ikan gabus-kitosan tripolifosfat dapat digunakan sebagai penyembuh luka bakar derajat dua dalam.

Kata kunci: serum, gelasi ionik, ikan gabus (*Channa striatus*), kitosan, natrium tripolifosfat, luka bakar derajat dua, histologi.

Abstract: Snakehead fish (*Channa striatus*) has been reported can be used for wound healing because contains high amount of protein, essential amino acids and fatty acids that influenced wound healing. This study was performed to formulate serum for burn wound healing contain concentrate powder of snakehead fish (*Channa striatus*) have been made with gelation ionic using chitosan and sodium tripolyphosphate as an active substances. Concentrate powder of snakehead fish with concentration 7.5% (formula 1), 10% (formula 2) and 12.5% (formula 3). And then formulated to serum using collagen and gelatin as thickening agent. Serum has been formulated, characterized and evaluated *in vivo* for burn wound healing second degree (*deep partial thickness*) on rabbits. Suspense and also serums has been characterized by physicochemical. The results showed that nanoparticle suspenses (formula 1, formula 2 and formula 3) have particle size in range 42.67-204.23 nm, 70.81-257.11 nm, 128.86-323.68 nm; zeta potential (+) 16.9 mV, (+) 18.3 mV, (+) 18.4 mV; all of formulas have sferichal particles. *In vivo* study and analized histology showed that serums from powder concentrate of snakehead fish and chitosan-tripolyphosphate have burn wound healing second degree (*deep partial thickness*) effect.

Keywords: serum, gelation ionic, snakehead fish (*Channa striatus*), chitosan, sodium tripolyphosphate, second degree burn wound, histology.

* Penulis korespondensi, Hp. 085771080672
e-mail: said.sitimardiyanti@gmail.com

PENDAHULUAN

INDONESIA kaya akan bahan alam yang berkhasiat obat, salah satunya adalah ikan gabus (*Channa striatus*) yang banyak ditemukan di wilayah perairan sungai di Kalimantan Selatan. Kadar protein ikan gabus lebih tinggi dibandingkan jenis ikan lain, yaitu mencapai 25,5% lebih tinggi dibandingkan ikan bandeng (20,0%), ikan emas (16,05), ikan kakap (20,0%), maupun ikan sarden (21,1%)⁽¹⁾. Selain daging, bagian lendir (mukus) juga digunakan untuk pengobatan yang berpotensi sebagai antinosiseptif/anestesi⁽³⁾. Ikan gabus mengandung semua asam amino esensial yang dibutuhkan untuk menyembuhkan luka, antara lain arginin, glisin, lisin, prolin, glukosamin, asam D-glukoronat dan karnosin^(4,5). Arginin merupakan prekursor tunggal dari nitrit oksida (NO), sinyal molekuler yang terlibat dalam respon imun, angiogenesis, epitelisasi dan pembentukan jaringan⁽⁶⁾. Glisin bersama dengan alanin, prolin, arginin, serin, isoleusin dan fenil alanin membentuk polipeptida yang akan meningkatkan pertumbuhan dan penyembuhan jaringan⁽⁷⁾. Selain itu, asam arakidonat yang merupakan asam lemak terbesar pada ikan gabus, diketahui sebagai prekursor dari prostaglandin dan tromboxane, keduanya berperan aktif dalam proses penggumpalan darah. Keuntungan menggunakan ikan gabus sebagai penyembuh luka adalah berkurangnya rasa sakit dan iritasi pada kulit⁽²⁾.

Sejumlah data yang dipublikasikan melaporkan bahwa di Indonesia lebih dari 250 jiwa meninggal per tahun akibat luka bakar dan cenderung menunjukkan gejala peningkatan. Luka bakar adalah kerusakan atau kehilangan jaringan yang disebabkan kontak dengan sumber panas seperti api, air panas, bahan kimia, listrik dan radiasi⁽⁸⁾. Luka bakar berdasarkan kedalaman luka dapat diklasifikasi menjadi tiga, yaitu derajat 1 kedalaman luka hanya mengenai lapisan epidermis; derajat 2 kedalaman luka mengenai lapisan dermis (*superficial*) maupun lapisan epidermis dalam (*deep partial*) hingga mengenai bagian kulit lain (kelenjar keringat, kelenjar minyak, folikel rambut); derajat 3 kedalaman luka mengenai semua lapisan kulit, subkutan dan dapat juga mengenai permukaan otot, syaraf, pembuluh darah serta tulang. Proses penyembuhan luka bakar, tidak banyak berbeda dibandingkan luka umumnya⁽⁹⁾. Proses penyembuhan luka merupakan proses biologi alami yang terjadi pada tubuh manusia yang terdiri dari beberapa fase yaitu inflamasi, proliferasi dan maturasi⁽¹⁰⁾.

Kandungan protein dan asam lemak ikan gabus yang dimanfaatkan dalam penelitian ini sebagai zat aktif untuk penyembuhan luka bakar. Sebagai pembawa zat aktif digunakan nanopartikel kitosan-

tripolifosfat hasil taut silang menggunakan metode pembuatan gelas ionik⁽¹¹⁾. Kitosan digunakan untuk nanopartikel karena sifatnya yang biokompatibel, biodegradabel dan tidak toksik. Dalam dunia biomedis, kitosan mempunyai sifat antibakteri dan berpotensi untuk mengobati luka bakar⁽¹²⁾. Kitosan mengalami protonasi dalam suasana asam sehingga membentuk polikation yang dapat membentuk ikatan silang dengan molekul anionik seperti tripolifosfat^(13, 14). Nanopartikel kitosan sangat efisien dan peningkat absorpsi yang bersifat non toksik untuk obat berupa peptida^(14, 15). Dengan digunakannya tripolifosfat sebagai salah satu pasangan ion kitosan, hasil nanopartikel yang didapat lebih stabil dan memiliki karakter penembusan membran yang lebih baik⁽¹⁶⁾. Metode gelas ionik memiliki kelebihan yaitu prosesnya relatif sederhana, mudah, tidak menggunakan pelarut organik dan temperatur tinggi, sehingga dapat digunakan untuk enkapsulasi molekul yang rapuh seperti protein⁽¹⁷⁾.

