



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS, STABILITAS FISIK DAN KEAMANAN  
SEDIAAN GEL PENCERAH KULIT YANG MENGANDUNG  
EKSTRAK JAMUR TIRAM (*Pleurotus ostreatus*)**

**TESIS**

**RIANI HAPSARI NAWAWI**

**1006787262**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN  
DEPARTEMEN FARMASI  
PROGRAM STUDI MAGISTER HERBAL  
DEPOK  
JANUARI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS, STABILITAS FISIK DAN KEAMANAN  
SEDIAAN GEL PENCERAH KULIT YANG MENGANDUNG  
EKSTRAK JAMUR TIRAM (*Pleurotus ostreatus*)**

**TESIS**

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

**RIANI HAPSARI NAWAWI**

**1006787262**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN**

**DEPARTEMEN FARMASI**

**PROGRAM STUDI MAGISTER HERBAL**

**DEPOK**

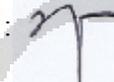
**JANUARI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Riani Hapsari Nawawi

NPM : 1006787262

Tanda tangan : 

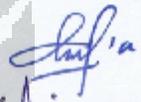
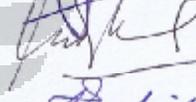
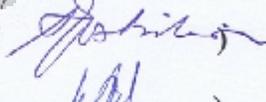
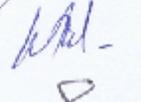
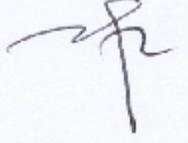
Tanggal : 12 Januari 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :  
Nama : Riani Hapsari Nawawi  
NPM : 1006787262  
Program Studi : Magister Herbal peminatan Estetika Herbal  
Judul Tesis : Uji Aktivitas, Stabilitas Fisik dan Keamanan Sediaan Gel Pencerah Kulit yang Mengandung Ekstrak Jamur Tiram (*Pleurotus ostreatus*)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Magister Herbal peminatan Estetika Herbal, Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I	: Dr. Berna Elya, M.Si., Apt	(  )
Pembimbing II	: Dra. Juheini Amin, MS., Apt	(  )
Penguji I	: Prof. Dr. Endang Hanani, Apt	(  )
Penguji II	: Pharm.Dr.Joshita Djajadisastra, MS., Ph.D	(  )
Penguji III	: Abdul Mun'im, MS., Ph.D	(  )
Penguji IV	: Dr. Mahdi Jufri, M.Si., Apt	(  )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 24 Januari 2012

## KATA PENGANTAR/ UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis ini. Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Departemen Farmasi Universitas Indonesia. Dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan tesis ini, penulis banyak sekali mendapat dukungan dan bantuan baik secara moril maupun materiil, sehingga pada kesempatan ini, dengan segala kerendahan hati, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dr. Berna Elya, M.Si selaku pembimbing I dan Dra. Juheini Amin, MS. selaku pembimbing II yang telah menyediakan waktu, pikiran dan tenaga untuk membimbing, memberi semangat dan mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.
2. Bapak Abdul Mun'im, MS.,Ph.D. selaku Ketua Program Studi Magister Herbal UI yang telah memberikan bimbingan, dukungan dan pengarahan selama penelitian.
3. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS. selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
4. Dr. Raymond R. Tjandrawinata, Ph.D. selaku Direktur dan Dr. James Sinambela dari PT Dexe Laboratories of Biomolecular Sciences (DLBS) atas kesempatan, yang diberikan, bimbingan, dan ide-ide yang bermanfaat selama penelitian.
5. Para *scientist* dari PT. DLBS, Friska, Nova, Upi, Nia, Laurens dan tim, Pak Asep, Bambang, Arfken dan tim, Olivia dan tim, Flo, Desi, Hayu, buat ilmu dan ide-ide yang bermanfaat, Bu Lingga dan tim selaku GA dan para analis yang telah membantu selama penelitian.
6. Kak Petty dan Mas Anton atas kesempatan dan bantuannya sehingga peneliti dapat memperoleh jamur tiram hasil budidaya sendiri.
7. Seluruh dosen/staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas bimbingan, ilmu, dan motivasi selama masa perkuliahan dan penelitian.

8. Karyawan dan petugas laboratorium Departemen Farmasi FMIPA UI atas bantuannya selama penelitian dan penyusunan tesis.
9. Papa, mama dan adik-adikku terkasih atas doa, dorongan semangat dan nasehat-nasehatnya selama perkuliahan dan penelitian.
10. Teman-teman Magister Herbal Angkatan 2010/2011 atas dukungan, semangat dan kebersamaan selama masa perkuliahan dan penelitian.
11. Seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberi bantuan, bimbingan, maupun pengarahan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Di akhir kata, tidak ada gading yang tak retak, penulis berharap semoga karya ilmiah ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu khususnya ilmu herbal dan juga dapat menjadi sumber inspirasi untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

Penulis

2012

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

---

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

Nama : Riani Hapsari Nawawi  
NPM : 1006787262  
Program Studi : Magister Herbal peminatan Estetika Herbal  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis Karya : Tesis

demikian 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 :

**Uji Aktivitas, Stabilitas Fisik dan Keamanan Sediaan Gel Pencerah Kulit yang Mengandung Ekstrak Jamur Tiram (*Pleurotus ostreatus*)**

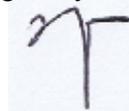
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal: 12 Januari 2012

Yang menyatakan,



Riani Hapsari Nawawi

## ABSTRAK

Nama : Riani Hapsari Nawawi  
Program Studi : Magister Herbal peminatan Estetika Herbal  
Judul : Uji Aktivitas, Stabilitas Fisik dan Keamanan Sediaan Gel Pencerah Kulit yang Mengandung Ekstrak Jamur Tiram (*Pleurotus ostreatus*)

Beberapa penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) berpotensi sebagai antioksidan dan anti tirosinase sehingga dapat menghambat pembentukan melanin. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh sediaan gel yang mengandung ekstrak jamur tiram yang mempunyai aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase, stabil dan aman. Metode yang digunakan adalah 1,1 difenil dipikrilhidrazil (DPPH) untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan dopakrom untuk mengetahui penghambatan terhadap enzim tirosinase. Parameter adanya aktivitas ditunjukkan oleh nilai  $IC_{50}$  dan persentase inhibisi. Uji stabilitas fisik terhadap sediaan gel selama 12 minggu dan uji keamanan kepada sukarelawan menggunakan metode *single application closed patch epicutaneous test under occlusion*. Hasil uji aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase menunjukkan ekstrak etanol 70% memiliki nilai  $IC_{50}$  yang lebih tinggi (79,0324  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,125 mg/mL) dibandingkan ekstrak air jamur tiram (94,4674  $\mu\text{g/mL}$ ; 2,350 mg/mL). Ekstrak etanol 70% jamur tiram dibuat sediaan gel dengan 3 macam konsentrasi yaitu 0,2; 0,4 dan 0,8% (b/b). Hasil uji aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase terhadap sediaan gel menunjukkan persentase inhibisi yaitu gel 0,2% (52,63; 22,73%), gel 0,4% (64,9; 29,74%) dan gel 0,8% (70,47; 38,22%). Hasil uji stabilitas fisik selama 12 minggu menunjukkan ketiga konsentrasi gel bersifat stabil dan uji keamanan terhadap gel 0,8% tidak menimbulkan iritasi sehingga aman diaplikasikan ke kulit.

Kata Kunci : ekstrak jamur tiram, aktivitas antioksidan, penghambatan tirosinase, gel.

xvi + 155 halaman : 56 tabel; 58 gambar; 14 lampiran

Acuan : 89 (1969 -2011)

## ABSTRACT

Name : Riani Hapsari Nawawi  
Study Program : Herbal Magister  
Title : Activity Assay, Physical Stability and Safety Tests of Skin Lightening Gel Containing Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Extract.

Previous studies reported that oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) was potential as antioxidant and tyrosinase inhibitory effect so be able to inhibit melanin formation. The aim of the study was to formulate into gel containing *Pleurotus ostreatus* extract which had the antioxidant and tyrosinase inhibitor activity, stable and safe. The methode used 1,1- diphenyl-dipicrylhydrazil (DPPH) to determine antioxidant activity and dopachrome to determine tyrosinase inhibitory effect. The parameters for identifying the activity were determined by IC<sub>50</sub> dan inhibitory percentage. Physical stability test was done for 12 weeks and safety test in human used single application closed patch epicutaneous test under occlusion method. The results showed that 70% ethanolic extract was higher in IC<sub>50</sub> (79,0324 µg/mL; 1,125 mg/mL) than water extract (94,4674 µg/mL; 2,350 mg/mL). The 70% ethanolic extract was formulated into gel for three kinds concentrations (0,2; 0,4 and 0,8% (w/w). The results for antioxidant and tyrosinase inhibitory activities were gel 0,2% (52,63; 22,73%), gel 0,4% (64,9; 29,74%) dan gel 0,8% (70,47; 38,22%). The physical activity test for 12 weeks showed that three concentrations of gel were stable and safety test for gel 0,8% no irritation was found. It's be concluded that the gel was safe for skin topical.

Keywords : oyster mushroom extract, antioxidant activity, tyrosinase inhibitory effect, gel.

xvi + 153 pages : 56 tables; 58 pictures; 14 appendixes

Bibliography : 89 (1969 -2011)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR/ UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
<b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Kosmetika.....	5
2.2 Radikal Bebas dan Antioksidan.....	5
2.3 Melanin dan Enzim Tirosinase.....	8
2.4 Jamur Tiram ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ).....	9
2.4.1 Deskripsi Umum.....	10
2.4.2 Klasifikasi dan Sinonim.....	11
2.4.4 Habitat.....	11
2.4.5 Budidaya Jamur Tiram.....	11
2.4.6 Kandungan Nutrisi dan Kandungan Kimia Jamur Tiram.....	12
2.4.7 Manfaat secara Medis.....	12
2.4.8 Beberapa Studi tentang Manfaat Ekstrak Jamur Tiram sebagai Antioksidan dan Tirosinase Inhibitor.....	13
2.5 Ekstraksi.....	13
2.6 Pengukuran Antioksidan dengan Metode Peredaman DPPH.....	15
2.7 Uji Penghambatan Tirosinase.....	16
2.8 Spektroskopi.....	20
2.9 Sediaan Gel.....	21
2.10 Stabilitas Fisik Gel.....	25
2.11 Uji Stabilitas.....	29
2.12 Uji Keamanan.....	30
<b>BAB III. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>32</b>
3.1 Lokasi Penelitian.....	32
3.2 Bahan dan Alat.....	32

3.2.1	Tanaman.....	32
3.2.2	Bahan Kimia.....	32
3.2.3	Alat.....	33
3.3	Cara Kerja.....	33
3.3.1	Penyiapan Simplisia Uji.....	33
3.3.2	Identitas dan Deskripsi Organoleptis Simplisia.....	33
3.3.3	Penapisan Fitokimia.....	34
3.3.3.1	Identifikasi Alkaloid.....	34
3.3.3.2	Identifikasi Saponin.....	34
3.3.2.3	Identifikasi Flavonoid.....	34
3.3.2.4	Identifikasi Senyawa Fenol.....	35
3.3.2.5	Identifikasi Tanin.....	35
3.3.4	Penetapan Parameter Simplisia sebagai Standardisasi.....	35
3.3.4.1	Susut Pengerinan.....	33
3.3.4.2	Kadar Abu.....	36
3.3.4.3	Kadar Sari Larut dalam Air.....	36
3.3.4.4	Kadar Sari Larut dalam Etanol.....	37
3.3.5	Pembuatan Ekstrak.....	37
3.3.6	Identifikasi Fitokimia Ekstrak.....	37
3.3.6.1	Identifikasi Alkaloid.....	37
3.3.6.2	Identifikasi Saponin.....	38
3.3.6.3	Identifikasi Flavonoid.....	38
3.3.6.4	Identifikasi Senyawa Fenol.....	38
3.3.6.5	Identifikasi Tanin.....	39
3.3.7	Deskripsi Organoleptik Ekstrak.....	39
3.3.8	Penetapan Parameter Ekstrak sebagai Standardisasi.....	39
3.3.8.1	Kelarutan dalam Air dan Etanol 96%.....	39
3.3.8.2	Kromatografi.....	40
3.3.8.3	Susut Pengerinan.....	40
3.3.8.4	Penetapan Kadar Fenol Total.....	41
3.3.9	Uji Antioksidan Ekstrak Jamur Tiram Metode DPPH.....	41
3.3.9.1	Penyiapan Bahan Kimia.....	41
3.3.9.2	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	43
3.3.9.3	Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak.....	43
3.3.9.4	Perhitungan Persen penghambatan (% inhibisi) dan IC <sub>50</sub> .....	43
3.3.10	Uji Penghambatan Tirosinase oleh Ekstrak Jamur Tiram.....	44
3.3.10.1	Penyiapan Bahan Kimia.....	44
3.3.10.2	Uji Pendahuluan.....	44
3.3.10.3	Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase oleh Asam kojat dan Asam askorbat.....	45
3.3.10.4	Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase oleh Sampel Ekstrak Jamur Tiram.....	46

3.3.10.5 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tiroinase menggunakan Microplate Reader dan Perhitungan Persentase Penghambatan.....	48
3.3.10.6 Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim Tirosinase.....	48
3.3.11 Pembuatan Sediaan.....	50
3.3.11.1 Formulasi Sediaan .....	50
3.3.11.2 Evaluasi Fisik Sediaan .....	51
3.3.11.3 Uji Stabilitas.....	52
3.3.11 Uji Aktivitas Antioksidan dari Sediaan Gel Ekstrak Jamur Tiram.....	52
3.3.12 Uji Penghambatan Tirosinas dari Sediaan Gel Ekstrak Jamur Tiram.....	53
3.3.13 Uji Keamanan terhadap Sukarelawan.....	54
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Penyiapan Simplisia.....	56
4.2 Ekstraksi.....	56
4.3 Identifikasi Fitokimia pada Simplisia dan Esktrak.....	58
4.4 Standardisasi Simplisia dan Ekstrak Jamur Tiram.....	60
4.5 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Menggunakan DPPH.....	61
4.5.1 Pembuatan Larutan Uji.....	61
4.5.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	62
4.5.3 Hasil Uji Antioksidan Menggunakan DPPH.....	62
4.6 Pengukuran Aktivitas Penghambatan Tirosinase.....	64
4.6.1 Uji Pendahuluan.....	64
4.6.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	66
4.6.3 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase.....	66
4.6.3 Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim Tirosinase.....	69
4.7 Formulasi.....	69
4.8 Uji Stabilitas Fisik.....	70
4.8.1 Pengamatan Organoleptis.....	71
4.8.2 Pengukuran pH.....	71
4.8.3 Pengukuran Viskositas dan Sifat Alir.....	71
4.8.4 Pengukuran Konsistensi.....	72
4.9 Uji Stabilitas Gel.....	72
4.9.1 Penyimpanan pada suhu $4\pm 2$ , $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ RH 65%, dan $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ RH 75%.....	72
4.9.2 <i>Cycling test</i> .....	73
4.10 Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Gel.....	73
4.11 Uji Aktivitas Penghambatan terhadap Enzim Tirosinase.....	74
4.12 Uji Keamanan kepada Sukarelawan.....	74
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	77
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	79

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Kategori nilai keadaan kulit.....	28
Tabel 2.2	Kategori respon dan iritasi.....	29
Tabel 3.1	Kelarutan zat dalam suatu pelarut.....	38
Tabel 3.2	Metode uji penghambatan enzim tirosinase.....	45
Tabel 3.3	Persentase bahan-bahan dalam formula gel (b/b%).....	48
Tabel 4.1	Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak jamur tiram dengan metode DPPH .....	61
Tabel 4.2	Hasil uji aktivitas antioksidan asam askorbat metode DPPH.....	62
Tabel 4.3	Hasil uji penghambatan enzim tirosinase ekstrak jamur tiram.....	65
Tabel 4.4	Hasil uji penghambatan enzim tirosinase asam kojat dan asam askorbat.....	66
Tabel 4.5	Hasil uji antioksidan sediaan gel ekstrak etanol 70% jamur tiram...	72
Tabel 4.6	Hasil uji aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase.....	72
Tabel 4.7	Hasil uji keamanan terhadap 12 orang sukarelawan.....	73
Tabel 4.8	Data identifikasi organoleptik simplisia jamur tiram.....	116
Tabel 4.9	Data identifikasi alkaloid simplisia jamur tiram.....	116
Tabel 4.10	Data identifikasi saponin simplisia jamur tiram.....	116
Tabel 4.11	Data identifikasi flavonoid simplisia jamur tiram.....	117
Tabel 4.12	Data identifikasi senyawa fenol simplisia jamur tiram.....	117
Tabel 4.13	Data identifikasi senyawa tanin simplisia jamur tiram.....	117
Tabel 4.14	Data susut pengeringan simplisia jamur tiram.....	117
Tabel 4.15	Data kadar abu simplisia jamur tiram.....	118
Tabel 4.16	Data kadar sari larut air dari simplisia jamur tiram.....	118
Tabel 4.17	Data kadar sari larut etanol dari simplisia jamur tiram.....	118
Tabel 4.18	Data identifikasi organoleptik ekstrak kering jamur tiram.....	119
Tabel 4.19	Data identifikasi alkaloid ekstrak jamur tiram.....	119
Tabel 4.20	Data identifikasi saponin ekstrak jamur tiram.....	120
Tabel 4.21	Data identifikasi flavonoid simplisia jamur tiram.....	120
Tabel 4.22	Data identifikasi senyawa fenol simplisia jamur tiram.....	120
Tabel 4.23	Data identifikasi senyawa tanin simplisia jamur tiram.....	121
Tabel 4.24	Data PH, berat jenis (BJ) dan total solid ekstrak kental jamur tiram 117.....	121
Tabel 4.25	Data rendemen ekstrak jamur tiram.....	121
Tabel 4.26	Data kelarutan dalam air dan etanol ekstrak kering jamur tiram...	122
Tabel 4.27	Data susut pengeringan ekstrak kering jamur tiram.....	122
Tabel 4.28	Penetapan kadar total fenol ekstrak air jamur tiram.....	123
Tabel 4.29	Penetapan kadar total fenol ekstrak etanol 70% jamur tiram.....	123
Tabel 4.30	Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak air jamur tiram.....	124
Tabel 4.31	Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% jamur tiram...	124
Tabel 4.32	Hasil optimasi konsentrasi enzim tirosinase.....	125
Tabel 4.33	Hasil optimasi konsentrasi substrat dengan konsentrasi enzim 310 U/mL.....	125

