

BAB III

METODE PENELITIAN

Metode yang dilakukan pada penelitian ini adalah metode eksperimental dengan memakai bahan tulang sotong (*Sepia* sp.), kemudian dilakukan determinasi hewan, pembuatan pereaksi, isolasi kitosan, karakterisasi kandungan kimia pada kitosandengan uji menggunakan larutan ninhidrine, analisis gugus fungsi dengan *Spektrofotometer Fourier Transform Infrared* (FTIR), formulasi kitosan dalam sediaan gel dengan konsentrasi. Analisis mutu fisik sediaan hidrogel (pH,viskositas,stabilitas), uji iritasi pada kulit dalam penyimpanan, serta uji antioksidan menggunakan dpph.

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Labroratorium Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Tjut Nyak Dhien dan Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara pada April sampai Juli 2021.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas laboratorium, *blender* (Philips®), *hot plate* (Nuova®), *magnetic stirrer*, pH meter (ATC®), *spektrofotometer fourier transform infra red* (FTIR), termometer.

3.2.2 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah akuades, Cmc - Na, gliserin, kitosanbaku, tulang sotong (*Sepia* sp.), propilenglikol, nipagin ninhidrine.

3.3.1 Pengumpulan sampel

Pengumpulan sampel dilakukan secara purposif. Bahan yang digunakan adalah tulang sotong yang diperoleh dari tempat penampungan ikan ulee lheu Aceh Besar.

3.3.2 Determinasi hewan

Determinasi hewan dilakukan di laboratorium sistematika hewan, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Studi Pascasarjana Universitas Sumatera Utara.

3.3.3 Pengolahan sampel

Tulang sotong yang diperoleh ditimbang, dibersihkan dan dikeringkan. Tulang sotong kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk dan ditimbang kembali.

3.4 Pembuatan Pereaksi

1. Pembuatan larutan NaOH 3,5%

Ditimbang 3,5 g pelet natrium hidroksida dimasukkan kedalam *beaker glass* dilarutkan dengan sebagian akuades aduk sampai larut dengan batang pengaduk sampai benar-benar larut, kemudian cukupkan hingga 100 ml.

2. Pembuatan HCl 1N

Diencerkan 83 ml asam klorida dengan aquadest hingga 1000 ml. (Ditjen POM, 1995).

3. Pembuatan larutan NaOH 50%

Ditimbang 50 g pelet natrium hidroksida dimasukkan kedalam *beaker glass* dilarutkan dengan sebagian akuades aduk sampai larut dengan batang pengaduk sampai benar-benar larut, kemudian cukupkan hingga 100 ml.

4. Indikator Ninhidrin 0,1%

Ditimbang 0,1 g serbuk ninhidrin dimasukkan kedalam *beaker glass* dilarutkan dengan sebagian akuades aduk sampai larut dengan batang pengaduk sampai benar-benar larut, kemudian cukupkan hingga 100 ml.

5. Pembuatan larutan induk baku DPPH

Ditimbang sejumlah 10 mg DPPH, kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 25 mL, volumenya dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 400 µg/mL (400 ppm)

3.5 Isolasi Kitosan dari Tulang Sotong

Proses isolasi kitosan dilakukan berdasarkan penelitian sebelumnya (Gaikward, dkk., 2015). Isolasi kitosan meliputi 3 tahap dasar yaitu deproteinisasi, demineralisasi dan deasetilasi. Sampel tulang sotong yang telah dihaluskan direndam dengan pelarut NaOH 3,5% selama 2 jam pada suhu 65°C dengan pengadukan konstan pada rasio 1:10 (w/v) (deproteinisasi). Hasil dari deproteinisasi dilakukan perendaman dengan pelarut HCl 1N selama 30 menit pada suhu ruangan dengan rasio 1:15 (w/v) (demineralisasi). Deasetilasi kitin dilakukan pada suhu 121°C menggunakan larutan natrium hidroksida 50% selama 15 menit dengan rasio 1:10(w/v). Setelah ini sampel disaring, dicuci dengan akuades sampai pH netral dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C selama 24 jam.

3.6 Uji Ninhidrine

Seberat 0,1 g kitosan yang diperoleh dari penelitian ditempatkan dalam suatu wadah dan disemprotkan dengan larutan ninhidrine kemudian didiamkan selama 5 menit. Diamati perubahan yang terjadi, jika sampel berubah warna menjadi ungu maka benar adanya gugus amina dalam sampel.(Agustina, dkk, 2015

3.7 Karakterisasi kitosan tulang sotong dengan *Spektrofotometry Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Sampel uji terlebih dahulu dibentuk pelet dengan campuran KBr. Sebanyak 100 μ g KBr dan 10 μ g sampel uji dicampurkan, kemudian ditumbuk sampai halus dan tercampur rata dalam mortar agate. Campuran tersebut dicetak dalam cetakan pelet. Pengukuran sampel uji dilakukan pada bilangan gelombang antara 4000-500 cm^{-1} . Spektra FTIR yang dihasilkan menunjukkan puncak-puncak serapan bilangan gelombang dari sampel uji. Gugus-gugus fungsi sampel uji ditentukan berdasarkan puncak serapan bilangan gelombang yang terdeteksi dengan wilayah serapan untuk gugus fungsi kitosan (Shanmugam, dkk., 2016).