Pengobatan pada luka bakar menggunakan sediaan topikal lebih banyak dipilih karena jaringan yang mengeras akibat luka bakar tidak dapat ditembus dengan pemberian obat dalam bentuk sediaan oral maupun parenteral. Dalam pengobatan luka bakar, sebagai topikal harus memiliki kualifikasi seperti aktivitas antibakteri spektrum luas, kemungkinan resistensi yang rendah, efek samping yang sedikit dan meminimalkan resiko toksisitas sistemik⁽¹⁸⁾. Saat terjadi luka bakar hebat terjadi pemecahan asam amino tubuh pada otot rangka sangat dominan. Oleh karena itu tubuh memerlukan asam amino yang bertujuan untuk memperbaiki jaringan, memproduksi protein pada fase akut, imunitas seluler dan glukoneogenesis⁽¹⁹⁾. Sebagai obat yang digunakan untuk luka bakar, yang akan kontak secara langsung dengan luka terbuka, perlu untuk memastikan sterilitas dari sediaan untuk menghindari penyebaran penyakit infeksi lain. Radiasi gamma merupakan metode yang paling cocok dan efektif untuk sterilisasi bahan bioaktif karena radiasi tidak menginduksi panas atau substansi yang berefek pada kualitas bahan untuk aplikasi biomedis⁽²⁰⁾. Sterilisasi ini dicapai dengan mengionisasi isotop (⁶⁰Co) pada akselerator voltase tinggi⁽²¹⁾. Untuk mencegah radikal menginduksi degradasi, penambahan antioksidan dapat melindungi protein selama radiasi gamma terhadap oksidasi⁽²²⁾.

Serum atau biasa disebut konsentrat, mengandung substansi aktif biologis sepuluh kali lebih banyak dibandingkan sediaan krim, sehingga lebih cepat dan lebih efektif. Serum memiliki sifat cepat diabsorpsi dan kemampuan untuk berpenetrasi ke lapisan kulit yang lebih dalam⁽²³⁾. Pemilihan sediaan serum dilatar belakangi oleh bentuk sediaan mudah dibuat,

praktis pemakaiannya, mudah meresap kedalam kulit serta memberikan rasa lembut dan lembab setelah digunakan⁽²⁴⁾. Uji aktivitas sediaan topikal ini hanya dilakukan pada kelinci, berdasarkan perhitungan persentase penyembuhan luka dan analisa histopatologi yakni mengamati jaringan kulit secara mikroskopi pada hari akhir pengobatan. Uji histopatologi diperlukan untuk mengetahui adanya pembentukan jaringan atau regenerasi sel pada kulit yang telah diobati. Data persentase penyembuhan luka kemudian dianalisa secara statistika menggunakan program SPSS 16. Dari hasil penelitian ini diharapkan diperoleh formulasi sediaan serum yang mengandung serbuk konsentrat ikan gabus dengan kitosan-tripolifosfat yang berkhasiat menyembuhkan luka bakar secara *in vivo*. Proses penyembuhan luka bakar ini diharapkan berlangsung lebih cepat sehingga mencegah terjadinya infeksi akibat waktu penyembuhannya lama dan memberikan kenyamanan bagi pasien.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Ikan gabus (*Channa striatus*), kitosan (derajat deasetilasi 90%), natrium tripolifosfat, asam asetat glasial, etanol 96%, kolagen cair, gelatin, propilen glikol, metil paraben, BHT, media tioglikolat cair, krim silver sulfadiazin, xylazine injeksi, ketamin injeksi. Hewan uji yang digunakan adalah 6 ekor kelinci putih jantan galur New Zealand berumur 3-6 bulan dengan bobot berkisar 2,5-2,9 kg.

Alat. Peralatan yang digunakan: *Laminar Air Flow* (Lab Conco, USA), autoklaf (Mettler, Jerman), timbangan analitik (Accu-Lab), *freeze dryer*, *waterbath* (Lab-Line Imperial IV, Australia), penangas air (IKA, Jerman), pengaduk magnetik (IKA ®C-MAG HS 7, Jerman), *homogenizer* (Omni-Multimix Inc., Malaysia), *Particle Size Analyzer* (Delsa Nano Seri C Beckman Coulter Inc., Amerika Serikat), *scanning electron microscope* JSM-5310 LV (JEOL Ltd., Jepang), mikroskop transmisi electron JEM-1400 (JEOL Ltd., Jepang), *researchinverted microscope* IX-73 (Olympus, Jepang), kamera digital mikroskop DP-73 (Olympus, Jepang), pH meter tipe 510 (Eutech Instrument, Singapura), viskometer Hoppler (HAAKE, USA), inkubator (Mettler, Jerman), oven kering (Mettler, Jerman), solder listrik *mini station* 938 (Cellkit, Hongkong), peralatan bedah (Gold cross, Australia), Iradiator gamma IRPASANA.

METODE. Pembuatan Suspensi Ikan Gabus-Kitosan Tripolifosfat Metode Gelasi Ionik. Ikan gabus dipotong menjadi bagian lebih kecil dan dibuang bagian kepala serta isi perutnya. Kemudian

digiling, ditambahkan pelarut etanol 70% dan diaduk selama 2 jam. Selanjutnya disaring dan dikumpulkan ampas untuk dikeringkan menggunakan *freeze dryer*. Hasil *freeze dry* kemudian dihancurkan dan diayak sehingga diperoleh serbuk konsentrat protein ikan gabus yang telah dikarakterisasi kandungannya.

