

Inovasi Nanokolagen Sisik Ikan Gurami (*Oshpronemus gouramy*) yang Dikombinasikan dengan Ekstrak Buah Delima (*Punica granatum* L.) sebagai Serum Anti-Aging

Riwayat artikel:

Diterima: 3 Oktober 2023

Direvisi: 13 November 2023

Diterbitkan: 30 Desember 2023

Puan Vindi Hayati Fallah¹, Rizal Bing Garumal Indianta¹, Sevita Regina Reniawati¹, Yinantha Tirtasari², Fibe Yulinda Cesa^{1*}

Kata kunci:

Anti-Aging;
Fish Scale;
Nanokolagen;
Pomegranate;
Serum

Pada kulit manusia yang terpapar sinar UV setiap hari akan meningkatkan pembengkakan jaringan sehingga dapat menimbulkan kerutan pada kulit. Sisik Ikan diketahui memiliki beberapa komponen salah satunya kolagen yang dapat bermanfaat untuk meningkatkan elastisitas dan membantu pembentukan sel kulit. Buah delima merah (*Punica granatum*) dikenal luas kaya akan zat bioaktif antioksidan seperti flavonoid, asam galat, dan asam askorbat yang memiliki dapat melindungi komponen seluler dari kerusakan akibat radikal bebas. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi dan membandingkan aktivitas antioksidan pada sediaan serum. Pengekstrakan sisik ikan gurami untuk mendapatkan kolagen, kemudian kolagen yang telah didapatkan diubah partikelnya menjadi nanokolagen. Pada buah delima akan dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan alkohol 75% kemudian maserat dievaporasi hingga menjadi ekstrak kental. pembuatan serum dilakukan dengan menggunakan magnetic stirer dengan kecepatan 120 rpm. Serum yang sudah jadi akan di uji evaluasi fisik. Hasil yang didapatkan pada pengujian evaluasi sediaan serum memenuhi persyaratan untuk sediaan serum. Tetapi pada pengujian DPPH yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi terdapat pada serum F3 dengan nilai IC50 sebesar 15.3643 ppm. Dan jika dibandingkan dengan serum pasaran dengan nilai IC50 sebesar 182.3051 ppm. Serum *anti aging* dengan kandungan ekstrak buah delima dan sisik ikan gurami memiliki kadar aktivitas antioksidan lebih tinggi. Pada hasil evaluasi fisik sediaan serum anti-aging dengan kandungan ekstrak buah delima dan nanokolagen sisik ikan gurami memenuhi persyaratan dengan baik.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Indonesia memiliki iklim tropis sehingga dapat memungkinkan terkena paparan sinar UV dengan intensitas yang tinggi. Pada kulit manusia yang terpapar sinar UV setiap hari akan meningkatkan pembengkakan jaringan sehingga dapat menimbulkan masalah kulit seperti munculnya kerutan pada kulit. Kerutan pada kulit terjadi karena adanya penuaan sel yang diakibatkan terjadinya

penurunan proliferasi [1]. Jika penuaan terjadi maka jumlah kolagen mengalami penurunan yang disebabkan oleh peningkatan sekresi metalloproteinase yang mendegradasi matriks oleh fibroblas pada lapisan dermal. Adapun upaya yang dapat dilakukan untuk mengurangi penuaan sel dengan menggunakan suatu produk inovasi yang dikemas dalam produk kosmetika berupa serum *anti-*

¹Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Universitas Ma Chung, Villa Puncak Tidar Blok N no. 1, Karangwidoro, Dau, Malang, East Java 65151, Indonesia

²Department of Management, Faculty of Economics and Business, Universitas Ma Chung, Villa Puncak Tidar Blok N no. 1, Karangwidoro, Dau, Malang, East Java 65151, Indonesia

Email: fibe.yulinda@machung.ac.id

aging. *Anti-aging* mengandung senyawa antioksidan untuk menstimulasi proses regenerasi pada kulit sehingga dapat menjaga kelembapan kulit dan mengurangi garis halus, kerutan dan bintik hitam. Adapun beberapa senyawa seperti asam galat dan vitamin C memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim tirosinase, sehingga dapat menangkal radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh [2]. Pada buah delima yang akan digunakan memiliki kandungan vitamin C dan asam galat sehingga dapat digunakan untuk mengatasi masalah penuaan yang terjadi akibat paparan sinar UV. Kolagen merupakan protein struktural yang paling banyak terdapat pada jaringan ikat dalam tubuh. Kolagen bertindak sebagai perancah struktural alami yang digunakan untuk pertumbuhan jaringan baru. Aktivitas biologi pada kolagen mampu dimanfaatkan pada bidang kesehatan dan kecantikan dengan melalui proses hidrolisis oleh enzim, aktivitas biologis protein dalam pembentukan polipeptida rendah yang dapat digunakan untuk peningkatan aktivitas biologisnya, sehingga akan menjadi protein kompleks yang dapat melepaskan dari fragmennya. Untuk meningkatkan stabilitas dan efektivitas pada sediaan kosmetik, dibuatlah inovasi dengan menggunakan metode nanopartikel yang merupakan ukuran yang lebih kecil dengan rentang diameter antara 1-100 nm. Ukuran dengan nanometer akan lebih efektif untuk diserap ke dalam kulit. Serum merupakan suatu sediaan dengan viskositas rendah dan dapat diklasifikasikan sebagai sediaan emulgel. Sebagian besar produk perawatan kulit adalah serum yang mengandung gel atau lotion ringan atau pelembap dan memiliki kemampuan yang baik untuk melembapkan kulit. Serum kulit memberikan tekstur menghaluskan kulit, membuat pori-pori lebih kecil dan membantu kelembapan pada kulit. Serum dioleskan ke wajah setelah dibersihkan. Serum bersentuhan langsung dengan kulit dan dapat diserap secara optimal. Anti penuaan adalah produk kosmetik yang mempunyai kemampuan untuk mengobati, mencegah dan menghilangkan gejala penuaan kulit [3].

