

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Kulit merupakan organ reseptor yang berperan melindungi bagian dalam tubuh, termasuk otot, tulang, sistem organ, persendian, pembuluh darah, dan saraf terhadap lingkungan luar (Amin et al., 2024). Seiring bertambahnya usia, secara alamiah seseorang akan mengalami proses penuaan (*aging*) dan salah satunya terjadi penuaan pada kulit (Irianti et al., 2022). Salah satu penyebab utama penuaan diakibatkan oleh faktor ekstrinsik yaitu akibat radiasi sinar ultraviolet berlebih yang menimbulkan produksi *Reactive Oxygen Spesies* (ROS). Kadar ROS yang meningkat menyebabkan peningkatan aktivitas enzim tirosinase dalam pembentukan melanin. Pembentukan melanin yang meningkat dapat menyebabkan terjadinya hiperpigmentasi pada kulit (Prasetyo et al., 2024).

Tindakan untuk dapat mencegah penuaan dan hiperpigmentasi yang terjadi pada kulit dapat dilakukan dengan penggunaan antioksidan yang dapat berfungsi mencegah kerusakan kulit akibat radikal bebas. Terdapat hubungan antara aktivitas antioksidan dengan antitirosinase yaitu efek sinergis yang berhubungan dengan penghambatan ROS (Wang et al., 2018). Agen antioksidan dan inhibitor tirosinase dapat berupa senyawa sintesis maupun bahan alam. Saat ini perubahan dalam persepsi konsumen terhadap produk kosmetik telah memotivasi industri untuk melakukan riset dan pengembangan produk perawatan wajah, terutama yang berbasis bahan alam. Pada tahun 2022, sekitar 75% produk kosmetik telah menggunakan formula alami, penggunaan produk ramah lingkungan (*green product*) dengan bahan alam semakin populer dan diperkirakan akan tumbuh sebesar 6,83% setiap tahunnya hingga tahun 2028 (Ariawa et al., 2024).

Beberapa komponen bahan alam terbukti memiliki aktivitas antioksidan dan inhibitor tirosinase seperti flavonoid dan polifenol. Salah satu bahan sumber antioksidan alami dan inhibitor tirosinase yaitu biji alpukat. Pada penelitian (Arukwe et al., 2012) melaporkan bahwa kandungan flavonoid dalam biji alpukat berkisar $1,90 \pm 0,07$ mg/100g. Biji alpukat memiliki kandungan flavonoid yang telah dilaporkan berupa katekin yaitu flavan-3-ol (Steenis, 2003). Penelitian yang dilakukan oleh Song & Barlow menyatakan bahwa dalam biji alpukat ditemukan kandungan fenolik sebesar $88,2 \pm 2,2$. Senyawa ini diduga memiliki aktivitas antioksidan (Song dan Barlow., 2004). Arukwe (2012) juga melaporkan bahwa senyawa fenolik dalam biji alpukat lebih besar dibandingkan yang terdapat dalam daun dan buah alpukat.



aman yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat juga menghambat tirosinase yang kuat (Abidin et al., 2019). Pada (2019), melaporkan bahwa biji alpukat (*Persea americana* Mill) antioksidan IC_{50} 44,58 μ g/mL. Suatu senyawa tergolong sebagai kuat apabila nilai IC_{50} <50 μ g/mL (Analianasari et al., 2021). Pada et al. (2020), melaporkan bahwa biji alpukat memiliki aktivitas

inhibitor tirosinase IC_{50} $93.02 \pm 1.98 \mu\text{g/mL}$. Suatu senyawa tergolong kuat dalam penghambatan aktivitas enzim tirosinase apabila nilai $IC_{50} < 100$ (Furi et al., 2022).