Pembuatan suspensi dilakukan dengan metode gelasi ionik. Serbuk ikan gabus ditimbang sesuai dengan formula kemudian dilarutkan dalam larutan kitosan (2 mg/mL). Selanjutnya larutan natrium tripolifosfat (1 mg/mL) dituangkan langsung ke dalam larutan campuran dan distirrer hingga terbentuk suspensi nanopartikel. Konsentrasi serbuk ikan gabus pada formula 1, formula 2 dan formula 3 adalah 7,5%; 10% dan 12,5%.

Karakterisasi Suspensi Nanopartikel. Karakterisasi nanopartikel meliputi penetapan distribusi ukuran partikel, indeks polidispersitas, potensial zeta, pengamatan morfologi dengan TEM. Morfologi permukaan suspensi nanopartikel yang telah dikeringkan dengan SEM.

Pembuatan Sediaan Serum dan Karakterisasi. Basis yang digunakan pada serum adalah kolagen cair, gelatin, propilen glikol, BHT, metil paraben, pewangi dan air. Sediaan serum yang dihasilkan selanjutnya disterilisasi dengan radiasi gamma. Karakterisasi sediaan meliputi uji sterilitas, pengamatan organoleptis, homogenitas, pH, berat jenis dan uji kestabilan fisik sediaan (ICH Guidelines, 2003) dievaluasi selama 12 minggu dan pengamatan dilakukan setiap 2 minggu, meliputi : (a) Uji stabilitas pada suhu kamar, stabilitas sediaan dievaluasi pada suhu (29±2) °C, (b) Uji stabilitas pada suhu panas, dievaluasi pada suhu (40±2) °C, (c) Uji stabilitas pada suhu dingin, dievaluasi pada suhu (4±2) °C, (d) Metode *Cycling test*, sediaan disimpan pada suhu dingin (4±2) °C selama 24 jam kemudian dipindahkan pada tempat penyimpanan bersuhu (40±2) °C selama 24 jam. Perlakuan ini adalah satu siklus. Hal tersebut dilakukan berulang selama 6 siklus.

Uji *In vivo* terhadap Luka Bakar. Pengujian dilakukan dengan mengacu dan memodifikasi penelitian Jurjus *et al*⁽⁹⁾. Dimana sebelumnya dilakukan optimasi terhadap semua formula serum yang telah dibuat. Tiga hari sebelum dibuat luka bakar, bulu disekitar punggung dicukur. Sebelum dilakukan eksperimen, area tersebut diberikan krim penghilang bulu. Kelinci dianestesi dengan injeksi intramuskular ketamin HCl (20 mg/kg) dan xylazine 2% (2 mg/kg) keduanya dicampur sebelum diinjeksikan. Selanjutnya setiap kelinci dibuat luka bakar derajat dua (*deep partial thickness*) sebanyak empat luka. Lempeng tembaga yang telah dimodifikasi dengan solder listrik yang dilengkapi dengan pengatur temperatur elektrik

diatur hingga temperatur menjadi 90 °C, kemudian diaplikasikan selama 20 detik dengan diameter alat 2,5 cm. Setelah dilukai, kelinci kemudian diresusitasi dengan larutan saline fisiologis (1 mL/kg, subkutan). Luka yang terbentuk kemudian diberikan sediaan serum sebanyak 1 g. Hal ini dilakukan secara terus menerus setiap hari selama 21 hari. Pembagian kelompok uji dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pembagian kelompok hewan uji.

| Kelompok | Perlakuan |
|----------|---|
| K1 | Perlakuan (Luka diberikan sediaan serum formula 3) |
| K2 | Kontrol positif (Luka diberikan sediaan krim Silver sulfadiazin) |
| K3 | Kontrol serum (Luka diberikan sediaan serum dari serbuk ikan gabus) |
| K4 | Kontrol negatif (Luka diberikan sediaan serum dari basis) |

Pada masing-masing kelompok hewan uji dilakukan pengukuran luas area luka kemudian dibandingkan antar kelompok. Pengambilan data dilakukan pada hari ke-0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 dan 21. Dihitung diameter area luka yang menandakan luka menutup dan mengalami penyembuhan.

Data persentase penyembuhan luka bakar, rumus perhitungannya :

$$P \% = \frac{d_0 - d_x}{d_x} \times 100 \%$$

Keterangan :

P % : persentase penyembuhan luka

d₀ : diameter luka awal

d_x : diameter luka pada hari pengamatan

Evaluasi Histopatologi. Pada akhir percobaan, kelinci dianastesi hingga mati. Dilakukan biopsi pada jaringan kulit bekas luka kelinci setiap kelompok. Dicuci dengan air mengalir, disimpan dalam BNF (Buffer Netral formalin) 10% selama sekurangnya 24 jam sebelum digunakan. Selanjutnya serial dilusi alkohol (*methyl*, *ethyl*, dan *absolute ethyl*) digunakan untuk dehidrasi. Spesimen dibersihkan dengan xylol dan disimpan dalam parafin pada suhu 56 °C dalam oven selama 24 jam. Selanjutnya dipotong dengan mikrotom 4 µm dan diwarnai dengan pewarna hematoxylin dan eosin untuk uji histopatologi menggunakan mikroskop cahaya elektrik. Uji ini dilakukan untuk melihat morfologi dari kulit kelinci setelah pengobatan dilakukan.

Analisa Data. Data uji aktivitas diperoleh dalam bentuk persentase penyembuhan luka. Dianalisa secara statistika dengan uji ANOVA menggunakan program SPSS 16 jika memenuhi persyaratan berupa data terdistribusi normal dan homogen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Suspensi Ikan gabus-Kitosan Tripolifosfat Metode Gelasi Ionik. Serbuk konsentrat ikan gabus yang dihasilkan berwarna kuning kecoklatan. Suspensi yang dihasilkan juga berwarna kuning kecoklatan, sesuai dengan warna serbuk konsentrat protein ikan gabus yang ditambahkan. Setelah terbentuk suspensi yang telah dikeluarkan dari *homogenizer* nampak adanya busa pada permukaan yang dapat hilang dengan sendirinya setelah didiamkan. Pengadukan dengan kecepatan tinggi ini menyebabkan gelembung-gelembung udara terperangkap dalam struktur protein yang terkandung dalam suspensi sehingga menimbulkan busa.

