

BAB III

TATA KERJA

3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah neraca analitik (OHAUS[®]), alat maserasi, alat perajangan, *rotary vaporator* (IKA[®]), viskometer (Brookfield), pH meter (Mettler Taledo[®]), lemari pendingin (Polytron[®]), sentrifugator (Hettich Zentrifugen EBA 20[®]), Spektrofotometer UV-Vis ((Shimadzu[®]) microplate reader (Infinite M200 Pro[®]), microwell plate (NEST[®]), micropipet (Soccorex[®]), blue tip, yellow tip, microtube (Eppendorf[®]), labu ukur (Pyrex[®]), mortir, stemper, alat uji daya sebar dan alat-alat gelas (Pyrex[®]) yang biasa digunakan di Laboratorium.

3.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah pir yang diperoleh dari pasar tradisional di daerah Bandung, beta arbutin, enzim tirosinase, substrat L-tirosin, DPPH (2,2-difenil-2-pikrilhidrazil), metanol p.a, asam stearat, trietanolamin, setil alkohol, gliserin, paraffin cair, natrium benzoat, *essence pear*, etanol 80%, dimetil sulfoksida, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄.H₂O, NaOH, akuades, pereaksi untuk karakterisasi simplisia dan skrining fitokimia.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Determinasi Buah Pir

Determinasi buah Pir dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran Jatinangor.

3.3.2. Pengumpulan dan Pengolahan Kulit Buah Pir

Buah Pir dikumpulkan, disortasi basah, dicuci, kemudian dikupas kulitnya dan dilakukan perajangan (Cho, *et al.*, 2011).

3.3.3. Karakterisasi Simplisia

A. Kadar abu total

Simplisia ditimbang sebanyak 2 gram yang telah dihaluskan dan dimasukkan kedalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara.

Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, aduk, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan kertas saring beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama. Masukkan filtrat kedalam krus, uapkan dan pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam %b/b (Kemenkes RI, 2010 : 134).

B. Kadar sari larut air

Simplisia ditimbang sebanyak 5 gram kemudian dimasukkan kedalam labu bersumbat, tambahkan 100 mL air jenuh kloroform, kocok berkali-kali selama 6 jam pertama, biarkan selama 18 jam. Saring, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105⁰C dan ditara, panaskan residu pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari larut air (Kemenkes RI, 2010 : 136).

C. Kadar sari larut etanol

Simplisia ditimbang sebanyak 5 gram kemudian dimasukkan kedalam labu bersumbat, tambahkan 100 mL etanol 95% P, kocok berkali-kali selama 6 jam pertama, biarkan selama 18 jam. Saring cepat untuk menghindari penguapan etanol, uapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105⁰C dan ditara, panaskan residu pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari larut etanol (Kemenkes RI, 2010 : 136).

3.3.4. Penapisan Fitokimia

A. Golongan fenol

Sejumlah sampel ditambahkan dengan air, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Pada filtrat ditambahkan pereaksi FeCl₃. Terbentuknya warna hijau biru menandakan adanya senyawa fenolik (Depkes RI, 1989).

B. Golongan flavonoid

Sejumlah sampel degerus dalam mortir dengan sedikit air, kemudian dipindahkan dalam tabung reaksi, ditambahkan sedikit logam

magnesium dan 5 tetes HCl 2 N. Seluruh campuran dipanaskan selama 5-10 menit. Setelah itu disaring panas-panas dan filtrat dibiarkan dingin, kepada filtrat ditambahkan amil alkohol, lalu dikocok kuat-kuat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1989).

C. Tanin

Sampel ditambahkan air dalam tabung reaksi, dipanaskan dan disaring. Pada filtrat ditambahkan larutan gelatin 1%, adanya tanin ditandai dengan terjadinya endapan putih (Depkes RI, 1989).

D. Kuinon

Sampel ditambahkan air dalam tabung reaksi, lalu dipanaskan dan disaring. Pada filtrat ditambahkan KOH 5%. Adanya senyawa kuinon ditandai dengan terjadinya warna kuning (Depkes RI, 1989).

