

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 HASIL

Setelah dilakukan penelitian Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Belut (*Monopterus Albus*) Terhadap Luka Bakar Tikus Putih Jantan *Sprague-Dawley*, diperoleh hasil sebagai berikut :

##### 4.1.1 Karakteristik ekstrak Belut

Belut yang digunakan adalah belut sawah yang diambil dari daerah Bukittinggi. Karakteristik ekstrak dilakukan menurut Parameter standar umum ekstrak ( DepKes RI, 2000). Dari ekstraksi 250 gram belut yang dilakukan dengan cara rendering basah didapatkan ekstrak cair rata-rata 251 gram, warna jernih kekuningan, bau seperti aroma minyak ikan lemah. Pengeringan ekstrak cair dengan Freeze dryer didapatkan rendemen 4,25%, warna serbuk kekuningan dan bau aroma minyak ikan lemah.

##### 4.1.2 Kandungan Asam amino ekstrak belut

Penentuan asam amino ekstrak belut dihitung dengan terlebih dahulu membuat kurva kalibrasi dari asam amino standar. Dari kurva kalibrasi yang dibuat didapatkan  $R^2$  mendekati satu (0,984-0,999). Sampel ekstrak belut terlebih dahulu dihidrolisa, 200 mg ekstrak kering dihidrolisa dengan Teknologi Agilent HPLC (Lampiran 2, Gambar 2.1). Hasil hidrolisa dianalisa dengan HPLC dan luas area kurva dibandingkan dengan asam amino standar. Dari tabel dapat dilihat lima kandungan asam amino utama dari ekstrak belut yaitu glisin, alanin, fenilalanin, lisin dan prolin (Lampiran 2, Tabel 2.1).

##### 4.1.3 Kandungan Asam lemak ekstrak belut

Dengan melihat kemiripan yang tinggi antara fragmen massa asam lemak sampel dan asam lemak standar bank data ( Lampiran 3. Tabel 3.1) maka dapat diketahui kalau asam lemak penyusun ekstrak belut didominasi oleh asam oleat, asam palmitat, asam penta dekanolat, asam stearat dan asam linoleat.

#### 4.1.4. Pemilihan Basis Gel Ekstrak Belut

Pemilihan basis gel yang telah diujikan yaitu PVA, HPMC dan Karbopol, dilakukan dengan memperhatikan secara organoleptis : konsistensi, homogenitas, warna, bau dan kejernihannya. Kadar PVA terendah yang membentuk sediaan kental seperti gel adalah 4% (formula B), 6% (formula F) untuk HPMC dan 0,6% (formula H) untuk Karbopol. Semua sediaan gel tidak berbau (Lampiran 4, Tabel 4.1). Dari pengamatan kejernihan gel yang dihasilkan, basis PVA memberikan hasil yang paling jernih diikuti HPMC dan Karbopol (lampiran 4, gambar 4.2).

Volume air yang dibutuhkan untuk mencuci 1 gram gel pada formula berbasis PVA (formula D) dan formula berbasis HPMC pada formula G dan H merupakan volume terkecil yang digunakan yaitu 10 ml. Formula E, F dan I membutuhkan air 15 ml dan formula lain lebih banyak dari 15 ml (Lampiran 4, Tabel 4.1)

Hasil pengukuran pH sediaan selama 6 minggu terlihat pH gel berbasis PVA berada pada 6,12 sampai 6,22; gel berbasis HPMC berada pada 6,45 sampai 6,88 dan gel berbasis Karbopol 5,66 sampai 7,44 dan tiap minggu mengalami penurunan (Lampiran 4, Tabel 4.3). Semua formula sediaan gel selama penyimpanan 6 minggu tersebut tidak mengalami perubahan konsistensi warna dan bau.