Tabel 4.34	Hasil uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase oleh asam kojat sebagai kontrol positif.....	126
Tabel 4.35	Hasil uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase oleh asam askorbat sebagai kontrol positif.....	127
Tabel 4.36	Hasil uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase oleh ekstrak air jamur tiram.....	128
Tabel 4.37	Hasil uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase oleh ekstrak etanol 70% jamur tiram .....	129
Tabel 4.38	Data kinetika penghambatan enzim tirosinase oleh ekstrak etanol 70% jamur tiram.....	130
Tabel 4.39	Hasil perhitungan konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) dan $V_{max}$ ...	130
Tabel 4.40	Hasil pengamatan sediaan gel pada minggu ke-0.....	131
Tabel 4.41	Hasil uji konsistensi pada minggu ke-0.....	131
Tabel 4.42	Hasil pengamatan cycling test.....	131
Tabel 4.43	Hasil uji viskositas sediaan gel yang mengandung ekstrak etanol 70% jamur tiram pada minggu ke-0.....	132
Tabel 4.44	Hasil pengamatan organoleptis sediaan gel pada suhu $4\pm 2^{\circ}C$ RH 65 selama 12 minggu.....	135
Tabel 4.45	Hasil pengamatan organoleptis sediaan gel pada suhu $28\pm 2^{\circ}C$ RH 65 selama 12 minggu.....	136
Tabel 4.46	Hasil pengamatan organoleptis sediaan gel pada suhu $40\pm 2^{\circ}C$ RH 75 selama 12 minggu.....	137
Tabel 4.47	Hasil pengamatan PH pada sediaan gel $4\pm 2^{\circ}C$ selama 12 minggu.....	138
Tabel 4.48	Hasil pengamatan PH pada sediaan gel $28\pm 2^{\circ}C$ selama 12 minggu.....	138
Tabel 4.49	Hasil pengamatan PH pada sediaan gel $40\pm 2^{\circ}C$ selama 12 minggu.....	138
Tabel 4.50	Data $R_f$ pada kromatografi lapis tipis ekstrak jamur tiram.....	139
Tabel 4.51	Hasil uji viskositas gel ekstrak etanol 70% jamur tiram pada minggu ke-12.....	140

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Pembentukan melanin.....	9
Gambar 2.2	Jamur tiram ( <i>Pleurotus ostrestus</i> ).....	10
Gambar 2.3	Reaksi kimia DPPH dan antioksidan.....	15
Gambar 2.4	Mekanisme aksi dari tirosinase inhibitor.....	16
Gambar 2.5	Grafik persamaan <i>Lineweaver-Burke</i> .....	17
Gambar 2.6	Grafik persamaan <i>Lineweaver-Burke</i> penghambat kompetitif.....	18
Gambar 2.7	Grafik persamaan <i>Lineweaver-Burke</i> penghambat non kompetitif...	18
Gambar 2.8	Grafik persamaan <i>Lineweaver-Burke</i> penghambat tipe campuran...	19
Gambar 2.9	Grafik persamaan <i>Lineweaver-Burke</i> penghambat unkompetitif...	19
Gambar 2.10	Rumus bangun karbomer.....	21
Gambar 2.11	Rumus bangun gliserin.....	22
Gambar 2.12	Rumus bangun propilen glikol.....	23
Gambar 2.13	Rumus bangun natrium metabisulfit.....	23
Gambar 2.14	Rumus bangun metilparaben.....	24
Gambar 2.15	Rumus bangun sodium EDTA.....	24
Gambar 2.16	Kurva aliran plastis.....	27
Gambar 2.17	Kurva aliran pseudoplastis.....	27
Gambar 2.18	Kurva aliran dilatan.....	28
Gambar 2.19	Kurva aliran tiksotropik.....	28
Gambar 4.1	Jamur tiram.....	87
Gambar 4.2	Media tumbuh jamur.....	87
Gambar 4.3	Jamur tiram yang sudah dikeringkan.....	88
Gambar 4.4	Jamur tiram yang dibuat serbuk.....	88
Gambar 4.5	Ekstrak kering air.....	89
Gambar 4.6	Ekstrak kering etanol 70%.....	89
Gambar 4.7	Alat –alat yang dipakai selama penelitian.....	90
Gambar 4.8	Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak jamur tiram.....	94
Gambar 4.9	Kurva kalibrasi standar asam galat.....	95
Gambar 4.10	Kurva panjang gelombang maksimum DPPH.....	95
Gambar 4.11	Kurva aktivitas antioksidan ekstrak air jamur.....	96
Gambar 4.12	Kurva aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% jamur tiram.....	96
Gambar 4.13	Kurva persentase inhibisi asam askorbat.....	97
Gambar 4.14	Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh asam kojat dalam konsentrasi $\mu\text{g/mL}$ .....	98
Gambar 4.15	Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh asam kojat dalam konsentrasi logaritma.....	98
Gambar 4.16	Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh asam askorbat dalam konsentrasi $\mu\text{g/mL}$ .....	99

Gambar 4.17	Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh asam askorbat dalam konsentrasi logaritma.....	99
Gambar 4.18	Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh ekstrak etanol 70% jamur tiram dalam konsentrasi $\mu\text{g/mL}$ .....	100
Gambar 4.19	Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh ekstrak etanol 70% jamur tiram dalam logaritma.....	100
Gambar 4.20	Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh ekstrak air jamur tiram dalam konsentrasi $\mu\text{g/mL}$ .....	101
Gambar 4.21	Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh ekstrak air jamur tiram dalam logaritma.....	101
Gambar 4.22	Kurva <i>Lineweaver- Burke</i> larutan ekstrak etanol 70% jamur tiram konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan blanko (B).....	102
Gambar 4.23	Bentuk sediaan gel.....	103
Gambar 4.24	Foto awal tiga macam sediaan gel dan blanko negatif.....	103
Gambar 4.25	Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-2.....	104
Gambar 4.26	Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-4.....	105
Gambar 4.27	Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-6.....	106
Gambar 4.28	Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-8.....	107
Gambar 4.29	Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-10.....	108
Gambar 4.30	Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-12.....	109
Gambar 4.31	Kurva viskositas gel 0,2% pada minggu ke-0 dan ke-12.....	110
Gambar 4.32	Kurva viskositas gel 0,4 % pada minggu ke-0 dan ke-12.....	110
Gambar 4.33	Kurva viskositas gel 0,8% pada minggu ke-0 dan ke-12.....	111
Gambar 4.34	Kurva perubahan pH pada penyimpanan suhu $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 12 minggu.....	112
Gambar 4.35	Kurva perubahan pH pada penyimpanan suhu $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 12 minggu.....	112
Gambar 4.36	Kurva perubahan pH pada penyimpanan suhu $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 12 minggu.....	113
Gambar 4.37	Foto hasil uji keamanan terhadap 12 orang sukarelawan.....	114

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Alur penelitian.....	143
Lampiran 2	Hasil identifikasi/ determinasi jamur tiram dari LIPI.....	144
Lampiran 3	Surat keterangan lolos kaji etik.....	145
Lampiran 4	Hasil uji mikrobiologi.....	146
Lampiran 5	<i>Certificate of Analysis</i> L-DOPA.....	147
Lampiran 6	<i>Certificate of Analysis</i> asam askorbat.....	148
Lampiran 7	<i>Certificate of Analysis</i> mushroom tyrosinase.....	149
Lampiran 8	<i>Certificate of Analysis</i> asam kojat.....	150
Lampiran 9	<i>Certificate of Analysis</i> Na EDTA.....	151
Lampiran 10	<i>Certificate of Analysis</i> metilparaben.....	152
Lampiran 11	<i>Certificate of Analysis</i> Na metabisulfit.....	153
Lampiran 12	<i>Certificate of Analysis</i> propilen glikol.....	154
Lampiran 13	<i>Certificate of Analysis</i> gliserin.....	155
Lampiran 14	<i>Certificate of Analysis</i> Ultrez-20.....	156

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kulit merupakan organ paling luar tubuh manusia yang berperan penting sebagai pertahanan utama terhadap bakteri, virus dan agen-agen toksik lainnya. serta paling banyak terekspos dengan radikal-bebas. *Reactive Oxygen Species* (ROS), nama lain dari radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron (Sen S. *et al.*, 2010). Reaksi ini akan berlangsung terus-menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menyebabkan penuaan kulit, inflamasi, kerusakan DNA, dan keganasan (Herrling T. *et al.*, 2007; Bickers D. & Athar, 2006, Poli G. *et al.*, 2004)

*Radical Oxygen Spesies* (ROS) menyebabkan peroksidasi lipid pada lapisan kulit bagian atas (*stratum korneum*) yang menyebabkan berkurangnya fungsi *barrier* juga dapat memacu terjadinya hiperpigmentasi dan melanogenesis namun *ROS scavenger* seperti antioksidan dapat menghambat proses tersebut (Bernatoniene J. *et al.*, 2011). Pembentukan melanin juga dapat dihambat dengan mekanisme seperti inhibisi terhadap enzim tirosinase secara langsung, inhibisi migrasi melanin dari melanosit ke keratinosit dan aktivitas hormonal (Nico S., Jana V., Stan P., 2009).

Penggunaan bahan-bahan yang bersifat sintetis pada produk kosmetika dinilai kurang aman karena dapat menimbulkan efek samping pada penggunaan jangka panjang. Agen depigmentasi seperti hidrokuinon, kortikosteroid dan asam kojat walaupun sampai saat ini efektivitasnya masih tinggi namun dalam pemakaian jangka panjang menimbulkan beberapa efek samping seperti okronosis, atrofi, karsinogenesis dan efek samping sistemik lainnya (Parvez S. *et al.*, 2006; Westerhof and Kooyers, 2005). Untuk itu diperlukan penelitian dan penemuan tentang

produk antioksidan dan pencerah kulit (*lightening agent*) yang lebih aman dan efektif yang berasal dari alam (Smit N., Vicanova J., Pavel S., 2009).

Konsep “*from food to cosmetic*” menarik perhatian produsen untuk memproduksi kosmetika yang berbahan dasar bahan alam karena selain dinilai lebih aman, kosmetika yang berbahan dasar dari makanan dan tanaman sudah terbukti mempunyai efektivitas yang baik untuk kesehatan maupun kecantikan (Vinayak B., Randive, 2007). Kosmetika berbahan dasar alam juga dinilai lebih ramah lingkungan (Qiushi C., 2009).

Jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) atau dikenal juga sebagai *oyster mushroom* mudah tumbuh di daerah tropis dan subtropis serta mudah dibudidayakan (Chirinang P and Intarapichet K., 2009). Jamur tiram mengandung vitamin B, vitamin C dan karbohidrat seperti  $\beta$ -glukan, monoterpenoid dan diterpenoid (Iwalokun, *et al.*, 2007). Bagian tubuh jamur merupakan sumber potensial lignin dan fenol (Fountoulakis *et al.*, 2002). Ada beberapa warna pada jenis jamur tiram ini antara lain putih, kuning, merah jambu, coklat dan abu-abu (Jeong HK. *et al.*, 2009), namun yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia umumnya adalah jamur tiram putih karena rasanya yang enak, kandungan nutrisinya yang tinggi dan berkhasiat untuk pengobatan penyakit. (Tjokrokusumo D., 2008).

Beberapa penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa jamur tiram berpotensi sebagai antioksidan dan anti tirosinase (Alam N. *et al.*, 2010; Venkatakrisnan *et al.*, 2010; Jeong HK. *et al.*, 2009; Iwalokun *et al.*, 2007), namun penelitian masih terbatas pada uji terhadap ekstrak kasar jamur tiram yang menggunakan metanol, aseton dan air hangat. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk meneliti jamur tiram dalam bentuk ekstrak etanol 70% dan air pada suhu 70<sup>0</sup>C, kemudian ekstrak yang mempunyai aktivitas antioksidan dan anti tirosinase yang lebih baik diformulasikan ke dalam sediaan gel. Pada masa yang akan datang diharapkan sediaan gel ini dapat digunakan sebagai salah satu produk kosmetika alami dengan manfaat antioksidan dan pencerah kulit (*lightening agent*).

## 1.2 Perumusan Masalah

Dari penelusuran kepustakaan belum ada penelitian mengenai uji aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase dari ekstrak etanol 70% dan ekstrak air hangat suhu 70<sup>0</sup>C dari jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*). Penelitian dilakukan untuk mengetahui ekstrak mana yang mempunyai aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase yang lebih tinggi, untuk kemudian dibuat formulasi sediaan gel.

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh sediaan gel yang mengandung ekstrak etanol 70% atau air pada suhu 70<sup>0</sup>C dari jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) yang mempunyai aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase, bersifat stabil dan aman.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Memperoleh ekstrak jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) yang mempunyai aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase yang lebih tinggi dengan membandingkan antara ekstrak jamur dalam etanol 70% dan ekstrak air pada suhu 70<sup>0</sup>C.
- b. Memperoleh formulasi sediaan gel dengan bahan aktif ekstrak etanol 70% atau air pada suhu 70<sup>0</sup>C dari jamur tiram yang mempunyai aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase.
- c. Memperoleh data uji aktivitas serta uji stabilitas dari formulasi sediaan gel.
- d. Memperoleh data uji keamanan formulasi sediaan gel kepada sukarelawan.

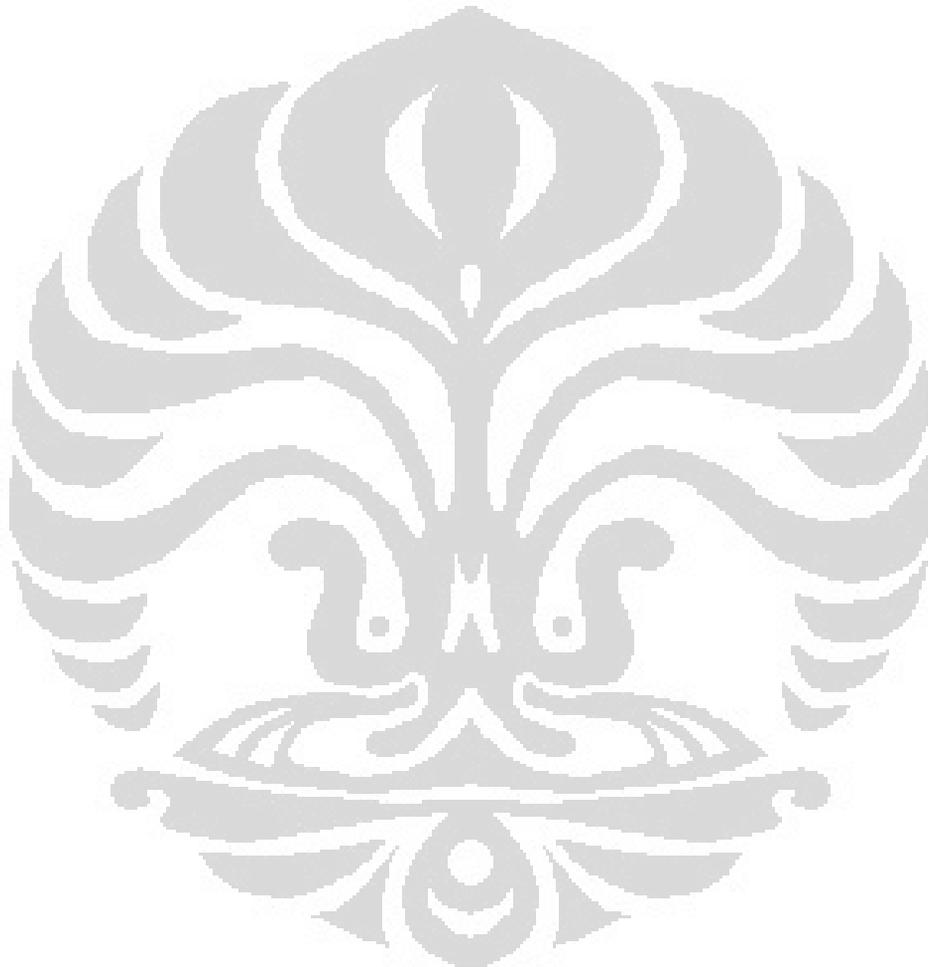
## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Aplikatif

Sediaan gel dapat dikembangkan menjadi produk topikal yang mempunyai manfaat sebagai antioksidan dan pencerah kulit (*lightening agent*) yang efektif dan aman.

#### 1.4.2 Manfaat Keilmuan

- a. Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan masukan untuk melakukan penelitian lanjutan seperti uji manfaat sebagai pencerah kulit.
- b. Memperkaya penelitian tentang tanaman hasil budidaya yang bermanfaat sebagai antioksidan dan pencerah kulit (*lightening agent*).



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kosmetika

Sediaan kosmetika perawatan kulit diperlukan untuk melindungi kulit agar tetap baik karena kulit sangat sensitif terhadap peradangan, kanker dan penuaan dini yang disebabkan oleh sinar ultraviolet yang memiliki efek oksidatif radikal bebas (Rieger MM., 2000). Kosmetika berasal dari bahasa Yunani “*kosmetikos*” yang berarti keterampilan menghias atau mengatur. Definisi kosmetika dalam Peraturan Menteri Kesehatan RI 445/Menkes/Permenkes/1998 adalah sebagai berikut “Kosmetika adalah sediaan atau paduan bahan yang siap untuk digunakan pada bagian luar badan (epidermis, rambut, kuku, bibir dan organ kelamin bagian luar), gigi, dan rongga mulut untuk membersihkan, menambah daya tarik, mengubah penampilan, melindungi supaya tetap dalam keadaan baik, memperbaiki bau badan tetapi tidak dimaksudkan untuk mengobati atau menyembuhkan suatu penyakit”

Sejak zaman dahulu ilmu kedokteran turut berperan dalam dunia kosmetik dan kosmetikologi. Dari data hasil penyelidikan antropologi, arkeologi, dan etnologi di Mesir maupun India membuktikan bahwa pemakaian ramuan seperti bahan pengawet mayat dan salep-salep aromatik dapat dianggap sebagai bentuk awal penggunaan kosmetika yang dikenal. Saat ini tujuan utama penggunaan kosmetik pada masyarakat modern antara lain untuk kebersihan pribadi, meningkatkan daya tarik melalui *make up*, meningkatkan rasa percaya diri dan perasaan tenang, melindungi kulit dan rambut dari kerusakan sinar UV, polusi, dan faktor lingkungan yang lain, mencegah penuaan, dan secara umum membantu seseorang lebih menikmati dan menghargai hidup (Mitsui, 1997).