3.8 Formula sediaan gel

Berdasarkan formula (widaningsih, dkk., 2016)

Ekstrak kitosan tulang sotong	2	g
CMC	5	g
Propilen glikol	5	g
Nipagin	0,1	g
Gliserin	10	g
Aquadest ad	100	ml

3.8.1 Prosedur pembuatan gel

Aquadest dipanaskan pada suhu 50°C, masukkan kedalam lumpang secukupnya tambahkan Na-CMC diaduk cepat sampai homogen (Massa 1). Dalam beackerglass masukkan aquadest 100ml dan letakkan diatas hotplate magnetic stirrer dengan kecepatan pengadukan 400 rpm dan suhu 50°C, masukkan massa 1, propilenglikol dan gliserin tunggu hingga larut, terakhir

masukkan nipagin dan tunggu 1-2 jam hingga terbentuk gel yang homogen lalu masukkan kedalam wadah.

3.9 Evaluasi Sediaan Gel

3.9.1 Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan dengan melakukan pengamatan terhadap bentuk, warna dan bau dari sediaan yang telah dibuat. (Ikhsanudin dan Mardhiyah, 2017)

3.9.2 Uji Ph

Kelarutan kitosan merupakan salah satu parameter yang dapat dijadikan sebagai standar penilaian mutu kitosan. Semakin tinggi kelarutan kitosan berarti mutu kitosan yang dihasilkan semakin baik. Kitosan dilarutkan dalam asam setat dengan konsentrasi 2% dengan perbandingan 1:100 (g/ml). (Agustina, dkk, 2015)

3.9.5 Uji Viskositas

Uji viskositas dilakukan dengan cara memasukkan sediaan sebanyak 100 mL ke dalam wadah berbentuk tabung lalu dipasang spindle yang sesuai. Spindle harus terendam dalam sediaan uji. Dinyalakan viskometer dan diatur kecepatan viskometer. Angka konstan yang ditunjukkan oleh viskometer merupakan nilai viskositas dari sediaan (Sindy vellayanti, 2020).

3.10 Uji Aktivitas Antioksidan pada Sediaan

Pada aktivitas antioksidan pada sediaan meliputi : pembuatan larutan induk baku DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*), penentuan panjang gelombang serapan maksimum, pengukuran *operating time*, pengukuran absorbansi DPPH tanpa sampel (blanko) dan penentuan nilai *inhibition concentration* (IC₅₀).

3.10.1 Pembuatan larutan induk baku DPPH

Ditimbang sejumlah 40 mg DPPH, kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 100 mL, volumenya dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 400 µg/mL (400 ppm).

3.10.2 Penentuan panjang gelombang serapan maksimum DPPH

Larutan induk baku DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*), dengan konsentrasi 400 ppm, dipipet 1 mL dan dimasukkan kedalam labu tentukur 10 mL kemudian cukupkan dengan metanol sampai garis tanda sehingga diperoleh konsentrasi 40 µg/mL (40 ppm), kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm, sehingga diperoleh absorbansi maksimum sebagai panjang gelombang.

3.10.3 Penentuan *overating time*

Ditimbang sejumlah 40 mg ekstrak tulang sotong (*sepia sp.*) kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan metanol dan cukupkan sampai garis tanda sehingga diperoleh larutan induk baku dengan konsentrasi 400 µg/mL (400 ppm), kemudian *operating time* dilakukan dengan cara pipet 1 mL larutan uji dimasukkan kedalam vial, tambahkan larutan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*) sejumlah 1 mL yang diambil, larutan induk konsentrasi 400 ppm kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *visible* pada panjang gelombang 512-520 nm dimulai dari menit pertama sehingga diperoleh absorbansinya yang sesuai dengan hukum lambert beer pada rentang waktu pengukuran yang stabil.

3.10.4 Pengukuran absorbansi DPPH dengan ekstrak tulang sotong

Sejumlah 2g ekstrak tulang sotong (*sepia* sp.) ditimbang lalu dimasukkan ke dalam labu 100 mL, kemudian dilarutkan dengan metanol sampai batas (400 µg/mL). Larutan uji dipipet 2,5mL, 3,75 mL, 5 mL, 6,25 mL dan 7,5 mL kemudian masing-masing dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL (untuk mendapatkan konsentrasi larutan uji 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100µg/mL, dan 200 µg/mL) ditambahkan masing-masing ekstrak 2 mL untuk sediaan gel 0,8 mL larutan DPPH(400 µg/mL) lalu ditambahkan metanol sampai garis tanda batas. Labu uji didiamkan di tempat gelap selama 30 menit. Diukur serapan dengan spektrofotometri UV-vis pada panjang gelombang 512-520 nm.

3.11 Analisis nilai IC₅₀

Dari data persentase aktivitas antioksidan dibuat persamaan garis regresi linear yang menandakan hubungan antara konsentrasi dengan persentase aktivitas antioksidan untuk menentukan nilai IC₅₀ (Muatarichie dkk., 2017). Hubungan nilai IC₅₀ terhadap Aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Tabel 3.2

Tabel 3.2 Hubungan Nilai IC₅₀ terhadap Aktivitas Antioksidan

IC ₅₀	Aktivitas Antioksidan
<50 µg/Ml	Sangat kuat
50 µg/Ml	Kuat
101 µg/mL - 250 µg/Ml	Sedang
250 µg/mL - 500 µg/Ml	Lemah
>500 µg/Ml	Tidak Aktif