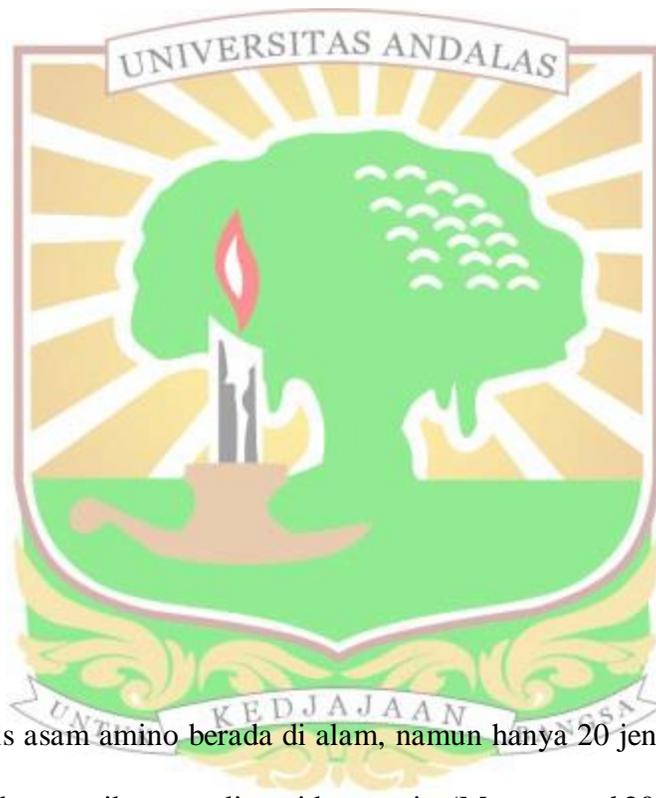
Dari uji iritasi kulit terlihat tidak satupun formula yang mengiritasi kulit. Pengujian daya tercuci yang dilakukan pada masing-masing formula didapatkan volume air yang diperlukan untuk mencuci 1 gram gel (Lampiran 4, Tabel 4.3)

Hasil pengujian dengan Viskometer Stormer menggunakan pembanding gliserin didapatkan sifat alir yang diberikan oleh sediaan formula B adalah pseudoplastis, yaitu kurva naik dan turun berimpit membentuk suatu garis yang melengkung (Lampiran 4, Gambar 4.3)

#### **4.1.5 Uji Luka Bakar Pada Hewan Percobaan**

Dari aklimatisasi pada hewan dipilih hewan yang perbedaan berat badan tiap harinya tidak lebih dari 10% sebanyak 12 ekor. Perbedaan berat badan tertinggi adalah 8,16% . Perbedaan suhu tubuh tertinggi adalah 0,8% .

Uji pengaruh kecepatan penyembuhan luka bakar dilakukan pada tikus putih jantan *Sprague-Dawley*. Data luas luka diperoleh dengan teknik planimetri memperlihatkan kelompok yang diberi ekstrak belut sembuh lukanya pada hari ke 19, kelompok yang diberi salep Levertran dan kelompok yang diberi basis gel mengalami kesembuhan pada hari ke 24 dan kelompok yang diberi gel ekstrak belut sembuh pada hari ke 17. Pengolahan statistik terhadap persentasi kesembuhan luka bakar perhari dengan uji statistik Anova ( $p < 0,05$ ) didapatkan semua kelompok berbeda secara signifikan (Lampiran 5, Tabel 5.1). Uji dilanjutkan dengan analisa statistik Duncan didapatkan bahwa semua kelompok mempunyai perbedaan bermakna satu sama lainnya (Lampiran 5, Tabel 5.2). Pemeriksaan uji Duncan juga dilakukan terhadap persentase kesembuhan luka perhari (Lampiran 5, Tabel 5.3). Uji statistik duncan diperiksa dengan alpha 0,05.



