



UNIVERSITAS INDONESIA

**FOSFORILASI GELATIN DAN KITOSAN
SEBAGAI EKSIPIEN
PEMBUATAN SERAT NANO ASIATIKOSIDA**

TESIS

SUSANA ELYA SUDRAJAT

0906651095

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**FOSFORILASI GELATIN DAN KITOSAN
SEBAGAI EKSIPIEN
PEMBUATAN SERAT NANO ASIATIKOSIDA**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Farmasi**

SUSANA ELYA SUDRAJAT

0906651095

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
JULI 2012**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa tesis ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan tindakan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.


Depok, 16 Juli 2012



(Susana Elya Sudrajat)

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun yang dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Susana Elya Sudrajat
NPM : 0906651095
Tanda Tangan : 
Tanggal :

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Susana Elya Sudrajat
NPM : 0906651095
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Judul : Fosforilasi Gelatin dan Kitosan sebagai Ekspipien
Pembuatan Serat Nano Asiatikosida


Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Farmasi pada Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Effionora Anwar, MS., Apt. ()

Pembimbing II : Prof. Dr. Eng. Khairurrijal ()

Penguji I : Dr. Mahdi Jufri, M.Si ()

Penguji II : Dr. Iskandarsyah, M.Si ()

Penguji III : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 16 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Kuasa atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis.

Tesis ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Magister Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dari berbagai pihak, kiranya sulit bagi penulis untuk menyelesaikan penulisan ini tepat pada waktunya. Pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati penulis menyampaikan terima kasih yang tulus kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Effionora Anwar, MS., Apt. sebagai Pembimbing I dan Bapak Prof. Dr. Eng. Khairurrijal sebagai Pembimbing II yang selalu sabar membimbing dan memberi saran selama penelitian berlangsung sampai tersusunnya tesis ini.
2. Bapak Dr. Abdul Mun'im, MS atas saran dan masukan yang diberikan selama penelitian berlangsung.
3. Ibu Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc, Bapak Dr. Mahdi Jufri, M.Si. dan Bapak Dr. Iskandarsyah, M.Si atas saran dan masukan yang diberikan.
4. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS. sebagai Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Departemen Fisika Institut Teknologi Bandung yang telah banyak membantu dalam usaha memperoleh data yang saya perlukan.
6. Seluruh Bapak dan Ibu Dosen Farmasi UI atas bimbingannya selama ini.
7. Ibu Dr. Fatimah dan Ibu Maria Evita, MS yang telah sabar membantu pembuatan serat nano.
8. Bapak Raditya Iswandana, Apt, Ibu Puspa N Lotulung, MS, Ibu Dra. Azalia A., dan Bapak dr. Hadi J, MS atas bantuannya dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
9. Fakultas Kedokteran UKRIDA yang telah memberi kesempatan penulis untuk melanjutkan studi di Departemen Farmasi FMIPA UI.

10. Suami, orang tua, tante Lusi, teman-teman tercinta, atas semua dukungan, kasih sayang, perhatian, kesabaran, dorongan semangat, dan do'a yang tidak henti-hentinya yang diberikan untuk penulis.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan bantuan dan dukungan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Saya berharap Tuhan yang maha kuasa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis menyadari bahwa tesis ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk kesempurnaan tesis ini. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan dalam dunia farmasi khususnya dan masyarakat pada umumnya.



Penulis
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Susana Elya Sudrajat
NPM : 0906651095
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Fosforilasi Gelatin dan Kitosan Sebagai Eksipien Pembuatan Serat Nano Asiatikosida

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : Juli 2012

Yang Menyatakan



(Susana Elya Sudrajat)

ABSTRAK

Nama : Susana Elya Sudrajat.
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Judul : Fosforilasi Gelatin dan Kitosan Sebagai Eksipien Pembuatan Serat Nano Asiatikosida.

Asiatikosida telah banyak digunakan dan masih terus diteliti untuk pemakaian topikal terutama untuk pengobatan luka dengan cara meningkatkan pembentukan fibroblast dan sintesa kolagen. Untuk mendapatkan efek optimal dari pengobatan luka, zat berkhasiat harus dapat dilepaskan dan diabsorpsi dari pembawanya. Pada penelitian ini dibuat sediaan serat nano dengan model obat asiatikosida untuk digunakan sebagai obat penyembuhan luka. Sebagai eksipien pembentuk serat nano digunakan fosforilasi gelatin dan kitosan. Pada penelitian ini dirancang 3 formula dengan memvariasikan konsentrasi fosfor. Daya penetrasinya diuji secara *in vitro* dengan cara disolusi dan sediaan terpilih diuji *in vivo* dengan menggunakan tikus galur *Sprague Dawley*. Jumlah asiatikosid yang terdisolusi dari ketiga sediaan serat memenuhi standar farmakope Indonesia yaitu diantara 90% – 110%. Pada uji penyembuhan luka pada tikus ternyata persentase pengurangan luas luka dengan pengobatan serat nano dengan asiatikosida pada hari ke 5 mencapai 72,2% (formula C), kontrol negatif 42,2 %, kontrol positif 56,8 % dan serat nano tanpa obat 52 %.

Kata kunci : asiatikosid, serat nano, fosforilasi , natrium tripolifosfat, pemintalan elektrik, disolusi

xv+ 57 halaman.: 32gambar; 11 tabel

Daftar pustaka : 25(2003-2011)

ABSTRACT

Name : Susana Elya Sudrajat
Study Program : Master of Pharmaceutical Science
Title : Phosphorylation of Gelatine and Chitosan as an Excipient
for Asiaticoside Nanofibers

Asiaticoside has been widely used and is still studied for topical treatment of wounds, increased fibroblasts and collagen production were noted at the site of injury. Base on getting the optimal effect of the wounds' treatment, drug must be released and absorbed from the carrier. In this research, nano fibers preparation made with the model drug asiaticoside. The result indicated that gelatine and chitosan phosphorylation can be used as an excipient for asiaticoside nanofiber. In this research was designed 3 formula with varying concentrations of phosphorus. Penetration was examined by dissolution and preparations were tested using Spraque Dawley rats in vivo. The percentage asiaticoside from nanofiber preparations were between 90% - 110 %. In the test wound healing in rats the percentage reduction in wound area with nano fiber treatment with the drug at day 5 reached 72.2% (formula C), nano fibers without drug 52%, 56.8% of positive controls and negative controls 42,2%.

Key Words : asiaticoside, nanofiber , phosphorylation, sodium tripolifosfat ,
electrospinning , dissolution

xv+ 57 pages : 32 pictures; 11 tables

Bibliography : 25(2003-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kulit	4
2.1.1 Definisi	4
2.1.2 Struktur Kulit	4
2.1.3 Penyembuhan Luka.....	5
2.2 Serat Nano.....	7
2.2.1 Definisi	7
2.3 Pembuatan Serat Nano	7
2.3.1 Pemintalan Elektrik Gelatin-Kitosan.....	9
2.4 Serat Nano Gelatin-Kitosan.....	10
2.5 Fosforilasi Gelatin-Kitosan	11
2.6 Kitosan	13
2.7 Gelatin.....	14
2.8 Asiatikosida	15
2.9. Natrium Tripolifosfat	17
2.10 Asam Asetat	18
BAB 3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Bahan	19
3.2 Alat	19
3.3 Cara Kerja	19
3.3.1 Preparasi Larutan Gelatin-Kitosan	19
3.3.2 Preparasi Larutan Natrium Tripolifosfat.....	20
	xi

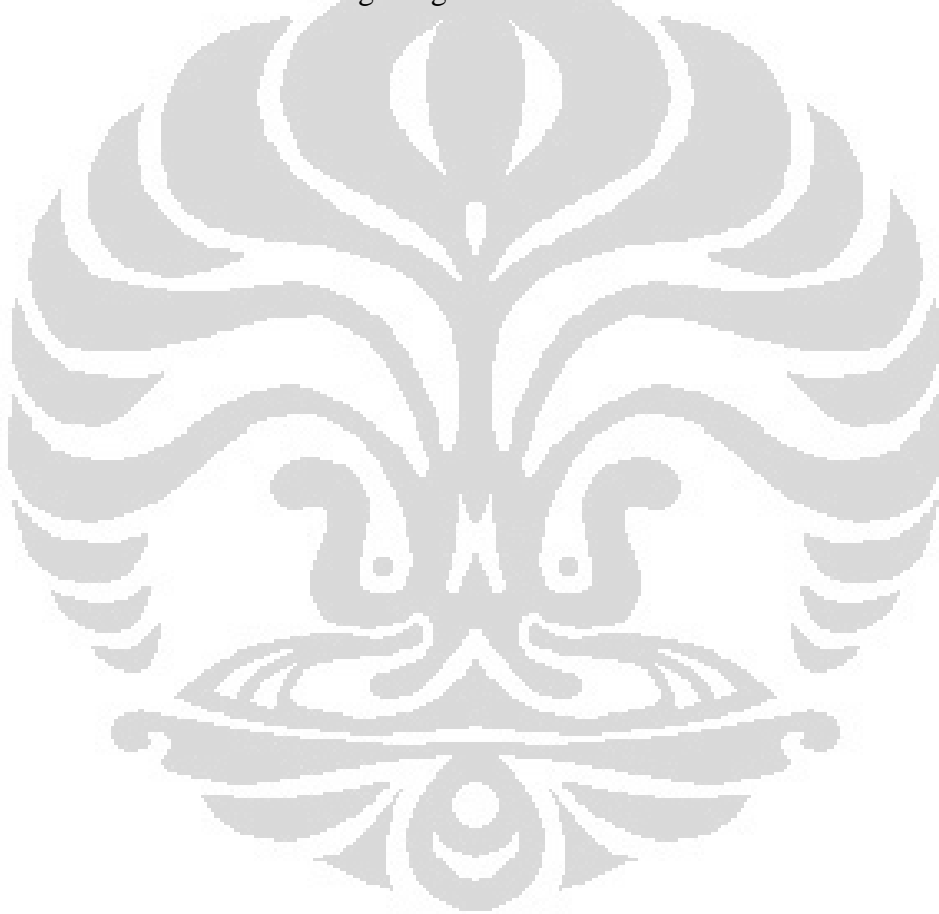
3.3.3 Optimasi Pembuatan Serat Nano	20
3.3.4 Pembuatan Sediaan	20
3.3.5 Pembuatan Kurva Kalibrasi Asiatikosida.....	21
3.3.6 Pengukuran Kadar Aktual Asiatikosida	21
3.3.7 Pengukuran Jumlah Asiatikosida yang Dilepaskan....	21
3.3.8 Pengukuran Morfologi dan Diameter Serat	22
3.3.9 Pengukuran Derajat Pengembangan	22
3.3.10 Pengukuran Kapasitas Retensi Air.....	22
3.3.11 Analisa FT-IR.....	22
3.3.12 Penetapan Serat nano Asiatikosida Terpilih.....	22
3.3.13 Uji Efektifitas Penyembuhan Luka.....	23
3.4. Analisis Data.....	23
3.5. Uji Histopatologis	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Optimasi Pembuatan Serat Nano	25
4.1.1 Pembuatan Serat Nano	27
4.1.2 Pengujian Morfologi dan Diameter Serat	28
4.1.3 Pengukuran Derajat Pengembangan	30
4.1.4 Pengukuran Kapasitas Retensi Air.....	31
4.1.5 Pengukuran Kadar Aktual Asiatikosida.....	32
4.1.6 Pengukuran Jumlah Asiatikosida Yang Dilepaskan...	32
4.1.7 Analisa FT-IR.....	33
4.1.8 Penetapan Sediaan Terpilih.....	36
4.2. Uji Efektifitas Penyembuhan Luka.....	37
4.3. Uji Histopatologis.....	38
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1 Kesimpulan	40
5.2 Saran	40
DAFTAR ACUAN	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur Kulit	4
Gambar 2.2.	Fase Penyembuhan Luka.....	6
Gambar 2.3.	Serat Nano.....	7
Gambar 2.4.	Skema Pemintalan Elektrik.....	8
Gambar 2.5.	Pembentukan Kerucut Jet.....	8
Gambar 2.6.	Fosforilasi Kitosan Dengan TPP.....	12
Gambar 2.7.	Fosforilasi Gelatin Dengan TPP.....	12
Gambar 2.8.	FTIR Kitosan, TPP Dan Kitosan-TPP	13
Gambar 2.9.	Struktur Kimia Kitosan	14
Gambar 2.10.	Struktur Gelatin.....	15
Gambar 2.11.	Tanaman <i>Centella Asiatica</i>	16
Gambar 2.12.	Struktur Kimia Asiatikosida	17
Gambar 2.1	Struktur Natrium Tripolifosfat.....	17
Gambar 3.1.	Punggung Tikus Yang Dilukai.....	23
Gambar 4.1.	Larutan: Formula A (A), Formula B (B), Formula C (C).....	27
Gambar 4.2.	Morfologi Serat Hasil Pemintalan Elektrik.....	29
Gambar 4.3.	Derajat Pengembangan Serat.....	30
Gambar 4.4.	Kapasitas Retensi Air	31
Gambar 4.5.	Pelepasan Asiatikosida Dibandingkan Kadar Aktualnya	33
Gambar 4.6.	Overlay FTIR Kitosan, TPP dan Kitosan TPP.....	34
Gambar 4.7.	Overlay FTIR Gelatin, TPP dan Gelatin TPP.....	36
Gambar 4.8	Persentase Pengurangan Luas Luka	39
Gambar 4.9.	Histologis Jaringan Luka Pada Hari Ke 5	39

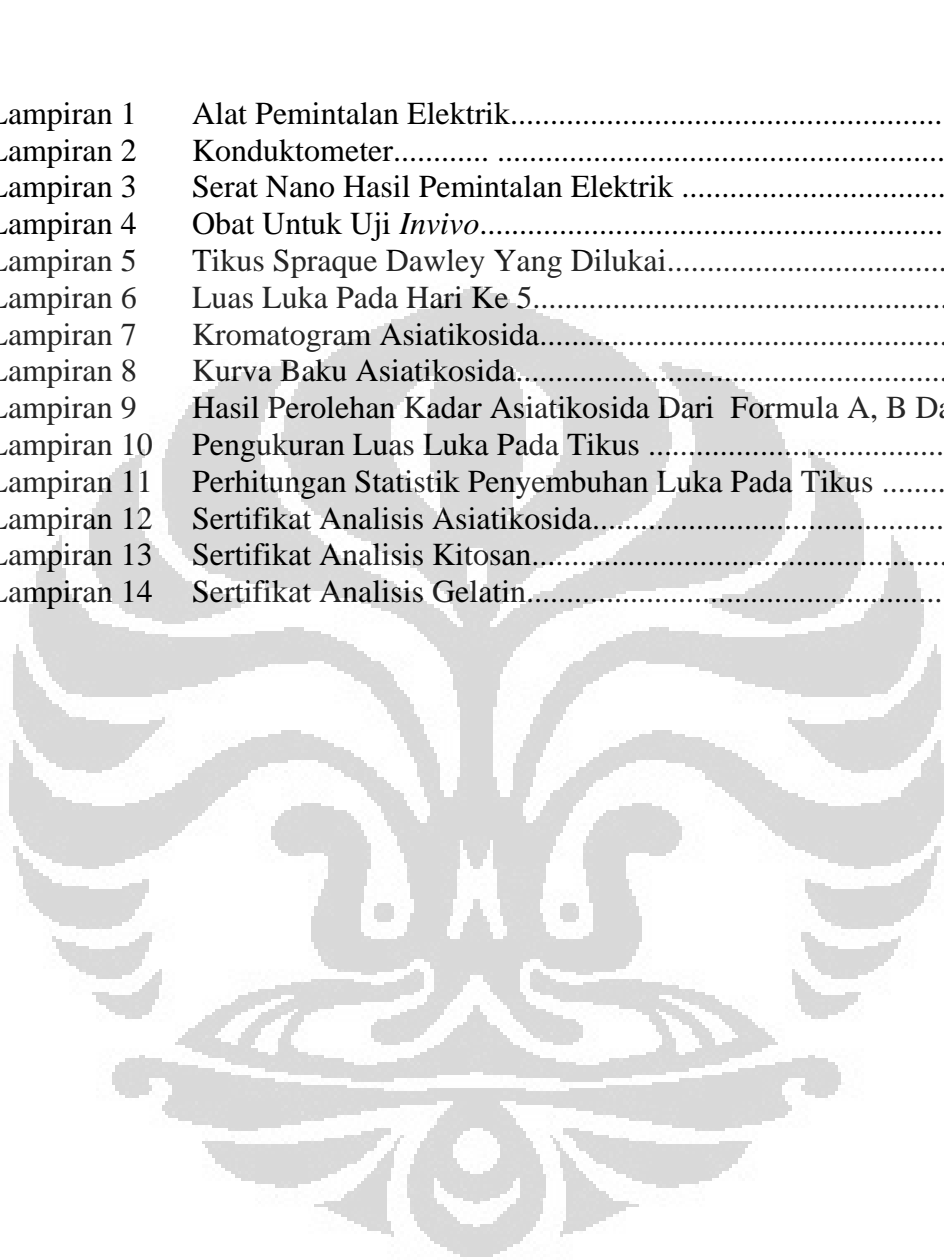
DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Formula Pembuatan Serat Nano	20
Tabel 4.1.	Formula Fosforilasi Gelatin-Kitosan.....	26
Tabel4.2.	Diameter Serat	28
Tabel 4.3.	Derajat Pengembangan.....	30
Tabel 4.4.	Kapasitas Retensi Air.....	31
Tabel 4.5.	Pengukuran Kadar Aktual Asiatikosida.....	32
Tabel 4.6.	Pelepasan Asiatikosida Dibandingkan Kadar Aktualnya.....	33
Tabel 4.7.	Persentase Pengurangan Luas Luka.....	37



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Alat Pemintalan Elektrik.....	46
Lampiran 2	Konduktometer.....	46
Lampiran 3	Serat Nano Hasil Pemintalan Elektrik	47
Lampiran 4	Obat Untuk Uji <i>Invivo</i>	47
Lampiran 5	Tikus Spraque Dawley Yang Dilukai.....	48
Lampiran 6	Luas Luka Pada Hari Ke 5.....	48
Lampiran 7	Kromatogram Asiatikosida.....	49
Lampiran 8	Kurva Baku Asiatikosida.....	49
Lampiran 9	Hasil Perolehan Kadar Asiatikosida Dari Formula A, B Dan	50
Lampiran 10	Pengukuran Luas Luka Pada Tikus	51
Lampiran 11	Perhitungan Statistik Penyembuhan Luka Pada Tikus	52
Lampiran 12	Sertifikat Analisis Asiatikosida.....	55
Lampiran 13	Sertifikat Analisis Kitosan.....	56
Lampiran 14	Sertifikat Analisis Gelatin.....	57



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asiatikosida merupakan komponen yang paling aktif dari tanaman *Centella asiatica* (pegagan) yang terdapat di berbagai daerah di Indonesia dan telah terbukti berkhasiat dalam proses penyembuhan luka yang meningkatkan fibroblast dan sintesa kolagen. Dalam penghantarannya, dibutuhkan suatu bentuk sediaan yang dapat menunjang pelepasan asiatikosida tersebut sehingga dapat bekerja dengan optimal (Sikareepaisan, 2007)..