Karakterisasi suspensi nanopartikel.

Karakterisasi suspensi ikan gabus – kitosan tripolifosfat yang dilakukan pada penelitian ini meliputi penetapan distribusi ukuran partikel, indeks polidispersitas, potensial zeta, pengamatan morfologi dengan TEM. Morfologi permukaan suspensi nanopartikel yang telah dikeringkan dengan SEM. Hasil karakterisasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pembagian kelompok hewan uji

| Formula | Distribusi ukuran partikel (nm) | Indeks polidispersitas | Potensial zeta (mv) | Morfologi (TEM) |
|-----------|---------------------------------|------------------------|---------------------|-----------------|
| Formula 1 | Zaverage = 119,07 | 0,1950 | (+16,9 | Sferis |
| | Dv 10 = 42,67 | | | |
| | Dv 50 = 81,30 | | | |
| Formula 2 | Zaverage = 141,82 | 0,1290 | (+18,3 | Sferis |
| | Dv 10 = 70,81 | | | |
| | Dv 50 = 128,86 | | | |
| Formula 3 | Zaverage = 195,32 | 0,1050 | (+18,40 | Sferis |
| | Dv 10 = 128,86 | | | |
| | Dv 50 = 234,49 | | | |
| | Dv 90 = 323,68 | | | |

Penentuan distribusi ukuran partikel bertujuan untuk melihat pola sebaran partikel didalam suatu sediaan⁽²⁵⁾. Dari hasil pengujian distribusi ukuran partikel menggunakan *Particle Size Analyzer*, suspensi serbuk konsentrat ikan gabus yang diperoleh dengan metode gelasi ionik yang menggunakan kitosan memiliki ukuran nanopartikel (formula 1: 42,67 nm–204,23 nm; formula 2: 70,81 nm–257,11 nm; dan formula 3: 128,86 nm–323,68 nm). Hal ini menunjukkan semakin besar kandungan serbuk konsentrat ikan gabus yang digunakan semakin besar distribusi ukuran partikel yang dihasilkan. Nilai indeks polidispersitas formula 1 adalah 0,1950; formula 2 adalah 0,1290 dan formula 3 adalah 0,1050. Kisaran nilai indeks polidispersitas adalah dari 0 sampai 1. Nilai 0 mengindikasikan dispersi yang homogen,

dan nilai yang lebih besar dari 0,5 menunjukkan heterogenitas yang tinggi⁽²⁶⁾. Hal ini menunjukkan bahwa semua formula memiliki tingkat keseragaman yang baik atau merupakan suspensi yang homogen.

Penentuan potensial zeta merupakan parameter penting yang diperlukan untuk karakterisasi sifat muatan permukaan dan menentukan stabilitas nanopartikel. Nilai potensial zeta yang menunjukkan sistem koloid yang stabil adalah diatas (+)30 mV atau dibawah (-)30 mV, karena besarnya muatan permukaan tersebut dapat mencegah agregasi partikel berdasarkan pada gaya tolak menolak elektrostatik⁽²⁵⁾. Ketika kitosan dan tripolifosfat dicampurkan, secara spontan membentuk kompleks yang tersusun rapat dengan muatan permukaan yang positif⁽¹⁷⁾. Zeta potensial formula 1 adalah (+)16,9; formula 2 adalah (+)18,3; dan formula 3 adalah 18,4.

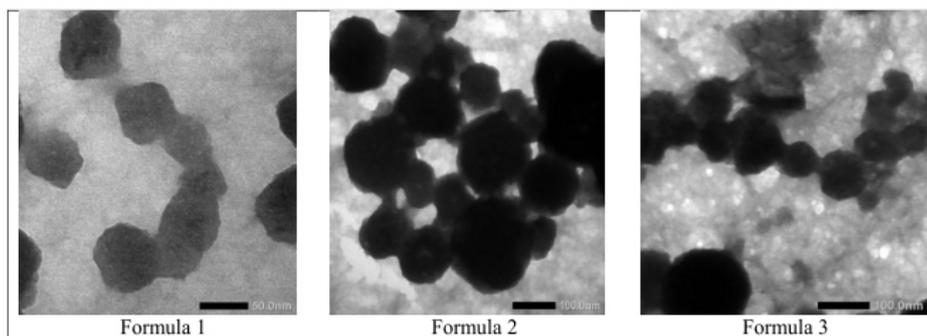
Pada penelitian ini, penggunaan TEM dimaksudkan untuk mengetahui rentang ukuran nanopartikel dan

mengamati morfologi partikel yang dihasilkan dalam berbagai formula suspensi serbuk konsentrat ikan gabus-kitosan tripolifosfat. Dari hasil pengamatan diketahui bahwa bentuk morfologi partikel formula 1, formula 2 dan formula 3 cenderung bulat atau sferis (Gambar 1).