E. Alkaloid

Sampel dibasakan dengan ammonia, kemudian ditambahkan kloroform, digerus kuat-kuat. Lapisan kloroform diambil kemudian ditambahkan asam klorida 2 N. Setelah itu, dikocok kuat-kuat dan terbentuk dua lapisan, lapisan asam diambil, dibagi menjadi tiga bagian. Bagian 1 ditambahkan pereaksi Mayer. Jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna putih, berarti sampel kemungkinan mengandung alkaloid. Bagian 2 ditambahkan pereaksi Dragendorf. Jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna jingga-kuning berarti sampel mengandung alkaloid. Bagian 3 digunakan sebagai blanko (Depkes RI, 1989).

F. Monoterpen dan seskuiterpen

Sampel digerus dengan eter, filtratnya diambil dan ditempatkan dalam cawan penguap, dan dibiarkan kering. Tambahkan larutan vanilin 10% dalam H₂SO₄ pekat. Terjadinya warna-warna menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan seskuiterpen (Depkes RI, 1989).

G. Steroid dan triterpenoid

Sampel digerus dengan eter, filtratnya diambil dan ditempatkan dalam cawan penguap, dan dibiarkan kering, kemudian ditambahkan pereaksi Lieberman-Burchard. Terjadinya warna ungu menunjukkan adanya

senyawa triterpenoid. Terjadinya warna hijau biru menunjukkan adanya steroid (Depkes RI, 1989).

H. Saponin

Sampel ditambahkan air, lalu dipanaskan dan disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dikocok kuat-kuat. Terbentuknya busa yang mantap dan tidak hilang selama 10 menit dengan tinggi busa minimal 1 cm menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1989).

3.3.5. Ekstraksi Kulit Buah Pir

Pembuatan ekstrak kulit buah pir dilakukan dengan metode maserasi. Kulit buah pir ditimbang sebanyak 500 gram, kemudian dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan pelarut etanol 80% sampai terendam. Proses maserasi dilakukan selama 3x24 jam, kemudian disaring. Hasil dari maserasi berupa ekstrak cair dievaporasi guna menghilangkan sisa pelarut sehingga diperoleh ekstrak kental, kemudian rendemen ekstrak dihitung (Cho, *et al.*, 2011).

3.3.6. Pembuatan Larutan DPPH (2,2-difenil-2-pikrilhidrazil)

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dalam metanol p.a sampai tepat 100 mL (Septriana, 2016).

3.3.7. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Pir

Ekstrak etanol kulit buah pir dilarutkan dalam metanol p.a, kemudian larutan dibuat dalam berbagai konsentrasi yaitu 5, 6, 7, 8 dan 9 µg/mL. Masing-masing larutan sampel dimasukkan ke dalam vial, ditambahkan larutan DPPH dengan perbandingan 1:2, didiamkan selama 30 menit. Absorbansi DPPH diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya. Kemudian ditentukan persen inhibisi dan dihitung nilai IC_{50} (Septriana, 2016).

3.3.8. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Terhadap Ekstrak

A. Pembuatan larutan dapar fosfat 0,1 M pH 6,8

Pembuatan larutan dapar fosfat dilakukan dengan cara Na_2HPO_4 ditimbang sebanyak 1,42 gram dilarutkan dalam aquades sampai volume 100 mL, diperoleh larutan Na_2HPO_4 0,1 M. Kemudian $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ditimbang sebanyak 1,38 gram dilarutkan dalam

akuades hingga volume 100 mL, diperoleh larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 M. Kemudian kedua larutan dicampurkan dan dicek pH dengan pH meter sampai diperoleh pH 6,8. Jika perlu ditambahkan NaOH untuk meningkatkan pH.

B. Pembuatan larutan substrat L-Tirosin 1 mM

Substrat L-tirosin sebanyak 4,53 mg dilarutkan dalam dapar fosfat pH 6,8 sampai volume 25 ml. Larutan disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C .