Bentuk sediaan obat topikal untuk luka yang beredar sekarang umumnya berbentuk salep dengan pemakaian dua kali sehari. Selain itu juga biasanya digunakan pembalut luka yang biasanya diganti tiap hari. Pada penggantian pembalut luka tersebut dapat menimbulkan rasa tidak nyaman bagi pasien. Oleh karena itu perlu diteliti bentuk sediaan yang dapat meningkatkan kenyamanan dan efektifitas penyembuhan luka.

Akhir-akhir ini penelitian mengenai penghantaran obat dan rekayasa jaringan berkembang sangat pesat dalam rangka meningkatkan kesehatan manusia. Sementara itu perkembangan nanoteknologi memberi kesempatan untuk membuat dan mengkarakterisasi obat dalam skala nanometer. Biomaterial dalam skala nano telah digunakan untuk penghantaran obat terkontrol dan matriks buatan untuk jaringan. Sistem penghantaran obat dapat direkayasa berdasarkan pelepasan obat terkontrol, komposisi, bentuk, ukuran, dan morfologinya. Penghantaran obat dalam skala nano antara lain *nanoparticles*, *nanogel*, dan serat nano

Dalam pengobatan secara topikal dibutuhkan suatu pembawa/media penghantaran obat yang dapat menjaga pelepasannya secara teratur. Pembawa ini harus aman dan tidak menghambat penyembuhan luka dan akan lebih baik lagi apabila pembawanya juga dapat berperan dalam mempercepat penyembuhan luka, seperti serat nano yang mempunyai sifat antara lain; area permukaan luas, porositas tinggi, pori-pori saling berhubungan, dan memungkinkan untuk memasukkan bahan aktif pada skala nanometer (Heunis, 2010).

Kecepatan pelepasan obat tergantung dari ketebalan dan tingkat degradasi polimer serat, di samping seberapa baik tubuh mampu menyerap obat. Oleh karena itu pemintalan elektrik dapat digunakan untuk membuat serat nano dengan tingkat degradasi direkayasa, guna menghantarkan obat secara optimal ke dalam tubuh. Obat dalam serat nano yang dibuat dengan pemintalan elektrik dapat menyebar untuk memfasilitasi pelepasannya. Interaksi obat dan pembawa dalam serat nano terjadi dengan berbagai cara antara lain; (1) obat menempel pada permukaan pembawa, (2) penggabungan serat obat dan serat pembawa, dan (3) obat diintegrasikan (dilapisi atau dicampur) dengan pembawa. Metoda (3) tidak menimbulkan pelepasan obat yang besar di awal (*burst release*), tapi lebih terkontrol. Pelepasan obatnya terkait dengan kelarutan, kompatibilitas obat dalam campuran dan kondisi pada waktu pembuatan serat nano (Liang, 2007).

Sedangkan rekayasa jaringan berdasarkan pada material berpori yang dapat terdegradasi, mengikuti perilaku pembentukan jaringan dan berukuran mirip dengan matriks ekstra seluler. Ukuran pori dalam sebuah jalinan serat nano merupakan kandidat yang sangat baik untuk penyembuhan luka, hemostatik dan perawatan luka bakar. Persamaan antara serat nano dan matriks ekstra seluler alami memungkinkan untuk mendukung pertumbuhan jaringan baru yang sehat di daerah yang terluka, dapat mengurangi pembentukan jaringan parut dan mengurangi waktu penyembuhan yang dibutuhkan. Pori-pori yang berukuran nano juga membantu melindungi luka dari bakteri. Porositas dan luas permukaan yang tinggi membantu penyerapan cairan yang juga mendorong penyembuhan luka (Liang, 2007).

Dasar pemilihan gelatin dan kitosan sebagai bahan dasar serat nano karena bersifat biodegradabel, biokompatibel, tidak toksik. Serat nano gelatin-kitosan yang mudah larut dalam air perlu dimodifikasi dengan cara difosforilasi untuk memperbaiki profil pelepasan obatnya. Natrium tripolifosfat (TPP) dipilih sebagai bahan fosforilasi karena sifatnya yang tidak toksik dan pembuatannya sederhana yaitu dengan cara melarutkan kedalam larutan gelatin-kitosan atau mencelupkan serat kedalam larutan TPP (Ko, 2002).

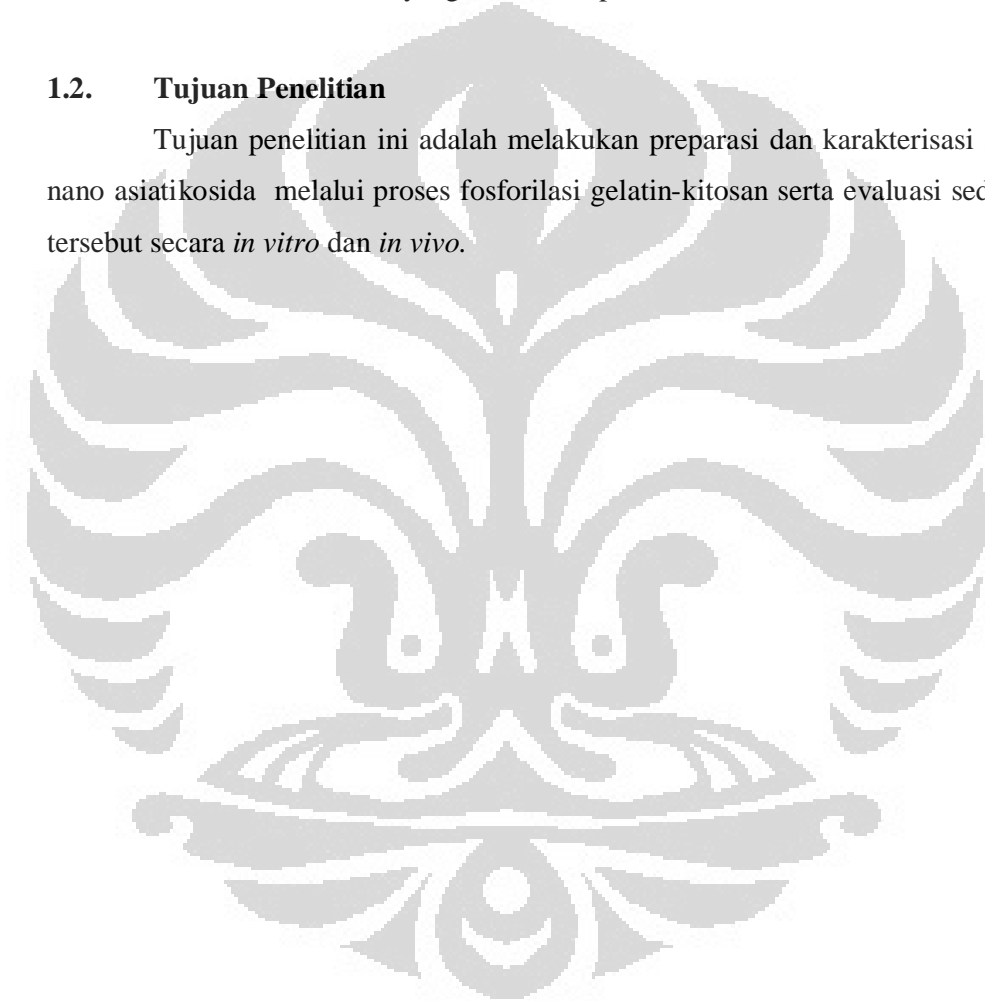
Kitosan merupakan polisakarida alam yang diperoleh dari limbah *Crustaceae* dan telah banyak dimanfaatkan untuk sistem penghantaran obat dan

sekaligus memiliki khasiat untuk mempercepat penyembuhan luka. Dalam penelitian ini gelatin dan kitosan difosforilasi terlebih dulu, kemudian dibuat serat nano dengan cara pemintalan elektrik (*electrospinning*).

Indonesia yang memiliki sumber daya alam yang melimpah dan pembuatan serat nano dengan fosforilasi gelatin dan kitosan akan meningkatkan penggunaan gelatin dan kitosan sebagai bahan baku industri farmasi. Demikianlah alasan-alasan tersebut di atas yang mendasari penelitian ini.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah melakukan preparasi dan karakterisasi serat nano asiatikosida melalui proses fosforilasi gelatin-kitosan serta evaluasi sediaan tersebut secara *in vitro* dan *in vivo*.



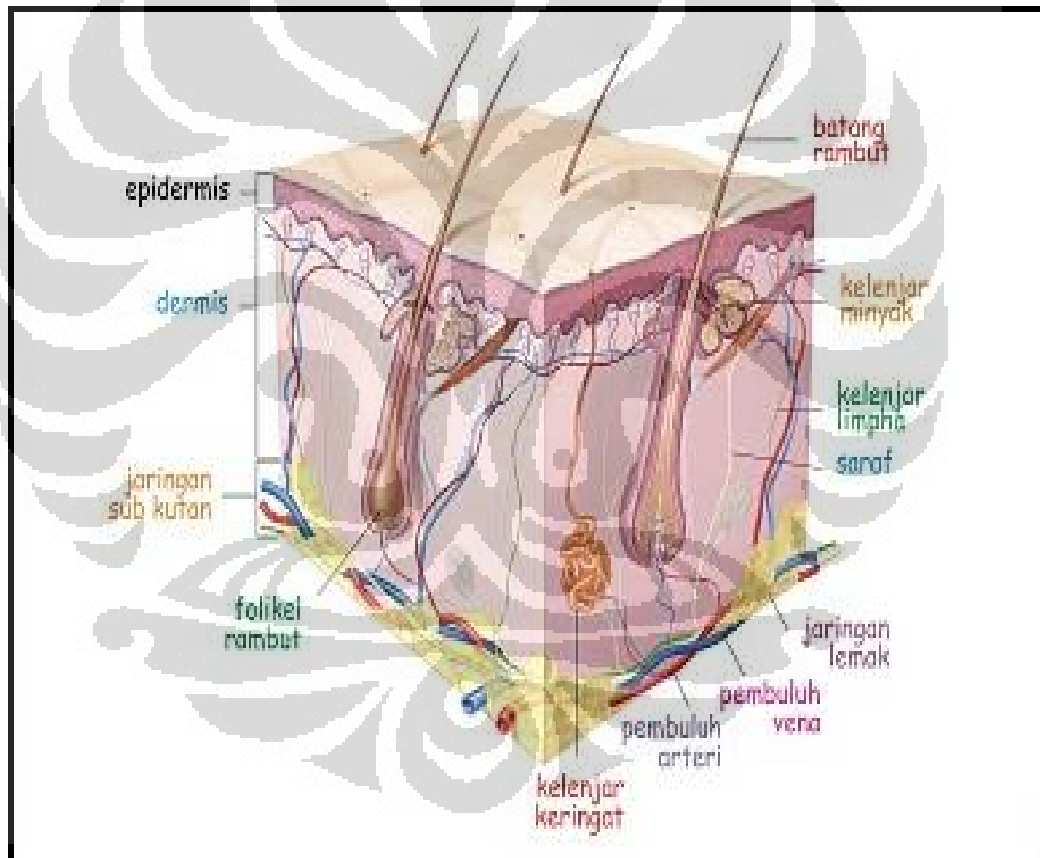
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kulit

2.1.1. Definisi

Kulit merupakan organ tubuh terluar dengan luas sekitar 2m^2 dan berat antara 4-7kg. Kulit berperan sebagai proteksi, dan indikator gangguan sistemik. Anatomi kulit terdiri dari epidermis, dermis dan sub kutan (Junqueira, 1995).

2.1.2. Struktur Kulit



[Sumber: Sriwulan, 2010, telah diolah kembali]

Gambar 2.1. Struktur kulit

Kulit terdiri atas tiga bagian besar dengan fungsi yang berbeda-beda, yaitu :

a. Epidermis

Merupakan lapisan paling luar dari kulit yang terdiri dari empat lapisan sel, yaitu dari luar ke dalam disebut lapisan tanduk (*stratum korneum*), lapisan bening (*stratum lucidum*), lapisan butir (*stratum granulosum*), lapisan tajuk (*stratum spinosum*), dan lapisan tunas (*stratum basale*).

b. Dermis

Dermis adalah suatu lapisan yang terletak di bawah epidermis dan berfungsi sebagai penopang struktur dan nutrisi. Lapisan ini lebih tebal dari lapisan epidermis.

c. Hipodermis/subkutan

Lapisan ini terdiri atas jaringan konektif, pembuluh darah, dan sel-sel penyimpan lemak yang memisahkan dermis dengan otot, tulang dan struktur lain.

2.1.3. Penyembuhan Luka.

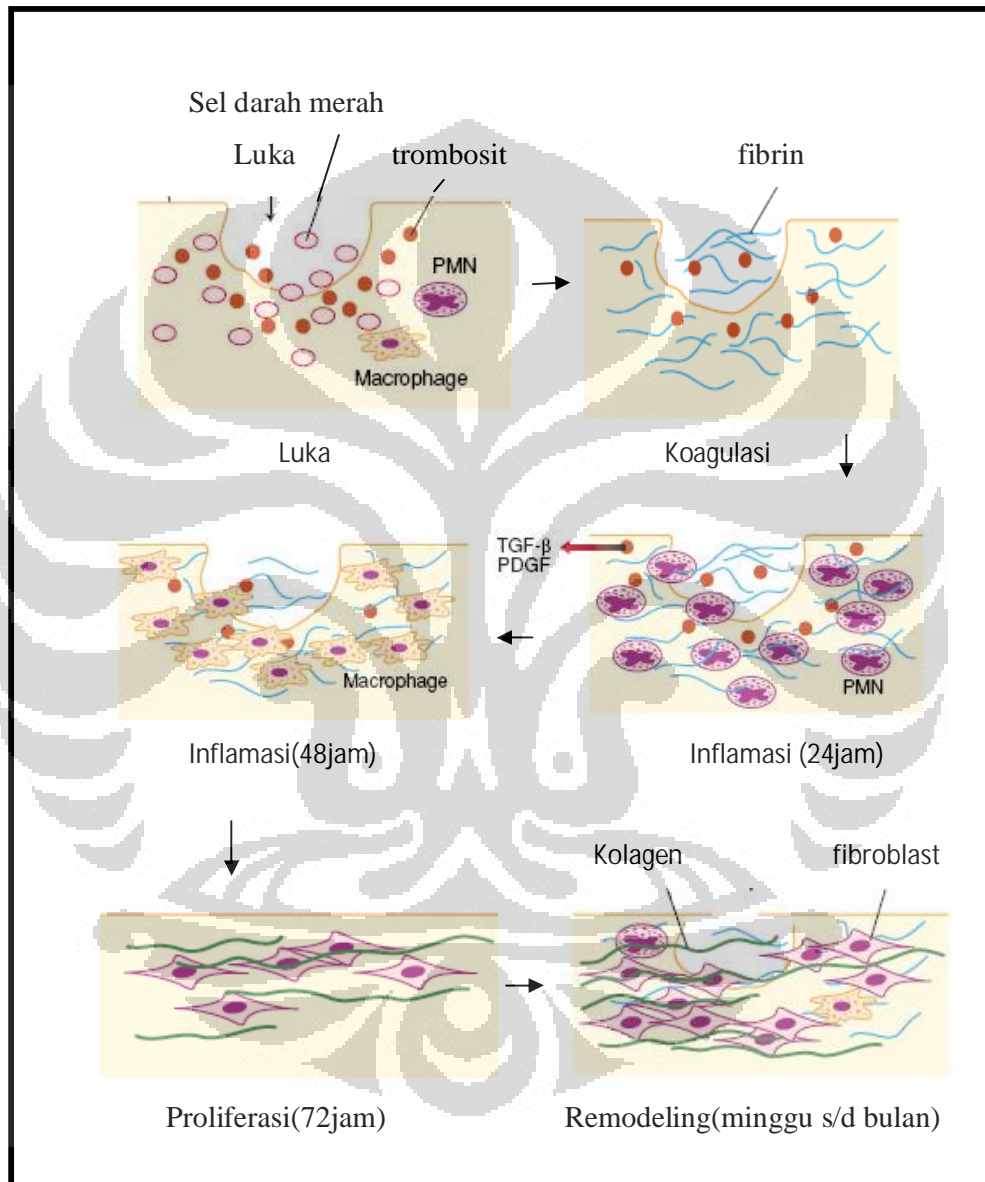
Pada manusia proses penyembuhan luka terdiri dari 3 fase yaitu (1) fase pembekuan darah atau hemostasis dan inflamasi di mana pembekuan darah dan reaksi inflamasi akut terjadi, (2) fase proliferasi yaitu regenerasi sel parenkim, sel epitel jaringan ikat serta matriks ekstra seluler dan (3) fase maturasi atau remodeling di mana pembentukkan jaringan ikat terus bertambah.

Proses penyembuhan luka merupakan proses interaktif dinamis yang melibatkan banyak faktor, antara lain mediator (sitokin dan faktor pertumbuhan), sel darah (trombosit, sel PMN (polymorphonuclear neutrophills)) dan sel parenkim yang terluka.

Kerusakan jaringan menyebabkan pembuluh darah terkoyak dan darah yang keluar akan kontak dengan matriks ekstra seluler untuk memulai proses hemostasis membentuk bekuan darah. Koagulasi terjadi karena trombosit beragregasi membentuk fibrinogen, selain itu juga mengeluarkan mediator PDGF(Platelet Derived Growth Factor) dan TGF- (Transforming growth Factor-) yang menarik PMN kedalam luka untuk mulai inflamasi. PMN bersama-sama makrofag membersihkan luka, melepaskan faktor-faktor pertumbuhan dan mulai

Universitas Indonesia

menyusun matriks ekstra seluler. Fase proliferasi dimulai setelah 72 jam dimana fibroblast dengan faktor-faktor pertumbuhan mulai mensintesa kolagen dan terakhir ialah fase remodeling yang memerlukan waktu dalam hitungan minggu atau bulan (Beanes, 2003).