#### 4.2 PEMBAHASAN

Sekitar 30 jenis asam amino berada di alam, namun hanya 20 jenis yang merupakan unit monomer untuk membangun ikatan polipeptida protein (Muray *et al.*2003). Belut kaya dengan protein dan untuk menentukan jenis dan jumlah asam aminonya digunakan HPLC. Semua jenis asam amino non esensial terdapat pada belut (Lampiran 2, Tabel 2.1). Lima kandungan asam amino utama dari ekstrak belut yaitu glisin, alanin, fenilalanin, lisin dan prolin.

Species ikan banyak dijadikan sebagai sumber protein dan asam amino (Babji, 2010). Jika dibandingkan dengan ekstrak ikan haruan (*Channa striatus*) (Febriyenti, 2012) dan ekstrak

ikan tuna (*Thunnus albus*) (Peng, 2013), kandungan utama asam amino ekstrak belut (mg/g ekstrak) sedikit berbeda. Dari tabel 4 berikut dapat dilihat bahwa kadar alanin dan fenil alanin ekstrak belut lebih tinggi dibanding ekstrak ikan haruan. Kandungan glisin, lisin dan prolin ekstrak ikan haruan lebih tinggi dari pada ekstrak belut. Hal ini berbeda jika dibandingkan dengan kandungan glisin ekstrak belut yang lebih tinggi dari kandungan glisin ikan tuna, walaupun kandungan alanin, fenilalanin, lisin dan prolinnya dibawah kadar ikan tuna. Ekstrak ikan haruan telah diformulasikan menjadi sediaan aerosol yang digunakan untuk luka bakar (Febriyenti, 2012). Ekstrak ikan tuna merupakan sumber asam amino dan asam lemak yang banyak digunakan untuk suplemen makanan. Melihat perbandingan kandungan asam amino ekstrak belut dengan kedua ikan tersebut diatas maka ekstrak belut dapat dijadikan sebagai sumber asam amino baik untuk zat gizi ataupun pengobatan luka bakar.

**Tabel 4: Perbandingan Kadar Beberapa Asam Amino Ekstrak Belut Dengan Ekstrak Ikan Haruan Dan Tuna.**

Asam amino	Kadar mg/ gram ekstrak		
	Ekstrak belut	Ekstrak haruan (Febriyenti, 2012)	Ekstrak tuna (Peng, 2013)
Glisin	5,57	6,01	3,75
Alanin	4,39	3,34	5,14
Fenilalanin	2,16	1,01	3,30
Lisin	1,88	2,06	8,19
Prolin	1,84	2,91	3,08

Belut juga mengandung banyak asam lemak. Asam lemak merupakan suatu asam monokarboksilat dengan rantai yang panjang. Asam lemak adalah asam organik berantai panjang

yang mempunyai atom karbon 4-24, memiliki gugus karboksil tunggal dan ujung hidrokarbon nonpolar yang panjang. Hal ini menyebabkan hampir semua lipid bersifat tidak larut dalam air dan tampak berminyak atau berlemak (Nelson *et al.*, 2008).

Identifikasi tiap komponen asam lemak dilakukan dengan membandingkan waktu retensinya dengan standar bank data. *Retention time* merupakan waktu yang diperlukan oleh sampel mulai dari saat injeksi sampai sampel mencapai *peak* maksimum. Pada *peak* asam lemak sampel, dihasilkan nilai *retention time* yang mendekati nilai *retention time* standar asam lemak. Perhitungan konsentrasi masing-masing jenis asam lemak didasarkan pada nilai luas area di bawah kurva tiap *peak* dibandingkan dengan luas area di bawah kurva asam amino standar (Scrimgeour, 2005).

Dari lima jenis asam lemak terbanyak ekstrak belut hasil analisa dengan metoda GC-MS dalam penelitian ini mempunyai jumlah yang berbeda dengan penelitian Razak *et al* pada tahun 2000 seperti terlihat pada tabel 5 dibawah ini. Hal ini diduga karena adanya perbedaan letak geografis, salinitas lingkungan, habitat, umur dan makanan yang dicerna (Ozyurt *et al.*, 2006). Asam lemak penyusun ekstrak belut didominasi oleh asam oleat, asam palmitat, asam penta dekanat, asam stearat dan asam linoleat.