Hasil dan Pembahasan

Uji Organoleptik

Uji organoleptis dilakukan untuk mengetahui keadaan fisik dengan menganalisis bau, warna dan

tekstur pada sediaan serum. Pengujian dilakukan dengan panca indera untuk mendapatkan hasil serum yang sesuai. Hasil yang didapatkan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Uji Organoleptik

Formula	Warna	Bau	Bentuk	Gambar
FP	Kekuningan	Khas	Cairan agak kental	
F0	Putih bening	Manis	Cairan agak kental	
F1	Orange	Khas	Cairan agak kental	
F2	Orange	Khas	Cairan agak kental	
F3	Orange	Khas	Cairan agak kental	

Jika diperhatikan warna pada **Tabel 1**, formula 3 lebih kecoklatan dari pada formula lain. Hal tersebut dapat terjadi karena ekstrak dari buah delima lebih banyak dari pada formula-formula lain. Sedangkan bau yang dihasilkan pada serum lebih dominan berbau buah delima. Dari 3 formulasi terdapat tekstur yang sama dikarenakan memiliki jenis basis gel yang sama. Serum yang dihasilkan tidak berminyak dan memiliki kadar air yang tinggi [4].

Uji Viskositas

Uji viskositas pada serum digunakan untuk mengetahui kekentalan suatu serum. Serum yang baik memiliki nilai viskositas baik berada pada rentang 230-1150 *centipoise*. Pengujian viskositas sediaan serum dengan menggunakan alat *rotary viscometer* dan didapatkan hasil pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Hasil Uji Viskositas

Formula	Rerata
FP	250.742
F0	322.463
F1	322.463
F2	422.934
F3	462.742

Hasil yang didapatkan bahwa viskositas semua formulasi serum yang telah diuji telah memenuhi persyaratan viskositas yang baik. Perubahan nilai viskositas pada serum dapat dipengaruhi oleh penambahan kadar TEA. Semakin kadar TEA ditambah akan semakin tinggi viskositas pada serum [5].

Uji Penetapan PH

Uji pH dilakukan bertujuan untuk mengetahui ukuran pH serum yang dibuat. Rentang pH yang baik untuk sediaan serum yaitu 4,5 - 6,5. Uji pH dilakukan dengan menggunakan instrumen pH meter. Hasil dari uji pH yaitu dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil Uji pH

		Uji pH				
Formula	FP	F0	F1	F2	F3	
Rerata	7.206	4.034	5.582	4.922	4.524	

Hasil pengukuran pH yang terdapat pada serum sudah sesuai dengan pH kulit, karena menghasilkan pH dengan rentang 3,80 - 5,58 dan formula serum F1, F2 dan F3 sudah memenuhi kriteria pH kulit. Pada formula pasaran terdapat pH yang tinggi yaitu 7,20 sehingga tidak sesuai dengan rentang pH kulit [5].

Uji Anti-iritan

Uji anti-iritan digunakan untuk memastikan sediaan serum tidak menyebabkan iritasi. Uji anti-iritan dilakukan dengan menggunakan metode *open patch test* yaitu pengolesan pada kulit yang didiamkan sekitar 5 jam. Uji anti-iritan yang baik yaitu ditandai dengan tidak adanya ruam dan kemerahan pada kulit. Hasil yang didapatkan pada serum dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil Uji Anti-Iritan

Responden	Reaksi Pada Kulit				
	FP	F0	F1	F2	F3
Si	-	-	-	-	-
Fe	-	-	-	-	-
Ra	-	-	-	-	-
Di	-	-	-	-	-
Le	-	-	-	-	-
Bi	-	-	-	-	-
Na	-	-	-	-	-
Ca	-	-	-	-	-
Ra	-	-	-	-	-
Ez	-	-	-	-	-

Dari hasil yang sudah didapatkan pada semua formulasi yang digunakan dinyatakan tidak memiliki efek iritasi pada kulit.

Uji Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan pada sediaan serum diperoleh dengan menggunakan metode DPPH untuk mengetahui perubahan warna setelah inkubasi dan hasil IC₅₀. Hasil yang didapatkan pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Hasil Uji Antioksidan

Formula	Kons (ppm)	Uji DPPH			Aktivitas Antioksidan
		Abs	%S	IC ₅₀	
FP	10	0.6388	2.5625	182.3051	Sedang
	20	0.6345	3.2184		
	30	0.6201	5.4148		
	40	0.5785	11.7602		
	50	0.5774	12.3856		
F1	10	0.5804	11.4704	78.7418	Kuat
	20	0.5707	12.9499		
	30	0.5478	16.4429		
	40	0.4831	26.3117		
	50	0.4255	35.0976		
F2	10	0.4189	36.1043	35.7247	Sangat Kuat
	20	0.4177	36.2873		
	30	0.4126	37.0652		
	40	0.4125	38.6211		
	50	0.4024	39.2007		
F3	10	0.3986	39.3532	15.3643	Sangat Kuat
	20	0.3976	44.4478		
	30	0.3642	44.4478		
	40	0.3546	45.9121		
	50	0.3476	46.9798		