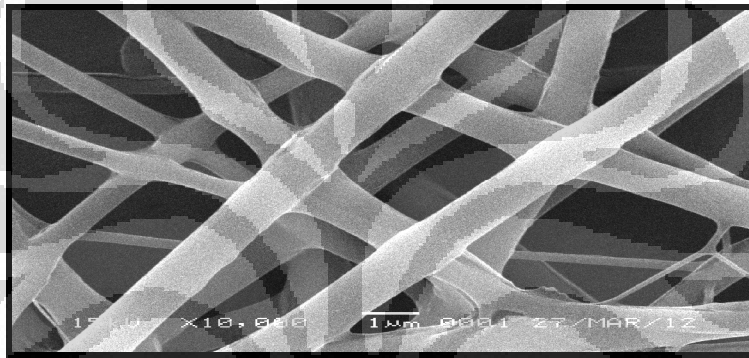
[Sumber: Beanes, 2003, telah diolah kembali]

Gambar 2.2. Fase penyembuhan luka

2.2. Serat Nano

2.2.1. Definisi

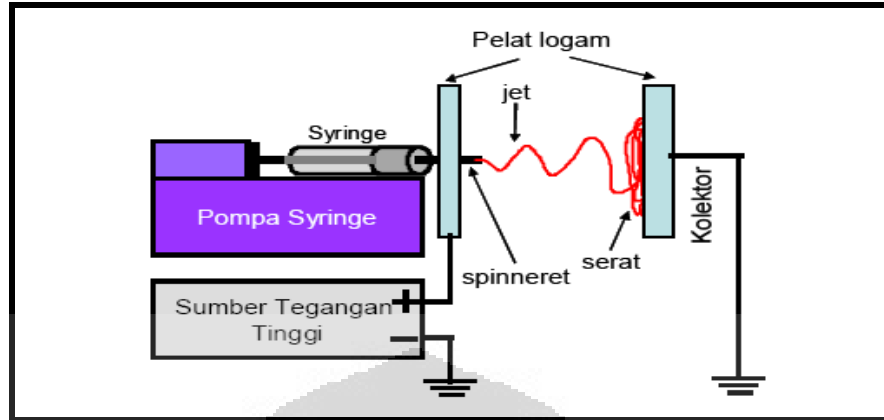
Serat nano merupakan serat-serat yang berasal dari polimer dengan diameter kurang dari 1000 nm. Mempunyai luas permukaan 1000 kali lebih besar dari volumenya. Serat nano hasil dari pemintalan elektrik banyak diteliti karena mempunyai karakteristik morfologi tertentu, seperti diameter serat berukuran nanometer yang akan mempertinggi luas permukaan, berpori-pori kecil dan dapat dibuat menjadi struktur 3 dimensi.



Gambar 2.3. Serat nano (perbesaran 10.000)

2.3. Pembuatan Serat Nano

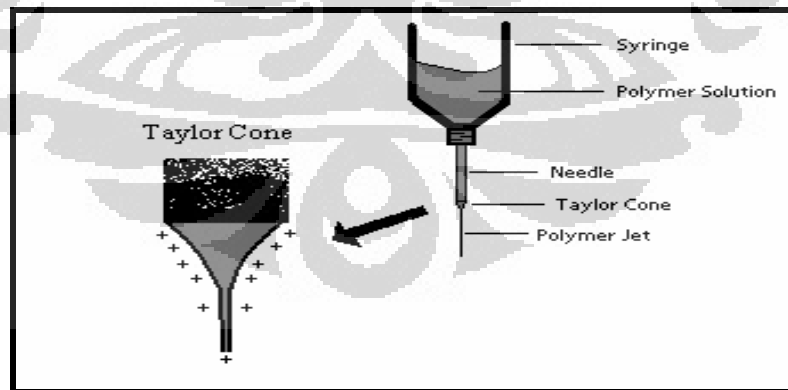
Salah satu cara pembuatan serat nano ialah dengan cara pemintalan elektrik. Proses ini berdasarkan pada pemberian tegangan listrik pada larutan atau lelehan polimer yang ditempatkan dalam tabung dengan kolektor logam. Ketika muatan listrik mencapai titik kritis, gaya elektrostatis mengatasi tegangan permukaan larutan polimer, dan menghasilkan jet yang bermuatan. Polimer jet yang bermuatan ini mulur dan disertai penguapan pelarut sehingga didapat serat yang berukuran nano. Proses ini banyak digunakan untuk membuat serat polimer alam maupun sintetis.



(Sumber:Khairurrijal et al, 2009, telah diolah kembali)

Gambar 2.4. Skema pemintalan elektrik

Sistim pemintalan elektrik terdiri dari 3 komponen utama, yaitu: *spinneret* yang biasanya terbuat dari jarum logam hipodermik, catu daya tegangan tinggi, dan kolektor yang konduktif secara listrik (biasanya menggunakan lembaran aluminium). Larutan untuk pemintalan elektrik tersebut ditempatkan dalam sebuah *syringe* plastik yang dihubungkan dengan jarum logam. *Syringe* tersebut dihubungkan dengan pompa sehingga laju aliran dapat dijaga untuk mendapatkan mutu serat yang baik. Larutan polimer bergerak dari *syringe* ke jarum logam yang dihubungkan dengan tegangan tinggi(1-30kV).



(Sumber:Khairurrijal et al, 2009, telah diolah kembali)

Gambar2.5. Pembentukan kerucut jet (Taylor cone)

Pemintalan elektrik adalah sebuah teknik yang berdasarkan elektrostatik. Bila sebuah tegangan tinggi diberikan pada *spinneret* tersebut, tetesan kecil (droplet) larutan pada lubang ujung jarum tersebut menjadi bermuatan listrik sangat tinggi dan mengalami perubahan bentuk menjadi bentuk kerucut (Taylor cone) karena gaya tolak elektrostatik antara dua muatan permukaan dan gaya tarik elektrostatik dari kolektor. Bila tegangan tersebut telah melampaui sebuah nilai ambang, gaya-gaya elektrostatik tersebut dapat mengatasi tegangan permukaan sehingga mendorong pelepasan sebuah jet larutan dari lubang ujung jarum tersebut (Khairurrijal, 2009).

Parameter yang harus dipertimbangkan yaitu parameter larutan dan alat. Parameter larutan antara lain: tipe polimer, konsentrasi polimer, tipe pelarut, konsentrasi pelarut, viskositas, konduktivitas dan tegangan permukaan. Sedangkan parameter alat/proses antara lain: kekuatan medan listrik, kecepatan aliran, jarak antara kapiler dan kolektor, bentuk dan pergerakan kolektor, temperatur dan kelembaban sekitarnya (Khairurrijal, 2009).

Viskositas merupakan parameter penting yang dipengaruhi oleh konsentrasi polimer. Harus ada jumlah minimal rantai polimer untuk dapat dipintal menjadi serat. Bertambahnya konsentrasi polimer akan menambah jumlah rantai polimer dalam larutan tapi juga akan menambah viskositas, tapi viskositas yang terlalu tinggi akan mencegah terbentuknya serat.

2.3.1 Pemintalan elektrik gelatin-kitosan

Kitosan merupakan polimer kationik dari bahan alam, di mana hanya sedikit pemintalan elektrik yang berhasil, karena gaya tolak antara gugus ionik pada rangka polimer yang timbul akibat tegangan tinggi membatasi pembentukan serat kontinu sehingga membentuk partikel.

Pemintalan serat nano kitosan dalam pelarut dipengaruhi oleh: tipe pelarut, pH, konsentrasi kitosan, viskositas, kerapatan muatan listrik, tegangan listrik, kecepatan aliran, jarak tip–kolektor, dan waktu pemintalan. Kitosan banyak diteliti, meskipun tantangan terbesar ialah viskositas dan pelarut yang cocok. Kitosan larut dalam larutan asam karena strukturnya yang mempunyai gugus

fungsi amin. Dengan konsentrasi polimer yang tinggi, susah untuk membuat viskositas yang rendah untuk pembuatan serat nano.

Kitosan dapat dibuat serat nano bersama sama dengan gelatin dengan pelarut asam asetat (Javary, 2011). Persyaratan yang harus dipenuhi untuk berhasilnya pemintalan elektrik antara lain; pembentukkan kerucut Taylor diujung *spinnerette*, pembentukkan jet yang stabil, keseragaman serat, ukuran serat kurang dari 500 nm. Setelah pembentukkan kerucut Taylor dan larutan jet yang stabil selama beberapa detik diikuti ledakan (*explosion*) kerucut Taylor dan larutan jet mengakibatkan deposisi tetesan dikelilingi semacam struktur serat. Disamping viskositas larutan yang cukup, pintalan harus cukup kuat untuk menghasilkan serat, juga kerapatan muatan akan bertambah dengan menguapnya pelarut. Karena kitosan mempunyai ikatan hidrogen inter dan antar molekul yang kuat, maka kitosan yang dapat dibuat serat nano yaitu kitosan dengan berat molekul rendah (BM 50000) yang mempunyai viskositas rendah (Vrieze, 2007).

2.4. Serat nano gelatin-kitosan

Kitosan banyak digunakan pada penelitian biomaterial karena strukturnya yang dapat dibuat sesuai fungsinya. Gelatin merupakan hasil hidrolisis parsial dari kolagen, yang merupakan protein pada jaringan manusia dan hewan. Serat nano gelatin dan kitosan merupakan biopolimer yang menarik karena mempunyai sifat biokompatibel sehingga banyak direkomendasikan untuk berbagai inovasi matriks biologis, seperti alat penghantaran obat, pembalut bioaktif (*bioactive dressings*) dan rangka untuk rekayasa jaringan. Akhir-akhir ini banyak digunakan dalam industri biomedik karena sifatnya yang non toksik, non immunogenisitas, biodegradabel, biokompatibel, mempunyai aktifitas anti mikroba, dan juga mempercepat penyembuhan luka (Javary, 2011).

Serat nano gelatin-kitosan mempunyai kelebihan, antara lain: struktur, bioaktifitas dan biodegradabilitas serat dapat dikontrol dengan metoda yang relatif sederhana. Berdasarkan penelitian serat gelatin-kitosan sangat cocok untuk pembalut luka karena tidak sitotoksik, tidak iritasi, dan merangsang fusi. Serat nano dari polimer biodegradabel seperti kitosan, dapat diaplikasikan untuk

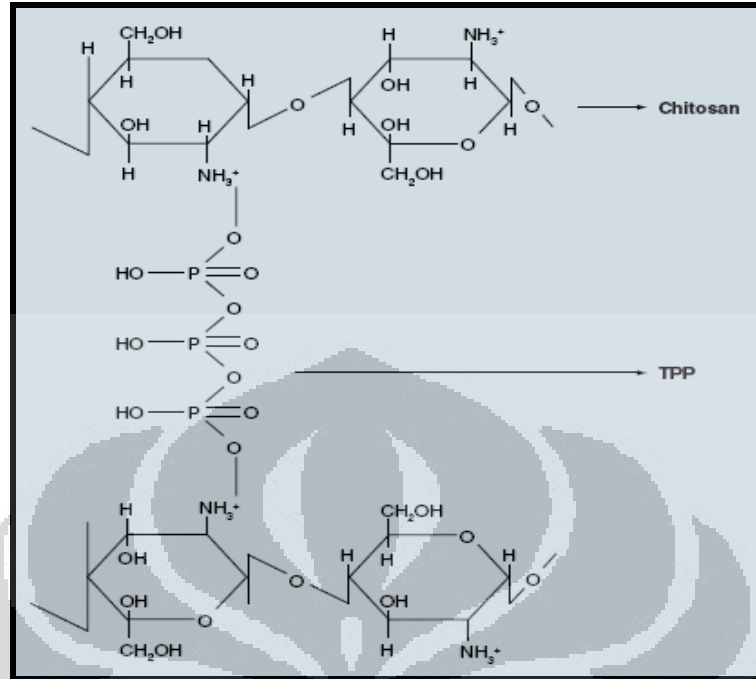
pelepasan obat terkontrol, sesuai dengan morfologi, porositas dan komposisi seratnya (Jiang et al, 2004).

Penambahan gelatin kedalam kitosan akan memperbaiki sifat kitosan sehingga dapat dibuat serat dengan pemintalan elektrik (Javary 2011). Polimer biodegradabel seperti gelatin dan kitosan perlu *dicrosslinked* untuk memperbaiki sifatnya agar dapat menghantarkan obat pada periode yang diinginkan. Reagen yang digunakan untuk *crosslinked* gelatin dan kitosan antara lain glutaraldehid, natrium tripolifosfat, etilen glikol, genipin dan lain-lain. Komposisi dan *crosslinked* akan mempengaruhi sifat fisiko kimia, seperti biodegradabilitas, pembasahan permukaan, disolusi dan derajat pengembangan.

2.5. Fosforilasi Gelatin-Kitosan

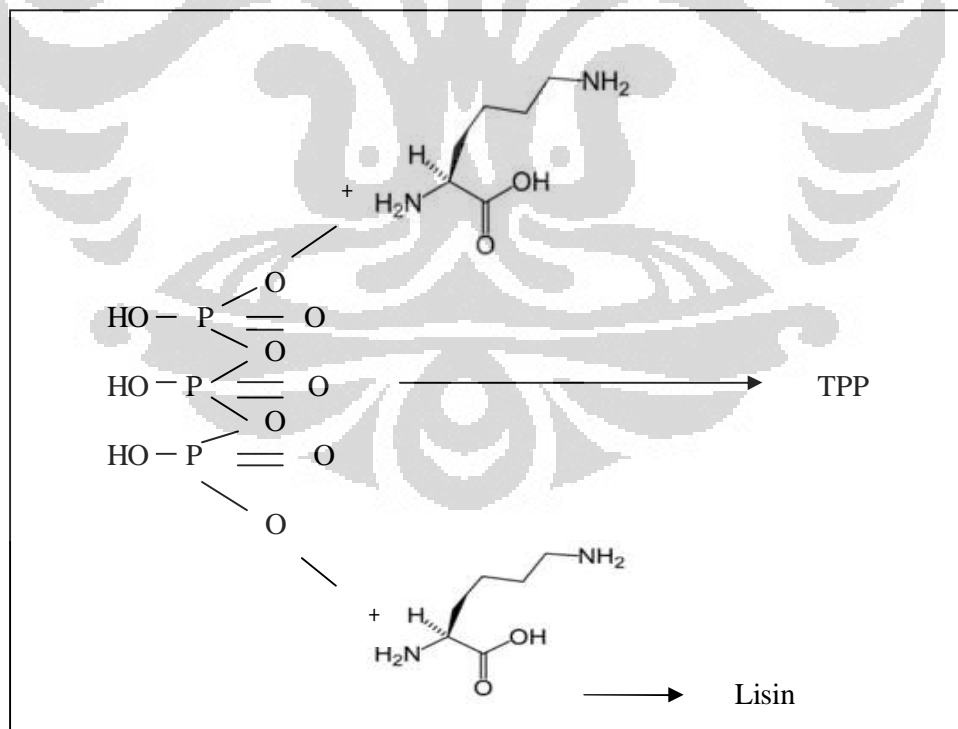
Fosforilasi merupakan proses sambung silang antara polielektrolit (kitosan) dengan pasangan ion multivalennya dalam hal ini natrium tripolifosfat (TPP), karena sifatnya yang aman digunakan dan juga sudah banyak diaplikasikan dalam sistem penghantaran obat (Bhumkar, 2006). Disamping itu pembuatannya sederhana yaitu dengan cara melarutkan TPP kedalam larutan gelatin-kitosan atau mencelup serat kedalam larutan TPP. TPP merupakan polianion yang dapat bereaksi dengan kation oleh gaya elektrostatik. Pada suasana asam, gugus $-NH_2$ dari molekul gelatin dan kitosan terprotonasi membentuk ion $-NH_3^+$ yang berinteraksi dengan anion TPP.

Ionisasi TPP dikontrol oleh pH larutan, pada pH tinggi TPP terdisosiasi menjadi ion OH^- dan ion-ion tripolifosfat ($HP_3O_{10}^{-4}$ dan $P_3O_{10}^{-5}$) sedangkan pada pH rendah hanya terbentuk ion $P_3O_{10}^{-5}$. Jika pH larutan bertambah maka ionisasi gugus amin dari gelatin dan kitosan akan berkurang menyebabkan sambung silang ionik yang lemah, sedangkan pada pH asam akan membentuk sambung silang yang sempurna yang biasanya digunakan untuk mengatur pelepasan obat (Ko, 2002).

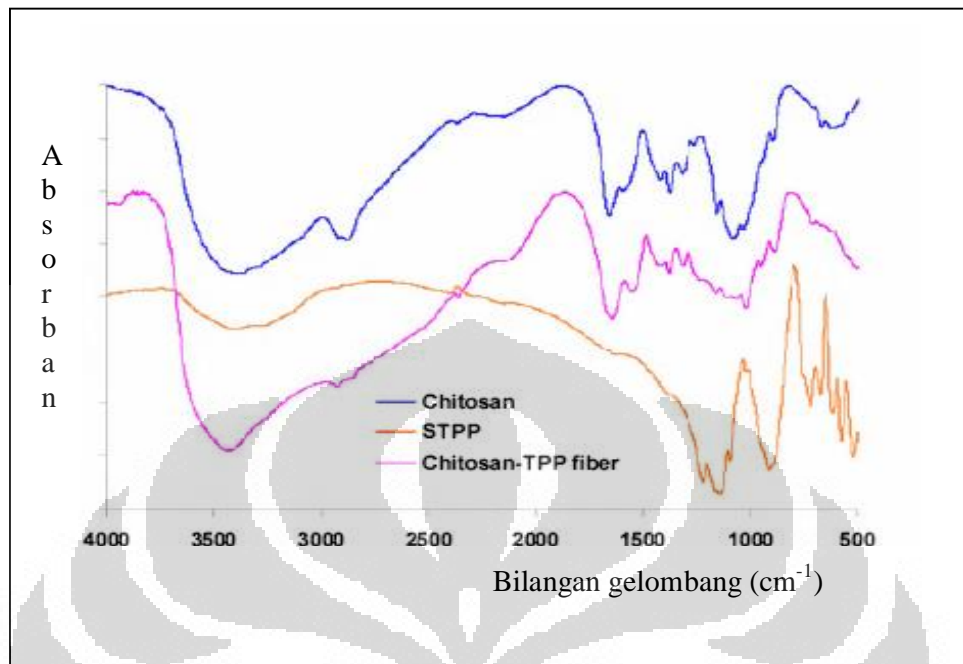


(Sumber Vandana, 2009 telah diolah kembali)

Gambar 2.6. Fosforilasi kitosan dengan TPP



Gambar 2.7. Fosforilasi gelatin dengan TPP



(Sumber Pati, 2010 telah diolah kembali)

Gambar 2.8. FTIR kitosan, TPP dan kitosan-TPP

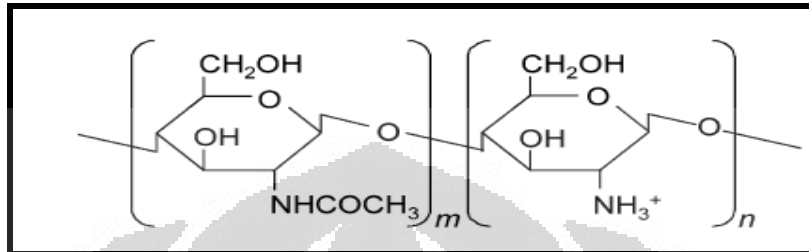
Dari perubahan spektrum infra merah terindikasi bahwa kitosan dapat difosforilasi oleh TPP, di mana serapan kitosan pada 1637cm^{-1} dan 1564 cm^{-1} yang menandakan adanya gugus amida I (C=O) dan amida II (N-H), berubah spektrumnya pada serat kitosan TPP yaitu serapan pada 1637 cm^{-1} bergeser ke 1556 cm^{-1} dan 1628 cm^{-1} , sedangkan serapan pada 1030 cm^{-1} menandakan adanya gugus fosfat dalam serat (Pati, 2010).