**Tabel 5: perbandingan Kadar Beberapa Asam Lemak Ekstrak Belut**

Asam lemak	mg/g ekstrak belut	
	Hasil penelitian	(Razak et al., 2000)
C18:1n-9 (As.Oleat)	8,17	8,58
C16:0 (As.Palmitat)	7,84	10,75
C15:0 (Penta decanoat)	6,55	-
C18:0 (As.Stearat)	2,05	4,42
C18:2n-6 (Linoleat)	0,73	0,75

Ekstrak belut dirancang menjadi sediaan dalam bentuk gel untuk diujikan pada luka bakar tikus putih jantan *Sprague-Dawley*. Hal ini didasarkan pada beberapa pertimbangan, diantaranya sediaan gel lebih diminati karena mudah dicuci terutama yang berbasis hidrofilik, tidak menimbulkan bekas pada saat pemakaian dan memberikan rasa yang menyejukkan (Walters, 2002; Ghosal *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini dikembangkan suatu formula sediaan gel luka bakar yang mengandung ekstrak belut dengan basis HPMC, PVA dan Karbopol. Dari ketiga basis yang diuji dipilih satu basis pada konsentrasi yang cocok untuk diujikan efektivitasnya terhadap luka bakar. Uji efektivitas dilakukan pada hewan uji tikus putih jantan *Sprague-Dawley*, dengan kontrol negatif (basis gel tanpa zat aktif ekstrak belut), dan sebagai kontrol positif adalah produk yang secara komersial telah teruji khasiatnya, yaitu salep levertran. Salep Levertran dipilih sebagai kontrol positif karena mengandung minyak ikan. Pengambilan konsentrasi ekstrak belut dalam sediaan gel disamakan dengan kadar minyak ikan dalam salep Levertran.

Sediaan gel ekstrak belut yang diformulasi dengan menggunakan basis PVA dengan konsentrasi 2%, 4% dan 6% (formula A, B dan C) membentuk sediaan yang kental dan memiliki konsistensi semi padat kecuali formula A memiliki konsistensi cair. Tingkat kekentalan dari setiap formula bervariasi dan mengalami kenaikan tiap peningkatan konsentrasi basis. Dari semua sediaan gel yang diformulasi memberikan warna bening atau transparan sedikit kekuningan karena pengaruh warna ekstrak yang kuning lemah. Semua sediaan gel terlihat homogen dan tidak berbau. Hasil pengukuran pH berkisar Formula A 6,19 pada formula B 6,20 dan formula C 6,17 PVA sendiri dikembangkan dalam air mempunyai pH 6 (Farmakope Indonesia IV berkisar 5,0 sampai 8,0. Terlihat pH sediaan sedikit naik karena penambahan ekstrak belut yang mempunyai pH 6,9.

Sediaan gel ekstrak belut yang diformulasi dengan menggunakan basis HPMC dengan konsentrasi 2%, 4% dan 6% (formula D, E dan F) membentuk sediaan yang cair pada formula D agak kental untuk formula E dan formula F memiliki konsistensi kental. Tingkat kekentalan dari setiap formula bervariasi dan mengalami kenaikan tiap peningkatan konsentrasi basis. Dari semua sediaan gel yang diformulasi memberikan warna sedikit buram. Semua sediaan gel terlihat homogen dan tidak berbau. Hasil pengukuran pH berkisar antara 6,81 sampai 6,83 dan HPMC sendiri dikembangkan dalam air mempunyai pH 6,5 pH sediaan sedikit naik karena penambahan ekstrak belut yang mempunyai pH 6,9. HPMC stabil dalam bentuk gel dan larutan dengan pH sediaan 3-11 (Rowe, 2009).