#### 2.2 Radikal Bebas dan Antioksidan

Radikal bebas atau disebut juga *Reactive Oxygen Species* (ROS) adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih

elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron (Sen S. *et al.*, 2010). Senyawa radikal bebas meliputi hidroksil (OH), anion superoksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), alkoksil (RO), peroksil (ROO), nitrit oksida (NO), nitrogen dioksida ( $NO_2$ ) dan lipid peroksil (LOO) (Pham Huy *et al.*, 2008).

Pada konsentrasi tinggi, ROS menyebabkan kerusakan struktur sel, asam-asam nukleat, lipid dan protein. ROS menyebabkan peroksidasi lipid dan kerusakan ribonukleotida yang diperlukan untuk sintesis DNA. Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) bersifat lebih reaktif dan dapat melewati membran sehingga menyebabkan kerusakan jaringan. Radikal bebas meningkatkan biosintesis melanin, merusak DNA, dan memacu proliferasi melanosit juga berperan pada patogenesis gangguan kulit (Nithya N. *et al.*, 2011).

Mekanisme pembentukan radikal bebas terbagi menjadi 3 (tiga) tahapan yaitu :

Tahap 1 : Tahap Inisiasi

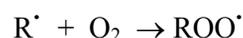
Faktor inisiasi yaitu sinar ultraviolet dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas dari suatu molekul stabil.

Tahap 2 : Tahap Propagasi

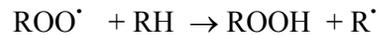
a. Radikal bebas yang terbentuk pada tahap inisiasi akan bereaksi dengan komponen dari sel kemudian mengikat hidrogen.



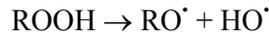
b. Radikal akil ( $R^\cdot$ ) yang terbentuk akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksida.



c. Radikal peroksida menarik hidrogen dari molekul terdekat membentuk hidroperoksida yang metastabil dan radikal akil yang baru.



e. Hidroperoksida dapat terdekomposisi secara membentuk radikal

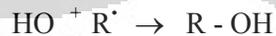


Selanjutnya kedua radikal bebas tersebut dapat berinteraksi dengan molekul organik yang baru untuk membentuk radikal akil baru.



Tahap 3 : Tahap Terminasi

Pada tahap ini terjadi antara 2 (dua) radikal bebas



Radikal bebas dan reaksi oksidasi dapat dihambat oleh suatu zat yang disebut antioksidan, yaitu senyawa yang mampu menunda, memperlambat atau menghambat reaksi oksidasi (Bagchi K., Puri S., 1998). Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan cara memberikan elektron kepada radikal bebas sebelum radikal bebas tersebut bereaksi dengan sel yang belum rusak sehingga membentuk radikal bebas yang tidak reaktif yang relatif stabil (Jacob RA., 1995). Antioksidan mencegah kerusakan sel dan jaringan karena kemampuannya menangkap radikal bebas sehingga disebut sebagai *free radical scavenger* (Masaki H. 2010; Debbie and Jennifer, 2010).

Di dalam tubuh manusia terdapat antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), glutathion, dan katalase. Antioksidan dapat juga kita peroleh dari asupan makanan yang mengandung vitamin A, C, beta karoten, vitamin E dan senyawa fenolik (Sies *et al.*, 1992). Bila proses radikal bebas terus berlangsung di dalam tubuh, persediaan tersebut tidaklah cukup sehingga diperlukan antioksidan dari asupan luar baik secara oral maupun topikal (Masaki H., 2010; Morganti *et al.*,

2002). Antioksidan topikal dapat melindungi kulit dari *stress* oksidatif, kerusakan kulit (Morganti *et al.*, 2002; Pinnell, 2003), membantu memperbaiki kondisi kulit dan sebagai *anti aging* (Darvin *et al.*, 2006 dan Vaillant *et al.*, 2000).

### 2.3 Melanin dan Enzim Tirosinase

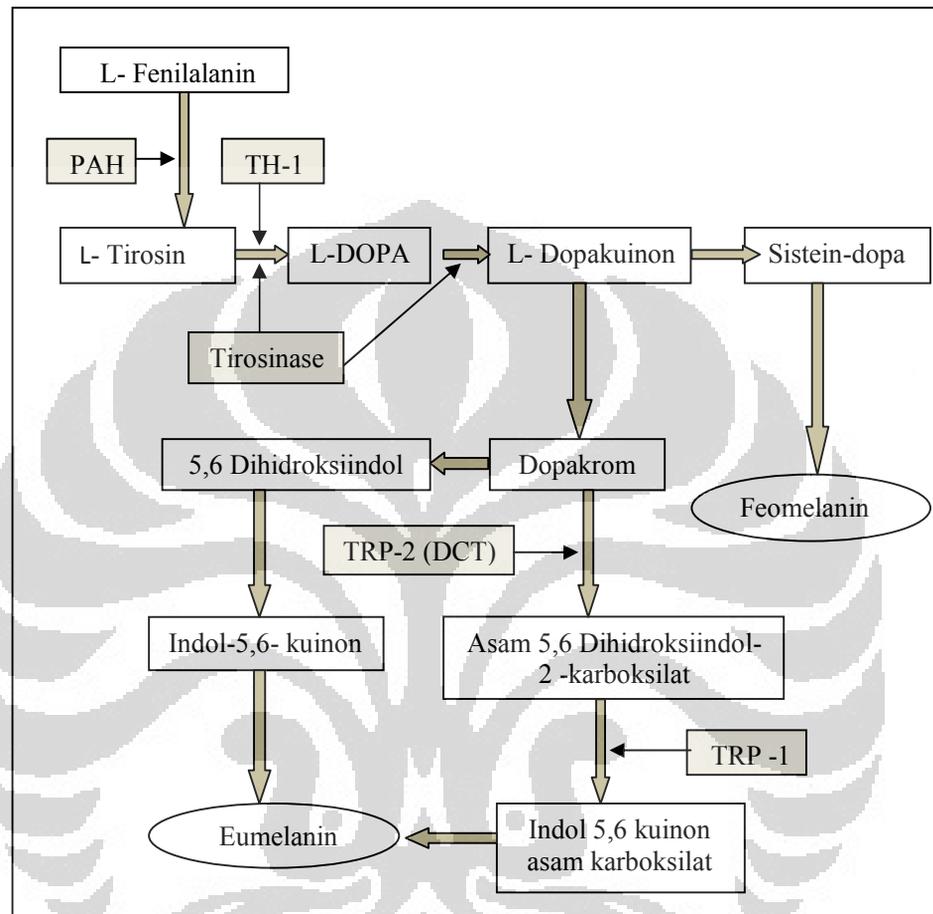
Warna kulit normal ditentukan oleh jumlah dan sebaran melanin yang dihasilkan oleh melanosom pada melanosit, yang secara genetik jumlahnya telah tertentu. Warna kulit juga dipengaruhi oleh ketebalan kulit, vaskularisasi kulit, kemampuan refleksi permukaan kulit serta kemampuan absorpsi epidermis dan dermis, selain itu juga ada beberapa pigmen lain seperti karoten (oranye), oksihemoglobin (merah), hemoglobin (biru) dan melanin (coklat) yang mempengaruhi warna kulit (Tranggono & Latifah, 2007).

Paparan sinar UV pada kulit dapat memacu sekresi melanin akibat proliferasi melanosit yang meningkat. Sekresi melanin yang abnormal juga menimbulkan hiperpigmentasi dari kulit. Melanin merupakan pigmen yang dapat melindungi jaringan kulit dari paparan sinar UV. Melanin terbentuk melalui jalur yang disebut melanogenesis di mana enzim tirosinase berperan penting (Herrling T. *et al.*, 2007).

Tirosinase adalah enzim *multicopper monooxygenase* yang terdapat pada tanaman, jamur, serangga dan mamalia termasuk manusia. Pada tanaman dan jamur, enzim ini dapat memberikan warna pada produk pertanian. Pada mamalia termasuk manusia, enzim tirosinase berperan pada proses melanogenesis atau hiperpigmentasi (Chang T., 2009).

Enzim tirosinase mengubah tirosin menjadi DOPA, kemudian menjadi dopakuinon. Dopakuinon diubah menjadi dopakrom melalui autooksidasi sehingga menjadi dihidroksiindol (DHI) atau asam dihidroksiindol-2-karboksilat (DHICA) untuk membentuk eumelanin (pigmen berwarna coklat). Dengan adanya sistein atau glutation, dopakuinon diubah menjadi sisteinil-dopa atau glutationil-dopa, reaksi ini membentuk feomelanin (pigmen berwarna kuning) (Chang T., 2009). Banyaknya jumlah eumelanin dan feomelanin yang terbentuk dapat memberikan warna lain

pada kulit sehingga kulit manusia tidak hanya berwarna hitam atau putih (Gambar 2.1).



[Sumber : Lin JW., *et al.* 2008. Natural Products with Skin-Whitening Effects]

**Gambar 2.1.** Pembentukan melanin

#### 2.4 Jamur Tiram (*Pleurotus ostreatus*)

Jamur merupakan organisme multiseluler atau bersel banyak yang memiliki perbedaan dengan organisme lain dalam hal struktur tubuh, habitat, cara makan dan reproduksi.

### 2.4.1 Deskripsi Umum

Jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) adalah jamur pangan dari kelompok Basidiomycota dan termasuk kelas Holobasidiomycetes dengan ciri-ciri umum diameter tudung 5-20 cm, mula-mula bentuk tudung bulat lengkung, berkembang cembung melebar, menjadi datar bahkan menjadi agak melengkung ke atas (kalau sudah tua), tubuh berwarna putih hingga krem dan tepi tudungnya halus hingga berombak mirip cangkang tiram (Tjokrokusumo, 2008) (Gambar 2.1).

Warna bervariasi tergantung strain, penyinaran dan kondisi suhu, tidak hanya berwarna putih (*Pleurotus ostreatus*), beberapa mengandung pigmen sehingga berwarna merah (*Pleurotus flabelatus*), coklat (*Pleurotus cystidiosus*), kuning (*Pleurotus cornucopiae*) biru keabua-abuan (*Pleurotus populinus*), abu-abu (*Pleurotus sajor-caju*) dan pink (*Pleurotus salmoneostramineus*) (Jeong KH. et al., 2009). Batangnya unik yaitu menempel pada tudung, dagingnya biasanya tipis. Beberapa strain membentuk kluster (berkelompok), sporanya berwarna putih dengan bentuk ellipsoid.



**Gambar 2. 2.** Jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*)

### 2.4.2 Klasifikasi dan Sinonim

Klasifikasi jamur tiram adalah sebagai berikut : (Gembong, 1986)

Kerajaan : Plantae  
 Divisi : Basidiomycota  
 Kelas : Holobasidiomycetes  
 Bangsa : Agaricales  
 Suku : Pleurotaceae  
 Marga : *Pleurotus*  
 Jenis : *Pleurotus ostreatus*

Jamur tiram atau dalam bahasa Inggris *oyster mushroom* dikenal juga dengan nama jamur kayu (*tree oyster*), *oyster shelf*. Orang Jepang menyebutnya *hiratake* atau *tamogitake* dan *shimeji*.

### 2.4.3 Habitat

Secara alami, jamur tiram ditemukan di bawah pohon berdaun lebar atau di bawah tanaman berkayu. Pada masa pertumbuhan miselium, jamur tiram sebaiknya ditempatkan dalam ruangan yang gelap namun pada masa pertumbuhan badan buah diperlukan adanya rangsangan sinar. Intensitas penyinaran yang dibutuhkan pada masa terbentuknya badan buah adalah 60-70% (Tjokrokusumo, 2008).

### 2.4.4 Budidaya Jamur Tiram

Pada budidaya jamur tiram suhu udara memegang peranan yang penting untuk mendapatkan pertumbuhan badan buah yang optimal. Pada umumnya suhu yang optimal untuk pertumbuhan jamur tiram, dibedakan dalam 2 (dua) fase yaitu fase inkubasi yang memerlukan suhu udara berkisar antara 22-28°C dengan kelembaban 60-70% dan fase pembentukan tubuh buah memerlukan suhu udara antara 16-22°C. Tingkat keasaman media juga sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan jamur tiram. Apabila pH terlalu rendah atau terlalu tinggi maka pertumbuhan jamur akan terhambat bahkan mungkin akan tumbuh jamur lain yang

akan mengganggu pertumbuhan jamur tiram itu. Keasaman pH media perlu diatur antara pH 6-7 dengan menggunakan kalsium karbonat (Ibekwe V.I. *et al.*, 2008).

#### 2.4.5 Kandungan Nutrisi dan Kandungan Kimia Jamur Tiram

Dari segi nutrisi, jamur tiram mengandung vitamin B1 (tiamin) 0,1 IU, B2 (Riboflavin) 2,04 mg, B3 (niasin) 54,30 mg, B5 (*Pantothenic acid*) 12,30 mg, vitamin D 116 IU (Paul Stamets, 2005), asam-asam organik seperti asam askorbat (vitamin C), asam malat dan asam fumarat, karbohidrat seperti  $\beta$ -glukan, protein seperti hidrofobin serta *trace element* seperti selenium (Iwalokun *et al.*, 2007). Selain itu, jamur tiram diketahui mengandung  *$\gamma$ -amino butyric acid* (GABA) yang merupakan golongan asam amino berfungsi sebagai neurotransmitter serta mengandung 9 (sembilan) macam asam amino yaitu lisin, metionin, triptofan, treonin, valin, leusin, isoleusin, histidin, dan fenilalanin (Chirinang P and Intarapichet, 2009). Bagian tubuh jamur tiram juga dikenal kaya akan lignin dan senyawa fenol (Fountoulakis *et al.*, 2007). Kandungan serat jamur tiram yang kaya *chitin* cukup baik untuk memperbaiki kinerja metabolisme tubuh (Alam N. *et al.*, 2008). Di samping itu dengan kandungan lemak yang rendah, jamur tiram dapat membantu mengurangi kadar lemak dalam darah.

#### 2.4.6 Manfaat secara Medis

Jamur tiram mengandung sejumlah komponen aktif biologis yang bermanfaat antara lain sebagai immunomodulator, menghambat pertumbuhan tumor, anti inflamasi, antitrombosis, menurunkan gula darah, menurunkan konsentrasi lemak darah, mencegah tekanan darah tinggi dan aterosklerosis (Chirinang *et al.*, 2009; Iwalokun *et al.*, 2007). Pada studi *in vitro* dan *in vivo*, jamur tiram diketahui mempunyai aktivitas sebagai antimikrobal, antioksidan, anti tumor, anti hipertensi dan *anti aging* (Lindequist *et al.*, 2005). Studi melaporkan bahwa ekstrak dari *Pleurotus ostreatus* dapat mengurangi hepatotoksisitas pada tikus yang diinduksi CCl<sub>4</sub>, juga melindungi jantung dan otak terhadap radikal bebas (Jayakumar *et al.*, 2006).

#### **2.4.7 Beberapa Studi tentang Manfaat Ekstrak Jamur Tiram sebagai Antioksidan dan Tirosinase Inhibitor**

Jamur mengandung komponen polifenol yang merupakan antioksidan yang poten disebabkan kemampuannya menangkal radikal bebas dengan cara transfer elektron tunggal (Hirano *et al.*, 2001). Pada uji DPPH, efek penangkalan terhadap radikal bebas pada ekstrak jamur tiram dalam pelarut aseton, metanol dan air hangat meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi di mana ekstrak aseton menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih baik (33,62-91,52%) dibandingkan ekstrak metanol (49,33-85,13%) dan air hangat (36,35-82,81%) pada konsentrasi 0,125-2,0 mg/mL (Alam N. *et al.*, 2010). Penelitian oleh Iwalokun *et al.*, 2007 menunjukkan bahwa kandungan senyawa fenol dan aktivitas antioksidan pada ekstrak aseton lebih baik dibandingkan pada ekstrak petroleum eter.

Pada uji tirosinase inhibitor yang pernah dilaporkan adalah bahwa ekstrak metanol jamur tiram menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap tirosinase lebih baik (11,36-59,56%) dibandingkan ekstrak aseton (11,37-52,05%) dan air hangat (9,60-49,60%) pada konsentrasi 0,125-1,0 mg/mL. Asam galat yang terkandung pada jamur tiram diduga sebagai tirosinase inhibitor yang efektif (Alam N. *et al.*, 2010).

#### **2.5 Ekstraksi**

Ekstraksi adalah proses pemisahan komponen zat padat atau zat cair dengan menggunakan bantuan pelarut, salah satunya adalah ekstraksi padat-cair. Ekstraksi padat-cair didefinisikan sebagai proses pemisahan zat padat yang dapat larut melalui kontak dengan pelarut. Setelah terjadi kontak padatan dengan pelarut maka terjadi perbedaan konsentrasi zat terlarut ke dalam fase padatan yang mana fase pelarut menjadi gaya pendorong berlangsungnya perpindahan massa zat terlarut dari fase padatan ke fase pelarut (Enny K.A & Fadilah, 2007).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kualitas dan kuantitas ekstrak antara lain :  
(Enny K.A & Fadilah, 2007) :

- a. Simplisia : derajat kehalusan, kadar air, kandungan kimia dan homogenitas simplisia mempengaruhi hasil ekstraksi.
- b. Pelarut : jenis, jumlah, kadar dan kecepatan mengalir pelarut mempengaruhi zat yang tersari, jumlah padatan yang terekstraksi dan kecepatan ekstraksi. Jika rasio pelarut-bahan baku besar maka akan memperbesar pula jumlah zat yang terlarut, di mana laju ekstraksi akan semakin meningkat namun semakin banyak pelarut yang digunakan, proses ekstraksi akan semakin mahal
- c. Proses ekstraksi : suhu, tekanan, waktu dan metode ekstraksi berpengaruh pada proses ekstraksi. Peningkatan temperatur akan meningkatkan jumlah zat terlarut ke dalam pelarut. Temperatur pada proses ekstraksi memang terbatas hingga suhu titik didih pelarut yang digunakan.
- d. Peralatan : jenis, volume dan tekanan dari peralatan yang digunakan untuk ekstraksi mempengaruhi hasil ekstraksi. Pengadukan akan dapat mempercepat terjadinya reaksi antara pelarut dengan zat terlarut.