Pada pengujian menggunakan metode DPPH dan mendapatkan nilai IC₅₀ yang digunakan untuk mengidentifikasi antioksidan dalam serum. Pada serum pasaran Formulasi Pasaran (FP) mendapatkan nilai IC₅₀ sebesar 182,3051 ppm yang termasuk ke dalam rentang aktivitas antioksidan sedang, untuk hasil formulasi serum yang ditambahkan dengan ekstrak delima mendapatkan nilai IC₅₀ pada F1 sebesar 78,7418 ppm, F2 sebesar 35.7247 ppm dan F3 sebesar 15.3643 ppm. Pada F1 termasuk ke dalam

rentang aktivitas antioksidan kuat, pada F2 dan termasuk ke dalam rentang aktivitas antioksidan sangat kuat dilihat dari nilai IC₅₀. Kadar antioksidan pada ketiga serum terdapat pada F3 dengan nilai IC₅₀ 15.3643 ppm. Sehingga dapat dikatakan bahwa formula dengan menggunakan ekstrak kulit buah delima memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan serum pasaran [6].

Uji Daya Sebar

Uji daya sebar digunakan untuk mengetahui penyebaran serum saat diaplikasikan pada kulit. Sampel serum akan menyebar pada kulit yang akan menunjukkan luas sampel serum berada. Pengujian daya sebar menggunakan alat daya sebar seperti cawan petri dan pemberat. Hasil yang didapatkan yaitu pada **Tabel 6**.

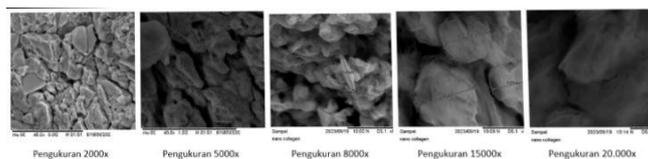
Tabel 6. Hasil Uji Daya Sebar

Beban (gram)	Daya Sebar (cm)				
	FP	F0	F1	F2	F3
0	4.752	6.563	6.779	6.67	6.626
1	4.608	7.344	7.175	7.143	7.308
3	6.451	7.425	7.306	7.17	7.45
5	7.344	7.544	7.724	7.583	7.611

Pada hasil pengujian daya sebar yang diperoleh menunjukkan bahwa sediaan serum dari FP, F0, F1, F2 dan F3 sesuai dengan spesifikasi yang tidak adanya perbedaan yang signifikan antara formula satu dengan formula lainnya. Hal tersebut menunjukkan penambahan kadar bahan aktif tidak berpengaruh terhadap daya sebar suatu serum, tetapi berpengaruh terhadap suatu efektivitas serum [7].

Uji SEM dan Uji PSA

Uji *Scanning Electron Microscopy* (SEM) digunakan untuk mengetahui **Gambaran** dengan resolusi tinggi dari permukaan suatu sampel. Penggunaan uji SEM memungkinkan untuk pemindaian area luas serta dapat mengumpulkan statistik suatu objek. Hasil yang didapatkan dari uji SEM yaitu pada **Gambar 1**. Sedangkan uji *Particle Size Analyzer* (PSA) digunakan untuk mengukur ukuran partikel kasar yang mana hubungan pada partikel lemah dan untuk beraglomerasi kecil. Dapat dilihat hasil uji PSA pada **Tabel 7**.



Gambar 1. Hasil Uji SEM

Tabel 7. Hasil Uji PSA

No.	Kode/Jenis Sampel	Parameter	Hasil Analisis				
			Median (µm)	Mean (µm)	Modul (µm)	Absorbansi	Std Dev
1.	Nanokolagen	Ukuran Partikel	6,521	5,752	8,521	0,039	0,381
2.		Ukuran Partikel	6,516	5,757	8,521	0,038	