Berdasarkan uraian tersebut, biji alpukat (*Persea americana* Mill) memiliki potensi untuk diformulasikan kedalam bentuk sediaan kosmetik. Salah satu bentuk kosmetik yang telah berkembang akhir-akhir ini adalah serum. Sediaan serum kosmetik merupakan sediaan yang memiliki viskositas rendah yang menghantarkan lapisan tipis bahan aktif ke permukaan kulit (Draelos, 2016). Formulasi serum gel terdiri dari zat aktif, bahan pembentuk gel (*gelling agent*) dan bahan tambahan lainnya. Salah satu *gelling agent* yang dapat digunakan dalam pembuatan serum adalah karbopol 940. Keunggulan karbopol 940 yaitu bersifat stabil dalam sediaan kosmetik, tidak toksik, dan tidak mengiritasi kulit (Rowe et al., 2009). Konsentrasi *gelling agent* harus dipilih secara tepat karena sebagai salah satu parameter penentu yang dapat mempengaruhi sifat dan stabilitas fisik serum (Sudjono dan Pratimasari, 2012). Sehingga perlu dilakukan uji evaluasi formula untuk mengetahui konsentrasi karbopol 940 sebagai *gelling agent* yang baik pada sediaan serum ekstrak biji alpukat. Oleh karena itu, penelitian ini berfokus pada formulasi dan uji stabilitas serum dari ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) yang diawali dengan pengujian aktivitas antioksidan dan uji inhibitor tirosinase.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang rumusan masalah penelitian ini, yaitu:

1. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill) dengan menggunakan metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)?
2. Bagaimana aktivitas inhibitor tirosinase ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill) dengan menggunakan metode dopakrom?
3. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi karbopol 940 terhadap stabilitas fisik sediaan serum ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill)?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka tujuan penelitian ini, yaitu:

1. Mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill) dengan menggunakan metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)?
2. Mengetahui aktivitas inhibitor tirosinase ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill) dengan menggunakan metode dopakrom?
3. Mengetahui pengaruh variasi konsentrasi karbopol 940 terhadap stabilitas fisik sediaan serum ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill)?



BAB II

METODE PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

II.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah 96-well microplate (IWAKI®), aluminium foil, cawan porselen, homogenizer (Turrax®), jangka sorong, microplate reader (ELISA) (Biotek®), microtube, mikropipet (DragonLab®), object glass, oven (Mettler®), pH meter (Horiba®), plat kaca, rotary evaporator (Buchi®), seperangkat alat gelas (Pyrex®), seperangkat alat maserasi, timbangan analitik (Ohaus®), tip biru, tip kuning, viskometer (Brookfield®) LV, dan waterbath (Mettler®).

II.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich®), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (Sigma-Aldrich®), aquadest (Waterone®), asam askorbat (Sigma-Aldrich®), asam kojat (Sigma-Aldrich®), biji alpukat (*Persea americana* Mill.), dimetil sulfoksida (DMSO), dinatrium ethylene diamine tetraacetic (Na₂EDTA), disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄), DMDM hydantoin, etanol 70% (ONEMED®), etanol absolut pro analisis (PA), fragrance, karbopol 940 (Acrypol®), propilen glikol, sodium dihydrogen phosphate (NaH₂PO₄), tyrosinase from mushroom (Sigma-Aldrich®) dan trietanolamin (TEA).

II.2 Metode Penelitian

II.2.1 Pembuatan simplisia Biji Alpukat

Sebanyak 3 kg biji alpukat (*Persea americana* Mill) yang diperoleh dari kota Maumere dicuci hingga bersih dengan air yang mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel dan biji alpukat dipotong dan diiris tipis, kemudian selanjutnya di keringkan menggunakan oven selama 5 jam pada suhu 50°C (Kemenkes RI, 2017).

II.2.2 Ekstraksi Biji Alpukat

Sampel biji alpukat (*Persea americana* Mill) yang telah dikeringkan kemudian dimaserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:5 (b:v) selama 3 x 24 jam. Maserat yang diperoleh disaring dan residunya di remaserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1,25 L. Maserat selanjutnya kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C pada tekanan 175 mbar. Ekstrak kental yang diperoleh diuapkan di atas waterbath dan dimasukkan ke dalam desikator sampai pelarut menguap. Kemudian dilakukan perhitungan % rendemen (Kementerian Kesehatan RI, 2017; Fadla dan Wulansari, 2021)



$$\text{rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

II.2.3 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

II.2.2 Pembuatan Larutan Stok DPPH

Ditimbang sebanyak 3,94 mg DPPH lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur 25 mL, dilarutkan menggunakan etanol absolut PA dan dicukupkan volumenya hingga tanda batas dan diperoleh larutan stok DPPH 0,4 mM.

