

## **BAB III**

### **TATA KERJA**

#### **3.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortar dan stamper, pH meter (mettler toledo-Seven Compact), *microplate reader*, penangas air, corong pisah, neraca analitik (HenHerr BL-H2<sup>®</sup>), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV-1800), Kuvet kuarsa (Helma), *hot plate*, pembakar spiritus, dan alat-alat gelas yang biasa digunakan dalam Laboratorium.

#### **3.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat metil sinamat yang diperoleh dari Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Bandung, metanol p.a, asam askorbat, DPPH, DMSO (Dimetil Sulfoksida), dapar Fosfat (pH 6.5), Asam Kojat, enzim tirosinase, L-trosin, asam stearat, setil alkohol, stearil alkohol, TEA (Trietanolamin), metil paraben, propil paraben, dan akuades.

#### **3.3 Metode Pengujian**

##### 3.3.1 Uji Aktivitas Antioksidan isolat metil sinamat

###### A. Pembuatan larutan DPPH

Larutan DPPH 50 ppm dibuat dengan cara menimbang DPPH sebanyak 5 mg dilarutkan dengan 100 mL metanol p.a dalam labu terukur. Pengukuran absorbansi DPPH dilakukan dengan memipet 2 mL DPPH menggunakan spektrofotometri UV-VIS (Brand-William, *et al.*, 1995). Pengukuran daya antioksidan pada isolat methyl sinamat dan sediaan krim yang mengandung isolat methyl sinamat, asam kojat dan sediaan krim yang mengandung asam kojat. Sampel uji disiapkan dengan berbagai konsentrasi dengan pelarut metanol p.a kemudian ditambahkan larutan DPPH yang sudah dilarutkan. Campuran tersebut di inkubasi selama 30 menit di ruang gelap dan diukur dengan absorbansi panjang gelombang 516 nm (Blois, 1958).

Aktivitas antioksidan diukur sebagai persen penurunan absorbansi DPPH pada sampel uji dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}) \times 100\%}{\text{Abs kontrol}}$$

B. Penetapan IC<sub>50</sub> Perdaman DPPH

Sampel uji dibuat dengan 6 variasi, kemudian diambil 2 mL, dan dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH (1:1). Campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap dan diukur absorbansi dengan panjang gelombang 516 nm. Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung persentase aktivitas antioksidan dan membuat kurva baku kalibrasi dengan persentase inhibisi sebagai sumbu y dan konsentrasi sampel uji atau pembanding sebagai sumbu x, sehingga diperoleh regresi linear. Dihitung IC<sub>50</sub> dengan memasukkan nilai 50 kedalam persamaan linear. Pada penetapan ini menggunakan pembanding yaitu vitamin C (Blois, 1958).

3.3.2 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Isolat Metil Sinamat

Pengujian aktivitas penghambatan tirosinase ini mengacu pada metode yang telah dilakukan oleh Batubara, *et al*, (2010). Dalam pengujian kali ini ada 2 jenis sampel yang diuji diantaranya adalah isolat methyl sinamat, dan standar asam kojat. Pembuatan masing-masing larutan sampel uji dilarutkan menggunakan DMSO hingga didapat konsentrasi 500 ppm untuk sampel uji berupa isolat dan asam kojat. Tiap sampel ini merupakan stok yang nantinya akan diencerkan dalam buffer natrium fosfat (50 mM dan pH 6,8). Pengujian ini menggunakan asam kojat sebagai kontrol positif. Pengujian ini menggunakan plate dengan 96 sumuran. Pada lubang-lubang sumur tersebut dimasukkan isolat atau sampel sediaan dari berbagai konsentrasi, sebanyak 70 µL sampel lalu ditambahkan dengan 30 µL tirosinase, masing-masing konsentrasi dilakukan dengan tiga kali ulangan. Setelah itu, plate disimpan di dalam ruangan diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Ditambahkan substrat (2 mM L-tirosin) sebanyak 110 µL ke dalam tiap-tiap lubang selama 30 menit. Panjang optik dari tiap sumur kemudian ditentukan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 492 nm. Konsentrasi dari

masing-masing ekstrak atau sediaan yang dapat menghambat setengah dari aktivitas tirosinase (IC<sub>50</sub>) tersebut ditentukan dengan cara membandingkan absorbansi sampel tanpa penambahan enzim dengan sampel yang ditambahkan enzim pada panjang gelombang 492 nm.