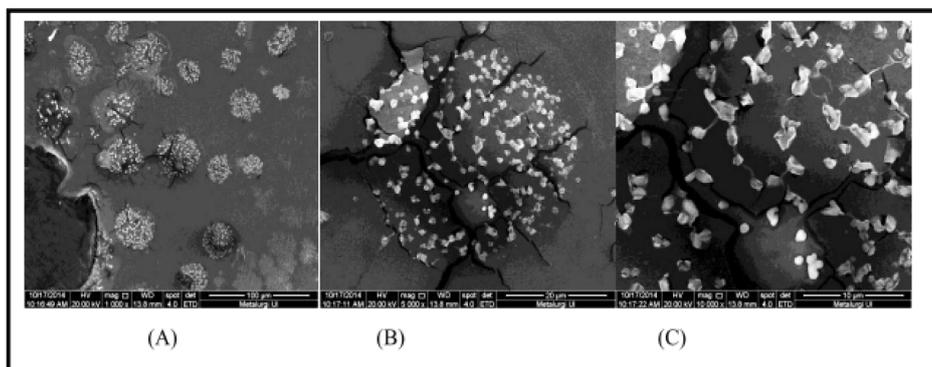
Suspensi nanopartikel yang dihasilkan kemudian dikeringkan dengan menggunakan alat *freeze dryer*. SEM (*Scanning Electron Microscopy*) ini digunakan untuk melihat morfologi serbuk nanopartikel yang mengandung serbuk konsentrat ikan gabus dengan eksipien kitosan-tripolifosfat. Hasil SEM dapat dilihat pada Gambar 2.

Pembuatan Sediaan Serum dan Karakterisasi.

Pada proses pembuatan sediaan serum, digunakan kolagen (*liquid*) dan gelatin sebagai agen pengental. Kolagen dalam industri farmasi telah digunakan sebagai penutup luka⁽²⁷⁾. Gelatin juga digunakan sebagai agen pengental. Gelatin diketahui dapat



Gambar 1. Hasil pengamatan nanopartikel berbagai formula dengan TEM.

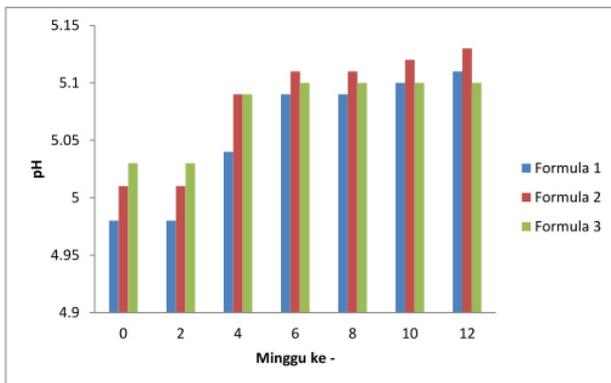


Gambar 2. Hasil SEM serbuk nanopartikel kering : (A) perbesaran 1.000x, (B) perbesaran 5.000x, (C) perbesaran 10.000x.

meningkatkan stabilitas protein pada formulasi cair⁽²⁸⁾. Suspensi ikan gabus-kitosan tripolifosfat digunakan sebagai bahan aktif dengan konsentrasi sebanyak 50%. Hasil evaluasi sediaan serum dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil evaluasi sediaan serum.

| Pengamatan | Formula 1 | Formula 2 | Formula 3 |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Organoleptis | Warna jernih kekuningan, homogen | Warna jernih kekuningan, homogen | Warna jernih kekuningan, homogen |
| pH | 4,98 | 5,01 | 5,02 |
| Berat jenis | 0,918 | 0,916 | 0,910 |
| Sterilitas | Steril | Steril | Steril |



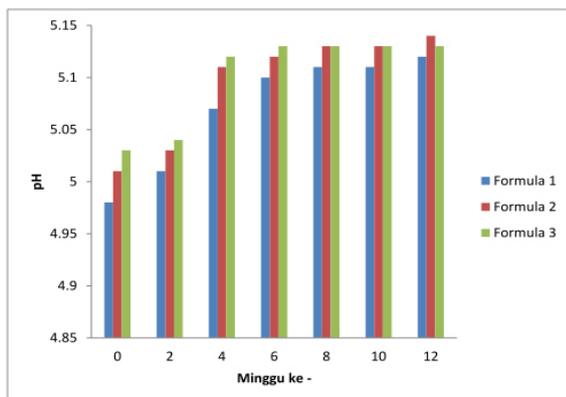
Gambar 3. Hasil pengukuran pH sediaan serum pada suhu kamar (29±2)° C.

Keterangan :

Formula 1 : Serum yang mengandung suspensi nanopartikel dengan konsentrasi 7,5 %

Formula 2 : Serum yang mengandung suspensi nanopartikel dengan konsentrasi 10 %

Formula 3 : Serum yang mengandung suspensi nanopartikel dengan konsentrasi 12,5 %



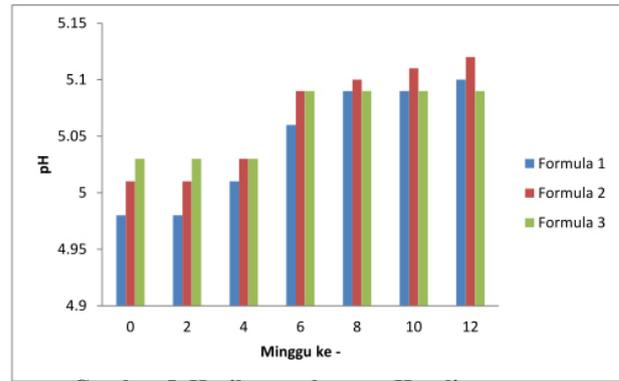
Gambar 4. Hasil pengukuran pH sediaan serum pada suhu panas (40±2)° C.

Keterangan :

Formula 1 : Serum yang mengandung suspensi nanopartikel dengan konsentrasi 7,5 %

Formula 2 : Serum yang mengandung suspensi nanopartikel dengan konsentrasi 10 %

Formula 3 : Serum yang mengandung suspensi nanopartikel dengan konsentrasi 12,5 %



Gambar 5. Hasil pengukuran pH sediaan serum pada suhu dingin (4±2)° C.