Beberapa pelarut yang sering digunakan adalah etanol, air, benzena, heksana dan eter. Pemilihan pelarut pada umumnya dipengaruhi oleh: (Amiarsi *et al*, 2006.)

- a. Selektivitas : pelarut hanya boleh melarutkan zat yang diinginkan
- b. Kelarutan : pelarut sedapat mungkin memiliki kemampuan melarutkan zat yang baik.
- c. Reaktivitas : pelarut tidak boleh menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen zat.
- d. Kriteria lain : sedapat mungkin murah, tersedia dalam jumlah besar, tidak toksik, tidak mudah terbakar, tidak eksplosif bila bercampur udara, tidak korosif, viskositas rendah dan stabil secara kimia dan fisik.

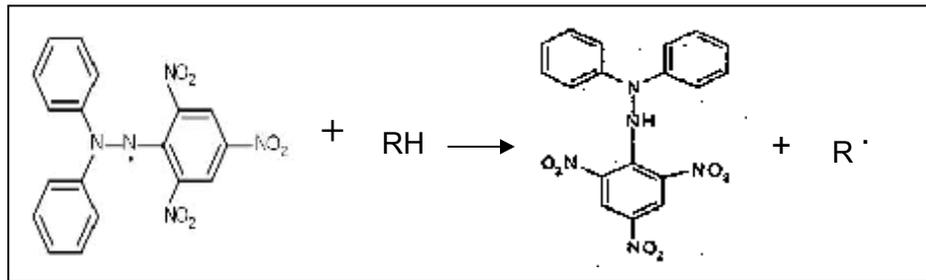
## 2.6 Pengukuran Antioksidan dengan Metode Peredaman DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Ada beberapa metode pengukuran antioksidan yang dapat digunakan, yang mana memberikan hasil yang berbeda tergantung dari radikal bebas spesifik yang digunakan sebagai reaktan. Metode *malondialdehyde* (MDA) atau *thiobarbituric acid-reactive-substances* (TBARS) sudah digunakan sejak 1950 untuk mengukur peroksidasi lemak pada membran dan sistem biologi. Metode ini sangat tergantung pada oksidasi substrat di mana dipengaruhi oleh suhu, tekanan, matriks dan tidak praktis digunakan pada sampel besar. (Prakash A, 2009).

Metode lain yang dapat digunakan antara lain *2,2 azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic-acid)* (ABTS) (Miller and Rice-Evans, 1997) dan *ferric reducing antioxidant power (FRAP)* (Guo *et al.*, 2003; Jimenez-Escrig *et al.*, 2001) yang digunakan untuk menskrining aktivitas antioksidan dari flavonoid dan fenol; *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC) (Prior *et al.*, 2003) untuk mengukur aktivitas antioksidan pada sayuran serta metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH).

Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH diperkenalkan pertama kali oleh Blois pada tahun 1958. DPPH merupakan radikal bebas atau zat pengoksidasi yang stabil yang mempunyai satu kelebihan elektron pada strukturnya. Penangkapan terhadap radikal bebas adalah dasar dari uji antioksidan menggunakan DPPH (Alma, Mavi, Yildirim, Digrak & Hirata, 2003; Sharma Om P., Bhat Tej K, 2009). Metode ini dapat digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan pada ekstrak tanaman dan makanan.

Prinsip kerja metode DPPH adalah berdasarkan adanya senyawa antioksidan (AH) yang mendonorkan hidrogen (H) pada DPPH sehingga mengubah radikal bebas DPPH yang berwarna ungu menjadi berwarna kuning pucat (Gambar 2.3). Kemudian dengan spektrofotometer UV-Vis diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum. DPPH yang tersisa diukur serapannya menurut jangka waktu tertentu. Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi dimana sampel uji menghambat DPPH sebesar 50%.



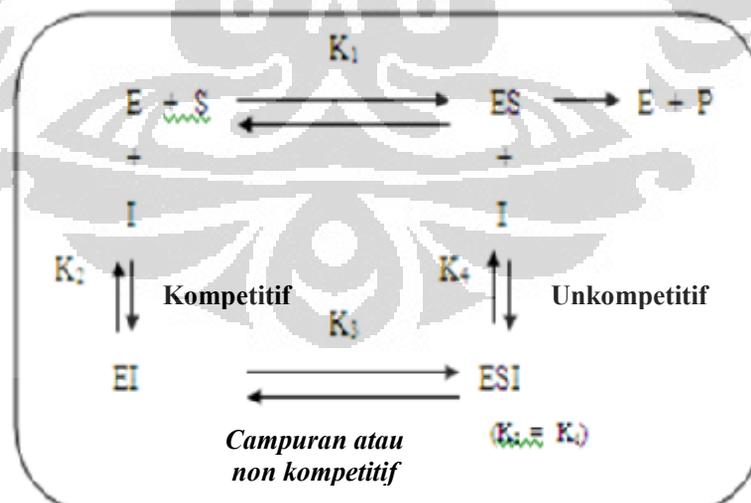
[Sumber : Miller *et al.*, 2000 Antioxidant activity]

**Gambar 2.3** Reaksi kimia DPPH dan antioksidan

Konsentrasi tinggi DPPH pada reaksi campuran yang menghasilkan absorbansi (serapan) tergantung dari keakuratan alat ukur spektrofotometer Selain itu cahaya, oksigen, dan pH dari reaksi campuran juga berpengaruh pada absorbansi DPPH (Sharma Om P., Bhat Tej K, 2009).

## 2.7 Uji Penghambatan Tirosinase

Tirosinase inhibitor dapat diklasifikasikan sebagai 4 (empat) tipe yaitu kompetitif, unkompetitif, non kompetitif, dan campuran (Gambar 2.3).

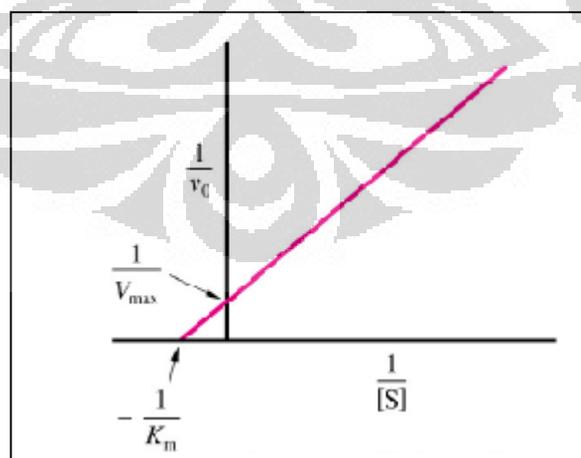


[Sumber : Chang T. 2009. An Update Review of Tyrosinase Inhibitors]

**Gambar 2. 4.** Mekanisme aksi dari tirosinase inhibitor ( E = Enzim, S = Substrat, I =Inhibitor, P = Produk)

Uji penghambatan tirosinase dapat dilakukan dengan metode dopakrom yang dimodifikasi yaitu berdasarkan pada adanya dopakrom yang merupakan hasil oksidasi L-DOPA oleh tirosinase (Narisa K., *et al*, 2007). Senyawa pemutih kulit akan berkompetisi dengan L-DOPA untuk berikatan dengan tirosinase. Kompetisi tersebut akan mengurangi jumlah produk dopakrom yang dihasilkan sehingga aktivitas penghambatan oleh senyawa pemutih dapat dihitung. Dopakrom yang terbentuk, berwarna merah jingga sampai coklat, diukur serapannya dengan cara kolorimetri dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Aktivitas penghambatan dari sampel uji dapat ditentukan dengan menghitung  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi dimana sampel uji menghambat aktivitas tirosinase sebesar 50%.

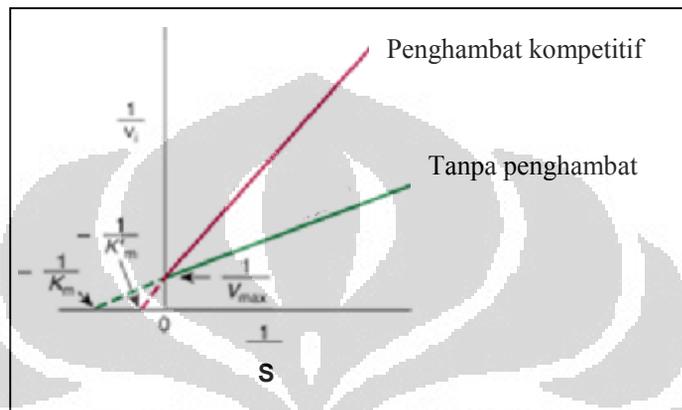
Mekanisme penghambatan kerja enzim tirosinase dapat diperkirakan melalui penentuan kinetika penghambatan enzim. Penentuan kinetika meliputi penentuan nilai konstanta *Michaelis-Menten* ( $K_m$ ) dan plot *Lineweaver-Burke*. Konstanta *Michaelis-Menten* ( $K_m$ ) adalah karakteristik dari suatu enzim dan substratnya. Nilai  $K_m$  berbanding lurus dengan konsentrasi substrat. Sedangkan plot *Lineweaver-Burke* adalah plot kurva substrat-penghambat dan substrat-tanpa penghambat dengan  $1/[S]$  sebagai sumbu x dan  $1/V_0$  sebagai sumbu y. S adalah konsentrasi substrat dan  $V_0$  adalah kecepatan awal (Champe, Harvey & Ferrier, 2005) (Gambar 2.5).



[Sumber : Champe, Harvey and Ferrier, 2005 ]

**Gambar 2.5** Grafik persamaan *Lineweaver-Burke*

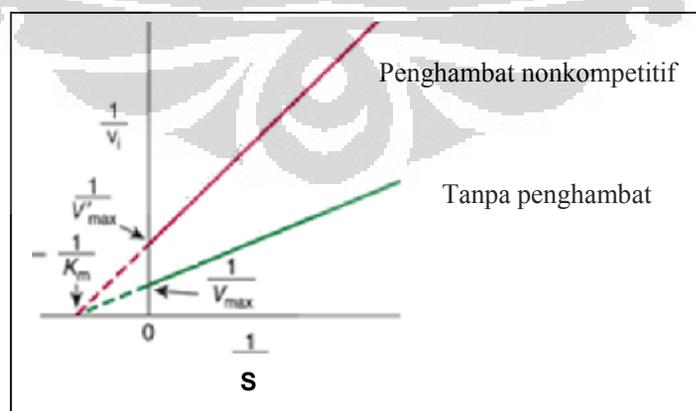
Adanya penghambat kompetitif akan menyebabkan peningkatan nilai substrat yang dibutuhkan untuk mencapai  $1/2 V_{\max}$  sehingga nilai  $K_m$  akan meningkat. Dengan penambahan substrat hingga mencapai konsentrasi tertentu, nilai  $V_{\max}$  yang sama pada kondisi sebelum adanya inhibitor dapat tercapai sehingga nilai  $V_{\max}$  akan tetap (Gambar 2.6).



[Sumber : Champe, Harvey and Ferrier, 2005 ]

**Gambar 2.6** Grafik persamaan *Lineweaver-Burke* untuk penghambat kompetitif

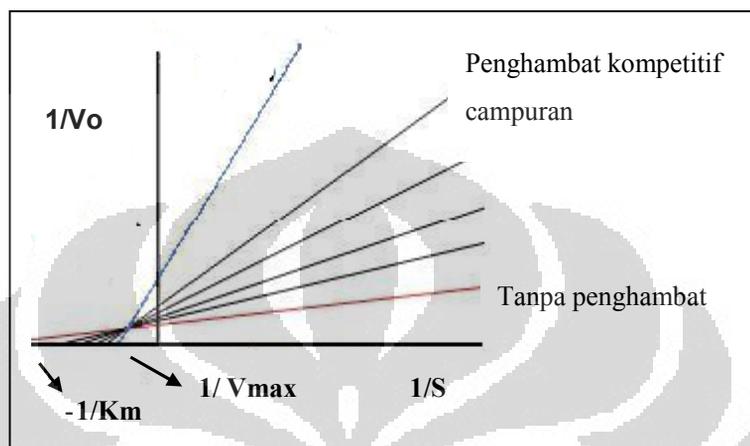
Adanya penghambat non kompetitif tidak dapat diatasi dengan penambahan substrat sebab penghambat non kompetitif tidak berpengaruh terhadap ikatan enzim dengan substrat sehingga nilai  $K_m$  yang sebanding dengan konsentrasi substrat akan tetap sedangkan  $V_{\max}$  akan turun (Gambar 2.7).



[Sumber : Champe, Harvey and Ferrier, 2005 ]

**Gambar 2.7** Grafik persamaan *Lineweaver-Burke* untuk penghambat nonkompetitif.

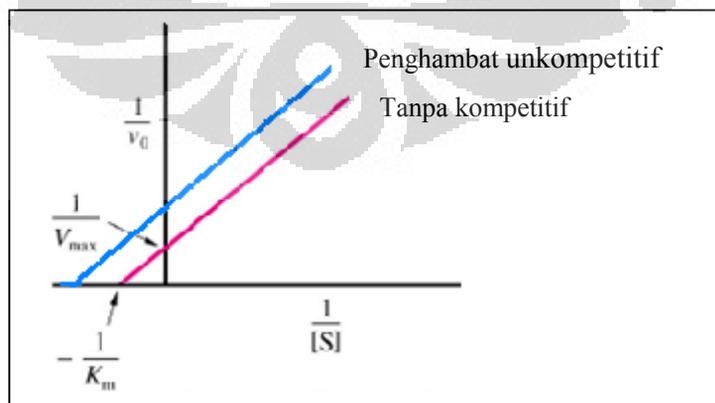
Adanya penghambat yang bersifat kompetitif campuran akan menyebabkan nilai  $K_m$  bertambah karena afinitas enzim terhadap substrat semakin berkurang akibat adanya perubahan bentuk pada sisi enzim, sedangkan nilai  $V_{max}$  akan turun karena ikatan enzim dengan substrat menjadi tidak optimal (Gambar 2.8).



[Sumber : Atkins, Peter and Julio de Paula., 2006 ]

**Gambar 2.8** Grafik persamaan *Lineweaver-Burke* untuk penghambat kompetitif tipe campuran

Adanya penghambat unkompetitif, nilai  $K_m$  berkurang disebabkan oleh besarnya afinitas enzim terhadap substrat, sedangkan berkurangnya nilai  $V_{max}$  disebabkan oleh adanya penghambat yang berikatan dengan kompleks enzim-substrat (Gambar 2.9).



[Sumber : Champe, Harvey and Ferrier, 2005 ]

**Gambar 2.9** Grafik persamaan *Lineweaver-Burke* untuk penghambat unkompetitif

## 2.8 Spektroskopi

Teknik spektroskopi pada daerah ultraviolet dan sinar tampak biasa disebut spektroskopi UV-Vis atau spektrofotometer UV-Vis. Dari spektrum absorpsi dapat diketahui panjang gelombang dengan absorbansi maksimum dari suatu unsur atau senyawa. Konsentrasi suatu unsur atau senyawa juga dengan mudah dapat dihitung dari kurva standar yang diukur pada panjang gelombang dengan absorbansi maksimum yang telah ditentukan.

Spektrofotometer digunakan untuk mengukur serapan sinar ultraviolet dan sinar tampak oleh suatu materi dalam bentuk larutannya. Jumlah cahaya yang diserap oleh suatu zat dalam larutan berbanding lurus dengan konsentrasi zat dalam larutannya. Hubungan antara serapan cahaya dengan konsentrasi zat dalam larutan dapat dinyatakan dengan persamaan *Lambert-Beer* berikut ini:

$$A = - \log T = \epsilon b c \quad (2.1)$$

Keterangan :

A = absorbansi

T = transmitansi

$\epsilon$  = absorptivitas molar (L/mol cm)

b = panjang sel (cm)

c = konsentrasi zat yang menyerap sinar (mol/L)

Dalam aplikasinya, terdapat beberapa persyaratan agar hukum *Lambert-Beer* dapat digunakan, yaitu:

- a. Syarat konsentrasi : konsentrasi larutan yang diukur harus encer
- b. Syarat kimia : zat pengabsorpsi (zat yang dianalisis) tidak boleh terdisosiasi, berasosiasi atau bereaksi dengan pelarut menghasilkan produk lain.
- c. Syarat cahaya : radiasi cahaya yang digunakan untuk pengukuran harus monokromatis (cahaya yang mempunyai satu macam panjang gelombang).
- d. Syarat kejernihan : kekeruhan larutan yang disebabkan oleh partikel-partikel koloid misalnya menyebabkan penyimpangan hukum *Lambert-Beer*.

## 2.9 Sediaan Gel

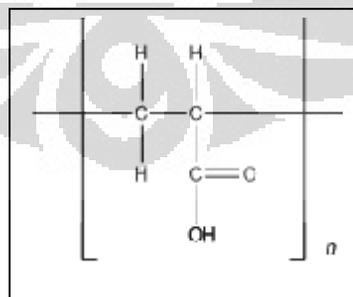
Menurut Farmakope Indonesia edisi IV, gel atau jelli merupakan sistem semi padat terdiri dari suspensi yang dibuat dari partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar terpenetrasi oleh suatu cairan (Depkes RI, 1995). Menurut Howard C. Ansel, gel didefinisikan sebagai suatu sistem semi padat yang terdiri dari suatu dispersi yang tersusun baik dari partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar dan saling diresapi cairan (Ansel, 1989).

Bentuk gel mempunyai beberapa keuntungan di antaranya tidak lengket, mudah dioleskan, mudah dicuci, tidak meninggalkan lapisan berminyak pada kulit, viskositas gel tidak mudah mengalami perubahan selama penyimpanan (Lieberman, 1989). Gel merupakan sediaan semisolid yang memiliki aliran tiksotropik dan pseudoplastik yang artinya berbentuk padat bila disimpan dan akan segera mencair bila dikocok (Depkes RI, 1995).