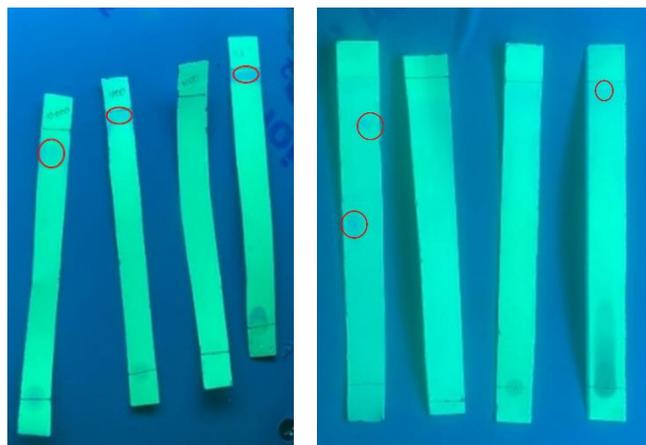
Hasil dari kolagen tipe 1 merupakan salah satu jenis protein yang memiliki suatu komponen yaitu *triple helix* yang stabil pada suhu yang tinggi (>30°C) ataupun dapat pada suhu yang lebih tinggi [8]. Kondisi ini dapat terjadi jika rantai alpha pada susunan kolagen terdegradasi akibat suhu panas dan membuat protein stabil pada suhu tinggi. Rantai helix akan tetap aman meskipun kondisi kolagen terdegradasi apabila pada suplemen makanan. Oleh karena itu, kolagen harus menyesuaikan kondisi pada suhu tubuh tanpa mengubah fungsinya. Tetapi lain halnya jika kolagen tipe 1 akan dimanfaatkan sebagai salah satu bahan aktif ataupun bahan tambahan pada suatu kosmetik. Penelitian sebelumnya menunjukkan, bahwa kolagen yang memiliki struktur *triple helix* tetap rentan terhadap sinar matahari (UV), apalagi jika struktur alpha terdegradasi [9]. Pada hasil uji didapatkan rata-rata ukuran yang dihasilkan pada partikel yaitu 5,7 mikrometer. Tetapi, pada perbesaran 5000x terdapat beberapa partikel memiliki sebaran ukuran yang hampir mendekati kriteria partikel nano yang sebenarnya yaitu 2,94 mikrometer (2940 nm). Hasil dari uji SEM dan PSA dengan ukuran yang tidak seragam disebabkan karena pada penelitian ini waktu pengadukan setelah penambahan CaCl₂ tergolong sangat minim, yakni 30 menit. CaCl₂ memiliki fungsi mengikat kolagen sehingga mampu menghasilkan partikel dengan ukuran nano. Selain itu, penelitian ini juga menggunakan metode enzimatik yang merupakan salah satu inovasi untuk membuat ukuran kolagen yang akan menjadi ukuran nanokolagen dengan prinsip memecah ikatan polipeptida kolagen menjadi peptida kolagen. Penelitian ini mencoba melakukan

inovasi dengan tidak melibatkan pemanasan dalam proses pemecahan nano partikel untuk mempertahankan struktur *triple helix*. Oleh karena itu, metode penelitian menggunakan enzim pepsin dengan penambahan CaCl_2 . Tetapi, pada hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa kolagen dari proses nanokolagen lebih sesuai untuk masuk pada kriteria mikrokolagen (3-30 mikrometer). Dari hasil pengamatan peneliti, pemecahan tersebut sudah sesuai dengan ukuran dari kolagen yaitu 80 mikrometer. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa waktu sangat berpengaruh dalam pengoptimasian ukuran nano dengan waktu optimal 3 jam pengadukan yang mampu menghasilkan partikel dengan ukuran nano yang baik yaitu 285 nm dan karena dibantu adanya pemanasan yang akan membuat lebih cepat dalam mendapatkan ukuran nano [10]. Namun, yang telah dijelaskan sebelumnya, pemanasan akan membuat senyawa penting dalam kandungan triple helix akan terdegradasi, sehingga metode dengan pemanasan tidak dipertimbangkan. Dengan demikian, metode pengadukan yang dikombinasikan dengan metode enzimatik menggunakan CaCl_2 dan enzim pepsin merupakan hal yang baru dan akan dikembangkan pada penelitian selanjutnya karena dapat memperkecil ukuran partikel dari standar ukuran kolagen rata-rata 80 mikron menjadi 5,7 mikron selama 6,5 jam proses

keseluruhan. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode ini mampu mengecilkan partikel tanpa proses pemanasan sehingga partikel kolagen diharapkan tetap stabil dalam bentuk triple helix sehingga semakin aman untuk digunakan dalam sediaan serum yang akan dikombinasikan dengan buah delima. Penambahan antioksidan dari kulit buah delima akan meminimalisir degradasi pada kolagen. Hal ini ditunjukkan juga bahwa pada penambahan propanediol dan xantohumol sebagai antioksidan mampu mengurangi radiasi sinar UV dibandingkan dengan tidak menggunakan antioksidan [11]. Oleh karena itu, inovasi selanjutnya yaitu penambahan kulit buah delima sebagai salah satu komponen dalam formulasi sediaan serum ini tetap menjadi serum anti-aging yang potensial untuk dikembangkan secara berkala.

Uji Identifikasi Asam galat dan Vitamin C

Uji identifikasi asam galat dan vitamin C dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Metode KLT adalah metode pemisahan fisika-kimia. Metode ini digunakan untuk memisahkan komponen-komponen berdasarkan senyawa yang dikandungnya berdasarkan tingkat interaksi dalam dua fase material pemisah dengan membandingkan RF baku pembanding dengan RF sampel. Hasil yang didapatkan pada pengujian asam galat dan vitamin C.



Gambar 2. Hasil Uji Asam Galat (kiri) dan Vitamin C (kanan)

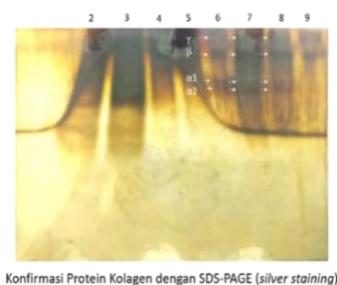
Hasil yang didapatkan pada pengujian Kromatografi Lapis Tipis telah membuktikan adanya kandungan vitamin C dan Asam Galat. Karena pada prinsip kerja KLT, yaitu adsorpsi, desorpsi, dan elusi. Adsorpsi terjadi saat larutan sampel akan dimasukkan ke fase

diam (plat KLT) menggunakan mikropipet, komponen pada sampel akan diabsorpsi di dalam fase diam. Desorpsi terjadi ketika komponen yang teradsorpsi di fase diam akan didesak oleh fase gerak (eluen). Persaingan yang terjadi antara eluen dan

komponen untuk berikatan dengan fase diam. Elusi adalah peristiwa ketika senyawa ikut terbawa oleh eluen [12].