Perhitungan nilai absorbansi pada reaksi yang terjadi dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Absorbansi monofenol} = B - A$$

Keterangan:

B : Absorbansi sampel dengan enzim

A : Absorbansi sampel tanpa enzim

Cara menghitung % penghambatan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi monofenolase} = \frac{x - y}{x} \times 100\%$$

Keterangan :

X : Absorbansi kontrol negatif

Y : Absorbansi monofenol

### 3.3.3 Formulasi Sediaan krim Isolat Metil Sinamat

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan krim isolat metil sinamat

Bahan	Konsentrasi (%)	Fungsi
Isolat Metil Sinamat	0,5	Zat Aktif
Asam Stearat	8	Emulgator
Setil alkohol	1	<i>Stiffening agent</i>
Propil paraben	0,05	Pengawet pada fase minyak
Stearil alkohol	1	<i>Emolient</i>
Metil paraben	0,1	Pengawet pada fase air
Gliserin	10	Humektan
TEA	1	Emulgator
Akuades	Ad 100	pelarut

### 3.3.4 Prosedur Pembuatan

Pembuatan sediaan krim dimulai dengan dibuat fase air dahulu yaitu gliserin, metil paraben, TEA dilarutkan dengan akuades yang sudah dipanaskan pada 70°C (fase 1). Bahan-bahan yang larut dalam minyak yaitu

asam stearat, setil alkohol, stearil alkohol, dan propil paraben dileburkan pada suhu 70<sup>0</sup>C (fase 2). Krim dibuat dengan mencampurkan fase minyak ke fase air sambil diaduk dengan stamper pada mortir panas, lalu diaduk kuat sampai homogen, setelah terbentuk krim dimasukkan isolat methyl sinamat dan diaduk kembali sampai homogen, dan dilakukan uji stabilitas fisik (Ulfa, 2016).

### 3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Krim Isolat Metil Sinamat

Sampel krim sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a, diperoleh larutan induk 100 ppm, kemudian dibuat pengenceran 400 ppm, 200 ppm, 100 ppm, dan 50 ppm. Larutan krim masing-masing diambil 2 mL dimasukkan kedalam vial dan ditambahkan 2 mL DPPH. Diinkubasi selama 30 menit kemudian diukur absorbansi DPPH pada panjang gelombang 516 nm. Selanjutnya dihitung persen inhibis dan IC<sub>50</sub> (Kiay, dkk., 2011).

### 3.3.6 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase sediaan krim Isolat Metil Sinamat

#### A. Preparasi Sampel Uji dan Standar Asam kojat

Sediaan krim Isolat metil sinamat dan sediaan standar asam kojat masing-masing ditimbang secara seksama sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO 2 mL, lalu ditambahkan dapar fosfat pH 6,8 selanjutnya dilakukan pengenceran hingga didapatkan larutan isolat dengan konsentrasi 2500, 1250, 625 µg/mL sebagai variasi konsentrasi pada pengujian untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub>.

#### B. Uji AKtivitas Penghambatan Tirosinase

Sediaan krim isolat metil sinamat dilarutkan dalam DMSO kemudian ditambahkan buffer fosfat pH 6,8 sampai volume 10 mL. Larutan sampel dibuat dengan konsentrasi 5000 ppm. Sediaan krim mengandung asam kojat sebagai kontrol positif. Sebanyak 70 µg/ml dari masing-masing sampel ditambahkan dengan 30 µg/ml enzim tirosinase (Sigma 250 unit/mL dalam buffer fosfat pH 6,8), setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Ditambahkan 100 µg/ml substrat L-tirosinas dalam sumur multi-well plate yang sudah ditentukan, larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu

kamar kemudian diukur pada panjang gelombang 492 nm, hal ini bertujuan untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambatan 50% (IC<sub>50</sub>) (Batubara, *et al.*, 2010).

### 3.3.7 Evaluasi Sediaan

Evaluasi sediaan krim dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dari sediaan yang dibuat. Evaluasi ini meliputi organoleptis, viskositas, pH, daya sebar, dan uji sentrifugasi.

#### A. Organoleptis

Uji organoleptik dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan dengan cara pengamatan terhadap bentuk, warna dan bau dari sediaan yang telah dibuat (Kumesan, 2013).

#### B. Penetapan pH

pH meter dikalibrasi menggunakan dapar pH 4 dan pH 7, dan dilakukan setiap saat akan melakukan pengukuran. Sediaan krim ditimbang sebanyak 0,5 gram lalu dilarutkan dalam 10 ml akuades. Elektroda yang telah dibersihkan dengan akuades dicelupkan kedalam larutan sampel krim dan dicatat nilai pH yang muncul pada layar. Pengukuran dilakukan pada hari 1, 3, 5, 7, dan selama 28 hari penyimpanan. (Mutia Eka, 2013).

#### C. Viskositas

Sediaan krim dituangkan kedalam wadah, lalu dipasang spindel 64 dan diturunkan kedalam wadah berisi sediaan hingga batas yang ditentukan. Pengukuran dilakukan dengan viskometer brookfield dengan kecepatan 1,5 dan 3 rpm, kemudian dicatat nilai yang ditunjukkan pada skala. Pengukuran dilakukan pada hari 1, 3, 5, 7 dan selama 28 hari penyimpanan (Mutia Eka, 2013).

#### D. Daya sebar

Sediaan krim ditimbang sebanyak 0,5 gram, diletakkan ditengah kaca objek, diatas krim diletakkan kaca objek lain dan ditambahkan beban 50, 100 dan 150 gram. Kemudian di diamkan selama 1 menit, lalu dicatat diameter penyebarannya. (Mutia Eka, 2013).

#### E. Uji Sentrifugasi

Sediaan krim dimasukkan ke dalam sentrifugasi kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit (Iswindri, 2013).