2.6. Kitosan

Kitosan merupakan polisakarida alam diperoleh dari limbah *Crustaceae* dan telah banyak dimanfaatkan untuk penghantaran obat dan sekaligus memiliki khasiat untuk mempercepat penyembuhan luka. Terdiri dari kopolimer glukosamin dan N-asetilglukosamin dan merupakan produk deasetilasi parsial dari kitin. Berat molekul dan derajat deasetilasi dapat dimodifikasi pada proses pembuatannya.

Universitas Indonesia

Derajat deasetilasi menentukan jumlah gugus amin pada rantai polimernya, Gugus amin ini menyebabkan kitosan bermuatan positif, dimana akan bereaksi dengan molekul yang bermuatan negatif.



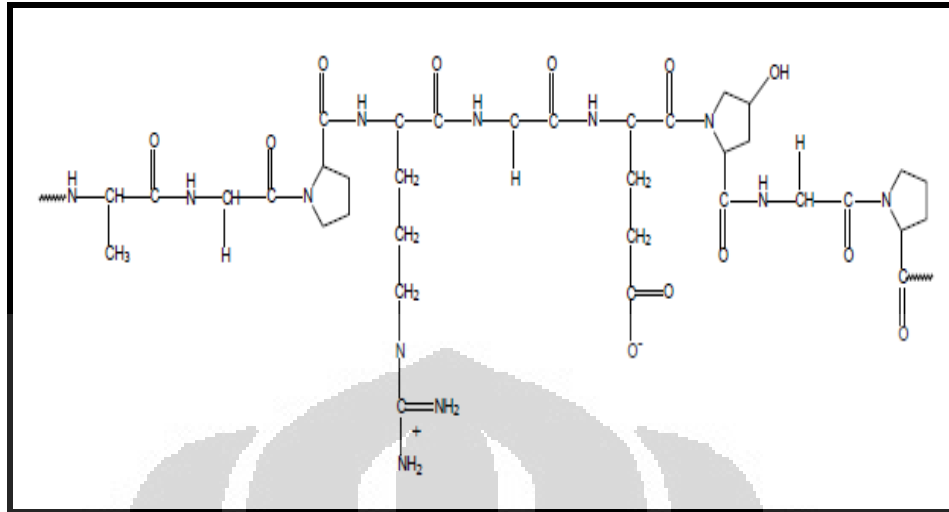
(Sumber: Matsumoto, 2007, telah diolah kembali)

Gambar 2.9. Struktur kimia kitosan

Derajat asetilasi kitosan akan berefek pada kristalinitasnya, dimana akan mempengaruhi kemampuan melarut dalam larutan asam. Kitosan tidak larut dalam suasana basa atau netral, tapi membentuk garam dengan asam anorganik atau organik seperti asam glutamat, asam hidroklorida, asam asetat dan asam laktat. Kitosan dengan sifat biologisnya sangat cocok untuk aplikasi biomedik, karena sifatnya yang biodegradabel dan tidak toksik (Heunis, 2010).

2.7. Gelatin

Gelatin merupakan biopolimer alam, terbuat dari hidrolisa parsial kolagen yang terdapat pada kulit, tulang dan jaringan binatang seperti sapi, babi dan ikan. Tergantung dari metoda pengolahannya, apakah dengan asam, basa atau enzimatis. Gelatin terdiri dari residu glisin, prolin dan hidroksiprolin, asam glutamate, alanin, arginin, asam aspartat, lisin, serin, leusin, valin dan lain-lain. Jumlah residu tersebut bervariasi tergantung dari bahan baku dan proses pembuatannya. Gelatin yang dibuat dari hidrolisa oleh asam disebut gelatin tipe A, sedangkan gelatin yang dibuat dari hidrolisa oleh basa disebut gelatin tipe B.



(Sumber GEA,2012, telah diolah kembali)

Gambar 2.10. Struktur gelatin

Sebagai polielektrolit amfoter, gelatin mempunyai banyak gugus NH₂ dan COOH. Karena harganya yang relatif murah dan sifatnya yang biokompatibel dan biodegradabel, gelatin banyak digunakan dalam industri farmasi, kosmetik dan medis (Sikareepaisan et al., 2008).

Pada suasana asam gelatin tipe B bermuatan positif dan akan bermuatan negatif pada pH diatas 5, disebabkan karena titik isoelektriknya pada pH 5 (Basu, 2009).

2.8 Asiatikosida

Centella asiatica (pegagan, antanan), merupakan tanaman liar yang banyak terdapat di Indonesia, kadang-kadang ditanam sebagai penutup tanah diperkebunan atau sebagai tanaman sayuran. Helai daun tunggal, bertangkai panjang sekitar 5 cm – 15 cm berbentuk ginjal.

Tanaman ini telah diteliti mempunyai khasiat untuk penyembuhan luka, luka bakar, ulkus pada kulit, lepra dan lain-lain. Kandungan zat aktifnya terdiri dari empat triterpenoid, yaitu: *Asiatic acid*, asiatikosida, *madecassic acid* dan *madecassoside*. Asiatikosida merupakan *triterpenoid triterpene* yang paling aktif

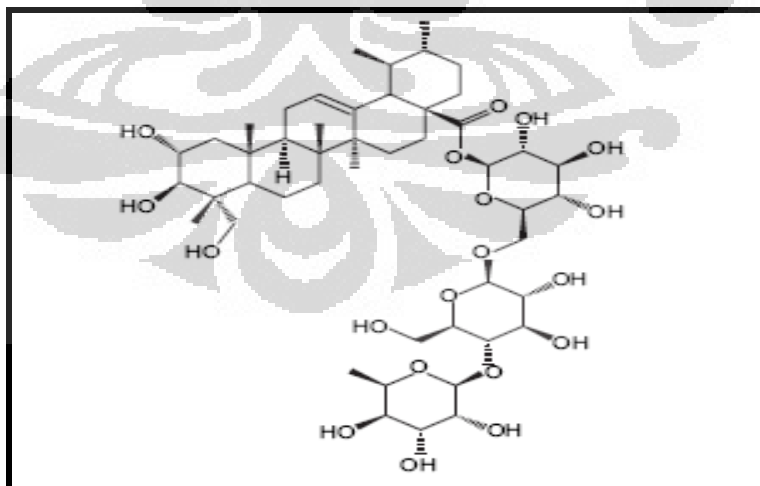
untuk penyembuh luka yaitu merangsang fibroblast dan mensintesa kolagen (Suwantong, 2010).



(Sumber:Koesandi, telah diolah kembali)

Gambar 2.11. Tanaman *Centella asiatica*

Asiatikosida larut dalam alkohol 50%, gliserin, butilen glikol, polietilen glikol 400, polietilen glikol 600 (European Pharmacopoeia). Ekstrak *Centella asiatica* telah lama digunakan untuk pengobatan luka dan banyak penelitian yang mendukungnya.



(Sumber:Sikareepaisan et al,2008,telah diolah kembali)

Gambar 2.12. Struktur kimia Asiatikosida

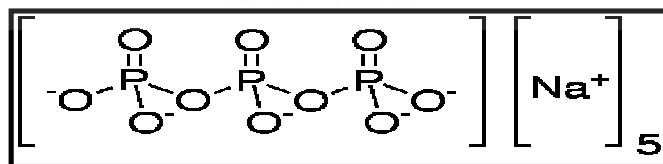
Pada studi preklinik dilaporkan bahwa berbagai formulasi (salep, krim dan jel) dari ekstrak *Centella asiatica* yang diaplikasikan pada luka terbuka pada tikus ternyata menambah proliferasi sel dan sintesa kolagen, terlihat dari bertambahnya jumlah kolagen dan kekuatan tarik (tensile strength).

Luka yang diobati dengan ekstrak *Centella asiatica* lebih cepat berepitelisasi dan kontraksi lukanya dibanding kontrol negatif. Pada penelitian dengan hewan coba terlihat bahwa asiatikosida menambah induksi anti oksidan pada tahap awal penyembuhan luka. Pada hewan coba marmot yang dilukai ternyata larutan asiatikosida 0,2% menambah produksi hydroxyproline 56%, 57% kekuatan tarik, menambah kandungan kolagen dan epitelisasi yang lebih baik. Sedangkan pada tikus yang dibuat diabetes dengan streptozotocin, dimana penyembuhan lukanya lebih lama, pemakaian larutan asiatikosida 0,4% menambah kandungan hydroxyproline, kekuatan tarik, kandungan kolagen dan epitelisasi (Gohil et al., 2010).

2.9. Natrium Tripolifosfat

Tripolifosfat (TPP) atau biasa disebut juga natrium tripolifosfat (*Natrium tripolyphosphate/STPP*) merupakan suatu serbuk atau granul berwarna putih dan bersifat sedikit higroskopis. TPP bersifat mudah larut dalam air dan tidak larut dalam etanol. Sebagai media penghantaran obat, kitosan menunjukkan profil pelepasan obat yang kurang baik.

Untuk memperbaiki profil pelepasan obat yang diharapkan dalam jangka waktu yang panjang, maka kitosan dan gelatin difosforilasi dengan molekul anion seperti tripolifosfat untuk membentuk jembatan antara rantai polimer.



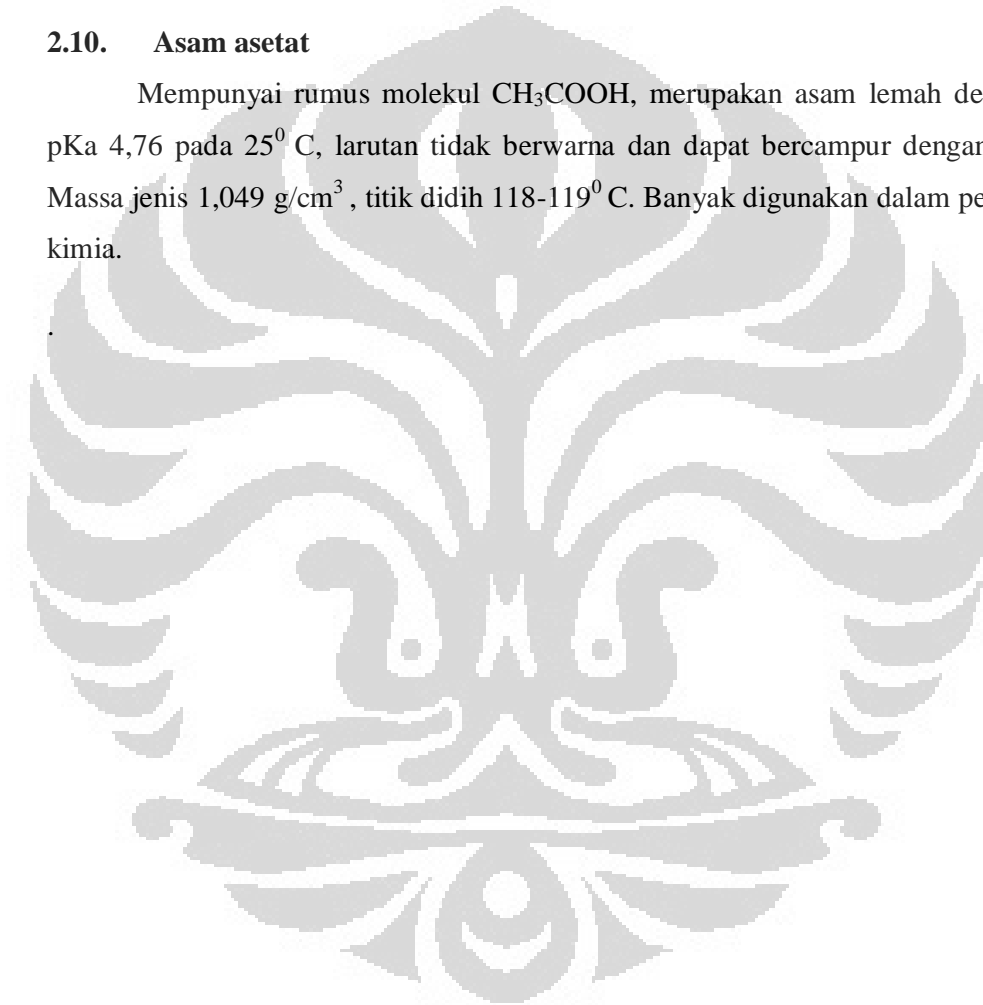
[Sumber: Greenwood, 1997, telah diolah kembali]

Gambar 2.13. Struktur natrium tripolifosfat

Prosedur fosforilasi sederhana, mudah serta tidak membutuhkan katalis, sehingga sangat menarik untuk diaplikasikan dalam bidang medis atau farmasi. Fosforilasi dapat dibuat dengan melarutkan atau mendispersikan TPP ke dalam larutan kitosan atau sebaliknya. Karena sifatnya yang tidak toksik, TPP banyak digunakan dalam system penghantaran obat, dibanding bahan lainnya seperti glutaraldehid (Bhumkar, 2006).

2.10. Asam asetat

Mempunyai rumus molekul CH_3COOH , merupakan asam lemah dengan pKa 4,76 pada 25°C , larutan tidak berwarna dan dapat bercampur dengan air. Massa jenis $1,049\text{ g/cm}^3$, titik didih $118\text{-}119^\circ\text{C}$. Banyak digunakan dalam pelarut kimia.



BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kitosan (derajat asetilasi 75-85%, BM 50.000) (Sigma), gelatin (tipe B, diekstraksi dari kulit sapi) (Sigma), natrium tripolifosfat (Wako, Jepang), asiatikosida (Guanyu, Cina), dapar fosfat (Wako, Jepang), asam asetat glasial (Merck, Jerman), natrium klorida (Indonesia), etilen glikol (Merck, Jerman), aqua demineralisata (Indonesia), larutan NaCl fisiologis (Indonesia), hematoksilin-eosin (Indonesia), formalin (Indonesia), dan parafin (Indonesia).

Hewan coba: Tikus jantan galur *Sprague Dawley* dengan berat ± 150 gram berumur 5 bulan (untuk pengujian secara *in vivo*) (Institut Pertanian Bogor, Indonesia).

3.2. Alat

Peralatan yang digunakan: alat pemintalan elektrik (Dep. Fisika ITB), HPLC Shimadzu LC6AD (Liquid Chromatograph) (Shimadzu, Jepang), FT-IR (Shimadzu, Jepang), konduktometer (Extech), pengaduk magnetik, *scanning electron microscope* JSM-5310LV (JEOL Ltd., Jepang), dan peralatan laboratorium lainnya.

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Preparasi Larutan Gelatin-Kitosan

Kitosan sebanyak 50 mg dan gelatin 2,2 gram dilarutkan larutan asam asetat 70% dengan menggunakan pengaduk magnetik, didiamkan semalam agar larut sempurna. Cara pembuatan asam asetat 70% adalah dengan mencampurkan 70 mL asam asetat glasial dalam aquadest hingga 100 mL.

3.3.2. Preparasi Larutan Natrium Tripolifosfat

Natrium tripolifosfat sebanyak 250 mg dilarutkan dalam 10 mL asam asetat 70% dengan menggunakan pengaduk magnetik, didapat larutan dengan kadar 2,5%.

3.3.3. Optimasi Pembuatan Serat Nano

Kitosan dan gelatin dilarutkan dalam larutan asam asetat 70% , didiamkan semalam agar larut sempurna. Kedalam larutan ditambahkan etilen glikol dan larutan natrium tripolifosfat, kemudian diukur konduktivitas, viskositas dan pHnya. Asiatikosida ditambahkan dan diaduk dengan pengaduk magnetik sesaat sebelum pemintalan elektrik. Larutan dimasukkan kedalam *syringe* 10 ml, dengan diameter jarum 0,8mm. Kemudian dibuat serat dengan kondisi alat pada pemintalan elektrik sebagai berikut: jarak antara tip/ jarum–kolektor 10cm, tegangan listrik 7,5kV dan kecepatan aliran larutan 0,3 ml/jam. Serat yang terjadi dikumpulkan pada kolektor alumunium foil.

Tabel 3.1. Formula pembuatan serat nano

Formula	Kitosan (b/v)	Gelatin (b/v)	TPP (b/v)	Etilen glikol (v/v)	Asam asetat 70%(v/v)	Asiatikosid (b/v)
A	0,5 %	22 %	0,1 %	5 %	70%	7,5 %
B	0,5 %	22 %	0,25 %	5 %	70%	7,5 %
C	0,5 %	22 %	0,5 %	5 %	70%	7,5 %

3.3.4. Pembuatan sediaan

Pembuatan sediaan yang mengandung asiatikosida 4 mg dibuat dari larutan formula (A,B,C) dengan kadar asiatikosid 75 mg/ml dengan kecepatan aliran 0,3ml/jam selama 10,7 menit.

3.3.5. Pembuatan Kurva Kalibrasi Asiatikosida

Asiatikosida ditimbang seksama sebanyak $\pm 200,0$ mg, kemudian dilarutkan dalam larutan dapar fosfat metanol pada labu tentukur sampai 100,0 mL. Didapat larutan dengan konsentrasi 2000 ppm. Larutan tersebut, dipipet 25,0 mL, dan diencerkan dengan larutan dapar fosfat metanol dan dicukupkan volumenya sampai 250,0 mL sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 200 ppm. Dari larutan 200 ppm, diencerkan dalam larutan dapar fosfat metanol sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm. Pada larutan dengan konsentrasi 25 ppm diamati dengan menggunakan HPLC, dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya. Panjang gelombang () maksimum asiatikosida dalam dapar fosfat metanol, ditentukan dengan melakukan *scanning* pada panjang gelombang antara 200 – 400 nm. Serapan larutan-larutan tersebut diukur dengan HPLC pada panjang gelombang maksimum, kemudian dihitung persamaan regresi linearnya.

3.3.6. Pengukuran kandungan aktual Asiatikosit

Sediaan formula A, B dan C yang mengandung asiatikosit 4mg dihaluskan, dilarutkan dalam media dapar fosfat yang mengandung 10% metanol, divortex selama 30 menit, kemudian di tambahkan media sampai 20 ml, diamkan selama 24 jam. Larutan disaring dengan saringan *microphore* 0,2 μ m. Asiatikosit yang dilepaskan diukur dengan HPLC pada 220 nm.