II.2.2 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Biji Alpukat

Ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) ditimbang sebanyak 5 mg lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan dicukupkan menggunakan pelarut etanol absolut PA untuk mendapatkan konsentrasi 500 ppm.

II.2.2 Pembuatan Larutan Stok Asam Askorbat

Ditimbang 10 mg asam askorbat dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan dilarutkan menggunakan etanol absolut PA kemudian volumenya dicukupkan hingga tanda batas dan diperoleh larutan stok asam askorbat dengan konsentrasi 1000 ppm. Diambil sebanyak 1 mL larutan stok konsentrasi 1000 ppm ke dalam labu tentukur 10 mL dan dicukupkan dengan etanol absolut PA hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan asam askorbat 100 ppm

II.2.2 Pengukuran Kadar % Inhibisi dan Nilai IC₅₀

Pengukuran % inhibisi ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) dilakukan dengan mencuplik masing-masing 5; 10; 15; 20; dan 25 µL kedalam *well microplate reader* lalu ditambahkan sebanyak 90 µL larutan stok DPPH dan dicukupkan hingga 200 µL menggunakan etanol absolut PA untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 12,5; 25; 37,5; 50; dan 62,5 ppm. Larutan uji diinkubasi selama 30 menit di tempat yang terhindar dari sinar matahari, lalu diukur pada panjang gelombang yang sesuai.

Pengukuran % inhibisi asam askorbat dilakukan dengan mencuplik larutan asam askorbat 100 ppm kemudian masing-masing 2; 4; 6; 8; dan 10 µL ke dalam *well microplate reader* lalu ditambahkan sebanyak 90 µL larutan stok DPPH, kemudian dicukupkan hingga 200 µL menggunakan etanol absolut PA sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1; 2; 3; 4; dan 5 ppm. Plat sumuran diinkubasi selama 30 menit diruangan gelap lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm (Blois, 1958). Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi, aktivitas antioksidan suatu sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH yang diketahui melalui perhitungan inhibisi serapan menggunakan rumus dibawah ini:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100$$



Setelah % inhibisi sampel dan standar dihitung, selanjutnya dibuat kurva baku dengan persamaan $y = ax + b$. Nilai IC_{50} dihitung dengan menggunakan rumus yaitu:

$$IC_{50} (\mu\text{g/mL}) = \frac{50 - b}{a}$$

Keterangan:

IC_{50} = Inhibition concentration 50%

a = Slope

b = Intersep

II.2.4 Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase

II.2.4.1 Pembuatan Buffer Fosfat 0,05 M pH 6,5

Ditimbang Na_2HPO_4 sebanyak 0,295 g dan NaH_2PO_4 sebanyak 1,251 g kemudian dilarutkan ke dalam labu tentukur 250 mL dengan *aquadest* hingga tanda batas. Selanjutnya dilakukan pengukuran pH menggunakan pH meter.

II.2.4.2 Pembuatan Larutan Substrat L-DOPA 2mM

Pembuatan larutan substrat L-DOPA 2 mM dengan cara ditimbang sebanyak 3,944 mg L-DOPA dan dilarutkan ke dalam 10 mL larutan buffer fosfat.

II.2.4.3 Pembuatan Larutan Enzim Tirosinase 333 unit/mL

Enzim tyrosinase 7164 unit/mg sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 10 mL larutan buffer fosfat pH 6,5 sehingga diperoleh konsentrasi enzim sebesar 716,4 unit/mL. Lalu, dicuplik 4,648 mL dari larutan enzim 716,4 unit/mL ke dalam labu tentukur dan dicukupkan volumenya hingga 10 mL dengan dapar fosfat pH 6,5 sehingga diperoleh konsentrasi 333 unit/mL.

II.2.4.4 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Biji Alpukat

Ditimbang ekstrak kental biji alpukat sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan buffer fosfat pH 6,5, kemudian masukkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan dicukupkan menggunakan buffer fosfat hingga tanda batas. Sehingga diperoleh larutan stok sampel 1000 ppm.

II.2.4.5 Pembuatan Larutan Stok Asam Kojat

Ditimbang 1 mg asam kojat dan dilarutkan ke dalam labu tentukur 10 mL menggunakan buffer fosfat hingga tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm.