Uji Identifikasi Kolagen

SDS-PAGE akan melibatkan denaturasi dan deterjen anionik yang digunakan untuk mengikat protein dan akan dipisahkan menurut berat molekulnya. Hasil dari uji identifikasi kolagen dapat dilihat pada **Gambar 3**. Pengujian SDS-PAGE digunakan untuk mengetahui pola kolagen tipe I yang dibutuhkan konfirmasi bahwa protein kolagen tipe ini berhasil diekstrak. Hasil dialisis menunjukkan adanya protein kolagen yang lebih baik, ditunjukkan dengan adanya struktur khas kolagen tipe I yang muncul pada pita ekstraksi protein nomor 6, 7, dan 8. Keseluruhan ekstrak tersebut adalah hasil dialisis menggunakan NaCl. Hasil paling stabil untuk dialisis, baik itu endapan maupun supernatan menggunakan konsentrasi NaCl.



Gambar 3. Hasil Uji SDS-PAGE

Kesimpulan

Dari penelitian yang sudah dilakukan, pada sisik ikan gurami memiliki kandungan kolagen tipe 1 dengan komponen *triple helix* yang dapat stabil dalam suhu panas, dan pada penelitian ini juga dapat memecah partikel kolagen menjadi ukuran lebih kecil. Pada buah delima yang telah berhasil diekstraksi terdapat 2 kandungan zat aktif yang berguna untuk antioksidan, berupa vitamin C dan Asam Galat. Hal ini dibuktikan dengan uji identifikasi dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Berdasarkan dari hasil penelitian pembuatan serum nanokolagen yang sudah dilakukan serum memiliki evaluasi fisik yang memenuhi persyaratan dan tidak membuat iritasi. Uji antioksidan menunjukkan adanya aktivitas antioksidan pada sediaan serum. Pada serum dengan ekstrak buah delima dan nanokolagen sisik ikan gurami yang

memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi terdapat pada F3.

Bahan dan Metode

Alat dan Bahan

Instrumen yang digunakan untuk penelitian meliputi: Batang pengaduk, erlenmeyer (Iwaki), beaker glass (Pyrex), Pisau, talenan, neraca (Ohaus), gelas ukur (Pyrex), labu ukur (Pyrex), pH Checker (Ohaus), toples kaca coklat bertutup, *magnetic stirrer* (Thermo), *Freezerdryer* (Biobase), *rotary evaporator* (Heidolph), wadah, kertas saring, corong (Pyrex), *water bath*, vortex (sigma), sendok tanduk, sendok *stainless*, sarung tangan (*safe glove*)

Sisik ikan gurami, buah delima, NaOH 0,05 N, asam asetat 0,6N, etanol 96% (Teknis), alkohol 70%, aquadest, *carbhopol ultrez 20*, *triethanolamine*, *methyl paraben*, propylenglikol, *propylparaben*, fragrance (Teknis), enzim pepsin (Teknis), Natrium posphat (Teknis), Kalium phospat (Teknis), CaCl (Teknis).

Pembuatan Kolagen

Sisik ikan gurami (*Oshpronemus gouramy*) dicuci hingga bersih dan ditimbang. Selanjutnya sisik ikan gurami dipotong kecil-kecil dan direndam dengan larutan NaOH 0,05N selama 1 hari dengan suhu 4°C untuk menghilangkan kadar non kolagen. Setelah 1 hari perendaman dilakukan netralisasi yaitu pencucian dengan aquadest dan pengecekan pH sampai mendapatkan pH 7 (netral). Selanjutnya sisik ikan ditambahkan dengan asam asetat dan didiamkan selama 24 jam dengan suhu 4-6°C. Kemudian sisik ikan dibilas dengan aquadest dan ditambahkan asam asetat lalu distirer selama 2 jam. Setelah distirer selama 2 jam diambil cairannya dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.500 rpm selama 15 menit. Supernatan dan endapan (filtrat) dipisahkan dan dipindahkan ke tabung eppendorf. Pada masing-masing supernatan dan endapan (filtrat) ditambahkan NaCl dengan perbandingan 1:1. Sampel kemudian dilakukan dialisis selama 24 jam menggunakan *dialysis tubing*. Sampel kolagen yang didialisis bisa disimpan sampai digunakan.

Pembuatan Nanokolagen

Kolagen dari sisik ikan gurami yang sudah didialisis dilarutkan dengan aquadest dengan rasio 4 ml:1

gram, lalu ditambahkan enzim pepsin sebanyak 200 ml dan di stirer selama 6 jam dengan suhu 40°C. Selanjutnya dibuat pembentuk nanokolagen dengan membuat larutan pengkelat (5 mm CaCl dalam 20 mm na. fosfat). Larutan pengkelat dimasukkan dalam hidrosilat kolagen dan diaduk dengan stirer selama 30 menit. Adjust ph 7,8 dengan menggunakan 6M HCl dan 6M NaOH yang dilarutkan dengan aquadest yang selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit. Diambil bagian endapan dan diletakkan pada kaca arloji lalu tunggu hingga kering.