3.3.7. Pengukuran jumlah asiatikosida yang dilepaskan (Sikareepaisan, 2008).

Sediaan direndam dalam 20 ml medium P/B/M (buffer fosfat yang mengandung 10% metanol) pada temperatur konstan ($37 \pm 0,5$ C). Selanjutnya 2 ml medium diambil pada berbagai interval waktu (1 jam, 2 jam, 3 jam, 6 jam, 12 jam, 48 jam, 72 jam) dan langsung diganti dengan medium baru dengan jumlah sama. Larutan disaring dengan saringan *microphore* 0,2 μ m. Jumlah asiatikosit dalam larutan diukur dengan HPLC pada 220 nm.

3.3.8. Pengukuran Morfologi dan Diameter Serat

SEM digunakan untuk mengetahui morfologi dan diameter serat yang dihasilkan (Vriez, 2007).

3.3.9. Pengukuran Derajat Pengembangan (*Swelling*)

Serat direndam dalam larutan buffer fosfat (PBS pH 7,4), kemudian serat ditimbang sampai beratnya konstan (interval 30 menit, 1 jam, 2 jam dan 3 jam) Kelebihan air diserap dengan kertas tissue (Pati F, 2010).

3.3.10. Pengukuran Kapasitas Retensi Air

Serat direndam selama 24 jam dalam larutan dapar fosfat dan disentrifuge pada 4000 rpm selama 5 menit untuk menghilangkan kelebihan air diantara ruang antar serat. Berat serat disebut berat basah (W_1). Serat dikeringkan pada 105°C selama 12 jam, kemudian disimpan dalam wadah vakum sampai berat konstan dicapai. Berat serat yang kering disebut berat kering (W_0)(Pati, 2010).

3.3.11. Analisis FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*)

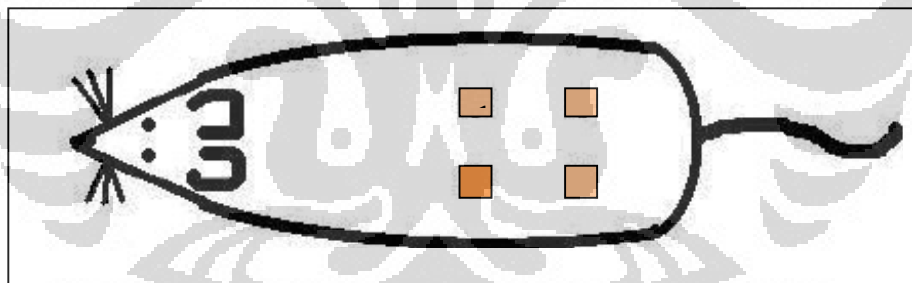
Spektrum FT-IR dari kitosan, gelatin, TPP dan serat nano kitosan-gelatin-TPP dilakukan pada daerah $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. Spektrum FT-IR digunakan untuk menentukan keberadaan dari TPP dalam serat nano. Serbuk disiapkan menggunakan KBr dibentuk *pellet*

3.3.12. Penetapan Serat Nano Asiatikosida Terpilih

Hasil karakterisasi dari ketiga formula (A, B, dan C) dibandingkan untuk menetapkan serat nano terpilih guna diujikan pada hewan coba. Karakter dari serat nano terpilih adalah berukuran nano, kadar aktual yang memenuhi syarat farmakope Indonesia, memiliki morfologi yang baik, dan dapat diterima pada konfirmasi dengan FT-IR.

3.3.13 Uji Efektivitas Daya Penyembuhan Luka

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan galur *Sprague dawley* sebanyak 5 ekor. Sebelumnya tikus terlebih dahulu diaklimatisasi selama 1 minggu dan diberi pakan seperti biasa. Tikus ditimbang untuk menentukan dosis obat bius. Tikus dibersihkan sebelum dibius, khususnya bulu punggung dibersihkan dengan gunting dan pembersih bulu. Lalu diinjeksi intra peritoneal dengan ketamine dengan dosis 80 mg/kg tikus dan xylazine 8 mg/kg tikus secara intra peritoneal. Kemudian masing-masing tikus dilukai 4 luka sedalam dermis, setelah itu luka dibersihkan dengan larutan Na Cl fisiologis dan ditutup dengan 4 cara yaitu (1) serat formula terbaik dengan asiatikosida (2) serat nano, (3) kontrol positif dan (4) kontrol negatif. Tikus yang digunakan sebanyak 5 ekor. Sediaan diaplikasikan secara topikal diatas luka selama 5 hari, untuk control positif dioleskan 2 x sehari. Proses penyembuhan luka (pengurangan luas luka) diamati pada hari ke 3 dan ke 5. (Nunes SP et al, 2010)



(Sumber Gal, etal.,2008 telah diolah kembali)

Gambar 3.1. Punggung tikus yang dilukai

3.4. Analisis Data

Data yang didapatkan pada uji *in vivo* dianalisis secara statistik dengan ANOVA, signifikansi statistik diterima pada tingkat kepercayaan $P < 0,05$ untuk melihat hubungan antar kelompok perlakuan.

3.5. Uji Histopatologis

Kulit tikus yang digunakan dalam uji dipotong dengan ukuran 0,5 cm x 1,5 cm, lalu dicuci dengan larutan *saline*. Dipisahkan dan disimpan dalam 10% formalin selama sekurangnya 24 jam sebelum digunakan, kemudian ditanamkan dalam parafin blok dan dipotong dengan ketebalan 3 μ m. Sayatan diletakkan di atas kaca objek dan diwarnai dengan hematoksilin-eosin, lalu diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya. Uji ini dilakukan untuk melihat perubahan morfologi dari kulit tikus yang mungkin terjadi akibat dari pemberian sediaan (Abdulaa et al, 2010).



BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Optimasi Pembuatan Serat Nano (Fosforilasi gelatin dan kitosan)

Proses fosforilasi gelatin dan kitosan dengan natrium tripolifosfat (TPP) dilakukan dalam 1 tahap, yaitu pada waktu sebelum pemintalan elektrik. Proses ini lebih murah dan lebih sederhana dibandingkan dengan fosforilasi 2 tahap, dimana serat dibuat terlebih dulu kemudian baru difosforilasi (Schiffman, 2007).

Fosforilasi gelatin dan kitosan merupakan hasil sambung silang antara polielektrolit dengan pasangan ionnya. Dalam penelitian ini digunakan gelatin, kitosan dan tripolifosfat sebagai bahan untuk eksipien pembuatan serat nano. Kitosan dan gelatin dalam suasana asam merupakan polimer kationik dapat bereaksi dengan anion multivalen seperti tripolifosfat. Ionisasi TPP dikontrol oleh pH larutan, pada pH tinggi TPP terdisosiasi menjadi ion OH⁻ dan ion-ion tripolifosfat ($\text{HP}_3\text{O}_{10}^{-4}$ dan $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$) sedangkan pada pH rendah hanya terbentuk ion $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$. Jika pH larutan bertambah maka ionisasi gugus amin dari kitosan akan berkurang menyebabkan sambung silang ionik yang lemah, sedangkan pada pH asam akan membentuk sambung silang yang sempurna yang biasanya digunakan untuk mengatur pelepasan obat (Ko, 2002). Gelatin dalam suasana asam merupakan polimer kationik, karena titik isoelektrik gelatin B pada pH5. Prosedur fosforilasi tersebut meliputi pencampuran dua larutan, yaitu larutan gelatin, kitosan dan larutan TPP.

Pada penelitian ini kitosan tidak dapat dibuat serat nano kecuali ditambahkan polimer lain. Kopolimer yang dipilih adalah gelatin, karena sifatnya yang tidak toksik, biodegradabel dan biokompatibel. Jadi kitosan dan gelatin digunakan bersama-sama sebagai polimer dan kopolimer. Pelarut yang digunakan adalah asam asetat 70%, karena dapat digunakan untuk membuat serat nano yang homogen baik untuk kitosan maupun gelatin. Kitosan mempunyai rangka polimer yang kaku (rigid), di mana gugus NH_2^+ dan OH^- berperan dalam terbentuknya ikatan hidrogen. Penambahan gelatin akan mengurangi interaksi intermolekul kitosan dengan ikatan hidrogennya (Javary, 2011).

Larutan campuran kitosan dan gelatin didapatkan dengan melarutkan kitosan dan gelatin dalam asam asetat 70% dengan menggunakan pengaduk magnetik. Larutan ini memiliki warna sedikit kekuningan, agak kental, dan beraroma khas asam asetat. Larutan kedua adalah larutan tripolifosfat yang didapatkan dengan melarutkan natrium tripolifosfat sebanyak 250 mg dalam 10 mL larutan asam asetat 70% dengan menggunakan pengaduk magnetik. Jumlah volume natrium tripolifosfat untuk formula A, B dan C berturut-turut ialah 0,4 ml, 1 ml dan 2 ml. Larutan ini tidak memiliki warna dan bau. Kadar TPP yang digunakan dalam larutan ialah 0,1%, 0,25% dan 0,5%, karena jika lebih dari 0,5% ada bagian yang tidak larut sehingga sehingga menyumbat *spinnerete*, terlihat bahwa penambahan TPP akan menaikkan derajat sambung silang.

Tabel 4.1. Formula fosforilasi gelatin dan kitosan

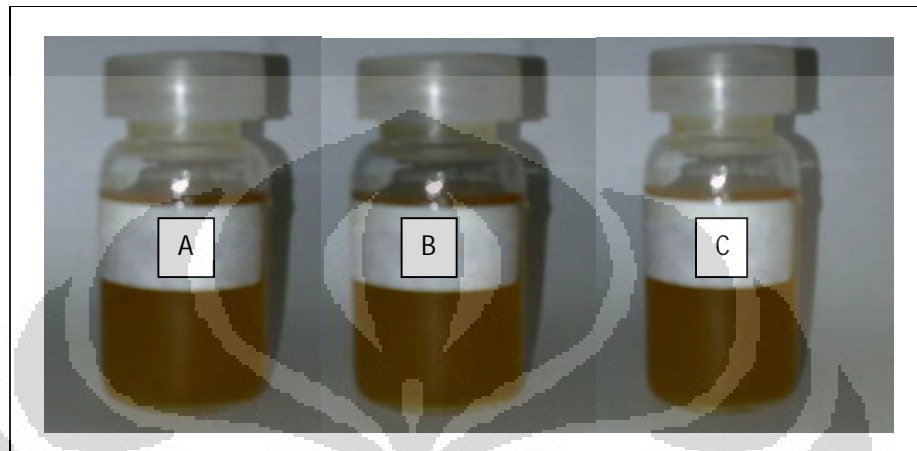
F	Kitosan (b/v)	Gelatin (b/v)	TPP (b/v)	EG (v/v)	AE 70% (v/v)	Konduktivitas $\mu\text{S cm}^{-1}$	Viskositas mPas	pH
A	0,5 %	22 %	0,1%	5 %	70%	2060	430	3
B	0,5 %	22 %	0,25%	5 %	70%	2260	455	3,2
C	0,5 %	22 %	0,5%	5 %	70%	2560	460	3,4

Keterangan : F=Formula, EG=etilen glikol, AE=asam asetat

Pada penelitian ini digunakan gelatin dengan kadar 22%, karena kadar gelatin yang kurang dari 22% menyebabkan gaya viskoelastis (*viscoelastic*) tidak dapat mengatasi gaya elektrostatis dan gaya Coulomb, sehingga terbentuk serat yang tidak homogen atau berbentuk serat dengan partikel (*bead*). Campuran kitosan dan gelatin mempunyai viskositas yang lebih rendah dari pada larutan yang hanya terdiri dari kitosan, sehingga meningkatkan kemampuan medan listrik untuk membentuk kerucut Taylor dan jet polimer dalam pembuatan serat nano yang baik dan seragam (Javary, 2011).

Penambahan etilen glikol sebagai kosolven untuk mendapatkan serat yang homogen dan tidak ada partikelnya (*beaded fibers*), meskipun etilen glikol bukan pelarut untuk gelatin tapi dipilih karena mempunyai konstanta dielektrik yang tinggi dibandingkan dengan asam asetat (konstanta dielektrik asam asetat

6,15 sedangkan etilen glikol 37,70). Penambahan etilen glikol akan menaikkan konduktivitas larutan. Konsentrasi optimal etilen glikol yang ditambahkan adalah 5% untuk mendapatkan larutan yang jernih dan seras yang homogen. (Choktaweessap, 2007).



Gambar 4.1. Larutan: formula A (A), formula B (B), formula C (C)

Penambahan asiatikosida dilakukan sesaat sebelum pemintalan elektrik, dengan cara diaduk dengan pengaduk magnetik. Hal ini dilakukan untuk mencegah rusaknya asiatikosida oleh asam.

Pembuatan ketiga formula dimaksudkan untuk membandingkan tingkat efektivitas pada pengujian secara *in vitro* dan *in vivo* berikutnya. Perbedaan formula fosforilasi gelatin dan kitosan terlihat pada Tabel 4.1 dan larutannya dapat dilihat pada Gambar 4.1.

4.1.1 Pembuatan Serat Nano

Larutan dimasukkan kedalam *syringe* 10 ml, dengan diameter jarum 0,8mm. Kemudian dibuat serat dengan kondisi alat pada pemintalan elektrik sebagai berikut: jarak antara tip/ jarum–kolektor 10cm, tegangan listrik 7,5 kV dan kecepatan aliran larutan 0,3 ml/jam. Serat yang terjadi dikumpulkan pada kolektor aluminium foil.

Diameter jarum yang optimal untuk penelitian ini berukuran 0,8 mm, dimana diameter yang lebih kecil dari 0,8 mm menyebabkan larutan menjadi cepat kering

pada lubang jarum sehingga menyumbat aliran larutan. Sedangkan diameter yang lebih besar dari 0,8 mm menyebabkan pembuatan serat tidak sempurna, karena larutan tidak cukup waktu untuk menguapkan pelarutnya.

Tegangan listrik yang ditambahkan merupakan parameter penting dalam pemintalan elektrik, karena berhubungan dengan kecepatan aliran jet. Ketika tegangan listrik ditambahkan, muatan listrik akan ditambahkan pada larutan polimer, sehingga terjadi pelepasan jet yang bermuatan dan membentuk serat. Bila tegangan yang diberikan terlalu kecil, maka tidak cukup untuk mengatasi gaya tolak menolak antar molekul polimer sehingga tidak terbentuk kerucut Taylor. Sedangkan tegangan yang terlalu besar menyebabkan aliran jet yang terlalu cepat sampai di kolektor, sehingga terbentuk *droplet*.

Jarak jarum kolektor harus cukup untuk menguapkan pelarut dari kerucut Taylor sampai ke kolektor.

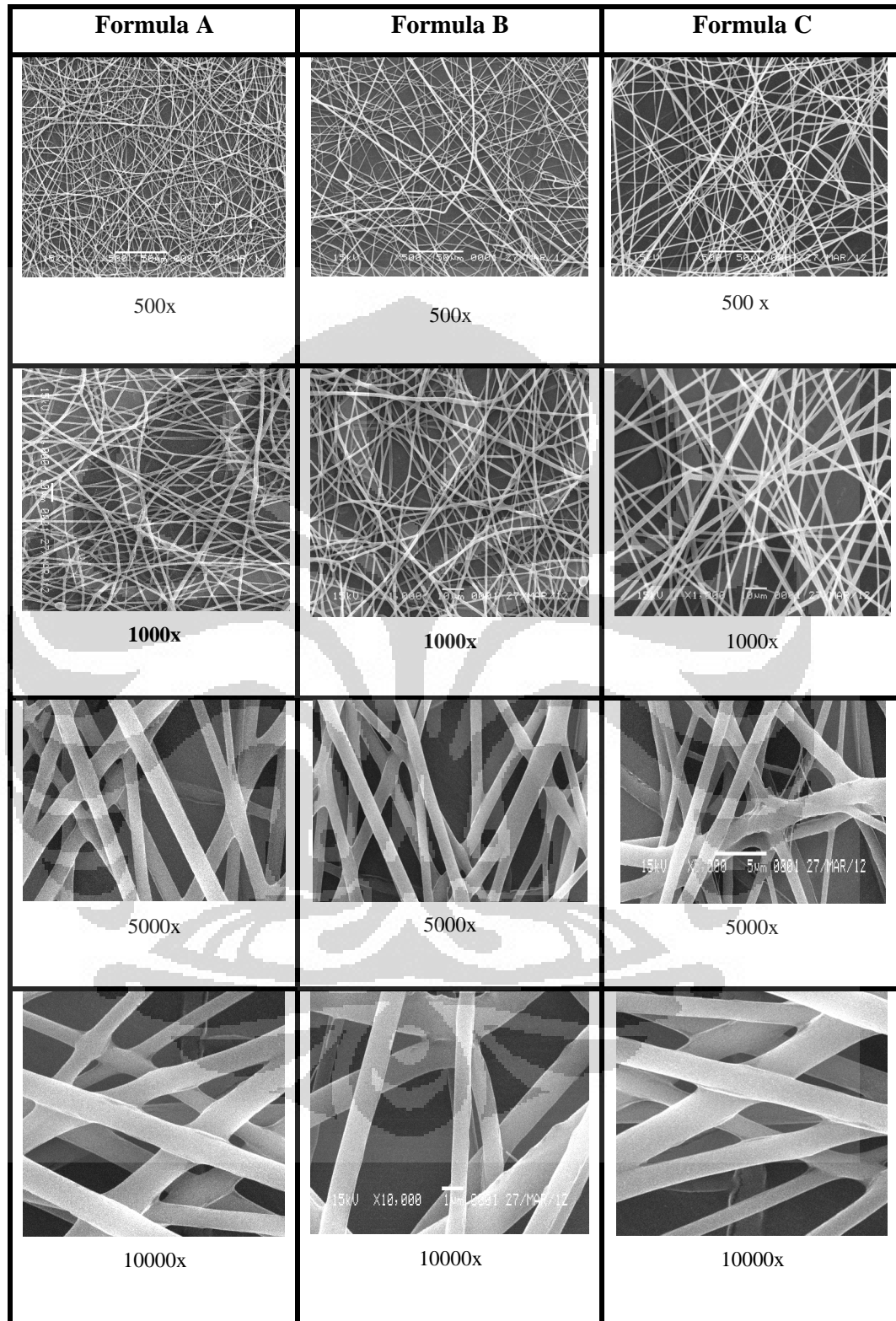
Penambahan kecepatan aliran yang terlalu besar akan mengganggu proses pemuluran polimer dan penguapan pelarut, sehingga ada polimer yang tidak bermuatan dan sampai di kolektor dalam bentuk *droplet*.

4.1.2. Pengujian morfologi dan diameter serat

SEM (*Scanning Electron Microscopy*) digunakan untuk mengetahui morfologi dan diameter serat yang dihasilkan dari formula A, B dan C. Perbedaan diameter serat terlihat pada Tabel 4.2 dan morfologi seratnya dapat dilihat pada Gambar 4.2.