C. Penyiapan larutan enzim tirosinase 250 Unit

Enzim tirosinase sebanyak 4,36 mg dilarutkan dalam larutan dapar fosfat pH 6,8 hingga volume 1 mL. Kemudian diambil 0,83 mL dan dilarutkan dalam dapar fosfat pH 6,8 sampai volume 10 mL. Larutan disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C .

D. Preparasi sampel uji dan standar beta arbutin

Ekstrak etanol kulit buah pir dan standar Beta arbutin masing-masing ditimbang secara seksama sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO 2 mL, lalu ditambahkan dapar fosfat pH 6,8 hingga volume 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga didapatkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 250, 125, 62,5 dan 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sebagai variasi konsentrasi pada pengujian untuk mendapatkan nilai IC_{50} .

E. Uji aktivitas penghambatan tirosinase

Ekstrak etanol kulit buah pir dilarutkan di dalam DMSO (dimetil sulfoksida) kemudian ditambahkan buffer posfat (pH 6,8) sampai volume 10 mL. Larutan ekstrak tersebut diuji pada tingkat konsentrasi 500, 250, 125, 62,5 dan 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Beta arbutin sebagai kontrol positif di uji pada konsentrasi yang sama. Didalam plat tetes 96 sumur. Sebanyak 70 μL dari masing-masing ekstrak pengenceran ini ditambahkan dengan 30 μL enzim tirosinase (Sigma 250 unit/ml dalam buffer fosfat pH 6,8), setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 110 μL substrat L-tirosin dalam sumur *multi-well plate* yang sudah ditentukan, larutan tersebut

diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 477 nm, hal ini bertujuan untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambatan 50% (IC₅₀) (Batubara, *et al.*, 2010).

3.3.9. Formula Losion

Tabel 3.1 Formula Losion Ekstrak Etanol Kulit Buah Pir

Bahan	Fungsi	Konsentrasi (%)	
		Basis	Formula
Ekstrak kulit buah pir	Zat aktif	-	0.5
Setil alkohol	Pengental	2	2
Asam stearate	Pengemulsi	2.5	2.5
Trietanolamin	Pengemulsi	1	1
Paraffin cair	Emolien	8	8
Gliserin	Humektan	15	15
Natrium benzoat	Pengawet	0,5	0,5
<i>Essence pear</i>	Pewangi	4 qtt	4 qtt
Akuades	Pelarut	Ad 100	Ad 100

(Hasibuan, dkk., 2014, yang telah dimodifikasi).

3.3.10. Pembuatan Losion

Pembuatan losion diawali dengan menimbang bahan-bahan yang diperlukan, bahan-bahan yang digunakan dipisah menjadi dua bagian, yaitu bahan yang larut fase minyak dan bahan yang larut fase air. Bahan-bahan yang larut minyak yaitu asam stearat, setil alkohol dan parafin cair dimasukkan ke dalam cawan penguap. Bahan-bahan yang larut air yaitu trietanolamin, gliserin dan akuades. Fase minyak dan fase air dipanaskan dan diaduk pada suhu 70-75°C secara terpisah hingga homogen. Proses pencampuran kedua sediaan dilakukan pada suhu 70°C. Proses pengadukan dilakukan hingga kedua fase homogen dan mencapai suhu 40°C. kemudian natrium benzoat, *essence pear* dan ekstrak etanol kulit buah pir dimasukkan ke dalam campuran pada suhu 35°C kemudian dilakukan pengadukan selama kurang lebih satu menit (Hasibuan, dkk., 2014).

3.3.11. Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Losion

Sediaan losion ekstrak etanol kulit buah pir dilarutkan dalam metanol, kemudian larutan dibuat dalam berbagai konsentrasi yaitu 40, 50, 60, 70 dan 80 µg/mL. Masing-masing larutan sampel dimasukkan ke dalam vial, ditambahkan larutan DPPH dengan perbandingan 1:2, didiamkan selama 30

menit. Absorbansi DPPH diukur pada gelombang maksimumnya. Kemudian ditentukan % inhibisi dan dihitung nilai IC_{50} (Septriana, 2016).