Faktor yang perlu diperhatikan dalam pembuatan sediaan gel yang baik adalah pemilihan dan pembuatan basis gel yang terdiri dari bahan pembentuk gel, humektan, pengawet dan air. Bahan pembentuk gel yang digunakan dapat berupa polimer karbohidrat alam seperti tragakan, pektin, alginat, selulosa dan derivatnya maupun polimer sintesis seperti karbomer (Aulton, 1988)

Bahan-bahan yang digunakan dalam formulasi gel ini adalah :

- a. Ultrez20 (*Acrylates CrossPolymer*)

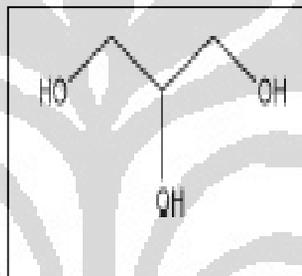


[Sumber : Rowe, Sheskey and Quinn, 2009]

**Gambar 2.10** Rumus bangun karbomer

Dalam penelitian ini, Ultrez 20 merupakan golongan karbomer digunakan sebagai *gelling agent*. Karbomer berbentuk serbuk berwarna putih, bersifat higroskopis, tidak berbau dan tidak berasa. Karbomer larut dalam air panas. Konsentrasi yang biasa digunakan sebagai *gelling agent* yaitu 0,5-2,0%. Karbomer dalam larutan 0,5% memiliki pH asam yaitu sebesar 2,7-3,5. Larutannya memiliki viskositas yang rendah dan bila telah dinetralkan dengan basa, seperti NaOH, akan memiliki viskositas yang tinggi. Viskositas akan berkurang apabila pH kurang dari 3 atau lebih besar dari 12 (Rowe, Sheskey and Quinn, 2009)

b. Gliserin

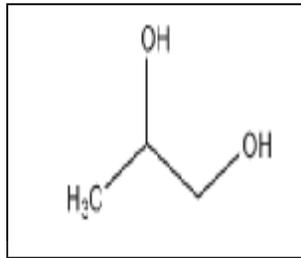


[Sumber : Rowe, Sheskey and Quinn, 2009]

**Gambar 2. 11** Rumus bangun gliserin

Penggunaan gliserin pada umumnya digunakan sebagai humektan, emolien juga sebagai bahan tambahan pada akuous maupun non akuous gel. Selain itu gliserin digunakan sebagai pelarut, plastisizer dan penambah viskositas. Karakteristik gliserin merupakan cairan jernih, tidak berwarna, tidak berbau, kental, rasa manis ( $\pm 0,6$  kali lebih manis dibandingkan sukrosa). Pada gel ini, gliserin digunakan sebagai *gel vehicle aqueous* dengan konsentrasi 5-15% dan juga sebagai humektan dengan konsentrasi  $\leq 30\%$  (Rowe, Sheskey and Quinn, 2009).

## c. Propilen glikol

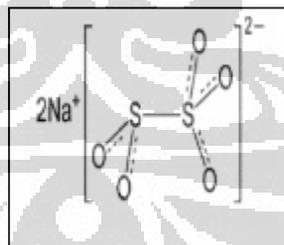


Sumber : Rowe, Sheskey and Quinn, 2009]

**Gambar 2. 12** Rumus bangun Propilen glikol

Bahan ini merupakan cairan jernih, tidak berwarna, manis, kental, dan praktis tidak berbau. Propilen glikol larut dalam aseton, kloroform, air, gliserin, eter dan etanol namun tidak larut dalam minyak mineral. Kegunaan propilen glikol adalah sebagai humektan, plastisizer, pelarut dan stabilizer. Konsentrasi propilen glikol yang umum digunakan sebagai humektan adalah  $\approx 15\%$  dan sebagai pelarut dalam sediaan topikal adalah 5-80% (Rowe, Sheskey and Quinn, 2009)

## d. Natrium metabisulfit

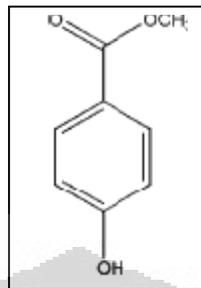


[Sumber : Rowe, Sheskey and Quinn, 2009]

**Gambar 2. 13** Rumus bangun natrium metabisulfit

Zat ini umumnya digunakan sebagai antioksidan pada sediaan oral, parenteral dan topikal. Konsentrasi yang digunakan 0,01-1,0%. Natrium metabisulfit larut dalam air dan sukar larut dalam propilen glikol (Rowe, Sheskey and Quinn, 2009)

## e. Nipagin (Metilparaben)

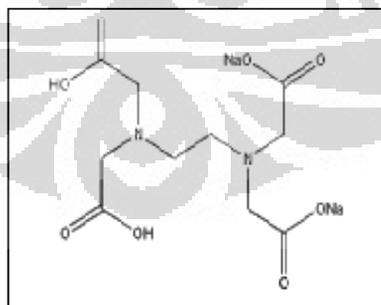


[Sumber : Rowe, Sheskey and Quinn, 2009]

**Gambar 2. 14** Rumus bangun metilparaben

Bahan ini biasanya digunakan sebagai bahan pengawet dalam produk makanan dan kosmetik. Metilparaben merupakan serbuk kristal putih atau tidak berwarna dan tidak berbau. Bahan ini dapat digunakan sendiri maupun dikombinasi dengan jenis paraben lain. Efektifitas pengawet ini memiliki rentang pH 4-8. Dalam sediaan topikal, konsentrasi nipagin yang umum digunakan adalah 0,02-0,3%. Bahan ini larut dalam air (1:5), etanol 95% (1:3), eter (1:10) dan metanol (Rowe, Sheskey and Quinn, 2009).

## f. Sodium EDTA



[Sumber : Rowe, Sheskey and Quinn, 2009]

**Gambar 2. 15** Rumus bangun sodium EDTA

Karakteristik sodium EDTA adalah seperti kristal putih, bubuk tidak berbau dengan sedikit berasa asam. Umumnya digunakan sebagai *chelating agent*. Bila digunakan sebagai campuran gel, terbukti gel lebih stabil, transparan dan tidak berwarna (Huang YB *et al.*,2002, Valenta *et al.*,1998). Konsentrasi yang digunakan adalah 0,005-0,1% (Rowe, Sheskey and Quinn, 2009).

f. Sodium hidroksida

Penggunaan sodium hidroksida dalam formulasi adalah untuk mengatur pH. Karakteristik sodium hidroksida merupakan massa berwarna putih, bentuk seperti pelet, keras dan seperti kristal (Rowe, Sheskey and Quinn, 2009).

g. Akuades

Akuades yang diperoleh dengan cara penyulingan, pertukaran ion, osmosis terbalik, atau dengan cara yang sesuai. Akuades digunakan dalam sediaan-sediaan yang membutuhkan air, terkecuali untuk parenteral di mana akuades tidak dapat digunakan karena harus disterilkan terlebih dahulu (Ansel, 1989).

## 2.10 Stabilitas Fisik Gel

Stabilitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu produk obat atau kosmetik untuk bertahan dalam batas spesifikasi yang diterapkan sepanjang periode penyimpanan dan penggunaan untuk menjamin identitas, kekuatan, kualitas, dan kemurnian produk. Definisi sediaan kosmetik yang stabil yaitu suatu sediaan yang masih berada dalam batas yang dapat diterima selama periode waktu penyimpanan dan penggunaan, dimana sifat dan karakteristiknya sama dengan yang dimilikinya saat dibuat (Ansel, 1989).

Kestabilan dari suatu gel ditandai dengan tidak terjadinya sineresis dan memberikan penampilan, bau, warna dan sifat-sifat fisik lainnya yang baik (Martin, Swarbick and Cammarata, 1983). Parameter-parameter yang digunakan dalam uji kestabilan fisik sediaan gel adalah (ASEAN, 2005) :

### 2.10.1 Organoleptis atau penampilan fisik

Pemeriksaan ini bertujuan untuk mengamati adanya perubahan bentuk gel, timbulnya bau atau tidak, dan perubahan warna, terjadinya sineresis atau tidak. Sineresis adalah suatu proses yang terjadi akibat adanya kontraksi di dalam massa gel sehingga cairan yang terjatoh akan keluar dan berada di atas permukaan gel.

### 2.10.2 Pemeriksaan homogenitas

Sediaan diletakkan di antara dua kaca objek lalu diperhatikan ada atau tidak ketidakhomogenan di bawah cahaya.

### 2.10.3 Pemeriksaan pH

Gel sebaiknya memiliki pH yang sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5-6,5 karena jika gel memiliki pH yang terlalu basa maka dapat menyebabkan kulit menjadi kering, sedangkan jika pH terlalu asam akan menimbulkan iritasi kulit. (Djajadisastra, 2004)

### 2.10.4 Sifat alir dan viskositas

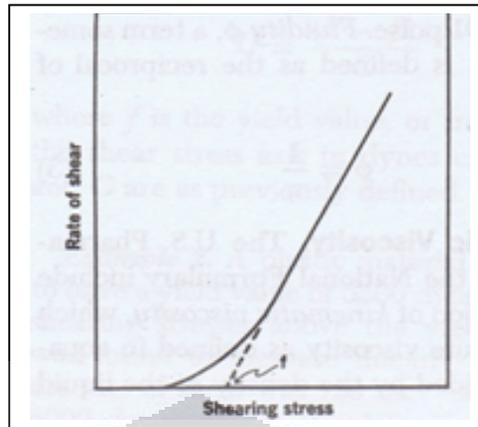
Viskositas merupakan ukuran tahanan suatu cairan untuk mengalir, sedangkan reologi adalah ilmu yang mempelajari sifat aliran zat cair. Secara umum kenaikan viskositas dapat meningkatkan kestabilan sediaan (berdasarkan Hukum *Stokes*). Umumnya sediaan gel memiliki sifat aliran sistem *non-Newton*. Sifat alir dari sistem *non-Newton* itu sendiri terbagi lagi menjadi dua yaitu (Martin, Swarbrick and Cammarata, 1983) :

#### 2.10.4.1 Cairan yang sifat alirnya tidak dipengaruhi oleh waktu

Kelompok ini terbagi lagi menjadi tiga kelompok, yaitu:

##### a. Aliran plastis

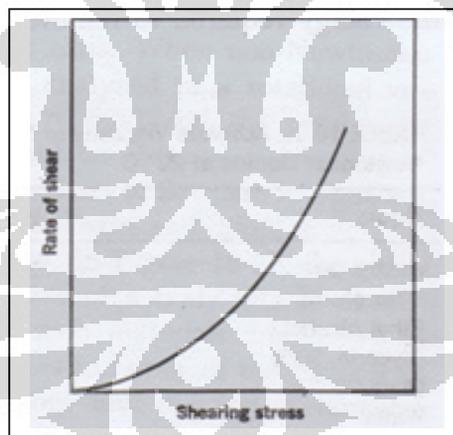
Cairan ini mempunyai sifat tidak akan mengalir sebelum gaya tertentu dilampauinya, yang disebut *yield value*. Kurva aliran plastis tidak melalui titik (0,0) tetapi memotong *shearing stress* pada suatu titik tertentu yaitu *yield value*. Adanya *yield value* disebabkan oleh adanya kontak antara partikel-partikel yang berdekatan yang harus dipecah sebelum aliran terjadi (Gambar 2.16).



**Gambar 2.16** Kurva aliran plastis

b. Aliran pseudoplastis

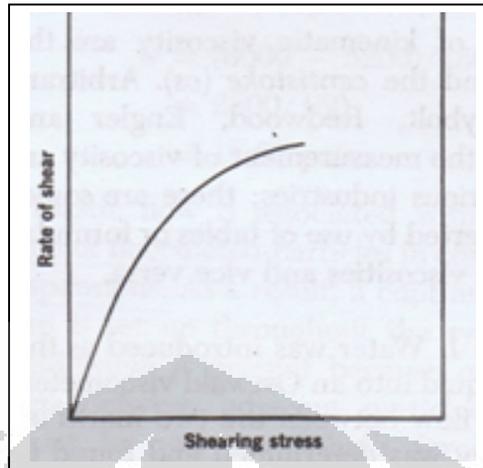
Sebagian besar produk farmasi seperti polimer menunjukkan aliran pseudoplastis. Kurva aliran ini melalui titik (0,0), hal ini berlawanan dengan aliran plastis sehingga aliran pseudoplastis tidak memiliki *yield value*. Viskositas berkurang dengan meningkatnya *rate of shear*, disebut juga *shear thinning system* (Gambar 2.17).



**Gambar 2.17** Kurva aliran pseudoplastis

c. Aliran dilatan

Peningkatan viskositas akan meningkat seiring meningkatnya *rate of shear* karena volume dari sediaan akan naik bila *rate of shear* ditingkatkan, disebut *shear thickening system*.



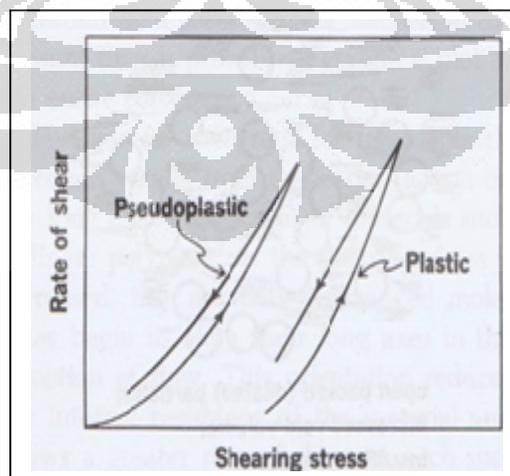
**Gambar 2.18** Kurva aliran dilatan

#### 2.10.4.2 Cairan yang sifat alirnya dipengaruhi waktu

Kelompok ini juga terbagi menjadi tiga kelompok, yaitu:

a. Tiksotropik

Aliran tiksotropik dijumpai pada zat yang mempunyai aliran plastis dan pseudoplastis, yang mana menunjukkan adanya pemecahan struktur yang tidak terbentuk dengan segera jika *stress* dihilangkan atau dikurangi. Kurva aliran ini bergantung pada *rate of shear* yang meningkat dan berkurang serta lamanya zat mengalami *rate of shear* (Gambar 2.19).



**Gambar 2.19** Kurva aliran tiksotropik

b. Reopeksi

Kurva aliran menurun disebelah kanan kurva menaik. Aliran ini merupakan kebalikan dari aliran tiksotropik.

c. Anti-tiksotropik

Aliran ini disebut juga aliran tiksotropik negatif, yaitu terjadi kenaikan konsistensi pada kurva menaiknya. Konsistensi meningkat seiring menaiknya waktu *shear*.

#### 2.10.5 Penentuan konsistensi

Sediaan yang akan diperiksa dimasukkan ke dalam wadah khusus dan diletakkan pada meja penetrometer. Peralatan diatur hingga ujung kerucut menyentuh bayang permukaan sediaan yang dapat diperjelas dengan menghidupkan lampu. Batang pendorong dilepas dengan mendorong tombol *start*. Angka penetrasi dibaca lima detik setelah kerucut menembus sediaan. Dari pengukuran konsistensi dengan penetrometer akan diperoleh *yield value*. Suatu sediaan dikatakan mudah menyebar jika memiliki nilai *yield value* berkisar antara 100-1000 dyne/cm<sup>2</sup> (Zatz & Kushla, 1989)

#### 2.11 Uji Stabilitas

Untuk memperoleh nilai kestabilan suatu sediaan farmasetika atau kosmetik dalam waktu yang singkat, dapat dilakukan uji stabilitas dipercepat. Tujuan pengujian ini adalah mendapatkan informasi yang diinginkan pada waktu sesingkat mungkin dengan cara menyimpan sampel pada kondisi yang dirancang sedemikian rupa untuk mempercepat terjadinya perubahan yang biasanya terjadi pada kondisi normal. Jika hasil pengujian suatu sediaan pada uji dipercepat selama 3 (tiga) bulan diperoleh hasil yang stabil, maka sediaan tersebut stabil pada penyimpanan suhu kamar selama setahun (Djajadisastra, 2004).

Uji stabilitas dipercepat pada sediaan gel antara lain :

- a. Peningkatan suhu dan kelembaban : bertujuan sebagai indikator kestabilan dan menguji kemasan produk. Berdasarkan ICH *guidelines*, uji penyimpanan dilakukan pada suhu 40<sup>0</sup>C / kelembaban kamar selama 3 hari; 1,2,3,4 minggu; 2,3,6 bulan.
- b. *Cycling test* : tes ini bertujuan untuk menguji apakah terjadi sineresis atau tidak. Sampel disimpan pada suhu rendah selama 24 jam lalu dipindahkan pada suhu tinggi selama 24 jam, dilakukan selama 6 (enam) siklus.

### 2.12 Uji Keamanan

Uji keamanan dilakukan dengan metode *single application closed patch epicutaneous test under occlusion or semi occlusion* berdasarkan *Colipa Guidelines*. Alasan digunakan metode ini karena sediaan gel yang diuji berupa ekstrak jamur tiram yang merupakan *raw material*. Parameter yang digunakan adalah indeks iritasi primer kulit berdasarkan *Primary Irritation Index (PII) for Human* (Tardiff R.,*et al*, 2003).

$$PII = \frac{\text{Jumlah semua nilai eritema, eschar dan edema pada jam ke-24 dan 48}}{\text{Jumlah sukarelawan} \times \text{jumlah waktu pengamatan}} \quad (2.2)$$

Iritasi kulit primer (*Primary skin irritant*) adalah substansi yang tidak bersifat korosif dan berdasarkan data uji manusia menunjukkan hasil iritasi primer dan atau berarti substansi yang menghasilkan skor 5 atau lebih pada uji hewan (Regulasi *Consumer Products Safety Commission/ CPSP*, 1996)

**Tabel 2.1** Kategori nilai keadaan kulit

<b>Reaksi kulit berupa eritema, eschar dan edema</b>	<b>Nilai</b>
<i>No evidence of reaction</i>	0
<i>Reaction readily visible but mild</i>	1
<i>Definite popular response</i>	2
<i>Definite edema</i>	3
<i>Definite edema and papules</i>	4
<i>Vesicular/ bulbous eruption</i>	5

[Sumber : Tardiff *et al.*, 2003)

**Tabel 2.2** Kategori respon dan iritasi

<b>Kategori</b>	<b>Indeks iritasi primer</b>
Tidak berarti	0 - 0,4
Iritasi ringan	0,5 - 1,9
Iritasi sedang	2,0 - 4,9
Iritasi berat	5,0 - 8,0

[Sumber : Regulasi *Consumer Products Safety Commission/ CPSP*, 1996]

Definisi kelainan kulit yang diamati sebagai berikut (Imu Penyakit Kulit Kelamin, FK UI, 2007) :

- a. Eritema : kemerahan pada kulit yang disebabkan pelebaran pembuluh darah kapiler yang reversibel.
- b. Papul : penonjolan di atas permukaan kulit sirkumskrip, berukuran diameter lebih kecil dari ½ cm dan berisikan zat padat.
- c. Vesikel : gelembung berisi cairan serum beratap, berukuran <1/2 cm garis tengah dan mempunyai dasar.