Tabel 4.2. Diameter serat

Formula	Diameter
A	620±76 nm
B	704± 90 nm
C	760±85 nm



Gambar 4.2. Morfologi serat hasil pemintalan elektrik

Diameter serat yang terjadi ditentukan oleh 2 tahap pemuluran (stretching) selama proses, yaitu pada pelepasan jet kerucut Taylor dan penguapan pelarut selama pencapaian kolektor. Penambahan TPP pada formula A sebesar 0,1% b/v, formula B 0,25% b/v dan formula C 0,5% ternyata berpengaruh pada diameter serat, ini disebabkan karena ada kenaikan viskosita larutan, sehingga mengurangi pemuluran serat selama proses pemintalan (Cokthaweesap, 2007).

4.1.3. Pengukuran derajat pengembangan (swelling)

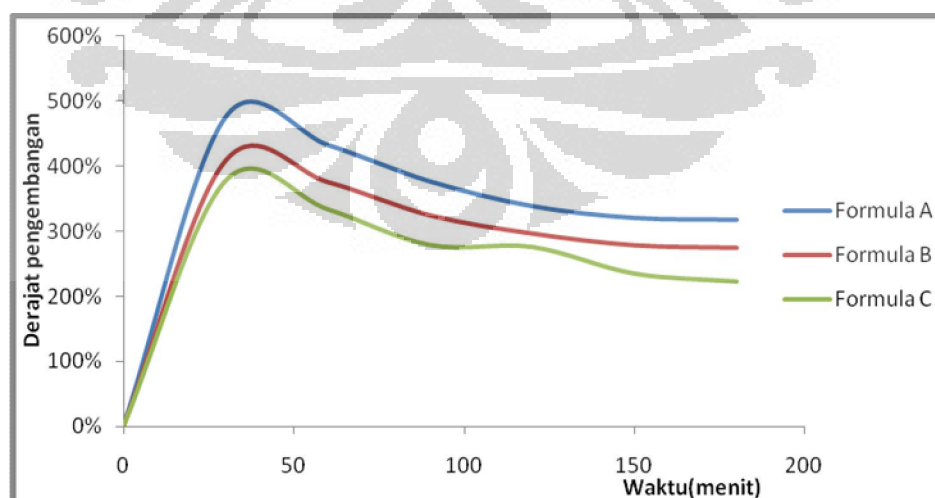
Serat direndam dalam larutan buffer fosfat (PBS pH 7,4), kemudian serat ditimbang sampai beratnya konstan (interval 30 menit, 1 jam, 2 jam dan 3 jam) Kelebihan air diserap dengan kertas tissue (Pati F, 2010).

Derajat pengembangan = $\frac{\text{berat basah}-\text{berat kering}}{\text{berat kering}} \times 100\%$

Perbedaan derajat pengembangan terlihat pada Tabel 4.3 dan grafiknya dapat dilihat pada Gambar 4.3.

Tabel 4.3. Derajat pengembangan

Formula	30'	60'	90'	120'	150'	180'
A	475%	432%	376%	338%	320%	317%
B	408%	375%	324%	296%	278%	274%
C	378%	334%	279%	276%	235%	223%



Gambar 4.3. Derajat pengembangan serat

Dapat dilihat dari grafik bahwa serat mengembang dimulai pada 30 menit pertama, kemudian relatif stabil setelah menit ke 90, di mana telah terjadi keseimbangan larutan. Serat memperlihatkan derajat pengembangan antara 100% sampai 200%. Serat dengan penambahan TPP 0,5% memperlihatkan derajat pengembangan paling rendah dibanding lainnya, karena densitas sambung silang yang paling tinggi.

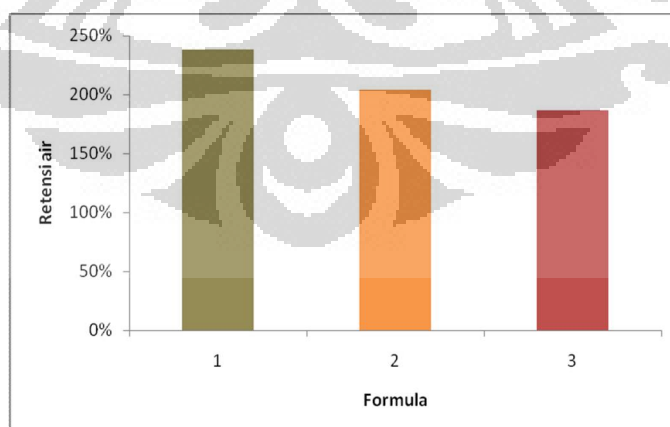
4.1.4. Pengukuran kapasitas retensi air (Pati F, 2010)

Serat direndam selama 24 jam dalam larutan buffer fosfat (PBS) dan disentrifuge pada 4000 rpm selama 5 menit untuk menghilangkan kelebihan air diantara ruang antar serat. Berat serat disebut berat basah (W_1). Kemudian serat dikeringkan pada 105°C selama 12 jam, kemudian disimpan dalam wadah vakum sampai berat konstan dicapai . Berat serat yang kering disebut berat kering (W_0).

Kapasitas retensi air (water retention capacity/WRC) dihitung sebagai berikut : $\% \text{ WRC} = (W_1 - W_0) / W_0 \times 100\%$

Tabel 4.4 Kapasitas retensi air

Formula	24 jam
1	238%
2	204%
3	187%



Gambar 4.4. Kapasitas retensi air

4.1.5. Pengukuran Kadar Aktual Asiatikosida

Asiatikosida dalam serat nano perlu diukur untuk mengetahui jumlah asiatikosida yang dikandung didalamnya. Sediaan serat nano dihaluskan dan dimasukkan kedalam dapar fosfat metanol, divortex selama 30 menit lalu ditambahkan dapar fosfat metanol sampai 20 ml, diamkan selama 24 jam. Larutan disaring dengan saringan microphore 0,2 μ m. Asiatikosid yang dilepaskan diukur dengan HPLC pada 220 nm.

Tabel 4.5. Pengukuran kadar aktual asiatikositid

Formula	Kadar	Persentase
A	3,80 mg \pm 0,04 mg	95% \pm 0,9%
B	3,76 mg \pm 0,06 mg	94% \pm 1,4%
C	3,76 mg \pm 0,07mg	94% \pm 1,7%

Pada metoda ini digunakan metanol untuk menambah kelarutan asiatikosida, dan dapar fosfat pH 7,4 yang menyerupai cairan tubuh. Jumlah asiatikosida yang didapat dari pemeriksaan memenuhi syarat Farmakope di mana formula A 95%, formula B 94% dan formula C 94%. Dari data yang diperoleh, jumlah asiatikosida yang diperoleh kembali cukup tinggi, ini menandakan asiatikosida cukup stabil terhadap proses pembuatan serat nano tersebut.

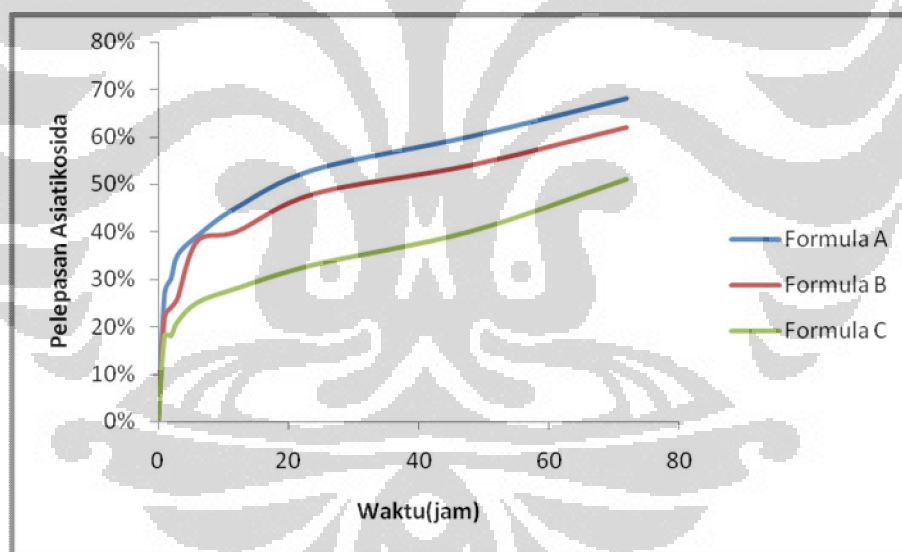
4.1.6. Pengukuran Jumlah Asiatikosida Yang Dilepaskan.

Pelepasan asiatikosida dari serat nano dilakukan dengan metoda perendaman total (total immersion) (Sikarepaisan, 2008). Media yang digunakan ialah dapar fosfat dengan metanol, karena dapar fosfat lebih menyerupai cairan tubuh dan penambahan metanol untuk menambah kelarutan asiatikosida. Sediaan direndam dalam 20 ml media pada suhu 37⁰C dalam waktu 3 hari. Selanjutnya 2 ml medium diambil pada berbagai interval waktu 1 jam, 2 jam, 3 jam, 6 jam, 12 jam, 48 jam, 72 jam, dan langsung diganti dengan medium baru dengan jumlah sama. Kadar TPP yang ditambahkan mempengaruhi banyaknya fosforilasi, di mana derajat pengembangan berkurang akan mempengaruhi pelepasan obat. Pelepasan asiatikosida yang berlangsung selama 72 jam menandakan bahwa

kitosan TPP dapat digunakan untuk mengatur pelepasan obat. Data pelepasan asiaticosida dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan Gambar 4.5.

Tabel 4.6. Pelepasan asiaticosida dibandingkan kadar aktualnya

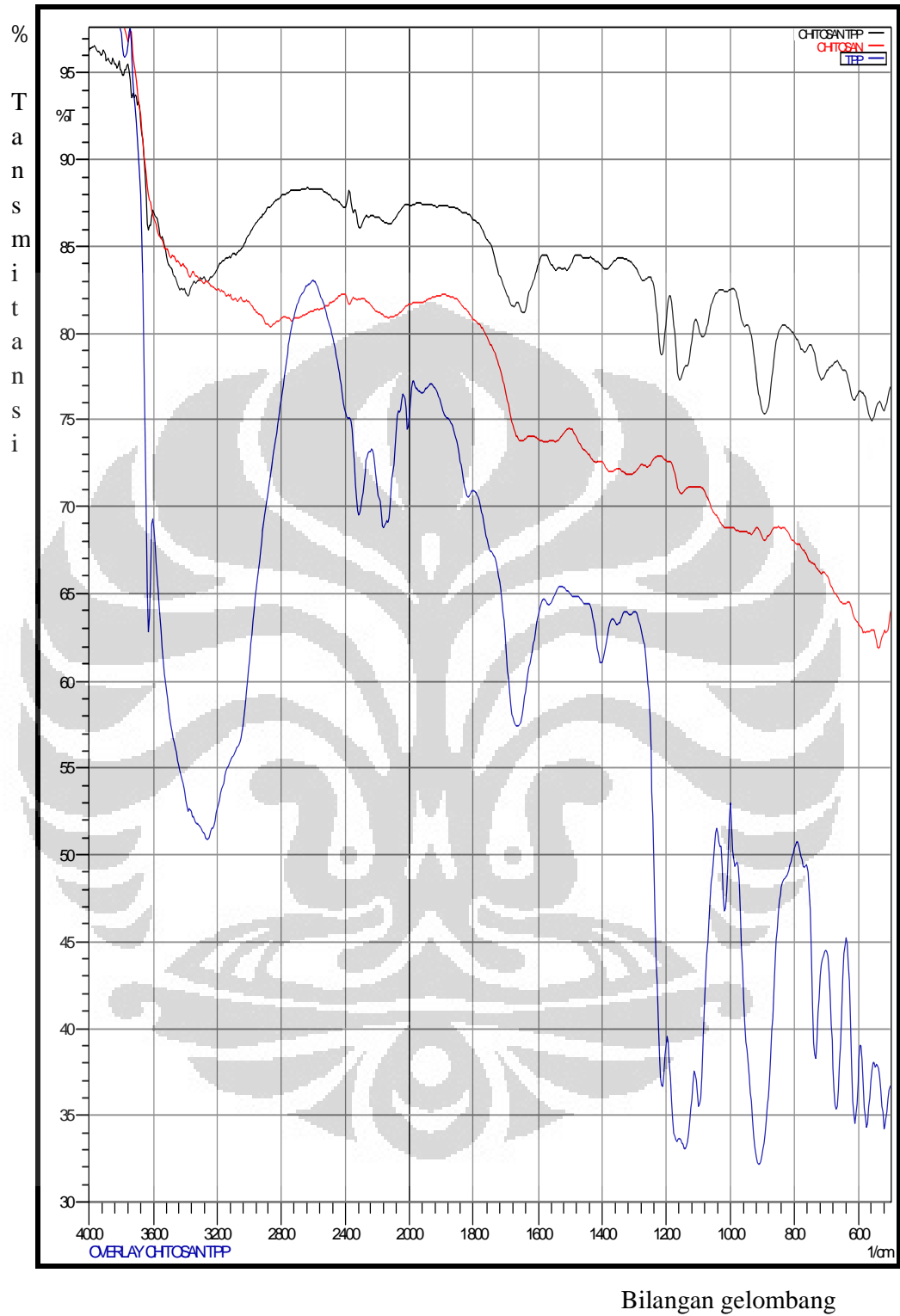
Waktu	Formula 1	Formula 2	Formula 3
1 jam	27%	22%	18%
2 jam	30%	24%	18%
3 jam	35%	26%	21%
6 jam	39%	38%	25%
12 jam	45%	40%	28%
24 jam	53%	48%	33%
48 jam	60%	54%	40%
72 jam	68%	62%	51%



Gambar 4.5 Pelepasan asiaticosida dibandingkan kadar aktualnya

4.1.7. Analisis FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*)

Untuk membandingkan suatu senyawa yang belum diketahui, perlu dibandingkan dengan spektrum standar yang dibuat dengan kondisi sama.

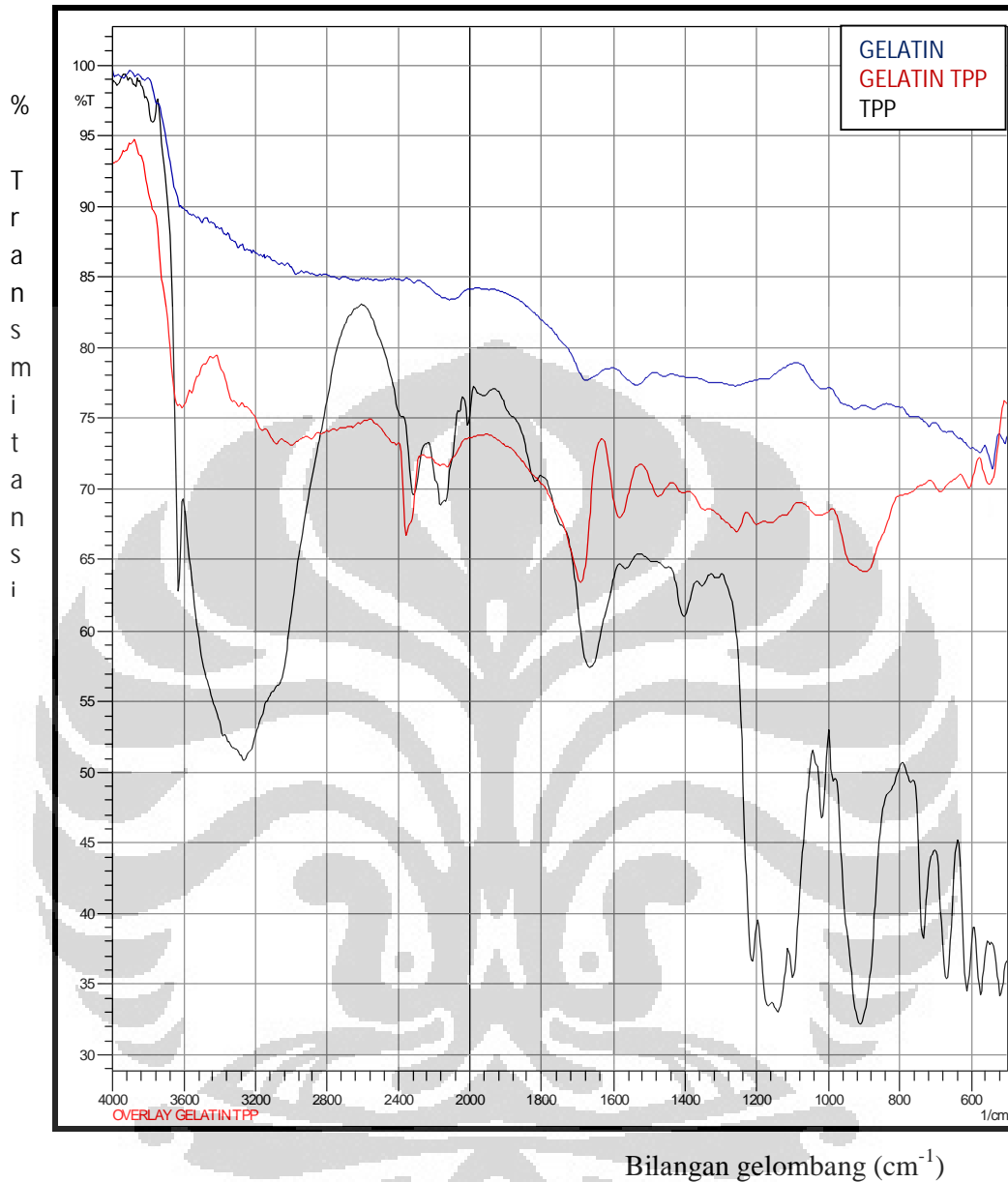


Gambar 4.6. Overlay FTIR Kitosan, TPP dan Kitosan TPP

Absorban radiasi infra merah sesuai dengan tingkat energi vibrasi dan rotasi pada ikatan kovalen yang mengalami perubahan momen dipol dalam suatu molekul. Vibrasi molekul hanya akan terjadi bila suatu molekul terdiri dari dua atom atau lebih. Untuk dapat menyerap radiasi infra merah, vibrasi suatu molekul harus menghasilkan perubahan momen dwi kutub. Terdapat dua jenis vibrasi molekul yaitu *stretching* dan *bending*. Vibrasi *stretching* adalah pergerakan atom yang teratur sepanjang sumbu ikatan antara dua atom sehingga jarak antara atom dapat bertambah atau berkurang.

Adanya fosfat dalam senyawa dapat dibandingkan dengan adanya serapan pada $1100-900\text{ cm}^{-1}$ (P-O *stretching*) dan $1300 - 1175\text{ cm}^{-1}$ (P=O *stretching*) dengan menggunakan alat spektro-fotometer infra merah. Dari hasil pemeriksaan spektra seperti terlihat pada gambar 4.6 terdapat perubahan pada puncak-puncak dan intensitas transmitan kitosan. Puncak yang muncul pada spektra inframerah terlihat pada bilangan gelombang 1271 , 1213 , dan 1157 cm^{-1} menunjukkan P = O *stretching vibration* dan puncak pada bilangan gelombang 1085 , 1012 dan 954 cm^{-1} menunjukkan P - O *stretching vibration*. Ini disebabkan karena ikatan antara muatan ionik dari penyambung silang TPP dengan gugus positif amino (R-NH₃⁺) dari kitosan (Ko et al, 2002).