II.2.4.6 Pengukuran % Kadar Inhibisi dan Nilai IC_{50}

Pengukuran % inhibisi menggunakan *96-well microplate reader* pada panjang gelombang 475 nm. Kurva baku sampel dibuat dengan lima seri konsentrasi yaitu 50; 200; 350; 500 dan 650 ppm. Larutan stok uji dibuat dengan mencuplik 50; 200; 350; 500; dan 650 μL stok sampel ke dalam *well-microplate reader* lalu dicukupkan dengan buffer fosfat hingga 1 mL. Selanjutnya pada masing-masing sumur



. L-DOPA, dan 30 μL enzim tirosinase. Kemudian, larutan enzim lalu ditambahkan, lalu ditambahkan 40 μL DMSO 2,45 M untuk menghentikan reaksi enzim. Setiap variasi konsentrasi sebanyak tiga replikasi

Pengukuran kurva baku standar (Asam kojat) dibuat dengan variasi konsentrasi 15; 30; 45; 60; dan 75 ppm dengan mencuplik sebanyak 150; 300; 450; 600; dan 750 μL larutan stok asam kojat ke dalam *well-microplate reader* kemudian dicukupkan dengan larutan buffer fosfat hingga 1 mL. Selanjutnya pada masing-masing sumur ditambahkan 110 μL L-DOPA, dan 30 μL enzim tirosinase. Kemudian, larutan diinkubasi selama 5 menit lalu ditambahkan, lalu ditambahkan 40 μL DMSO 2,45 M sebagai *stop solution* untuk menghentikan reaksi enzim. Setiap variasi konsentrasi dibuat sebanyak tiga replikasi. Blanko dalam pengukuran ini berisi 70 μL buffer fosfat pH 6,5, 30 μL enzim tirosinase dan 110 μL L-DOPA (Hachiya et al., 1989).

Aktivitas penghambatan enzim tirosinase ditentukan melalui perhitungan menggunakan rumus persamaan di bawah ini, kemudian dihitung IC_{50} berdasarkan kurva baku yang diperoleh

$$\% \text{inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100$$

Selanjutnya, sampel ditransformasi ke dalam bentuk logaritma. Data logaritma variasi konsentrasi dan % inhibisi dianalisis menggunakan *non-linear regression* pada aplikasi *Graphpad prism 9* untuk memperoleh nilai IC_{50} sampel sebagai inhibitor tirosinase.

II.2.5 Formulasi Serum

II.2.5.1 Rancangan Formulasi Serum

Tabel 1. Rancangan formulasi serum biji alpukat (*Persea americana* Mill)

Komposisi	Fungsi	Formula (%b/v)			
		F0	F1	F2	F3
Ekstrak biji alpukat	Zat aktif	-	1	1	1
Karbopol 940	Basis serum	0,35	0,3	0,35	0,4
TEA	<i>Alkalizing agent</i>	0,045	0,075	0,06	0,045
Dinatrium EDTA	Pengkelat	0,01	0,01	0,01	0,01
Propilen glikol	<i>Enhancer</i>	10	10	10	10
Gliserin	Humektan	5	5	5	5
DMDM hydantoin	Pengawet	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Scandalous Fragrance</i>	Parfum	0,001	0,001	0,001	0,001
	Penyangga pH	1	1	1	1
	Pembawa	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100



II.2.5.2 Pembuatan Serum

Pembuatan serum ini diawali dengan mendispersikan karbopol 940 ke dalam *aquadest* selama 24 jam. Setelah dihidrasi, dimasukkan TEA ke dalam wadah yang berisi karbopol 940 sedikit demi sedikit. Campuran ini kemudian di homogenkan menggunakan *homogenizer*. Ekstrak biji alpukat dilarutkan dengan propilen glikol dan gliserin kemudian ditambahkan ke dalam basis. Selanjutnya, ditambahkan DMDM Hydantoin, dan Na_2EDTA ditambahkan ke dalam campuran basis. Kemudian, dimasukkan *Scandalous fragrance* dan buffer fosfat pH 5,5. Campuran serum kemudian dihomogenkan kembali menggunakan *homogenizer* (Garg et al., 2002).

II.2.6 Evaluasi Fisik Formula Serum

II.2.6.1 Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan secara visual untuk pemeriksaan sediaan secara langsung melalui panca indera untuk melihat fisik dari warna, aroma, dan tekstur sediaan (Kemenkes RI., 2020).