Nilai pH pada ketiga formula tersebut memenuhi kriteria pH untuk sediaan kulit yaitu dengan kisaran pH kulit yaitu 4,5–6,5. Hasil pengukuran pH sediaan serum ketiga formula selama 12 minggu pada suhu (29±2) °C, (40±2) °C, (4±2) °C dapat dilihat berturut-turut pada Gambar 3-5.

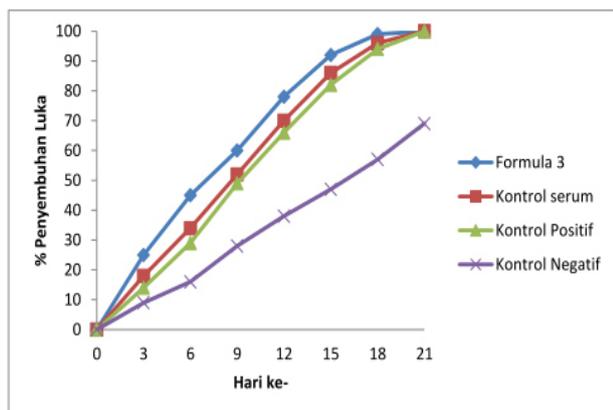
Dari hasil uji kestabilan fisik pada pengukuran suhu kamar (29±2) °C, suhu dingin (4±2) °C, dan suhu panas (40±2) °C tersebut, dapat disimpulkan bahwa formula sediaan serum ikan gabus-kitosan tripolifosfat stabil dalam kondisi penyimpanan pada suhu kamar, suhu dingin, maupun suhu panas dalam jangka waktu penyimpanan selama 12 minggu.

Perlakuan *freeze thaw* diketahui dapat meningkatkan ukuran partikel dari sampel yang merupakan protein, yang diindikasikan dengan flokulasi atau koalesense partikel⁽²⁹⁾. Hasil *cycling test* pada formula 1, formula 2 dan formula 3 (Tabel 4) menunjukkan bahwa sediaan serum yang dihasilkan tidak terjadi pembentukan kristal maupun endapan

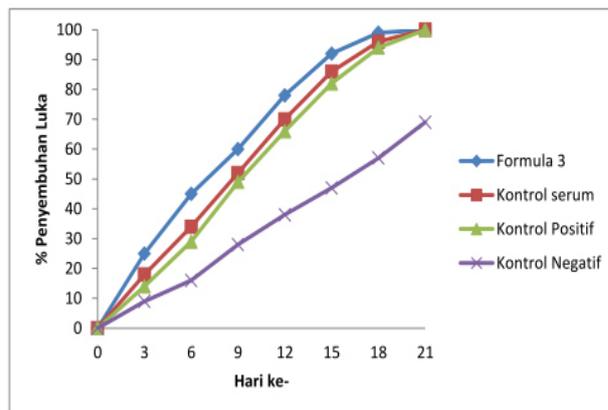
Tabel 4. Hasil cycling test sediaan serum

| Serum | Pengamatan | |
|-----------|---|---|
| | Awal | Siklus ke-6 |
| Formula 1 | Warna : kuning jernih Tidak terbentuk kristal, endapan | Warna : kuning jernih Tidak terbentuk kristal, endapan |
| Formula 2 | Warna : kuning jernih Tidak terbentuk kristal, endapan | Warna : kuning jernih Tidak terbentuk kristal, endapan |
| Formula 3 | Warna : kuning jernih Tidak terbentuk kristal, endapan | Warna : kuning jernih Tidak terbentuk kristal, endapan |

Uji In vivo Terhadap Luka Bakar. Sebelumnya telah dilakukan orientasi untuk menentukan formula terbaik yang akan digunakan untuk uji aktivitas luka bakar secara *in vivo*, dihasilkan bahwa konsentrasi 12,5% yang memiliki grafik antara persentase penyembuhan luka dan hari terbaik bila dibandingkan dengan kontrol negatif (Gambar 6).



Gambar 6. Persentase penyembuhan luka pada berbagai formula.



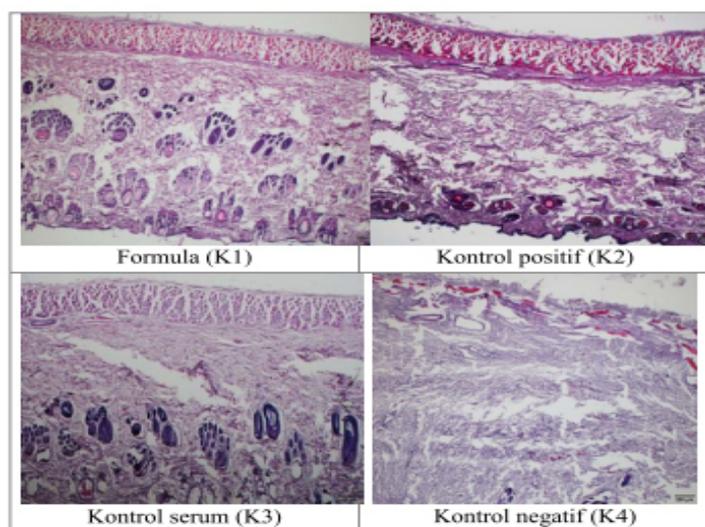
Gambar 7. Persentase penyembuhan luka pada berbagai kelompok uji *in vivo*.