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Dexa Laboratories of Biomolecular Sciences (DLBS) Cikarang dan Laboratorium Farmasetika Departemen Farmasi FMIPA, Universitas Indonesia, Depok.

#### 3.2 Bahan dan Alat

##### 3.2.1 Tanaman

Pada penelitian ini yang diteliti adalah jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) yang diperoleh dari hasil budidaya di daerah Cisarua Lembang dan sudah dideterminasi di Herbarium LIPI Cibinong.

##### 3.2.2 Bahan Kimia

Pada penelitian ini digunakan bahan-bahan kimia antara lain *purified water*, etanol 96% (Merck), metanol (Merck), kloroform (Mallinckrodt), petroleum eter (Merck), etil asetat (JT Baker), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck), HCl (Mallinckrodt), amonia (Merck), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck), Iodium (Merck), serbuk Mg (Merck), amil alkohol (Merck), Folin ciocalteu (Merck), silika gel G60 F<sub>254</sub> (Merck), 1,1 difenil-2-pikirihidrazil (DPPH) (Aldrich), *butylated hydroxytoluene* (BHT) (Sigma), asam askorbat (DSM), asam galat (Aldrich), *mushroom tyrosinase* (Sigma), L-DOPA (Sigma), asam kojat (Sigma), kalium peroksida (Merck), natrium hidrosida (Merck), Na EDTA (Merck), propilen glikol (Dow Chemical), gliserin (Oleochemicals), nipagin (Deno), natrium metabisulfit (Merck), Ultrez-20 (Lubrizol).

### 3.2.3 Alat

Pada penelitian ini digunakan alat-alat antara lain timbangan analitik (Scout Pro), neraca analitik (Mettler Toledo), *waterbath* (Mettler), *rotary evaporator* (Buchi), oven (Mettler), blender (Philips), *chamber* (Camag), *moisture analyzer* (Mettler Toledo), tanur, *power sonic*, pH meter (Mettler Toledo), *TLC scanner* (Camag), inkubator (Biotech Inc.), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi), kuvet kuarsa (Merck), *vacuum drying oven* (Vision), piknometer, alkoholmeter, vortex (Maxi Mix), *ependorf microcentrifuge tube*, *stirrer*, viskometer Brookfield, *centrifuse* (Allegra X22R), *96-well microtiter plate*, *microplate reader* 680 (Bio-Rad), labu ukur, pipet mikro, pipet volume, batang ose, kaca arloji, cawan petri, cawan porselen, tabung reaksi, botol vial, alat-alat gelas lainnya.

## 3.3 Cara Kerja

### 3.3.1 Penyiapan Simplisia

Jamur tiram segar dan bersih dipotong-potong dengan ukuran yang kurang lebih sama (2 cm x 2 mm), selanjutnya dikeringkan di udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari langsung. Setelah kering, jamur diserbukkan dengan cara diblender.

### 3.3.2 Identitas dan Deskripsi Organoleptik Simplisia

Identitas simplisia jamur tiram meliputi nama latin dan nama Indonesia, bagian tumbuhan yang digunakan dan nama simplisia. Deskripsi organoleptik simplisia jamur tiram diperiksa bentuk, warna, bau dan rasa.

### 3.3.3 Identifikasi Fitokimia Simplisia

#### 3.3.3.1 Identifikasi Alkaloid (Metode Bouchardat, Mayer dan Dragendorff)

Serbuk simplisia ditimbang sejumlah 500 mg lalu dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*. Selanjutnya ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air dan dipanaskan di atas *penangas air* pada suhu 95<sup>0</sup>C selama 5 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut :

- a. Filtrat dipipet 1 mL di atas kaca arloji kemudian ditambahkan 2 tetes reagen Bouchardat. Hasil positif dengan terbentuknya endapan coklat sampai hitam.
- b. Filtrat dipipet 1 mL di atas kaca arloji kemudian ditambahkan 2 tetes reagen Mayer. Hasil positif dengan terbentuknya endapan berwarna putih.
- c. Filtrat dipipet 1 mL di atas kaca arloji kemudian ditambahkan 2 tetes reagen Dragendorff. Hasil positif dengan terbentuknya endapan jingga coklat.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau paling sedikit dua atau tiga dari percobaan diatas (Depkes RI, 1989)

#### 3.3.3.2 Identifikasi Saponin

Sejumlah 500 mg serbuk simplisia ditimbang lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sejumlah 10 mL air panas ditambahkan lalu didinginkan, dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang tidak hilang selama tidak kurang dari 10 menit dan dengan penambahan 1 tetes HCl 2N buih juga tidak hilang maka simplisia mengandung saponin (Depkes RI, 1989).

#### 3.3.3.3 Identifikasi Flavonoid

Sejumlah 500 mg serbuk simplisia ditimbang lalu ditambahkan 10 mL air panas, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas dengan kertas saring. Filtrat sejumlah 5 mL dipipet lalu ditambahkan 100 mg serbuk magnesium, 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol kemudian dikocok kuat. Bila lapisan amil alkohol berwarna jingga atau merah jingga berarti simplisia mengandung flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan di lemari asam (Farnsworth, 1966).

#### **3.3.3.4 Identifikasi Senyawa Fenol**

Sejumlah 1 g serbuk simplisia ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 10 mL metanol 80%. Disonikasi selama 20 menit lalu disaring dengan kapas. Filtrat sejumlah 1 mL dipipet lalu ditambahkan 1 mL larutan Folin-ciocalteu. Didiamkan selama 5 menit di tempat gelap. Bila terbentuk warna kuning kehijauan atau hijau berarti simplisia mengandung senyawa fenol (Harbone, 1987).

#### **3.3.3.5 Identifikasi Tanin**

Sejumlah 1 g sampel ditambahkan air panas sebanyak 100 mL dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu disaring, sebagian filtrat yang diperoleh ditambah 2 (dua) tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau, biru atau kehitaman (Farnsworth, 1966).

### **3.3.4 – Penetapan Parameter Simplisia sebagai Standardisasi**

#### **3.3.4.1. Susut Pengerinan**

Pengukuran susut pengerinan dilakukan dengan cara cawan porselen dan tutupnya yang telah dipanaskan dalam oven pada suhu  $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit ditimbang dan ditara (A). Sejumlah 2 g serbuk simplisia ditimbang (B), dimasukkan ke dalam cawan porselen ditutup kembali. Simplisia dalam cawan diratakan dengan cara menggoyangkan cawan tersebut lalu dimasukkan ke dalam oven pada suhu  $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , tutup cawan dilepaskan dan dibiarkan di dalam oven. Bobot sisa ditimbang dan dicatat hasilnya, dimasukkan kembali ke dalam oven pada suhu  $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam, lalu ditimbang kembali. Jika bobot dari penimbangan pertama dan kedua menunjukkan hasil yang sama maka telah tercapai bobot tetap (C). Jika belum mencapai bobot tetap maka diulangi kembali langkah sebelumnya hingga diperoleh bobot tetap (Depkes RI, 2008).

Terakhir dihitung kadar susut pengeringan dengan rumus :

$$\text{Kadar susut pengeringan} = \frac{(A + B - C)}{B} \times 100\% \quad (3.1)$$

#### 3.3.4.2 Kadar Abu

Pengukuran kadar abu dilakukan dengan cara 2 g serbuk simplisia (A) ditimbang lalu dimasukkan secara merata ke dalam cawan porselen yang telah dipijarkan di dalam tanur pada suhu 700<sup>0</sup>C selama 30 menit (B). Cawan porselen dipijarkan kembali ke dalam tanur pada suhu 700<sup>0</sup>C hingga arang habis lalu dinginkan. Bobot sisa ditimbang dan dicatat hasilnya. Cawan dimasukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 700<sup>0</sup>C selama 2 jam dan ditimbang. Jika bobot dari penimbangan pertama dan kedua menunjukkan hasil yang sama maka telah tercapai bobot tetap (C). Jika belum mencapai bobot tetap maka diulangi kembali langkah sebelumnya hingga diperoleh bobot tetap (Depkes RI, 2008).

Terakhir dihitung kadar abu dengan rumus :

$$\text{Kadar abu} = \frac{(C - B)}{A} \times 100\% \quad (3.2)$$

#### 3.3.4.3. Kadar Sari Larut dalam Air

Sejumlah 5 g simplisia dimaserasi selama 24 jam dalam 100 mL air jenuh kloroform dalam labu *erlenmeyer* tertutup, sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama kemudian dibiarkan selama 18 jam dan disaring. Sejumlah 20 mL filtrat pertama diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang telah ditara. Sisa dipanaskan dalam oven pada 105<sup>0</sup>C sampai diperoleh bobot konstan kadar sari yang larut di dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2008).

#### 3.3.4.4 Kadar Sari Larut dalam Etanol

Sejumlah 5 g simplisia yang telah dikeringkan di udara dimaserasi selama 24 jam dalam 100 mL etanol 95% dalam labu *erlenmeyer* tertutup sambil dikocok sesekali 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam dan disaring. Sejumlah 20 mL filtrat pertama diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang telah ditara. Sisanya dipanaskan dalam oven pada 105°C sampai diperoleh bobot konstan kadar sari yang larut di dalam etanol dihitung terhadap bahan yang dikeringkan di udara (Depkes RI, 2008).

#### 3.3.5 Pembuatan Ekstrak

Ekstrak diekstraksi dengan cara sebagai berikut serbuk jamur tiram dimasukkan ke dalam dua bejana, masing-masing sejumlah 100 g. Bejana pertama dituangi air panas suhu 70°C sejumlah 1000 mL dan bejana kedua dituangi etanol 70% suhu 50°C sejumlah 1000 mL. Kemudian campuran direndam selama 2 (dua) jam sambil setiap 15 menit diaduk selama 10 menit. Hasil maserasi disaring menggunakan tekanan vakum. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu dan tekanan yang sesuai hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental dikeringkan di dalam oven suhu 50°C sampai menjadi ekstrak kering. Dihitung nilai rendemen.

#### 3.3.6 Identifikasi Fitokimia Ekstrak

##### 3.3.6.1 Identifikasi Alkaloid (Metode Bouchardat, Mayer dan Dragendorff)

Ekstrak air dan etanol 70% jamur tiram ditimbang masing-masing sejumlah 100 mg dan 400 mg lalu dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*. Selanjutnya ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air dan dipanaskan di atas penangas air pada suhu 95°C selama 5 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut :

- d. Filtrat dipipet 1 mL di atas kaca arloji, kemudian ditambahkan 2 tetes reagen Bouchardat. Hasil positif dengan terbentuknya endapan coklat sampai hitam.

- e. Filtrat dipipet 1 mL di atas kaca arloji, kemudian ditambahkan 2 tetes reagen Mayer. Hasil positif dengan terbentuknya endapan berwarna putih.
- f. Filtrat dipipet 1 mL di atas kaca arloji, kemudian ditambahkan 2 tetes reagen Dragendorff. Hasil positif dengan terbentuknya endapan jingga coklat.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau paling sedikit dua atau tiga dari percobaan diatas (Depkes RI, 1989; Sermakkani and Thangapandian, 2010)

### 3.3.6.2 Identifikasi Saponin

Ekstrak air dan etanol 70% jamur tiram ditimbang masing-masing sejumlah 100 mg dan 400 mg lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sejumlah 10 mL air panas ditambahkan lalu didinginkan, dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang tidak hilang selama tidak kurang dari 10 menit dan dengan penambahan 1 tetes HCl 2N buih juga tidak hilang maka simplisia mengandung saponin (Depkes RI, 1989; Sermakkani and Thangapandian, 2010).

### 3.3.6.3 Identifikasi Flavonoid

Ekstrak air dan etanol 70% jamur tiram ditimbang masing-masing sejumlah 100 mg dan 400 mg lalu dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* lalu ditambahkan 10 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas dengan kertas saring. Filtrat sejumlah 5 mL dipipet lalu ditambahkan 100 mg serbuk magnesium, 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol kemudian dikocok kuat. Bila lapisan amil alkohol berwarna jingga atau merah jingga berarti simplisia mengandung flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan di lemari asam (Farnsworth, 1966).

### 3.3.6.4 Identifikasi Senyawa Fenol

Ekstrak air dan etanol 70% jamur tiram ditimbang masing-masing sejumlah 100 mg dan 400 mg lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. lalu ditambahkan 10 mL metanol 80%. Disonikasi selama 20 menit lalu disaring dengan kapas. Filtrat sejumlah 1 mL dipipet lalu ditambahkan 1 mL larutan Folin-ciocalteu. Didiamkan

selama 5 menit di tempat gelap. Bila terbentuk warna kuning kehijauan atau hijau berarti simplisia mengandung senyawa fenol (Harbone, 1987).

### 3.3.6.5 Identifikasi Tanin

Ekstrak air dan etanol 70% jamur tiram ditimbang masing-masing sejumlah 100 mg dan 400 mg lalu dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*. ditambahkan air panas sebanyak 100 mL dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu disaring, sebagian filtrat yang diperoleh ditambah 2 (dua) tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau, biru atau kehitaman (Harbone, 1987).

### 3.3.7 Deskripsi Organoleptik Ekstrak

Deskripsi organoleptik ekstrak air dan ekstrak etanol 70% jamur tiram diperiksa bentuk, warna, bau dan rasa.

### 3.3.8 Penetapan Parameter Ekstrak sebagai Standardisasi

#### 3.3.8.1 Kelarutan dalam Air dan Etanol 96%

Untuk mengetahui kelarutan dalam air, sejumlah 100 mg ekstrak ditimbang ke dalam erlemenyer kemudian ditambahkan 3 mL air, disonikasi selama 10 menit. Lalu diamati kelarutan.

Untuk mengetahui kelarutan dalam etanol 96%, 100 mg ekstrak ditimbang ke dalam *erlemenyer* kemudian ditambahkan 3 mL etanol 96%, disonikasi selama 10 menit. Lalu diamati kelarutan. (Tabel 3.1)

**Tabel 3. 1** Kelarutan zat dalam suatu pelarut

No	Istilah kelarutan	Bagian pelarut yang diperlukan untuk melarutkan 1 bagian zat
1	Sangat mudah larut	Kurang dari 1 bagian
2	Mudah larut	1 sampai 10 bagian
3	Larut	10 sampai 30 bagian
4	Agak sukar larut	30 sampai 100 bagian
5	Sukar larut	100 sampai 1000 bagian
6	Sangat sukar larut	1000 sampai 10.000 bagian
7	Praktis tidak larut	Lebih dari 10.000 bagian

[Sumber : Depkes RI, 1995]

### 3.3.8.2 Kromatografi

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan dengan cara 20 mg ekstrak ditimbang lalu dilarutkan dengan 1 mL air untuk ekstrak air dan 1 mL etanol 70% untuk ekstrak etanol 70%. Larutan disonikasi selama 10 menit kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian ditotolkan sebanyak 10  $\mu$ L pada plat silika gel G60 F<sub>254</sub>. Elusi sejauh 8 cm dengan menggunakan fase gerak butanol : asam asetat : air = 100 : 10 : 10 dalam sebuah chamber tertutup yang sudah dijenuhkan selama 3 menit. Kemudian plat dikeringkan dari fasa gerak dan diamati pada UV  $\lambda = 254$  nm dan  $\lambda = 366$  nm. Selanjutnya disemprotkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% dan dikeringkan, lalu diamati pada UV  $\lambda = 366$  nm dan cahaya tampak (*visible*).

### 3.3.8.3 Susut Pengerinan

Pengukuran susut pengeringan dilakukan dengan alat *moisture analyzer*. Sampel dikeluarkan lalu dimasukkan dan tara pan bersih. Ekstrak dimasukkan sebanyak kurang lebih 2 g. *Moisture content* (%MC) diukur pada kondisi pengeringan 105<sup>0</sup>C dan Switchoff mode 3. Dicatat hasil yang diperoleh.

### 3.3.8.4 Penetapan Kadar Fenol Total

Untuk penetapan kadar fenol total dilakukan dengan cara sejumlah 1000 mL air dididihkan, segera tutup lalu didinginkan. Air tersebut telah bebas CO<sub>2</sub> dan siap digunakan. Sejumlah 7 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ditimbang lalu dilarutkan dalam 100 mL air bebas CO<sub>2</sub>. Asam galat sejumlah 25 mg ditimbang lalu dilarutkan dalam air bebas CO<sub>2</sub> dalam labu ukur volume 25 mL. Asam galat dilarutkan kemudian diencerkan sampai dengan konsentrasi 100 µg/mL. Sejumlah 100 mg ekstrak air jamur tiram dan 400 mg ekstrak etanol 70% ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur volume 50 mL. Air bebas CO<sub>2</sub> ditambahkan sampai tanda batas lalu disonikasi selama 10 menit dan disaring. Untuk analisis sebagai berikut, masing –masing dipipet sebanyak 1 mL air bebas CO<sub>2</sub> (sebagai blanko), 1 mL larutan asam galat dan 1 mL larutan sampel, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur volume 25 mL yang telah berisi 9 mL air bebas CO<sub>2</sub>. Ditambahkan pada masing-masing labu sejumlah 1 mL reagen Folin-ciocalteu lalu didiamkan selama 5 menit dalam kondisi tempat gelap. Sebanyak 10 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% dan air bebas CO<sub>2</sub> ditambahkan sampai tanda batas. Setiap larutan dihomogenkan kemudian diamkan selama 2 jam dalam kondisi tempat yang gelap. Diukur kadar fenol total menggunakan spektrofotometer pada λ= 750 nm. Pengujian dilakukan secara triplo.

$$\% \text{ Total fenol} = \frac{(\text{Bobot total fenol total})}{\text{Bobot sampel}} \times 100\% \quad (3.3)$$

### 3.3.9 Uji Antioksidan Ekstrak Jamur Tiram dengan Metode DPPH

#### 3.3.9.1 Penyiapan Bahan Kimia

##### a. Pembuatan larutan uji ekstrak air jamur tiram

Ekstrak yang akan diuji ditimbang sejumlah 50 mg dimasukkan ke dalam labu ukur volume 5 ml dan dilarutkan dengan air sampai batas volume untuk membuat konsentrasi induk sebesar 10.000 µg/mL. Larutan disonikasi selama 15 menit. Selanjutnya masing-masing 1 mL larutan sampel dipipet dan dimasukkan

ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan metanol sampai dengan tanda batas untuk membuat konsentrasi sebesar 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Ke dalam vial berwarna gelap, larutan sampel dipipet sejumlah volume tertentu dan ditambahkan metanol sejumlah tertentu sehingga volume akhir pada masing-masing vial adalah 4 mL dan konsentrasi sampel terdiri dari 12,5, 25, 50, 75, 100, 125 dan 150  $\mu\text{g/mL}$ .