Pembuatan Ekstrak Buah Delima

Buah delima yang masih segar dicuci hingga bersih. Dilakukan pengsortasian basah lalu dikeringkan selama kurang lebih 5 hari dan melakukan pengsortasian kering. Simplisia buah delima diserbukkan dan dimaserasi dengan alkohol 70%

dengan perbandingan 1:3. Pengadukan pada maserasi dilakukan 1 kali dalam 24 jam selama 5 hari dengan wadah tertutup. Setelah maserasi 5 hari ekstrak disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga memperoleh ekstrak kental.

Pembuatan Serum

Dibuat basis gel dengan campuran *Carbophol Ultrez 20* kemudian didispersikan dengan aquadest, lalu ditambahkan *Triethanolamine* dalam dispersi aduk *ad homogen*. Selanjutnya dalam wadah lain *Propylenglycol* dilarutkan dengan *Methylparaben* dan *Propylparaben* aduk *ad larut*, setelah larut ditambahkan ke basis gel aduk *ad homogen*. Jika sudah homogen ditambahkan ekstrak buah delima dan *nanokolagen* dari sisik ikan gurami. Rancangan Formula yang digunakan pada penelitian ini sebagai berikut (**Tabel 8**) [13].

Tabel 8. Rancangan Formula

Nama Bahan	F1	F2	F3
Carbophol Ultrez 20	0,5%	1%	2%
Triethanolamine (TEA)	2%	5%	10%
Methyl Paraben	0,02%	0,1%	0,3%
Propylenglicol	15%	15%	15%
Propylparaben	0,03%	0,1%	0,4%
Fragrance	0,001%	0,001%	0,001%
Buah Delima (<i>Punica granatum L</i>)	0,5%	2%	4%
Sisik Gurami(<i>Oshpronemus gouramy</i>)	1%	3%	5%
Aquadest	80,94%	74,99%	63,29%

Evaluasi Mutu Fisik

Evaluasi mutu fisik suatu serum dilakukan beberapa uji yaitu: uji organoleptis, uji homogenitas, uji penetapan pH, uji anti-iritan, uji daya sebar, uji viskositas, uji antioksidan, uji SEM, uji *Particle Size Analyzer*, uji identifikasi asam galat dan vitamin C dan uji identifikasi kolagen.

Uji Organoleptis

Serum diamati dengan melihat warna, bentuk dan tekstur sediaan. Pengujian organoleptis dilakukan secara visual dengan panca indera dengan melihat warna, bentuk dan tekstur pada sediaan serum [14].

Uji Homogenitas

Sediaan serum dioleskan pada suatu wadah yaitu kaca objek yang digunakan untuk mengamati homogenitasnya. Uji homogenitas dilakukan secara visual dengan panca indera dengan melihat ada atau tidaknya partikel kasar pada sediaan serum. Jika tidak terdapat butiran-butiran maka sediaan serum homogen [14]

Uji Penetapan PH

Pengujian pH akan diawali dengan melakukan kalibrasi pH dengan pH 4, 7 dan 10. Hasil yang didapatkan dari pengujian pH diharapkan sesuai dengan rentang pH kulit yaitu 4,6 - 6,5 [14]

Uji Anti-Iritan

Uji anti-iritan dengan metode *patch test*. Langkah pertama untuk uji anti-iritan dilakukan dengan membersihkan lengan bawah dengan alkohol swab, selanjutnya sampel dioleskan dengan laus 2,5 x 2,5 cm pada kulit yang didiamkan selama 5 jam dan dibalut dengan *patch*. Serum bisa dikatakan baik tidak meninggalkan bekas seperti ruam dan kemerahan pada kulit. Jika kulit ada kemerahan diberi tanda (+), jika kulit ada gatal-gatal diberi tanda (++) , jika kulit terasa bengkak diberi tanda (+++)

Uji Daya Sebar

Hal yang pertama untuk pengujian daya sebar yaitu dengan penyiapan sampel yang selanjutnya ditimbang sebanyak 1 gram pada masing-masing sampel serum. Lalu masing-masing sampel diletakkan pada tengah kaca objek dan diberikan pemberat sebesar 100 gram selama 1 menit. Kemudian melakukan pengukuran diameter pada kaca objek. Rentang daya sebar sediaan serum yang baik yaitu 5-7cm [14]

Uji Viskositas

Uji viskometer dengan menggunakan alat Viskometer Ostwald. Disiapkan *stopwatch* dan serum yang akan diuji, pada bagian viskometer dipastikan kering dan bersih. Lalu, serum dimasukkan sampai tanda batas A dan hisap dengan menggunakan bulb secara perlahan hingga tanda batas B. Kemudian hisapan dikurangi secara perlahan hingga berada pada tanda C. Catat waktu yang diperlukan serum dari batas B hingga menuju ke batas C. Prinsip kerja viskometer ostwald yaitu dengan mengukur waktu yang

diperlukan untuk melewati tanda batas B ke C pada sebuah tabung kapiler vertikal [14].