Keterangan :

- Formula 1 : Luka diberikan sediaan serum yang mengandung suspensi nanopartikel dengan konsentrasi 7,5%
- Formula 2 : Luka diberikan sediaan serum yang mengandung suspensi nanopartikel dengan konsentrasi 10%
- Formula 3 : Luka diberikan sediaan serum yang mengandung suspensi nanopartikel dengan konsentrasi 12,5%
- Kontrol negatif : Luka diberikan sediaan basis dari serum

Keterangan

- Perlakuan : Luka diberikan sediaan serum formula 3
- Kontrol serum : Luka diberikan sediaan serum dari serbuk ikan gabus
- Kontrol positif : Luka diberikan sediaan krim Silver sulfa diazin
- Kontrol negatif : Luka diberikan sediaan serum dari basis



Gambar 8. Hasil histologi pada berbagai kelompok uji *in vivo*

Keterangan

- Perlakuan : Luka diberikan sediaan serum formula 3
- Kontrol positif : Luka diberikan sediaan krim Silver sulfadiazin
- Kontrol serum : Luka diberikan sediaan serum dari serbuk ikan gabus
- Kontrol negatif : Luka diberikan sediaan serum dari basis

Dari hasil uji *in vivo* pada penyembuhan luka bakar, serbuk konsentrat ikan gabus-kitosan tripolifosfat yang diformulasikan dalam bentuk serum (K1) terbukti dapat menyembuhkan luka bakar derajat dua (*deep partial thickness*) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif luka bakar yang diobati dengan menggunakan basis dari serum (K4), dan berbeda secara bermakna ($p < 0,05$). Apabila

dibandingkan dengan kelompok kontrol positif luka bakar, yang diobati dengan krim silver sulfadiazin (K2), sediaan serum ikan gabus-kitosan tripolifosfat juga memberikan persentase penyembuhan luka yang lebih baik. Hal ini juga terjadi jika dibandingkan dengan kelompok serum serbuk ikan gabus (K3), memberikan hasil persentase penyembuhan luka yang lebih baik. Persentase penyembuhan luka bakar pada berbagai kelompok uji *in vivo* dapat dilihat

pada Gambar 7. Persentase penyembuhan luka bakar dievaluasi berdasarkan empat skala spesifik⁽⁵⁾.

Evaluasi Histopatologi. Histologi dari penyembuhan luka bakar derajat dua pada semua kelompok diamati pada hari ke 21 setelah perlakuan dapat dilihat pada Gambar 8. Dapat dilihat pada kelompok yang diberikan serum nanopartikel ikan gabus – kitosan tripolifosfat telah terjadi proses re-epitelisasi yang sempurna dimana pada epidermis telah tertutupi dengan baik oleh lapisan epitel baru. Hal ini juga terjadi pada kelompok perbandingan yang diberikan sediaan serum ikan gabus dan kontrol positif yang telah diberikan krim silver sulfadiazin. Tetapi, pada kelompok kontrol negatif proses re-epitelisasi belum sempurna dimana sel epitel yang terbentuk tidak menutupi seluruh lapisan epidermis. Pada kelompok formula, dapat dilihat telah terbentuknya kolagen yang memenuhi seluruh dermis, selain itu juga telah terbentuk banyak kelenjar minyak maupun folikel rambut. Pada kelompok kontrol serum, sudah terbentuk kolagen tetapi belum memenuhi seluruh dermis, dan telah terbentuk kelenjar minyak dan folikel rambut. Pada kelompok kontrol positif, kolagen yang terbentuk lebih sedikit, dan hanya sedikit terbentuk kelenjar minyak dan folikel rambut. Pada kelompok kontrol negatif, kolagen yang terbentuk lebih sedikit dan mulai terlihat adanya pembentukan kelenjar minyak maupun folikel rambut.

Tabel 5. Skala untuk persentase penyembuhan.

| Persentase penyembuhan (P %) | Signifikansi |
|------------------------------|---------------------|
| < 30% | Tidak ada perbaikan |
| 70% > P% ≥ 30% | Perbaikan sedang |
| 100% > P% ≥ 70% | Perbaikan tinggi |
| - 100% | Menyembuhkan |

Berdasarkan kecepatan penyembuhan luka dan uji histologi yang telah dilakukan pada kulit kelinci yang dibuat luka bakar derajat dua (*deep partial thickness*), dapat ditemukan bahwa serum nanopartikel serbuk konsentrat ikan gabus - kitosan tripolifosfat yang dibuat pada penelitian ini efektif dalam proses percepatan penyembuhan luka bakar. Hal ini mengindikasikan serum nanopartikel tersebut dapat digunakan sebagai penyembuh luka bakar dengan sifat penyembuhan luka yang cepat.

SIMPULAN

Serbuk konsentrat ikan gabus (*Channa striatus*) yang diformulasi dengan kitosan dan natrium

tripolifosfat menggunakan metode gelasi ionik menghasilkan ikan gabus-kitosan tripolifosfat dan setelah dikarakterisasi diperoleh hasil formula 1 menghasilkan partikel berukuran 42,67-204,23 nm, potensial zeta (+)16,9 mV, morfologi sferis; formula 2 menghasilkan ukuran partikel 70,81-257,11 nm, potensial zeta (+)18,3 mV, morfologi sferis dan formula 3 menghasilkan ukuran partikel 128,86-323,68 nm, potensial zeta (+)18,4 mV, morfologi sferis. Dari hasil optimasi uji *in vivo* penyembuhan luka bakar, diketahui formula 3 (konsentrasi ikan gabus 12,5%) memberikan persentase penyembuhan luka yang lebih baik dibandingkan formula lain. Hasil analisa histologi, juga memberikan hasil formula 3 memberikan aktivitas penyembuhan yang lebih baik. Hasil uji *in vivo* penyembuhan luka bakar, sediaan serum ikan gabus dengan kitosan dan tripolifosfat menunjukkan aktivitas penyembuhan luka yang lebih baik dibandingkan kelompok uji lainnya. Hasil analisa statistik menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) diperoleh bila dibandingkan kelompok formula dengan kelompok lainnya. Dari hasil analisa histologi, didapatkan aktivitas penyembuhan paling baik pada kelompok serum ikan gabus-kitosan triplifosfat. Sediaan serum ikan gabus-kitosan tripolifosfat menunjukkan aktivitas penyembuhan luka yang lebih baik dibandingkan sediaan serum konsentrat ikan gabus.