Dari hasil pemeriksaan spektra seperti terlihat pada gambar 4.7, terdapat perubahan pada puncak-puncak dan intensitas transmitan gelatin. Puncak yang muncul pada spektra inframerah terlihat pada bilangan gelombang 1257 cm^{-1} yang menunjukkan P = O *stretching vibration* dan puncak pada bilangan gelombang 1026 dan 900 cm^{-1} menunjukkan P - O *stretching vibration*. Ini disebabkan karena ikatan antara muatan ionik dari penyambung silang TPP dengan gugus positif amino (R-NH₃⁺) dari gelatin.



Gambar 4.7. FTIR gelatin,TPP dan gelatin TPP

4.1.8. Penetapan Sediaan Terpilih

Hasil karakterisasi dari ketiga formula (A, B, dan C) dibandingkan untuk menetapkan serat nano terpilih guna dijadikan sebagai sediaan pada tahap selanjutnya (uji pada hewan coba). Karakter dari formula serat nano terpilih adalah memiliki memiliki ukuran dan morfologi yang baik dan dapat diterima pada konfirmasi dengan FT-IR. Yang terpenting adalah pelepasan asiaticosida sesuai dengan yang dibutuhkan untuk penyembuhan luka. Asiaticosida memiliki

khasiat untuk merangsang fibroblast dan mensintesa kolagen (Suwantong, 2010). Fase di mana fibroblast mulai mensintesa kolagen dimulai sekitar 72 jam setelah perlukaan (fase proliferasi) (Beanes, 2003). Berdasarkan hasil karakterisasi tersebut menunjukkan bahwa formula C adalah yang terbaik dengan pelepasan asiatikosida 51% selama 72 jam, dibanding formula A (68%) dan formula B (62%). Disamping itu formula C mempunyai morfologi , diameter serat dan kandungan aktual yang memenuhi syarat farmakope.

4.2. Uji Efektifitas Penyembuhan Luka

Pada hari pertama tikus dilukai, luas luka diukur dengan cara menjiplak luas luka diatas dengan menggunakan plastik dan spidol. Gambar kemudian dipindahkan ke atas kertas, dan ditimbang. Luas luka dihitung dengan membandingkan berat kertas yang luasnya 1 cm². Pengukuran luas luka diulangi pada hari ke 3 dan ke 5. Data pengukuran luas luka dapat dilihat pada Tabel 4.7 dan Gambar 4.8

Serat nano kitosan dan gelatin yang mengandung komponen seperti matrik ekstra seluler akan meningkatkan pertumbuhan sel, disamping strukturnya yang luas yang meningkatkan proliferasi dan migrasi sel. Juga mempunyai ruangan untuk penyaluran nutrisi dan produk limbah dari sel (Javary, 2011).

Tabel 4.7. Persentase pengurangan luas luka

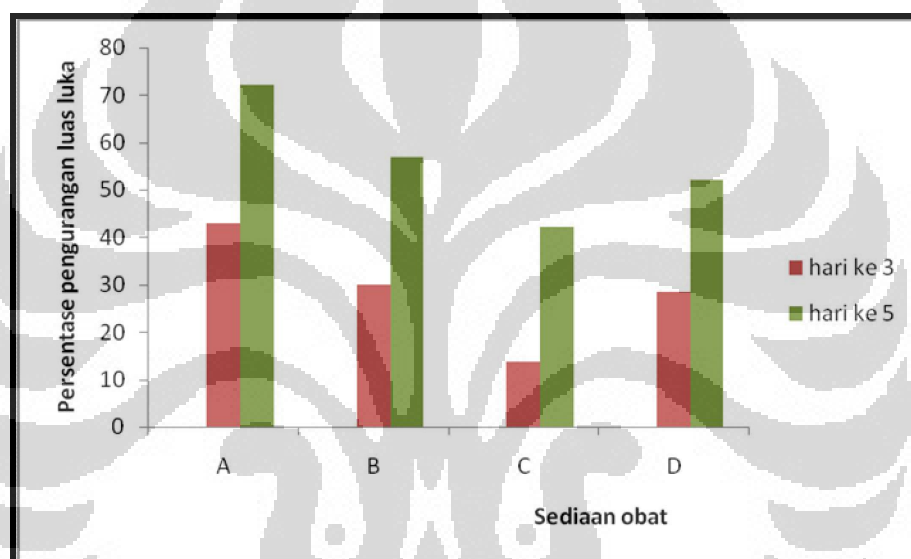
Perlakuan	Hari ke 0	Hari ke 3(%)	Hari ke 5(%)
1	0	43	72,2
2	0	30	56,8
3	0	13,8	42,2
4	0	28,4	52

Keterangan :

- 1 : serat nano dengan obat
- 2 : kontrol positif
- 3 : kontrol negatif
- 4 : serat nano tanpa obat

Pelepasan asiatikosida dalam waktu 72 jam sejumlah 52% sangat sesuai pada penyembuhan luka, di mana asiatikosida berkhasiat dalam meningkatkan fibroblast dan sintesa kolagen pada fase proliferasi yang dimulai 72 jam setelah

perluasan, tapi juga menambah jumlah anti oksidan pada awal perlukaan yang berpengaruh pada penyembuhan luka pada tikus (Sikareepaisan, 2008). Persamaan antara serat nano dan matrik ekstra seluler alami memungkinkan untuk mendukung pertumbuhan jaringan baru yang sehat di daerah yang terluka, dapat mengurangi pembentukan jaringan parut dan mengurangi waktu penyembuhan yang dibutuhkan. Pori-pori yang berukuran nano juga membantu melindungi luka dari bakteri. Porositas dan luas permukaan yang tinggi membantu penyerapan cairan yang juga mendorong penyembuhan luka (Liang, 2007).



Gambar 4.8. Grafik persentase pengurangan luas luka

Keterangan :

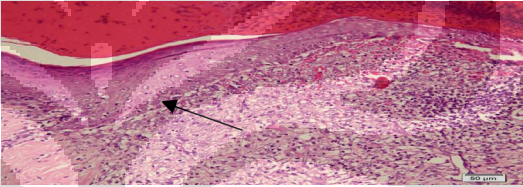
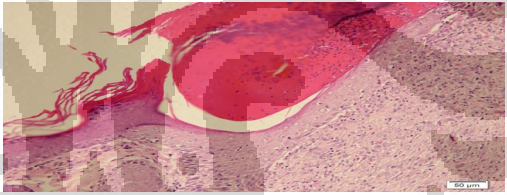
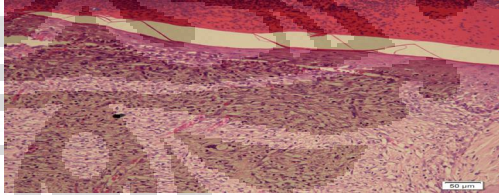
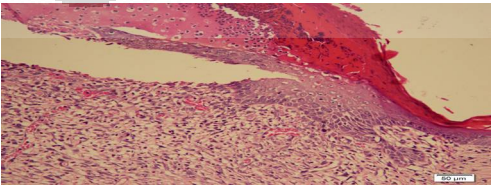
- 1 : serat nano dengan obat
- 2 : kontrol positif
- 3 : kontrol negatif
- 4 : serat nano tanpa obat

4.3. Uji histopatologis

Pada uji histopatologis, hari ke 5 setelah perlukaan, terlihat pada gambar 4.10 bahwa epitelisasi yang paling tebal ialah pengobatan luka dengan serat nano asiaticosida. Struktur serat nano mempunyai keuntungan antara lain: cairan radang tidak berkumpul di bawah keropeng, dan juga tidak menyebabkan luka

mengering. Serat nano juga mengontrol penguapan air, permeabilitas oksigen dan dapat mengeluarkan cairan radang. Tapi disamping itu dapat menghambat masuknya bakteri karena pori-porinya sangat halus. Dari uji histologis terlihat bahwa kecepatan epitelisasi lebih cepat dan sehingga dapat melindungi dermis.

Pelepasan asiaticosida dalam waktu 72 jam sejumlah 52% sangat sesuai pada penyembuhan luka, di mana asiaticosida berkhasiat dalam meningkatkan fibroblast dan sintesa kolagen pada fase proliferasi yang dimulai dari awal sampai hari ke 5 setelah perlukaan , sehingga epitelisasi lebih cepat.

Obat	Histologis jaringan luka
1	
2	
3	
4	

Gambar 4.9. Histologis jaringan luka pada hari ke 5

DAFTAR ACUAN

- Abdulla, MA., Ahmed, KAA., Abu-Luhood, FM., Muhanid, M. (2010). Role of Ficus Deltoidea Extract in the Enhancement of Wound Healing in Experimental Rats. *Biomedical Research*: 21(3): 241-245.
- Basu, SK., Kavitha, K., Rupeshkumar, M. (2011). Evaluation of Ionotropic Cross-Linked Chitosan/Gelatin B Microspheres of Tramadol. *AAPS Pharm Sci Tech*. 12(1): 28-34.
- Basu, SK., Kavitha, K., Rupeshkumar, M. (2011). Evaluation of Ketorolac Tromethamine Microspheres by Chitosan/Gelatin B Complex Coaservation. *Sci Pharm*. 78: 79-92.
- Beanes, SR., Dang, C., Soo, C., Ting, K. (2003). Skin Repair and Scar Formation: The Central Role of TGF- β . *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 5(21).
- Bhumkar, Devika R., Varsha B. Pokharkar. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS PharmSciTech*. 7 (2) Article 50.
- Choktaweasap, N., Arayanarakul, K., Aht-ong, D., Meechaisue, C., Supaphol, P. (2007). Electrospun Gelatin Fibers: Effect of Solvent System on Morphology and Fiber Diameters. *Polymer Journal*. 39(6):622-631.
- Gal, P., Toporcer, T., Grendel, T., Vidova, Z., Smetana, K., Dvornakova, B., Gal, T., Mozes, S., Lenhardt, L., Longaur, F., Sabol, M., Sabo, J., Backor, M. (2008). Simple Method of Open Skin Wound Healing Model in Corticosteroid-Treated and Diabetic Rats: Standardization of Semi-Quantitative and Quantitative Histological Assessments. *Veterinari Medicina*. 53(12):652-659.
- Gohil, KJ., Patel, JA., Gajjar, AK. (2010). Pharmacological Review on *Centella asiatica*: A Potential Herbal Cure-all. *Indian J Pharm Sci*. 72(5):546-556.

- Heunis, TDJ., Dicks, LMT. (2010). Nanofibers Offers Alternative Ways to the Treatment of Skin Infections. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.510612.
- Jain, KP., Agrawal, RK. (2008). High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Asiaticoside in *Centella asiatica* (L) Urban. *Chiang mai J. Sci.* 35(3): 521-525.
- Javari, J., Emami, SH., Samadikuchaksaraei, A., Bahar, MA., Gorjipour, F. (2011). Electrospun Chitosan Gelatin Nanofibrous Scaffold: Fabrication and *In Vitro* Evaluation. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 21: 99-102.
- Junqueira , LC., Carneiro, J., Kelly, RO. (ed). (1995). Basic histology. New York : Appleton & lange, 62-90.
- Kavitha, K., Pavanveena, C., Anil, KSN., Tamizh, MT. (2010). Formulation and Evaluation of Trimetazidine Hydrochloride Loaded Gelatin Microspheres. *Int J Pharmacy and Pharm Sci.* 3(2).
- Khairurrijal ., Munir, MM., Saehana, S., Iskandar, F., Abdullah, M. (2009). Teknik pemintalan elektrik untuk pembuatan nanoserat dari pemodelan hingga eksperimen . *Jurnal Nanosains & Nanoteknologi*. edisi khusus
- Ko, JH., Yin, HY., An, JH., Chung, DJ. (2010). Characterization of Cross-linked Gelatin Nanofibers through Electrospinning. *Macromolecular Research*. 18(2): 137-143.
- Kumari, M., Eesha, BR., Amberkar, M., Babu, S., Rajshekar ., Kumar, N. (2010). Wound Healing Activity of Aqueous Extract of *Crotalaria Verrucosa* in Wistar Albino Rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*: 783-787.
- Liang, DH., Hsiao, BS., Chu, B. (2007). Functional Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Biomedical Applications. *Adv Drug Deliv Rev*.59(14):1392-1412.

- Nirmala, R., Il, BW., Navamathavan, R., El-Nehewy, MH., Young, H. (2011). Preparation and Characterization of Anisotropic Chitosan Nanofibers via Electrospinning. *Macromolecular Research*. 19(4): 345-350.
- Pati, F., Datta, P., Chatterjee, J., Dhara, S. (2010). Development of Chitosan-Tripolyphosphate Fiber for Biomedical Application. *IEEE Students' Technology Symposium*.
- Sangsanoh, P., Supaphol, P. (2006). Stability Improvement of Electrospun Chitosan Nanofibrous Membranes in Neutral or Weak Basic Aqueous Solutions. *Biomacromolecules*. 7: 2710-2714.
- Schiffman, JD., Schauer, CL. (2007). Cross-Linking Chitosan Nanofibers: *Biomacromolecules*. 8:594-601.
- Schiffman, JD., Schauer, CL. (2007). One-Step Electrospinning of Cross-Linked Chitosan Fibers: *Biomacromolecules*. 8:594-601.
- Sikareepaisan, P., Suksamrarn, A., Supaphol, P. (2008). Electrospun Gelatin Fiber Mats Containing a Herbal-*Centella asiatica*- Extract and Release Characteristic of Asiaticoside. *Nanotechnology*. 19:015102.
- Srinatha, A., Pandit, JK., Singh, S. (2008). Ionic Cross-linked Chitosan Beads for Extended Release of Ciprofloxacin: *In Vitro* Characterization. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Januari-February 2008.
- Vandana, M., Sahoo, KS. (2009). Optimization of Physicochemical Parameters Influencing the Fabrication of Protein-loaded Chitosan Nanoparticles: *Nanomedicine*. 4(7): 773-785.
- Vrieze, S., Westbroek, P., Camp, T., Langenhove, L. (2007). Electrospinning of Chitosan Nanofibrous Structures: Feasibility Study. *J Mater Sci*. 42:8029-8034.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut :

1. Fosforilasi gelatin-kitosan dengan tripolifosfat dapat dijadikan bahan eksipien pembuatan serat nano asiatikosida. Formula C merupakan formula terbaik di mana pelepasan kumulatif asiatikosida setelah 72 jam ialah 52%, sedangkan formula A 68% dan formula B 62%.
2. Pada uji *in vivo*, sediaan serat nano asiatikosida dapat menyembuhkan luka lebih cepat dibanding sediaan serat nano, kontrol positif dan kontrol negatif, terlihat dari pengurangan luas luka yang paling besar dan dengan epitelisasi yang paling cepat. Secara statistik, ada perbedaan secara bermakna pada pengurangan luas luka di antara keempat jenis sediaan yang diujikan ($P < 0,05$).

5.2. Saran

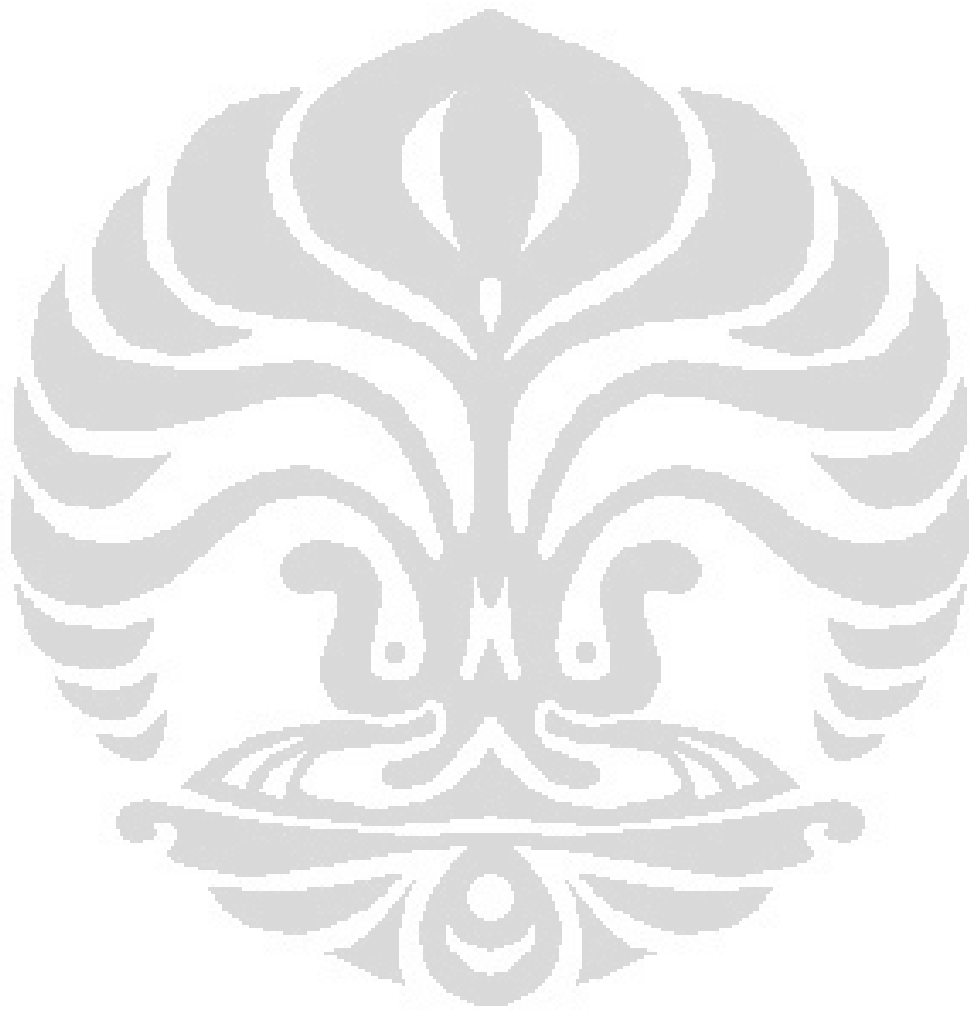
1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk pembuatan serat nano yang lebih sederhana agar dapat dibuat dalam skala besar.
2. Perlu diteliti cara untuk mensterilisasi sediaan, mengingat penggunaanya untuk luka terbuka.