**b. Pembuatan larutan uji ekstrak etanol 70% jamur tiram**

Ekstrak yang akan diuji ditimbang sejumlah 200 mg (mengandung 25% zat aktif dan 75% *filler*) dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan dilarutkan dengan etanol 70% sampai batas volume untuk membuat konsentrasi induk sebesar 10.000  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan disonikasi selama 15 menit kemudian disaring dengan menggunakan saringan ukuran 0,45. Selanjutnya masing-masing 1 mL larutan sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan metanol sampai dengan tanda batas untuk membuat konsentrasi sebesar 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Ke dalam vial berwarna gelap, larutan sampel dipipet sejumlah volume tertentu dan ditambahkan metanol sejumlah tertentu sehingga volume akhir pada masing-masing vial adalah 4 mL dan konsentrasi sampel terdiri dari 12,5, 25, 50, 75, 100, 125, dan 150  $\mu\text{g/mL}$ .

**c. Pembuatan larutan kontrol**

Larutan kontrol dibuat berbeda antara masing-masing ekstrak. Larutan kontrol untuk ekstrak air dibuat dengan cara 1 mL air dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan metanol sampai dengan tanda batas. Larutan kontrol untuk ekstrak etanol 70% dibuat dengan cara 1 mL etanol 70% dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan metanol sampai dengan tanda batas. Selanjutnya masing-masing dipipet sebanyak 4 mL ke dalam vial.

**d. Pembuatan larutan DPPH**

Larutan DPPH 0,3 mM dibuat dengan cara ditimbang sejumlah 2,957 mg serbuk DPPH (BM = 394,32) dimasukkan ke dalam labu ukur volume 25 mL lalu dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas.

### 3.3.9.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Sebelum pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dulu penentuan panjang gelombang maksimum dengan menggunakan larutan kontrol yang sudah ditambahkan DPPH dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 400 – 600 nm.

### 3.3.9.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak

Larutan uji dibuat dengan cara 4 mL dari masing-masing konsentrasi ditambahkan 1 mL DPPH 0,3 mM. Campuran divorteks selama 20 detik kemudian larutan uji dan larutan kontrol diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Asam askorbat digunakan sebagai pembanding atau kontrol positif.

Uji antioksidan ekstrak dilakukan dengan metode DPPH yang menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Serapan atau absorbansi larutan uji diukur pada panjang gelombang maximum. Untuk menghasilkan pengukuran yang baik, larutan yang diukur memberikan serapan sebesar 0,2-0,8 di daerah ultraviolet atau cahaya tampak (Depkes, 2008).

### 3.3.9.4 Perhitungan Persentase Penghambatan (% Inhibisi) dan IC<sub>50</sub>

Persentase penghambatan atau inhibisi dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (3.4)$$

IC<sub>50</sub> dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan persen penghambatan (% inhibisi) sebagai sumbu y. Dari persamaan  $y = a + bx$  dapat dihitung nilai IC<sub>50</sub>.

### 3.3.10 Uji Penghambatan Tirosinase oleh Ekstrak Jamur Tiram

#### 3.3.10.1 Penyiapan Bahan Kimia

##### a. Pembuatan larutan dapar fosfat 0,1 M dengan PH 6,8

Untuk menyiapkan 200 mL dapar fosfat 0.1 M, kalium dihidrogen fosfat ditimbang sebanyak 2,722 g (BM = 136,09), kemudian dilarutkan dengan akuades 100 mL. Larutan tersebut ditambahkan larutan NaOH 0,2 N sebanyak 10 mL dan ditambahkan akuades hingga hampir mencapai 200 mL. Diukur pH larutan dan diteteskan NaOH hingga mencapai pH 6,8.

##### b. Pembuatan larutan substrat L- DOPA

Larutan substrat dibuat dengan cara 39,438 mg L-DOPA (BM = 197,19) dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat pH 6,8 sehingga diperoleh konsentrasi substrat 20 mM. Larutan substrat 20 mM tersebut selanjutnya diencerkan hingga mencapai konsentrasi 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 ; dan 0,625 mM,;

##### c. Pembuatan larutan enzim tirosinase

Larutan induk enzim dibuat dengan cara 2 mg serbuk dilarutkan dalam 1 mL dapar fosfat sehingga didapatkan konsentrasi 3762 U/mL. Larutan enzim tersebut diencerkan hingga mencapai konsentrasi 310, 155 dan 75 U/mL.

#### 3.3.10.2 Uji Pendahuluan

##### a. Optimasi konsentrasi enzim tirosinase

Sebanyak 120  $\mu$ L larutan buffer fosfat (0.1 M, pH 6.8), 40  $\mu$ L larutan L-DOPA, dan 40  $\mu$ L larutan enzim tirosinase dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Masing-masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Konsentrasi substrat dibuat 2 (dua) macam yaitu 2,5 dan 5 mM dengan masing-masing ditambahkan larutan enzim dengan konsentrasi 310, 155 dan 75 U/mL. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Campuran diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang optimum.

**b. Optimasi konsentrasi substrat (L-DOPA)**

Sebanyak 120  $\mu\text{L}$  larutan buffer fosfat (0.1 M, pH 6.8), 40  $\mu\text{L}$  larutan L-DOPA, dan 40  $\mu\text{L}$  larutan enzim tirosinase dimasukkan ke dalam *96 well-microtiter plate*. Masing-masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Konsentrasi substrat dibuat 6 (enam) macam yaitu 20; 10; 5; 2,5; 1,25 dan 0,625 mM dengan masing-masing ditambahkan larutan enzim dengan konsentrasi optimumnya. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Campuran diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang optimum.

**3.3.10.3 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase oleh Sampel Asam Kojat dan Asam Askorbat****a. Pembuatan larutan sampel asam kojat sebagai kontrol positif**

Serbuk asam kojat ditimbang sejumlah 5 mg dan dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat pH 6,8 sehingga diperoleh konsentrasi 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Kemudian larutan asam kojat 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dipipet 1,0 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL. Volume labu ukur dicukupkan dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh konsentrasi larutan asam kojat 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , demikian selanjutnya hingga diperoleh konsentrasi larutan asam kojat 20, 10, 5 dan 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**b. Pengujian larutan sampel asam kojat sebagai kontrol positif**

Sebanyak 80  $\mu\text{L}$  larutan buffer fosfat (0.1 M, pH 6.8), 40  $\mu\text{L}$  larutan asam kojat 40  $\mu\text{L}$  larutan L-DOPA, dan 40  $\mu\text{L}$  larutan enzim tirosinase dimasukkan ke dalam *96 well-microtiter plate*. Masing-masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Campuran diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang optimum.

**c. Pembuatan larutan sampel asam askorbat sebagai kontrol positif**

Serbuk asam askorbat ditimbang sejumlah 5 mg dan dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat pH 6,8 sehingga diperoleh konsentrasi 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Kemudian larutan

asam askorbat 500 µg/ml dipipet 1,0 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL. Volume labu ukur dicukupkan dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh konsentrasi larutan asam askorbat 100 µg/mL, demikian selanjutnya hingga diperoleh konsentrasi larutan asam askorbat 80, 40, 20, 10, dan 5 µg/mL.

**d. Pengujian larutan sampel asam askorbat sebagai kontrol positif**

Sejumlah 80 µL larutan buffer fosfat (0.1 M, pH 6.8), 40 µL larutan asam askorbat 40 µL larutan L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase dimasukkan ke dalam *96 well-microtiter plate*. Masing-masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Campuran diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang optimum.

**3.3.10.4 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase oleh Sampel Ekstrak Jamur Tiram**

**a. Pembuatan larutan sampel ekstrak air jamur tiram**

Serbuk ekstrak air jamur tiram ditimbang sejumlah 100 mg dan dilarutkan dalam 5 mL air sehingga diperoleh konsentrasi 20.000 µg/mL. Larutan disonikasi selama 15 menit. Kemudian larutan ekstrak 20.000 µg/mL dipipet 2,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL. Volume labu ukur dicukupkan dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak 10.000 µg/mL demikian selanjutnya hingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak 5000, 2500, 1250 dan 625 µg/mL.

**b. Pembuatan larutan sampel ekstrak etanol 70% jamur tiram**

Serbuk ekstrak etanol 70% jamur tiram ditimbang sejumlah 400 mg dan dilarutkan dalam 5 mL etanol 70% sehingga diperoleh konsentrasi 20.000 µg/mL. Larutan disonikasi selama 15 menit kemudian disaring. Selanjutnya larutan ekstrak 20.000 µg/mL dipipet 2,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL. Volume labu ukur dicukupkan dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh konsentrasi

larutan ekstrak 10.000  $\mu\text{g/mL}$ , demikian selanjutnya hingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak 5000, 2500, 1250 dan 625  $\mu\text{g/mL}$ .

**c. Pengujian larutan sampel ekstrak jamur tiram**

Sejumlah 80  $\mu\text{L}$  larutan buffer fosfat (0.1 M, pH 6.8), 40  $\mu\text{L}$  larutan sampel, 40  $\mu\text{L}$  larutan L-DOPA, dan 40  $\mu\text{L}$  larutan enzim tirosinase dimasukkan ke dalam 96 well-microtiter plate. Masing-masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase (Tabel 3.2). Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. Campuran diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang optimum.

**Tabel 3. 2** Metode uji penghambatan enzim tirosinase

BAHAN	PLATE ( $\mu\text{L}$ )			
	Blanko ( $\mu\text{L}$ )	Kontrol Blanko ( $\mu\text{L}$ )	Sampel ( $\mu\text{L}$ )	Kontrol Sampel ( $\mu\text{L}$ )
Larutan dapar fosfat (pH 6.8)	120	160	80	120
L-DOPA (5 mM)	40	40	40	40
Larutan sampel	-	-	40	40
Enzim Tirosinase (310 U/mL)	40	-	40	-

### 3.3.10.5 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Menggunakan *Microplate Reader* dan Perhitungan Persentase Penghambatan (% Inhibisi)

Uji penghambatan tirosinase ditentukan dengan mengukur absorbansi menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang optimum. Absorbansi yang terukur merupakan absorbansi pembentukan dopakrom. Dari absorbansi pengukuran ini dapat dihitung persentase inhibisi tirosinase menurut metode Chang *et al.* (2005) dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi tirosinase} = \frac{(B - S)}{B} \times 100\% \quad (3.5)$$

Keterangan :

B = absorbansi kontrol dikurangi absorbansi blanko kontrol ( $B_1 - B_0$ )

S = absorbansi sampel dikurangi absorbansi blanko sampel ( $S_1 - S_0$ )

$IC_{50}$  dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier, konsentrasi sampel (dalam logaritma) sebagai sumbu x dan persen penghambatan (% inhibisi) sebagai sumbu y. Dari persamaan  $y = a + bx$  dapat dihitung nilai  $IC_{50}$ . Asam kojat dan asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif.

### 3.3.10.6 Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim Tirosinase

Jenis inhibisi dari ekstrak jamur tiram ditentukan dengan cara membuat kurva *Lineweaver-Burk* dari data reaksi inhibisi antara beberapa konsentrasi L-DOPA dengan tirosinase yang diperoleh dan membandingkannya dengan kurva *Lineweaver-Burk* tentang pengaruh inhibitor terhadap laju reaksi.

#### a. Pengujian kontrol dengan berbagai konsentrasi substrat

Sejumlah 120  $\mu\text{L}$  larutan buffer fosfat (0.1 M, pH 6.8), 40  $\mu\text{L}$  larutan L-DOPA, dan 40  $\mu\text{L}$  larutan enzim tirosinase dimasukkan ke dalam *96 well-microtiter plate*. Masing-masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Konsentrasi substrat dibuat 4 (empat) macam yaitu 5; 2,5; 1,25; dan 0,625 mM dengan masing-masing ditambahkan larutan enzim dengan

konsentrasi 310 U/mL. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Campuran diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang optimum.

**b. Pengujian sampel dengan berbagai konsentrasi substrat**

Sejumlah 80 µL larutan buffer fosfat (0.1 M, pH 6.8), 40 µL larutan sampel, 40 µL larutan L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase dimasukkan ke dalam *96 well-microtiter plate*. Konsentrasi sampel yang dipakai adalah konsentrasi yang memiliki persen penghambatan yang lebih besar. Masing-masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase (Tabel 3.2). Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Campuran diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang optimum.

**c. Analisis data kinetika**

Data serapan dari pengujian kontrol dan sampel dengan berbagai konsentrasi substrat L-DOPA dianalisis menggunakan metode *Lineweaver-Burk* untuk memperoleh plot kurva *Lineweaver-Burk* dan konstanta *Michaelis-Menten* ( $K_m$ ). Konstanta *Michaelis-Menten* ( $K_m$ ) dihitung berdasarkan persamaan regresi  $y = a + bx$  di mana  $x$  adalah jumlah substrat dan  $y$  adalah absorbansi sampel.

$$y = 0 \rightarrow x = -1 / K_m$$

$$y = a + bx \rightarrow 0 = a + b(-1 / K_m) \rightarrow K_m = b / a \quad (3.6)$$

$$x = 0 \rightarrow y = 1 / V_{max}$$

$$y = a + bx \rightarrow 1 / V_{max} = a + b(0) \rightarrow V_{max} = 1 / a \quad (3.7)$$

Hasil plot kurva *Lineweaver-Burk* dan konstanta *Michaelis-Menten* ( $K_m$ ) kemudian digunakan untuk menentukan jenis mekanisme sampel dalam menghambat enzim tirosinase.

### 3.3.11 Pembuatan Sediaan

#### 3.3.11.1 Formulasi Sediaan

**Tabel 3. 3** Persentase bahan-bahan dalam formula gel (b/b%)

Bahan	Blangko negatif (%)	Formula 1 (%)	Formula 2 (%)	Formula 3 (%)	Blangko positif (%)
Sodium Hidroksida	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Nipagin	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Sodium EDTA	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Na Metabisulfit	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Gliserin	5.75	5.75	5.75	5.75	5.75
Propilen Glikol	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Ultraz 20	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Ekstrak		<b>0.2</b>	<b>0.4</b>	<b>0.8</b>	
Asam askorbat					0.5
Akuades	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Pada pembuatan gel dari ekstrak etanol 70% jamur tiram, pertama-tama bahan-bahan yang akan digunakan ditimbang terlebih dahulu. Ke dalam *beaker glass* pertama, dimasukkan akuades 10 mL dan sodium hidroksida lalu diaduk sampai larut (berwarna jernih), disebut larutan 1. Kemudian ke dalam *beaker glass* kedua dimasukkan nipagin ke dalam propilen glikol, diaduk sampai larut baru ditambahkan gliserin, diaduk kembali sampai larut (berwarna jernih), disebut larutan 2. Selanjutnya ke dalam *beaker glass* ketiga, dimasukkan akuades 15 mL, sodium EDTA dan natrium metabisulfit lalu diaduk sampai larut (berwarna jernih), disebut larutan 3. Ke dalam *beaker glass* keempat, dimasukkan akuades 45 mL, ultrez-20 sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *stirer* kecepatan 140–255 ppm sampai terdispersi homogen. Kemudian ditambahkan larutan 1, diaduk dengan *stirer* kecepatan 160 rpm sampai kelihatan lebih kental lalu ditambahkan larutan 2 dan selanjutnya larutan 3, diaduk sampai homogen. Selanjutnya dimasukkan ekstrak jamur tiram yang terlebih dahulu dilarutkan dalam etanol 70%. Diaduk dengan *stirer*

kecepatan 160 rpm sampai kental dan homogen. Terakhir ditambahkan akuades sampai dengan 100 gram, diaduk dengan *stirer* kecepatan 160 rpm sampai kental dan homogen dan menjadi massa gel.

### 3.3.11.2. Evaluasi Fisik Sediaan

Evaluasi dari sediaan gel dilakukan untuk pengamatan organoleptis, homogenitas, pengukuran pH, viskositas, dan konsistensi

#### a. Pengamatan organoleptis

Sediaan diamati warna, baunya, terjadi sineresis atau tidak.

#### b. Pemeriksaan homogenitas

Sediaan diletakkan di antara dua kaca objek lalu diperhatikan adanya partikel-partikel kasar atau ketidakhomogenan di bawah cahaya

#### c. Pengukuran pH

Uji pH dapat dilakukan menggunakan indikator universal atau pH meter. Jika pH diukur dengan menggunakan pH meter, mula-mula elektroda dikalibrasi dengan dapar standar pH 4, 7 dan 9. Kemudian elektroda dicelupkan ke dalam sediaan, dicatat nilai pH yang muncul di layar. Pengukuran dilakukan pada suhu ruang.

#### d. Penentuan viskositas dan sifat alir

Pengukuran viskositas dengan menggunakan viskometer Brookfield menggunakan *spindle* nomor yang sesuai, dipasang pada alat kemudian dicelupkan ke dalam sediaan yang telah diletakkan dalam breaker glass. Kecepatan alat dipasang pada kecepatan yang beragam pada 2, 4, 10, 20 rpm, dan kemudian dibalik 20, 10, 4 dan 2 rpm kemudian dibaca skalanya dengan mengamati jarum merah saat posisinya stabil. Sifat aliran dapat diperoleh dengan membuat kurva *shearing stress vs rate of shear*.

#### e. Penentuan konsistensi

Sediaan yang akan diperiksa dimasukkan ke dalam wadah khusus dan diletakkan pada meja penetrometer. Peralatan diatur hingga ujung kerucut menyentuh bayang permukaan sediaan yang dapat diperjelas dengan menghidupkan

lampu. Batang pendorong dilepas dengan mendorong tombol *start*. Angka penetrasi dibaca lima detik setelah kerucut menembus sediaan. Dari pengukuran konsistensi dengan penetrometer akan diperoleh *yield value*. Pemeriksaan konsistensi dilakukan pada minggu awal dan minggu akhir dengan penyimpanan pada suhu  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.11.3 Uji Stabilitas

#### a. Uji stabilitas pada suhu $4 \pm 2$ , $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ RH 65%, dan suhu $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ RH 75%

Tiap formula sediaan disimpan pada suhu  $4 \pm 2$ ,  $28 \pm 2$ , dan suhu  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  dan diukur parameter-parameter kestabilannya seperti bau, warna, dan pH dievaluasi selama 12 minggu dengan pengamatan setiap 2 minggu.