Sediaan gel yang menggunakan basis karbopol dengan konsentrasi 0,4%, 0,6% dan 0,8% (formula G, H dan I) dengan trietanolamin membentuk sediaan yang kental dan memiliki konsistensi semi padat pada formula H dan I sedangkan formula G mempunyai konsistensi yang agak kental. Dari semua sediaan gel yang diformulasi memberikan warna sedikit buram. Semua sediaan gel terlihat homogen dan tidak berbau. Hasil pengukuran pH berkisar antara 7,26 dan 7,44 sedangkan karbopol sendiri dikembangkan dalam air mempunyai pH 3,5. Trietanolamin ditambahkan untuk mengatur pH sediaan, pH sediaan menjadi 7,5 setelah penambahan trietanolamin. Hasil pengukuran pH sediaan sedikit menurun karena penambahan ekstrak belut.

Penyimpanan pada suhu kamar dan terlindung cahaya selama 6 minggu terlihat penurunan pH pada gel pada formula G, H dan I dengan basis gel karbopol, ini memperlihatkan ketidak stabilannya selama penyimpanan, pH pada formula berbasis PVA dan HPMC terlihat stabil (Lampiran 4, Tabel 4.2). Semua formula sediaan gel selama penyimpanan 6 minggu tersebut tidak mengalami perubahan konsistensi, warna dan bau. Tidak satupun dari formula yang

mengalami pemisahan selama penyimpanan (WHO, 1996; Bajaj 2012). Dari uraian diatas semua fomula selain formula yang berbasis karbopol dapat dikatakan stabil selama penyimpanan.

Setelah dilakukan uji iritasi pada 3 panelis untuk satu formula dengan uji tempel tertutup pada kulit, tidak satupun memperlihatkan gejala seperti kemerahan dan gatal-gatal pada kulit. Semua formula uji tidak mengiritasi kulit.

Pada semua formula dilakukan uji tercuci untuk mengetahui kemampuan tercucinya. Satu gram gel diletakan di telapak tangan kemudia dialiri air secara terukur (Jellineck, 1970). Volume terkecil (10 ml) yang dibutuhkan untuk mencuci gel terlihat pada formula D, G dan H. Formula E, F dan I memerlukan air 15 ml untuk mencucinya. Sedangkan formula A memerlukan air 20 ml, B (30 ml) dan C (35 ml). Sediaan gel yang baik dapat tercuci dengan mudah (Jellineck, 1970; Walters, 2002; Ghosal *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini dipilih Formula dengan basis PVA 4% atau formula B untuk dilanjutkan pada uji pengaruh terhadap luka bakar tikus, dengan penambahan humektan propilenglikol. Humektan ditambahkan untuk menjaga kestabilan sediaan dan untuk mempertahankan kelembaban kulit (Carter, 1975; Sinko, 2011; Barel, 2009). Pengawet nipagin dan nipasol ditambahkan ke dalam formula mengingat tingginya kandungan air dalam formula. Kandungan air yang tinggi dalam sediaan gel dapat menyebabkan terjadinya kontaminasi mikroba. Penambahan anti oksidan vitamin E ke dalam sediaan berfungsi untuk mencegah penguraian asa-asam lemak dari ekstrak belut yang merupakan zat khasiatnya.

Formula B ini mempunyai warna yang transparan dan pH yang cocok dengan pemakaian untuk kulit yaitu 6,12 sampai 6,22. Formula gel berbasis HPMC berada pada 6,45 sampai 6,88 dan gel berbasis Karbopol 5,66 sampai 7,44 dengan mengalami penurunan tiap minggu penyimpanan. Sediaan untuk digunakan dikulit harus mempunyai pH yang sesuai dengan range

pH normal kulit yaitu 5,0-6,8 (Ansari, 2009). Formula B ini juga stabil pHnya selama penyimpanan sehingga memungkinkan untuk disimpan lama.