LAMPIRAN



Daftar Lampiran

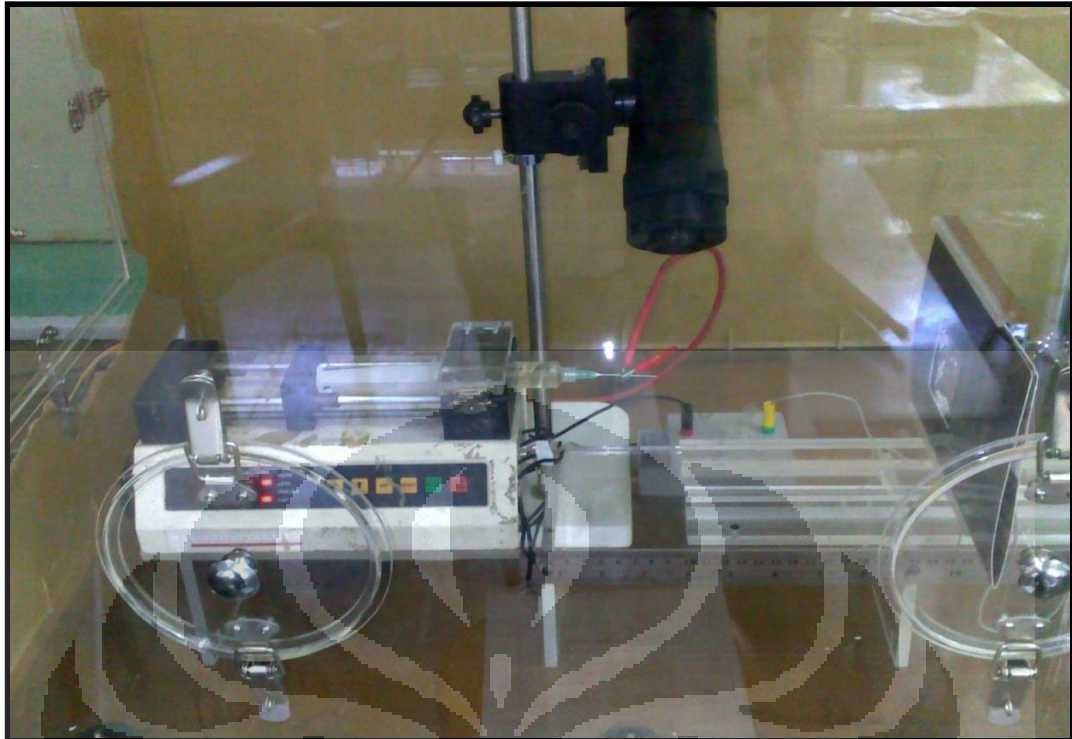
Jenis lampiran	No
Lampiran gambar	1 - 8
Lampiran tabel	9-10
Lampiran perhitungan	11
Lampiran sertifikat	12 – 14



Lampiran 1

Alat pemintalan elektrik

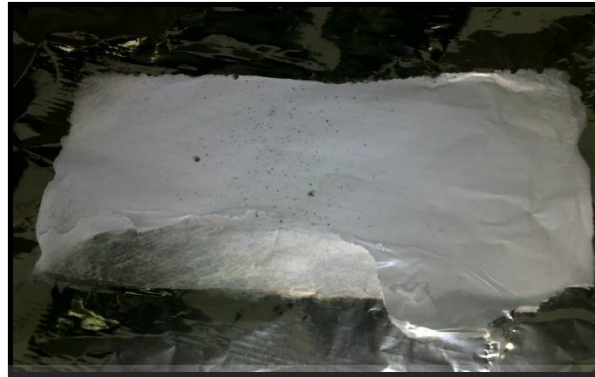
(Sumber: Dep. Fisika ITB)



Lampiran 2

Konduktometer

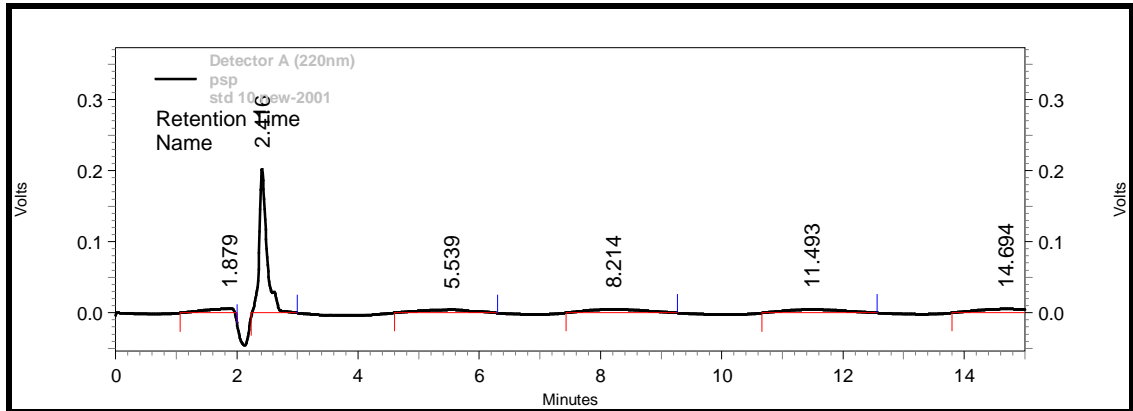


Lampiran 3.**Serat nano hasil pemintalan elektrik****Lampiran 4****Obat untuk uji *in vivo***

Lampiran 5**Tikus Spraque dawley yang dilukai****Lampiran 6****Luas luka pada hari ke 5**

Lampiran 7

Kromatogram asiatikosida



HPLC Shimadzu LC 6 AD (Liquid Chromatograph)

UV-vis detector Shimadzu SPD-10 A

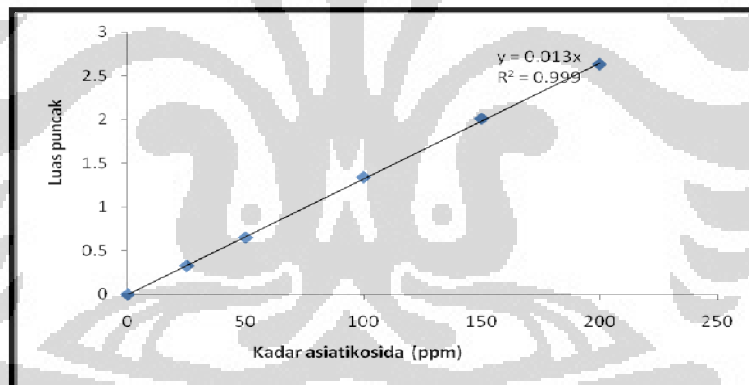
Column : Assentis C 18 ; 25 cm x 4.6 mm, 5 μ m

Eluent : Methanol + water (70+30)

Flow rate : 1 ml/min

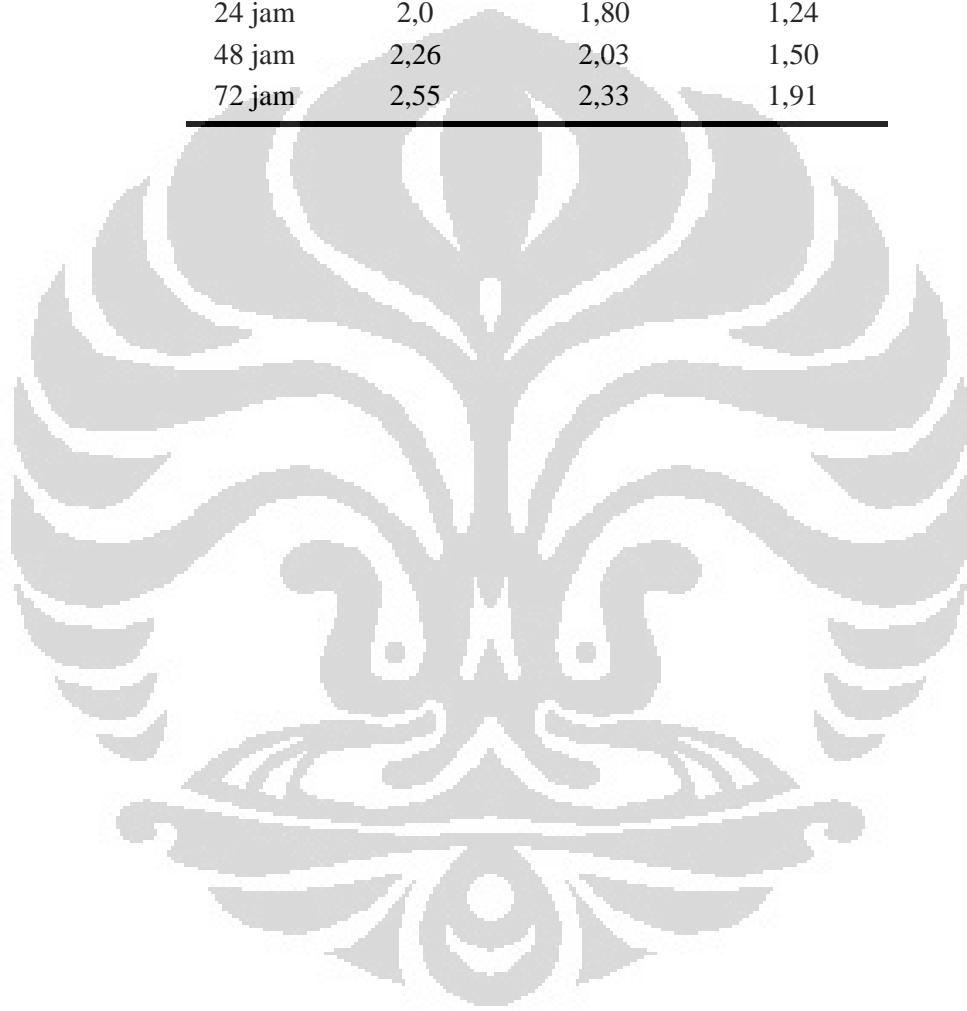
Lampiran 8

Kurva baku asiatikosida



Lampiran 9**Hasil perolehan kadar asiatikosid dari formula A, B dan C**

Waktu	Formula 1 (mg)	Formula 2 (mg)	Formula3 (mg)
1 jam	1,01	0,82	0,61
2 jam	1,12	0,90	0,68
3 jam	1,32	0,98	0,78
6 jam	1,46	1,43	0,94
12 jam	1,69	1,50	1,05
24 jam	2,0	1,80	1,24
48 jam	2,26	2,03	1,50
72 jam	2,55	2,33	1,91



Lampiran 10
Pengukuran luas luka pada tikus

Serat nano obat			
Tikus	Hari ke 0 (mm²)	Hari ke 3 (mm²)	Hari ke 5 (mm²)
1	93	48	28
2	91	52	27
3	90	60	24
4	90	48	32
5	95	53	27

Serat nano			
Tikus	Hari ke 0 (mm²)	Hari ke 3 (mm²)	Hari ke 5 (mm²)
1	72	63	48
2	80	56	32
3	102	63	40
4	85	64	37
5	90	62	45

Kontrol positif			
Tikus	Hari ke 0 (mm²)	Hari ke 3 (mm²)	Hari ke 5 (mm²)
1	97	65	37
2	90	72	35
3	87	55	40
4	88	56	44
5	92	70	40

Kontrol negatif			
Tikus	Hari ke 0 (mm²)	Hari ke 3 (mm²)	Hari ke 5 (mm²)
1	88	79	48
2	90	70	45
3	89	72	54
4	90	85	60
5	102	90	45

Lampiran 11
Perhitungan statistik penyembuhan luka pada tikus

ONEWAYmetode BY luka
 /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
 /MISSING ANALYSIS
 /POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05).

Descriptives

luka	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					1	5		
2	5	52.0000	11.46734	5.12835	37.7614	66.2386	33.00	61.00
3	5	24.4000	10.54988	4.71805	11.3006	37.4994	12.00	37.00
4	5	26.8000	11.92476	5.33292	11.9934	41.6066	15.00	45.00
Total	20	43.8500	22.30477	4.98750	33.4110	54.2890	12.00	84.00

KETERANGAN :

1. Dari 5 kelompok yang terdiri dari 5 sampel pada tabel di atas, hasil analisis data deskriptif adalah sebagai berikut:
 - a. Kelompok 1 (A) : rata-rata persentase luka 72.2
 - b. Standard deviate : 7.36
 - c. Range : 20 (84-64)
2. Kelompok 2:
 - a. Kelompok 2 (B) : rata-rata persentase luka 52.00
 - b. Standard deviate : 11.46
 - c. Range : 28 (61-33)
3. Kelompok 3
 - a. Kelompok 3 (C) : rata-rata persentase luka 24.4
 - b. Standard deviate : 10.55
 - c. Range : 25 (37-12)

4. Kelompok 4 (D) Kelompok 4:
 - a. rata-rata persentase luka 26.8
 - b. Standard deviate : 11.92
 - c. Range : 30 (45-15)
5. Confidence interval memberikan makna bila intervalnya meliputi angka "1" maka variasi di dalam kelompok (inter group) tidak berbeda bermakna.
Contoh : - 22 (lower) and 23 (upper). Kebetulan pada data sampel di atas semuanya bermakna (tidak ada yang meliputi angka '1').

Test of Homogeneity of Variances

luka

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.547	3	16	.657

Keterangan: Levenae statistic: menunjukkan data semuanya seragam.

ANOVA

Luka	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7695.750	3	2565.250	23.363	.000
Within Groups	1756.800	16	109.800		
Total	9452.550	19			

Keterangan : hasil Anova dengan nilai $F=23.363$ dengan signifikansi $p=0.000$ menunjukkan ada perbedaan yang bermakna, Jika kita membuat Hipotesis nol: semua kelompok tidak mempunyai perbedaan nilai varians (artinya semua kelompok tidak berbeda) maka H_0 harus ditolak karena nilai $p < (\text{nilai test alfa} = 0.05)$ nilai p hasil 0.000 yang berarti lebih kecil dari alfa .

Multiple Comparisons

luka





Tukey HSD

(I) metode	(J) metode	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	20.20000*	6.62722	.035	1.2394	39.1606
	3	47.80000*	6.62722	.000	28.8394	66.7606
	4	45.40000*	6.62722	.000	26.4394	64.3606
2	1	-20.20000*	6.62722	.035	-39.1606	-1.2394
	3	27.60000*	6.62722	.004	8.6394	46.5606
	4	25.20000*	6.62722	.008	6.2394	44.1606
3	1	-47.80000*	6.62722	.000	-66.7606	-28.8394
	2	-27.60000*	6.62722	.004	-46.5606	-8.6394
	4	-2.40000	6.62722	.983	-21.3606	16.5606
4	1	-45.40000*	6.62722	.000	-64.3606	-26.4394
	2	-25.20000*	6.62722	.008	-44.1606	-6.2394
	3	2.40000	6.62722	.983	-16.5606	21.3606

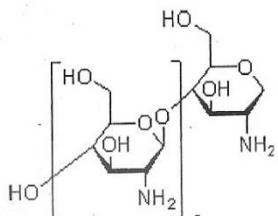
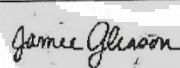
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Keterangan: tabel di atas untuk melihat nilai varians satu persatu. Misalnya pada baris 1 → kelompok 1 dibandingkan dengan kelompok 2 hasilnya berbeda bermakna ($p=0.035$) dan juga berbeda bermakna dengan kelompok 3 dan 4 ($p=0.000$)
Kelompok 2 dibandingkan dengan kelompok 1 hasilnya $p=0.035$ (berbeda bermakna) dan dengan kelompok 3 dan 4.

Lampiran 12
Sertifikat analisis asiatikosida

GUANYU BIO-TECH			
西安冠宇生物技术有限公司 <u>XI'AN GUANYU BIO-TECH CO.</u>			
Certificate of Analysis			
Product Name	Gotu Kola P.E.	Botanical Name	<i>Centella Asiatica (L.) Urban</i>
Batch Number	GO110224	Plant Part	Air herb
Quantity	18kgs	Analysis Date	Feb.26,2011
Manufacture Date	Feb.24,2011	Certificate Date	Feb.28,2011
Analysis	Specification	Results	
Assay(BY HPLC)	Asiaticoside > 90%	91.72%	
Physical & Chemical Control			
Identification	Positive	Complies	
Appearance	Fine Powder	Complies	
Color	White	Complies	
Odor	Bitter	Complies	
Taste	Lighter bitter	Complies	
Mesh Size	80mesh	Complies	
Loss On Drying	3%Max	2.1%	
Residual Solvents	0.05%Max	Complies	
Sulphated Ash	3%Max	Complies	
Heavy Metals	5ppm	Complies	
Pesticides	Negative	Negative	
Microbiological			
Total Plate Count	<1000/gMax	Complies	
Yeast & Mold	<100/gMax	Complies	
Salmonella	Negative	Negative	
E. Coli	Negative	Negative	
Conclusion	Complies with specification		
Storage	Store in cool & dry place, Keep away from strong light and heat.		
Shelf life	18 Months when properly stored		
			
 Quality Assurance Officer		 Corrector	
 Analyst			
GUANYU BIO-TECHNOLOGY CO., LTD Add: No 212Xinhua road, Chang'an District, Xi'an China		Tel.: 0086-29-88907599 Fax: 0086-29-85658727	

Lampiran 13
Sertifikat analisis kitosan

SIGMA-ALDRICH®		sigma-aldrich.com	
		3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA	
		Website: www.sigmaaldrich.com	
		Email USA: techserv@sial.com	
		Outside USA: eurtechserv@sial.com	
Certificate of Analysis			
Product Name: Chitosan low molecular weight			
Product Number:	448869		
Lot Number:	MKBG3334V		
Brand:	ALDRICH		
CAS Number:	9012-76-4		
MDL Number:	MFCD00161512		
Quality Release Date:	24 JAN 2011		
Test	Specification	Result	
Appearance (Color)	Beige	Faint beige	
Appearance (Form)	Conforms to Requirements	Powder	
Powder and/or Chips			
Assay	> 75.0 %	96.1 %	
Viscosity	20.00 - 300.00 cps	35.00 cps	
c = 1% in 1% Acetic Acid			
 Jamie Gleason, Manager Quality Control Milwaukee, Wisconsin US			
<p>Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.</p>			
Version Number: 1		Page 1 of 1	

Lampiran 14
Sertifikat analisis gelatin

SIGMA-ALDRICH®		<small>sigma-aldrich.com</small>
		3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA Website: www.sigmaaldrich.com Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com
Certificate of Analysis		
Product Name: Gelatin from bovine skin - Type B		
Product Number:	G9382	
Lot Number:	041M0052V	
Brand:	SIGMA	
CAS Number:	9000-70-8	
MDL Number:	MFCD00081638	
Quality Release Date:	23 MAY 2011	
Recommended Retest Date:	APR 2019	
Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Light Yellow to Beige	Light Beige
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Faint Yellow to Yellow or Brown-Yellow	Faint Brown-Yellow
Solubility (Turbidity)	Hazy to Very Hazy	Very Hazy
50 mg/ml H ₂ O		
% Protein (Biuret)	> 70	78
Recommended Retest Period		
8 years		
 Rodney Burbach, Manager Analytical Services St. Louis, Missouri US		
<p>Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.</p>		
Version Number: 1	Page 1 of 1	