Uji Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), dilakukan 2 kali pengujian DPPH, dengan sampel ekstrak dan sampel serum. Langkah yang pertama membuat larutan induk DPPH dengan menimbang DPPH dan dilarutkan dalam 100ml dengan metanol p.a. Selanjutnya membuat larutan kontrol pembanding dengan menimbang asam galat yang dilarutkan dalam metanol dengan perbandingan 1:1. Kemudian larutan kontrol pembanding dibuat konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50ppm dan larutkan dalam 10mL metanol ad tanda batas lalu masukkan ke dalam vial. Lalu membuat sampel dengan menimbang ekstrak dan serum yang dilarutkan dalam 10 ml metanol. kemudian larutan kontrol pembanding dibuat konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm dan larutkan dalam 10 ml metanol ad tanda batas lalu masukkan ke dalam vial. Untuk penentuan panjang gelombang maksimum, menyiapkan spektrofotometer UV-Vis dan dimasukkan DPPH dalam kuvet, skrining gelombang maksimal di panjang gelombang 200-800 nm, panjang gelombang dicatat dengan puncak tertinggi. Selanjutnya penentuan *operating time* dilakukan dengan menyiapkan DPPH dan asam galat dari larutan induk skrining pada waktu 0-30 menit. Kemudian pembacaan absorbansi blanko dengan *operating time* 15 menit. Dengan menyiapkan metanol dan ditambahkan DPPH dalam kuvet, lakukan *pipetting*. Lalu diinkubasi dalam kondisi gelap dan dibaca pada panjang gelombang maksimal yang sudah ditentukan dan dicatat hasilnya. Kemudian pembacaan absorbansi sampel dengan *operating time* 15 menit. Dengan menyiapkan 0,2 ml semua sampel dalam konsentrasi yang sudah ditentukan, lalu tambahkan 3,8 DPPH dalam kuvet, lalu dilakukan *pipetting*. Inkubasi dalam kondisi gelap dan dibaca pada panjang gelombang maksimal yang sudah ditentukan dan dicatat hasilnya. Terakhir yaitu menghitung IC_{50} sampel yang sudah didapatkan nilai absorbansinya, berikut aktivitas antioksidan pada **Tabel 9** [15].

Tabel 9. Rentang IC₅₀

The IC50 Value	Antioxidant Characteristic
200 ppm-150 ppm	Less
150 ppm-100 ppm	Moderate
100 ppm-50 ppm	Strong
<50 ppm	Very Strong

Uji SEM

Uji *Scanning Electron Microscope* (SEM) memiliki prinsip kerja yaitu pada berkas elektron yang dihasilkan oleh filamen akan difokuskan oleh lensa magnet dan elektron akan menumbuk sampel. Elektron akan tersebar dan ditangkap oleh detektor. Jadi, permukaan sampel dapat dilihat.

Uji Particle Size Analyzer

Uji *Particle Size Analyzer* yang digunakan untuk mengukur diameter ukuran nanopartikel yang memiliki mekanisme kerja yaitu pada cahaya yang muncul akan disebarkan oleh partikel pada sampel. Cahaya yang disebarkan akan berbanding terbalik dengan ukuran pada partikel dan menghasilkan sinyal analog yang diubah menjadi sinyal digital dan menjadi hasil deret hitung.

Uji Identifikasi Senyawa Asam Galat dan Vitamin C

Uji Identifikasi senyawa asam galat dan vitamin C dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan fase gerak dan fase diam [16].

1. Identifikasi asam galat dimulai dari pembuatan fase gerak yaitu kloroform : metanol dengan perbandingan 9 : 1 yang dijenuhkan dengan kertas saring. Selanjutnya untuk plat KLT digunting dengan ukuran 10 x 1 cm sebanyak 4 biji dan dikeringkan dengan oven bersuhu 50°C. Diberikan pembatas atas dan bawah 1 cm. Kemudian dilanjutkan untuk penotolan, menggunakan mikropipet dengan asam galat E1, E2 dan E3 pada plat KLT. Plat KLT yang sudah dilakukan penotolan dimasukkan dalam larutan fase gerak sampai tanda batas atas. Lalu dikeringkan dan dibaca dengan alat UV dan diukur untuk mendapatkan nilai RF dan HRF.
2. Identifikasi vitamin C dimulai dari pembuatan fase gerak yaitu n-Butanol : kloroform : asam asetat : ammonia : aquades dengan

perbandingan 7 : 4 : 5 : 1 : 1 yang dijenuhkan dengan kertas saring. Selanjutnya untuk plat KLT digunting dengan ukuran 10 x 1 cm sebanyak 4 biji dan dikeringkan dengan oven bersuhu 50°C. Diberikan pembatas atas dan bawah 1 cm. Kemudian dilanjutkan untuk penotolan, menggunakan mikropipet dengan vitamin C, E1, E2 dan E3 pada plat KLT. Plat KLT yang sudah dilakukan penotolan dimasukkan dalam larutan fase gerak sampai tanda batas atas. Lalu dikeringkan dan dibaca dengan alat UV dan diukur untuk mendapatkan nilai RF dan HRF [17].

Uji Identifikasi Kolagen

1. Persiapan Gel
Mencampur bahan separating sesuai dengan konsentrasi yang telah dihitung, campuran *separating* gel dihomogenkan dengan cepat agar tidak segera mengeras, lalu masukkan *separating* gel ke dalam gel counter dengan menggunakan pipet dan berikan aquadest agar permukaan gel rata dan oksigen tidak ada. Setelah *separating* gel mengeras lalu buang aquades lalu tambahkan *stacking* gel diatas *separating* gel dan segera pasang sisir diatas *stacking* gel, biarkan gel mengeras lalu pasang gel dan kaca dipasang pada alat *elektroforesis* dan *running* buffer.
2. Persiapan Sampel
Sampel protein sebanyak 20 mikroliter dan 20 mikroliter tracking dye campur lalu masukkan ke dalam eppendorf, rebus sampel pada suhu 100 derajat celsius selama 5 menit, dinginkan pada suhu ruang.
3. Elektroforesis Sampel
Sampel dimasukkan dalam gel melalui *stacking* gel sebanyak 2 mikroliter. Power supply dinyalakan, lalu sampel diproses atau *running* dengan memberikan tegangan listrik sebesar 120V selama 60-90 menit, lalu lepas gel dari kaca.
4. Staining dengan silver staining
Gel yang sudah dilepas kemudian direndam dalam silver staining diletakkan diatas shaker selama 20-30 menit.