Pengujian viskositas bertujuan untuk mengetahui nilai kekentalan suatu zat. Semakin tinggi nilai viskositasnya maka semakin tinggi tingkat kekentalan zat tersebut (Garg et al., 2002). Viskositas mempengaruhi sifat alir, viskositas yang optimum akan mampu menahan zat aktif tetap terdispersi dalam basis gel dan meningkatkan konsistensi gel tersebut. Sifat alir yang diberikan oleh sediaan formula B adalah pseudoplastis, yaitu kurva naik dan turun berimpit membentuk suatu garis yang melengkung (Sinko, 2011). Karena keterbatasan alat, dalam pengukuran viskositas gel, yang seharusnya menggunakan Viskometer Brook Field diganti dengan viskometer Stormer.

Pada hewan uji yang dibakar punggungnya dilihat pengaruh pemberian gel ekstrak belut 10% formula B (basis gel PVA 4%), dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, basis gel dan pemberian ekstrak cair saja. Dari hasil pengukuran luas luka tiap hari terlihat sediaan gel ekstrak belut memberikan kesembuhan yang lebih cepat dari yang lainnya ( $p < 0,05$ ). Kandungan asam-asam amino seperti asam glutamat, asam aspartat, glisin, alanin dan prolin, dari ekstrak belut bersama-sama dengan asam-asam lemaknya dapat mempercepat masa penyembuhan luka (Williams, 2003).

Percepatan penyembuhan luka yang disebabkan asam amino terjadi pada fase proliferasi dan remodeling (Russell, 2001). Penelitiannya memperlihatkan pengaruh kekurangan protein memberikan kontribusi yang kuat terhadap penghambatan pembentukan kolagen. Pada penelitian ini terlihat persen penyembuhan perhari berdasarkan luas luka, pada hari ke lima sampai hari ketujuhbelas didominasi oleh gel ekstrak belut, diikuti ekstrak belut, salep levertran

dan basis gel. Menurut Stashak (2004) pada hari ke 4 sampai hari ke 21 terjadi fase proliferasi dan remodeling.

Kandungan glisin dari ekstrak belut merupakan kandungan terbesar dari asam-asam aminonya. Glisin merupakan sepertiga kandungan terbesar dari asam amino penyusun kolagen, kolagen berfungsi menutupi luka yang dimulai pada masa maturasi dalam masa remodeling (Percival, 1997). Terjadi kontraksi luka, akibat pembentukan aktin myofibroblas dengan aktin mikrofilamen yang memberikan kekuatan kontraksi pada penyembuhan luka. Kolagen tipe III digantikan kolagen tipe I (remodeling) yang dimediasi matriks metalloproteinase yang disekresi makrofag, fibroblas, dan sel endotel. Dalam ekstrak belut juga terkandung asam-asam amino lain penyusun kolagen yaitu, prolin, lisin, dan sistein.

Radang atau inflamasi terjadi pada hari ke 2 sampai ke 4 setelah terjadi luka bakar, fase ini dipercepat dengan adanya asam-asam lemak (Heller, 2000). Pada Lampiran 5, Tabel 5.1 terlihat persentase kesembuhan luka kelompok gel ekstrak belut dan kelompok ekstrak belut mempunyai angka yang tidak berbeda secara signifikan, tetapi berbeda signifikan dengan kelompok salep Levertran dan kelompok basis gel, dimana kelompok yang diberikan ekstrak belut mempunyai persentase yang lebih besar. Hal ini memperlihatkan bahwa asam-asam lemak yang terkandung dalam ekstrak belut mampu memutus masa inflamasi sehingga penyembuhan dipercepat.

Gel ekstrak belut formula B membentuk lapisan tipis dan mengering dikulit, sehingga dapat melindungi kulit dari pengaruh luar seperti kelembaban yang tinggi dan kontaminasi udara, disamping itu PVA sebagai basis gel dapat menyerap cairan luka sehingga luka tetap kering dan ini juga mempercepat penyembuhan luka (Othman, 2011).