II.2.6.2 Uji pH

Pengujian pH dilakukan menggunakan pH meter, alat dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan buffer standar sebelum digunakan. Nilai pH sediaan harus berada dalam kisaran pH yang sesuai dengan pH normal kulit yaitu 4,5 – 6,5 (Voight., 1995)

II.2.6.3 Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan mengoleskan sampel sediaan pada kaca objek, sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terdapat adanya butiran-butiran kasar (Garg et al., 2002).

II.2.6.4 Uji Daya Sebar

Pengujian daya sebar dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 0,5 g sediaan serum di atas plat kaca, dibiarkan selama 1 menit, lalu dihitung luas daerahnya. Lalu ditutup lagi dengan kaca yang diberi beban seberat 150 g dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian catat kembali pertambahan luas sediaan (Garg et al., 2002)

II.2.6.5 Uji Daya Lekat

Pengujian daya lekat dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 0,25 gram sediaan serum lalu diletakkan diantara 2 *object glass*. Kemudian ditekan dengan beban 200 gram selama 5 menit, beban diangkat dicatat waktu pelepasan serum (Tilarso et al., 2022). Semakin lama daya lekat sediaan serum maka semakin baik sediaan serum tersebut. Lama daya lekat sediaan serum yaitu pada rentang >1 detik (Garg et al., 2002).

II.2.6.6 Uji Viskositas



Uji viskositas menggunakan viskometer Brookfield LV menggunakan batang tatan 50 rpm. Formula F0 (0,35%), F2 (0,3%), F3 (0,35%) dan ising menggunakan spindel 5, spindel 4, spindel 5, dan spindel yang ditunjukkan kemudian dicatat nilai viskositasnya (Agustin kositas sediaan serum berada pada rentang 2000 – 4000 cPs

II.2.6.7 Uji Penyimpanan Dipercepat

Pengujian stabilitas fisik serum dilakukan dengan uji penyimpanan dipercepat untuk mengetahui stabilitas fisik dari sediaan selama masa penyimpanan dalam jangka waktu tertentu. Uji ini dilakukan dengan menyimpan sediaan serum pada oven dengan suhu $40^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$ dan kelembapan relatif $75\%\pm 5\%$ RH selama 15 hari. Adapun perubahan fisik yang terjadi pada sediaan diamati setelah penyimpanan ini yaitu organoleptis, pH, homogenitas, daya sebar, daya lekat, dan viskositas sediaan serum (ICH, 1996)

II.2.7 Pengumpulan Data dan Analisis Data

Data hasil penelitian kemudian dikumpulkan, ditabulasi, lalu dilakukan analisis secara statistika menggunakan aplikasi *Microsoft Excell dan GraphPad Prism 9*. Sebelum dilakukan analisis data, data perlu melalui uji normalitas yang dilakukan dengan metode *Shapiro-Wilk* dikarenakan jumlah data kurang dari 50.

Data pengujian pH, viskositas, daya lekat, dan daya sebar yang terdistribusi secara normal dianalisis menggunakan metode *Paired T-Test* untuk mengevaluasi bagaimana signifikansi dari ke empat formula yang berbeda pada sebelum dan setelah penyimpanan dipercepat. Metode ini sering digunakan pada penelitian farmasi yang memiliki tujuan untuk menilai apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara dua kelompok yang ditandai dengan nilai signifikan ($p < 0,05$) (Nurba'id et al., 2024).

Dalam analisis statistik, simbol bintang pada p -value digunakan dalam tabel/grafik untuk menginterpretasikan tingkat signifikansi suatu hasil. Setiap bintang mewakili rentang nilai p yang mencerminkan seberapa signifikan hasil tersebut berdasarkan standar yang telah ditentukan. Penandaan (*) menunjukkan signifikansi dengan $p \leq 0,05$; (**) menunjukkan signifikansi dengan $p \leq 0,01$; (***) menunjukkan signifikansi dengan $p \leq 0,001$; (****) menunjukkan signifikansi dengan $p \leq 0,0001$; dan (ns) menandakan tidak signifikan dengan $p \geq 0,05$ (Akbar et al., 2023)