3.3.12. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Sediaan Losion

A. Preparasi sampel uji dan standar beta arbutin

Sediaan losion ekstrak etanol kulit buah pir dan sediaan standar beta arbutin masing-masing ditimbang secara seksama sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO 2 mL, lalu ditambahkan dapar fosfat pH 6,8 hingga volume 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga didapatkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 2500, 1250 dan 625 $\mu\text{g/mL}$ sebagai variasi konsentrasi pada pengujian untuk mendapatkan nilai IC_{50} .

B. Uji aktivitas penghambatan tirosinase

Sediaan losion ekstrak etanol kulit buah pir dilarutkan di dalam DMSO (dimetil sulfoksida) kemudian ditambahkan buffer fosfat (pH 6,8) sampai volume 10 mL. Larutan sampel diuji pada tingkat konsentrasi 5000, 2500, 1250 dan 625 $\mu\text{g/mL}$. Sediaan losion yang mengandung beta arbutin sebagai kontrol positif diuji pada konsentrasi yang sama. Sebanyak 70 μL dari masing-masing sampel pengenceran ini ditambahkan dengan 30 μL enzim tirosinase (Sigma 250 unit/mL dalam buffer fosfat pH 6,8), setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 100 μL substrat L-tirosin dalam sumur *multi-well plate* yang sudah ditentukan, larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 477 nm, hal ini bertujuan untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambatan 50% (IC_{50}) (Batubara, *et al.*, 2010).

3.3.13. Evaluasi Sediaan Losion

Parameter yang diamati dalam evaluasi sediaan ini meliputi:

A. Uji organoleptis

Uji organoleptis dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan losion meliputi uji warna, bau dan konsistensinya.

- B. Uji homogenitas
Uji homogenitas dilakukan secara visual dengan melihat keseragaman warna dalam basis yang sudah bercampur dengan ekstrak.
- C. Pengujian pH losion
Sebanyak 1 gram sediaan losion dilarutkan dengan menggunakan akuades sampai 10 mL. Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan pH meter yang sebelumnya telah dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan buffer pH 7, pH 4, dan pH 10. Pengukuran dilakukan secara langsung dengan mencelupkan elektroda pH meter ke dalam sediaan uji, lalu ditunggu sampai angka yang muncul pada layar menjadi stabil (Setiawan, 2010). Pengamatan dilakukan pada hari ke 1, 7 dan selanjutnya tiap minggu selama 28 hari.
- D. Pengujian viskositas losion
Pengujian dilakukan dengan menggunakan *viscometer Brookfield*. Spindel no 2 dipasang pada viskometer, spindel yang telah terpasang diarahkan tegak lurus ke dalam *cup* kemudian dimasukkan sampel uji ke dalam *cup* yang telah disiapkan, hasil viskositas diamati hingga diperoleh angka yang konstan. Pengukuran dilakukan pada hari ke 1, 7 dan selanjutnya setiap minggu selama 28 hari penyimpanan. Nilai viskositas yang diharapkan adalah 2000-50000 Poise (Hasibuan, dkk., 2014).
- E. Pengujian kestabilan losion
sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam tabung sentrifugator lalu disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Setelah disentrifugasi, diamati apakah terjadi pemisahan atau tidak pada fase minyak dan fase air (Hasibuan, dkk., 2014).
- F. Pengujian daya sebar
Sediaan ditimbang sebanyak 1 g kemudian diletakkan pada pusat antara dua lempeng gelas kaca bulat berskala dengan diameter 15 cm. Beban seberat 5 g diletakkan di atas kaca dan didiamkan selama 1 menit. Diameter sebaran sediaan losion diamati. Penambahan beban terus dilakukan setelah 1 menit dengan kelipatan berat 5 g hingga

diperoleh diameter sebar yang konstan. Diameter permukaan yang dihasilkan dengan naiknya pembebanan menggambarkan karakteristik daya sebar. Garg, *et al.*, (2002) menyatakan daya sebar yang menunjukkan konsistensi semisolida dalam memberikan kenyamanan pada saat penggunaan adalah sebesar 4-7 cm.