- Destaining
Perwarnaan pada gel dihilangkan dengan merendam dalam destain solutio selama 1-2 jam sambil tetap di shaker, lakukan destaining hingga gel terlihat bersih, lihat band pada gel.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Pembelajaran dan Kemahasiswaan; Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi dalam Program Kreativitas Mahasiswa Bidang Riset Eksakta (PKM-RE) tahun 2023; serta peneliti mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Ma Chung atas dukungan penggunaan sarana dan prasarana laboratorium selama penelitian ini dilaksanakan.

Daftar Pustaka

- Gromkowska-Kępką, K. J., Puścion-Jakubik, A., Markiewicz-Żukowska, R. & Socha, K. The Impact Of Ultraviolet Radiation On Skin Photoaging — Review Of In Vitro Studies. *Journal Of Cosmetic Dermatology* **20**, 3427–3431 (2021).
- Insanu, M., Mutia, C. & Artarini, A. A. *Pengujian Toksisitas In Vitro Ekstrak Dan Fraksi Dari Daun Jambu Air (Syzygium Aqueum) Dan Kulit Buah Delima (Punica Granatum) Terhadap Sel Vero*. *Acta Pharmaceutica Indonesia /* (2017).
- Septiyanti, M., Liana, L., Sutriningsih, Kumayanjati, B. & Meliana, Y. Formulation And Evaluation Of Serum From Red, Brown And Green Algae Extract For Anti-Aging Base Material. In 020078 (2019). Doi:10.1063/1.5134642.
- Noor Hikmah, F. *Et Al. Formulasi Dan Evaluasi Sediaan Serum Gel Ekstrak Bunga Melati (Jasminum Sambac L.)*. *Journal Of Pharmaceutical Care And Sciences* Vol. 3.
- Dharma, N. M. *Et Al. Formulasi Dan Evaluasi Mutu Fisik Lip Balm Dari Ekstrak Kulit Buah Hylocereus Lemairei Dengan Variasi Konsentrasi Cera Alba Formulation And Physical Quality Evaluation Of Hylocereus Lemairei Rind Extract Lip Balm With Cera Alba Concentration Variations*. *Jurnal Integrasi Obat Tradisional •* Vol. 2 (2022).
- Mardhani, Y. D. *Et Al. Formulasi Dan Stabilitas Sediaan Serumdari Ekstrak Kopi Hijau (Coffea Canephora Var. Robusta) Sebagai Antioksidan Formulation And Stability Of Green Coffee (Coffea Canephora Var. Robusta) Extract Serum As An Antioxidant*. *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal* Vol. 2 (2017).
- Rahmayani, U., Pringgenies, D. & Djunaedi, A. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Keong Bakau (Telescopium Telescopium) Dengan Pelarut Yang Berbeda Terhadap Metode Dpph (Diphenyl Picril Hidrazil)*. *Journal Of Marine Research* Vol. 2 (2013).
- Fujii, K. K. *Et Al. The Thermal Stability Of The Collagen Triple Helix Is Tuned According To The Environmental Temperature*. *International Journal Of Molecular Sciences* **23**, (2022).
- Cullen, J. J., Neale, P. J. & Lesser, M. P. *By Ultraviolet Radiation*. **258**, (1992).
- Desmelati *Et Al. Determination Of Nano-Collagen Quality From Sea Cucumber Holothuria Scabra*. *Iop Conference Series: Earth And Environmental Science* **430**, 0–11 (2020).
- Adamiak, K. & Sionkowska, A. *The Influence Of Uv Irradiation On Fish Skin Collagen Films In The Presence Of Xanthohumol And Propanediol*. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy* **282**, 121652 (2022).
- Puspita Sari, S. *Et Al. Volume 4 Nomor 2 Kromatografi Lapis Tipis (Klt): Pendekatan Pola Kromatogram Untuk Mengkonfirmasi Rhodamin B Pada Perona Pipi*. *Journal Syifa Sciences And Clinical Research* (2022) Doi:10.37311/Jsscr.V4i2.14865.
- Skin Care And Cosmetic Ingredients.
- Budiasih, S. *Et Al. Formulation And Characterization Of Cosmetic Serum Containing Argan Oil As Moisturizing Agent*. In 297–304 (Scitepress, 2019). Doi:10.5220/0008361702970304.
- Priska, M., Peni, N. & Carvallo, L. *Phytochemicals Screening And Antioxidant Effectiveness Of Garlic (Allium Sativum) From Timor Island*. *Biosaintifika: Journal Of Biology & Biology Education* **11**, 1–7 (2019).
- Saxena, R., Sharma, R. & Nandy, B. C. *Chromatographic Determination Of Phenolic Profile From Punica Granatum Fruit Peels*. *International Research Journal Of Pharmacy* **8**, 61–65 (2017).
- Mariana, G., Claudia, G. T., Corina, M. & Sanda, B. *Thin-Layer Chromatographic Method For Identifying Vitamin C In Fruits And Drugs*. *Fascicle: Environmental Protection* Vol. Xxxiii (2019).