DAFTAR PUSTAKA

1. Nugroho M. Uji biologis ekstrak kasar dan isolat albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) terhadap berat badan dan kadar serum albumin tikus mencit. *Jurnal Teknologi Pangan*. 2013. 5(1):16–26.
2. Mat Jais AM, R Fung, E. Bosi, C Platell, R McCauley, K. Croft. Preliminary evidence on the potential of haruan (*Channa striatus*) for wound healing. *Mal. Applied Biol*. 1998. 27:50-51.
3. Mat Jais AM. Pharmacognosy and pharmacology of haruan (*Channa Striatus*), a medicinal fish with wound healing properties. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2007. 6(3):52–60.
4. Baie SH and Sheikh KA. The wound healing properties of *Channa striatus*-cetrinide cream-wound contraction and glycosaminoglycan measurement. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000. 73:15-30.
5. Lay-Harn Gam, Chiuan-Yee Leow, Saringat Baie. Amino acid composition of snakehead fish (*Channa striatus*) of various sizes obtained at different times of the year. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005.3(2): 19–30.
6. Debats IBJG, Wolfs TGAM, Gotoh T, Cleutjens JPM, Peutz-Kootstra CJ, Van der Hulst RRWJ. Role of

- arginine in superficial wound healing in man. Nitric Oxide. 2009. p. 1–9.
7. Zuraini A, Somchit MN, Solihah, MH, Goh YM, Arifah, AK, Zakaria MS, *et al.* Fatty acid and amino acid composition of three local Malaysian *Channa spp.* fish. Food Chemistry. 2006. 97:674-78.
 8. Rismana E, Rosidah I, Prasetyawan Y, Bunga O, Erna Y. Efektivitas khasiat pengobatan luka bakar sediaan gel mengandung fraksi ekstrak pegagan berdasarkan analisis hidrosiprolin dan histopatologi pada kulit kelinci. Buletin Penelitian Kesehatan. 2013. 41(1):45–60.
 9. Jurjus A, Atiyeh B, Abdallah I, Jurjus S, Hayek S, Jaoude M, Gerges A, Tohme R. Pharmacological modulation of wound healing in experimental burns. Burns. 2007. 33:892–907.
 10. Kulac M, Aktas C, Tulubas F, Uygur R, Kanter M, Erboga M, *et al.* The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. Journal of Molecular Histology. 2013. 44:83-90.
 11. Fabregas A, Minarro M, Montoya E, Lozano P, Carrillo C, Sarrate R, *et al.* Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics. 2013. 446:199–204.
 12. Pati F, Adhikari B, Dhara S. Development of chitosan–tripolyphosphate fibers through pH dependent ionotropic gelation. Carbohydrate Research. 2011. 346:2582–88.
 13. Berger J, Reist M, Mayer, JM, Felt O, Peppas N.A, Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical application. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004. 57:19-34.
 14. Tsai LM, Bai WS, Chen RH. Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan–sodium tripolyphosphate nanoparticle. Carbohydrate Polymers. 2008. 71:448–457.
 15. Bhumkar DR, Pokharkar, VB. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A Technical Note. AAPS PharmSciTech. 2006. 7(2):1-6.
 16. Yu HL, Kiran S, Kurt ML, Jyuhn HJ, Fwu, L. M., Han, W. Y., Hsing, W. S. Multi-Ion-Crosslinked Nanoparticles with pH-Responsive Characteristics for Oral Delivery of Protein Drugs. Journal of Controlled Release. 2008. 132:141-149.
 17. Rampino, A, Borgogna M, Blasi P, Bellich B, Caesaro A. Pharmaceutical nanotechnology chitosan anoparticles: Preparation, Size Evolution And Stability. International Journal of Pharmaceutics. 2013. 455:219–28.
 18. Shan YH, Peng LH, Liu X, Chen X, Xiong J, Gao JQ. Silk fibroin/gelatin electrospun nanofibrous dressing functionalized with astragaloside IV induced healing and anti scar effect on burn wound. International Journal of Pharmaceutics. 2015. 479:291 – 301.
 19. Wen X, Zheng Y, Wu J, Yue L, Wang C, Luan J, Wu Z, Wang K. In vitro and in vivo investigation of bacterial cellulose dressing containing uniform silver sulfadiazine nanoparticle for burn wound healing. Natural science : Material International. 2015. 25:197–203.
 20. Singh D, Sing R. Papain incorporated chitin dressings for wound debridement sterilized by gamma radiation. Radiation Physics and Chemistry. 2012. 81:1781–85.
 21. Rogers WJ. Sterilization of biomaterial and medical device. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2012. p. 151-211.
 22. Assemmand E, Lacroix M, Mateescu M, Alexandru. Protective role of l-tyrosine in the sterilization of ceruloplasmin therapeutic protein by gamma-irradiation. Radiation Physics and Chemistry. 2004. 71:403–7.
 23. Shan Sasidharan, Pyarry Joseph, Junise. Formulation and evaluation of fairness serum using polyherbal extracts. International Journal of Pharmacy. 2014. 4(3):105-12.
 24. Mitsui Takeo. New Cosmetic Sciences. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 1998. p. 13–14.
 25. Jahanshahi Monsen dan Babaei. Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. Journal Biotech. 2008. 7(25):4926-34.
 26. Avadi MR, Assal MMS, Nasser M, Saideh A, Fatemeh A, Rassoul D, Morteza R. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2010. 6:58-63.
 27. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. International Journal of Pharmaceutics. 2001. 221:1–22.
 28. Schiffter HA. Pharmaceutical proteins–structure, stability and formulation. Oxford: Elsevier; 2011. p. 522-40.
 29. Jezek J, Rides M, Derham B, Moore, J, Cerasoli E, Simler R, Ramirez BP. Viscosity of concentrated therapeutic protein compositions. Advanced Drug Delivery Reviews. 2011. 63:1107-17.