#### b. *Cycling test*

Sampel disimpan pada suhu  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam lalu dipindahkan ke dalam lemari uji stabilitas bersuhu  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam, waktu selama penyimpanan dua suhu tersebut dianggap satu siklus. *Cycling test* dilakukan sebanyak 6 (enam) siklus kemudian dilihat organoleptis berupa perubahan warna dan apakah terjadi sineresis atau tidak.

### 3.3.12 Uji Aktivitas Antioksidan dari Sediaan Gel Ekstrak Jamur Tiram

#### a. Pembuatan Larutan Sampel

Sampel sediaan gel ditimbang sejumlah 1 g kemudian diekstraksi dengan penambahan 10 mL pelarutnya. Disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Cairan supernatan ditampung sedangkan endapan dilarutkan kembali dengan pelarutnya dan disentrifus kembali. Perlakukan diulang sampai 3 (tiga) kali. Masing-masing larutan uji dari 3 (tiga) macam sediaan gel dipipet sejumlah 1 mL kemudian ditambahkan metanol sampai 4 mL. Selanjutnya masing-masing larutan uji ditambahkan 1 mL DPPH 0,3 mM. Larutan uji dan larutan kontrol diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif.

**b. Pembuatan Larutan DPPH**

Larutan DPPH 0,3 mM dibuat dengan cara ditimbang sejumlah 2,957 mg serbuk DPPH (BM = 394,32), dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL lalu dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas.

**c. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak**

Uji antioksidan ekstrak dilakukan menggunakan metode DPPH dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Serapan atau absorbansi larutan uji diukur pada panjang gelombang maximum. Persentase penghambatan atau inhibisi dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (3.8)$$

**3.3.13 Uji Penghambatan Tirosinase dari Sediaan Gel Ekstrak Jamur Tiram**

Sampel sediaan gel ditimbang sejumlah 1 g kemudian diekstraksi dengan penambahan 10 mL pelarutnya. Disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Cairan supernatan ditampung sedangkan endapan dilarutkan kembali dengan pelarutnya dan disentrifus kembali. Perlakuan diulang sampai 3 (tiga) kali.

Ke dalam *96-well microtiter plate* dimasukkan 80  $\mu$ L larutan buffer fosfat (0.1 M, pH 6.8), 40  $\mu$ L larutan sampel, 40  $\mu$ L L-DOPA (5 mM) dan 40  $\mu$ L larutan tirosinase (310 unit/mL). Masing-masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. Campuran diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang optimum. Nilai aktivitas penghambatan enzim tirosinase diperoleh dengan menghitung penghambatan dopakrom yang terbentuk menggunakan rumus persamaan.

### 3.3.14 Uji Keamanan terhadap Sukarelawan (Colipa Guidelines, 1997)

Uji keamanan dilakukan pada sukarelawan sebanyak 12 orang. Sukarelawan dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi.

#### 3.3.14.1 Kriteria inklusi :

Pria dan atau wanita yang bersedia untuk menjadi sukarelawan dan telah mendapat penjelasan mengenai produk yang akan diuji.

#### 3.3.14.2 Kriteria eksklusi :

- Tidak sedang hamil dan atau menyusui
- Tidak mempunyai riwayat alergi kulit sebelumnya
- Tidak sedang menjalani pengobatan topikal atau memakai produk tertentu untuk penyembuhan penyakit kulit.
- Tidak sedang menderita penyakit kulit

Sediaan yang diuji yaitu sediaan yang mengandung basis saja (kontrol negatif) dan sediaan yang mengandung ekstrak jamur tiram dengan konsentrasi yang paling tinggi (0,8%).

Uji keamanan dilakukan dengan metode *single application closed patch epicutaneous test under occlusion or semi occlusion* berdasarkan *Colipa Guidelines*.

Prosedur pengujian dilakukan berdasarkan *Colipa Guidelines* sebagai berikut

Jenis Patch	: <i>hypoallergenic tape</i>
Lokasi	: punggung
Frekuensi	: 1 (satu) kali
Jumlah yang dioleskan	: $\pm 80$ mg
Cara pengolesan	: <i>gentle swabbing</i>
Waktu pengamatan	: setelah 30 menit <i>tape</i> dibuka, kemudian 24 jam dan 48 jam berikutnya.
Parameter	: data yang diperoleh diolah untuk memperoleh indeks iritasi primer kulit berdasarkan <i>Primary Irritation Index (PII) for Human</i> (Tardiff R., et al, 2003)

$$PII = \frac{\text{Jumlah semua nilai eritema, eschar dan edema pada jam ke-24 dan 48}}{\text{Jumlah sukarelawan} \times \text{jumlah waktu pengamatan}}$$

(3.9)

**Tabel 3.4** Kategori nilai keadaan kulit

<b>Reaksi kulit berupa eritema, eschar dan edema</b>	<b>Nilai</b>
<i>No evidence of reaction</i>	0
<i>Reaction readily visible but mild</i>	1
<i>Definite popular response</i>	2
<i>Definite edema</i>	3
<i>Definite edema and papules</i>	4
<i>Vesicular/ bulbous eruption</i>	5

**Tabel 3.5** Kategori respon dan iritasi

<b>Kategori</b>	<b>Indeks iritasi primer</b>
Tidak berarti	0 - 0,4
Iritasi ringan	0,5 - 1,9
Iritasi sedang	2,0 - 4,9
Iritasi berat	5,0 - 8,0

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Penyiapan Simplisia

Simplisia yang digunakan adalah jamur tiram yang diperoleh dari hasil budidaya di daerah Cisarua. Jamur dikumpulkan pada bulan Agustus 2011, diambil pada pagi hari dalam kondisi segar dan bersih dan tetap dijaga kondisinya dengan penyimpanan dalam *cold room*. Jamur tiram yang dipilih adalah yang mempunyai ukuran 8-10 x 8-10 cm. Jamur tiram kemudian diidentifikasi atau dideterminasi di Herbarium LIPI Cibinong dan hasil determinasi yaitu jenis jamur tiram adalah jenis *Pleurotus ostreatus*, suku Pleurotaceae.

Sebelum dipotong-potong, jamur tiram terlebih dahulu disortasi basah, Proses ini bertujuan memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Bagian tubuh jamur tiram yang telah bersih kemudian dipotong-potong dengan ukuran yang relatif sama (2 cm x 2 mm). Hal ini dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan dan pembuatan serbuk.

Pengeringan dilakukan di udara terbuka dengan tidak langsung terkena sinar matahari selama 24 jam. Berat bagian jamur ditimbang sebelum dan sesudah dikeringkan untuk mengetahui penyusutan berat. Hasil susut pengeringan simplisia jamur tiram adalah 9,9%. Hasil ini cukup baik karena memenuhi kriteria di mana sampel yang dapat disimpan dalam jangka waktu panjang adalah sampel yang memiliki susut pengeringan kurang dari 10% (Pratiwi, 2009). Susut pengeringan bagian jamur dapat dilihat pada Tabel 4.14. Selanjutnya bagian jamur yang telah kering dibuat serbuk dengan cara diblender.

#### 4.2 Ekstraksi

Ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi padat-cair. Pada penelitian ini simplisia jamur merupakan padatan, diekstraksi menggunakan pelarut air dan

etanol 70%. Sistem pelarut dalam ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Gamse, 2002). Larutan penyari yang baik harus memenuhi kriteria: murah, mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki dan tidak mempengaruhi zat aktif (Lucas *et al*, 1949). Kedua larutan ini yaitu air dan etanol bersifat tidak toksik dan ekonomis. Etanol digunakan sebagai penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 70%, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, panas untuk pemekatan sedikit, dan mudah bercampur dengan air. Etanol 70% efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal. Selain itu etanol merupakan pelarut yang mampu mengekstraksi hampir semua kandungan kimia alam yang memiliki bobot molekul rendah (Eka dan Aprival, 2010).

Ekstraksi dilakukan dengan cara masing-masing 100 g serbuk simplisia jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) dimasukkan ke dalam bejana. Bejana pertama dituangi air panas suhu 70°C dan bejana kedua dituangi etanol 70% suhu 50°C. masing-masing sebanyak 1000 mL. Direndam selama 2 (dua) jam sambil diaduk setiap 15 menit selama 10 menit. Peneliti menggunakan perbandingan simplisia dan pelarut adalah 1 : 10 (Depkes, 2008).

Temperatur mempengaruhi proses tersebut sehingga peneliti menggunakan temperatur yang lebih tinggi dengan alasan akan lebih menguntungkan pada proses ekstraksi padat cair karena akan meningkatkan harga difusivitas perpindahan massa sebagai perpindahan zat terlarut, kelarutan zat terlarut dan pelarut. Titik didih etanol murni adalah 78°C sehingga dengan etanol 70%, dipilih suhu 50°C dianggap aman, begitu pula dengan penggunaan suhu 70°C pada ekstrak air. Suhu 70°C dianggap tidak terlalu panas, sehingga tidak merusak ekstrak namun juga tidak terlalu rendah, sehingga dapat menarik zat-zat yang diinginkan. Dilakukan pengadukan sesekali pada proses dengan tujuan mempercepat terjadinya reaksi antara pelarut dengan zat terlarut (Enny dan Fadilah, 2007).

Waktu ekstraksi merupakan hal yang berpengaruh dalam ekstraksi tanaman. Semakin lama waktu ekstraksi maka semakin banyak pula zat terlarut yang didapat namun waktu yang terlalu lama menyebabkan biaya produksi semakin tinggi. Dalam penelitian ini, peneliti memilih menggunakan waktu 2 (dua) jam dengan asumsi dianggap sudah cukup efektif untuk mengekstraksi zat yang diinginkan.

Hasil maserasi disaring menggunakan tekanan vakum. Digunakan tekanan vakum dengan asumsi hasil maserasi lebih tersaring banyak dengan penambahan tekanan. Filtrat yang diperoleh dipekatan dengan *rotary evaporator* dengan suhu dan tekanan yang sesuai hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian dikeringkan di dalam oven suhu 50<sup>0</sup>C sampai menjadi ekstrak kering. Dihitung nilai rendemen, dapat dilihat pada Tabel 4.25. Ekstrak kering disimpan dalam wadah gelap kedap udara.

#### **4.3 Identifikasi Fitokimia pada Simplisia dan Ekstrak**

Identifikasi fitokimia dilakukan pada simplisia dan ekstrak. Pada simplisia dan ekstrak jamur tiram dilakukan identifikasi alkaloid, saponin, flavonoid, senyawa fenol dan tanin serta penetapan kadar total fenol pada ekstrak.

Identifikasi golongan alkaloid dilakukan dengan penambahan pereaksi Bouchardat, Mayer dan Dragendorff pada serbuk simplisia jamur tiram. Senyawa alkaloid umumnya ditemukan di tanaman dalam bentuk garam yang bersifat larut dalam air atau bentuk basa sehingga senyawa ini dapat ditarik dengan pelarut air dalam suasana asam (Farnsworth, 1966).

Pengamatan hasil identifikasi golongan alkaloid adalah melalui endapan yang terbentuk. Dari hasil uji ketiga metode, serbuk simplisia jamur tiram memberikan hasil uji positif di mana pada uji metode Bouchardat, Mayer dan Dragendorff menghasilkan endapan berturut-turut yaitu endapan coklat, putih dan merah jingga (Tabel 4.9). Pada hasil uji ekstrak air jamur tiram menunjukkan hasil positif pada dengan menggunakan metode Bouchardat dan Mayer namun hasil negatif pada uji Dragendorff di mana tidak terbentuk endapan. Pada hasil uji ekstrak etanol 70% jamur tiram didapatkan hasil uji positif pada uji Bouchardat, Mayer dan Dragendorff di mana terbentuk endapan (Tabel 4.19).

Identifikasi saponin dilakukan dengan pengocokan serbuk simplisia dalam air suling panas. Hasil positif diamati melalui banyak dan stabilnya busa yang terbentuk. Pada hasil uji ini simplisia jamur tiram menunjukkan hasil positif (Tabel 4.10). Pada hasil uji ekstrak, terbentuk busa namun tidak sebanyak pada simplisia, pada ekstrak 70% etanol, busa hilang setelah penambahan 1 tetes HCl 2N (Tabel 4.20). Hal ini dimungkinkan karena sifat saponin yang memang lebih mudah larut dalam air dibandingkan dalam etanol 70%.

Pengamatan identifikasi flavonoid adalah melalui lapisan amil alkohol berwarna jingga atau merah jingga yang terbentuk. Hasil uji pada simplisia maupun ekstrak adalah negatif (Tabel 4.11 dan 4.21). Hal ini sama dengan hasil penelitian oleh Mattila et al (2001) dan Iwalokun et al. (2007) di mana pada uji kandungan flavonoid menunjukkan hasil yang negatif. Tidak adanya kandungan flavonoid pada jamur mungkin disebabkan oleh perbedaan ekologi atau tempat tumbuh.

Identifikasi senyawa fenol menggunakan larutan Folin-ciocalteu di mana hasil positif bila terbentuk warna kuning kehijauan atau hijau. Hasil uji pada simplisia dan ekstrak adalah positif (Tabel 4.13 dan 4.22). Dari warna yang terlihat, ekstrak 70% etanol menunjukkan warna yang lebih hijau dibandingkan pada ekstrak air sehingga diasumsikan bahwa kadar fenol pada ekstrak etanol 70% lebih tinggi.

Identifikasi tanin dilakukan dengan reaksi warna  $\text{FeCl}_3$ . Inti fenolik yang terdapat pada tanin dan ion  $\text{Fe}^{3+}$  dari pereaksi  $\text{FeCl}_3$  akan membentuk senyawa kompleks berwarna. Warna biru kehitaman menunjukkan tanin terhidrolisis sedangkan warna hijau kecoklatan menunjukkan adanya tanin terkondensasi (Trease and Evans, 1989). Pada hasil uji simplisia dan ekstrak, warna yang terbentuk adalah kuning kecoklatan yang menunjukkan hasil negatif (Tabel 4.13 dan 4.23).

Untuk identifikasi ekstrak kering jamur tiram dilakukan juga uji total fenol dengan asam galat sebagai larutan standar. Kandungan total fenol dinyatakan sebagai milligram per mL dari ekivalen asam galat (*Gallic Acid Equivalent* = GAE). Pengujian dilakukan secara triplo. Dari hasil uji kedua ekstrak yang berbeda terlihat perbedaan kandungan total fenol di mana kandungan total fenol pada ekstrak etanol jamur tiram lebih tinggi persentasenya dibandingkan pada ekstrak air (Tabel 4.28 dan 4.29). Persentase yang rendah dari kandungan total fenol diduga ada hubungan

dengan perbedaan basah miselium dan berat basah. Penelitian yang dilakukan oleh Nwanze et al.(2005) terhadap *Lentinus squarrosulus* dan *Psanthyrella atroumbonata* menunjukkan bahwa komposisi media dan minyak berpengaruh pada biomassa miselium. Oleh karena itu penelitian ke depan perlu diperhtaikan kondisi optimum tempat tumbuh jamur tiram sehingga dapat diperoleh kandungan fenol yang optimal

Kandungan fitokimia pada ekstrak organik dapat diidentifikasi secara kualitatif menggunakan kromatografi lapis tipis (Trease and Evans, 1989). Pada uji KLT digunakan fase gerak butanol : asam asetat : air = 100 : 10 : 10 (Alam N. *et al.*, 2010).

#### 4.4 Standardisasi Simplisia dan Ekstrak Jamur Tiram

Simplisia yang diekstraksi mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat dan derajat keasaman. (Depkes, 2008). Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Kejegan kadar senyawa aktif merupakan syarat mutlak mutu ekstrak yang diproduksi. Oleh sebab itu setiap simplisia dan ekstrak harus distandardisasi.

Standardisasi terhadap simplisia dan ekstrak dilakukan sesuai pedoman pada Farmakope Herbal Indonesia, 2008. Namun karena jamur tiram belum tercatat pada Farmakope maka hasil uji yang didapat tidak dapat dibandingkan dengan standardisasi pada Farmakope.

Standardisasi simplisia meliputi identitas simplisia berupa pemerian, susut pengeringan, kadar abu total, sari larut air dan sari larut dalam etanol. Tidak dilakukan standarisasi kandungan kimia. Standarisasi ekstrak meliputi rendemen, pemerian, kelarutan dalam air dan etanol 96%, susut pengeringan, dan penetapan kadar fenol total.

Peneliti melampirkan data pemeriksaan mikrobiologi guna menjamin bahwa simplisia dan ekstrak tidak boleh mengandung mikroba patogen dan non patogen

yang melebihi batas yang ditetapkan karena akan berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan berbahaya bagi kesehatan (toksik) (Lampiran 3).

#### **4.5 Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Menggunakan Metode DPPH**

Aktivitas antioksidan dari ekstrak air dan etanol 70% jamur tiram diukur untuk dievaluasi guna menemukan sumber antioksidan alami yang baru. DPPH umum digunakan sebagai substrat untuk menguji aktivitas antioksidan karena sifatnya yang stabil dalam bentuk radikal bebas dan merupakan uji yang sederhana, cepat dan murah (Bozin, *et al*, 2008).

Prinsip kerja metode DPPH adalah berdasarkan adanya senyawa antioksidan (AH) yang mendonorkan hidrogen (H) pada DPPH sehingga mengubah radikal bebas DPPH yang berwarna ungu menjadi berwarna kuning pucat. Kemudian dengan spektrofotometer UV-Vis diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum. DPPH yang tersisa diukur serapannya menurut jangka waktu tertentu. Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi dimana sampel uji menghambat DPPH sebesar 50%. Peneliti menggunakan metanol sebagai pelarut pada uji aktivitas antioksidan karena metanol memberikan absorbansi yang tinggi (Sharma & Bhat, 2009)

##### **4.5.1 Pembuatan Larutan Uji**

Larutan uji dibuat dengan cara melarutkan terlebih dahulu ekstrak air dengan air dan ekstrak etanol 70% dengan etanol 70% karena ekstrak tidak larut sempurna di metanol. Pelarut air dan etanol umum digunakan dalam spektrofotometri UV-vis karena tidak mempengaruhi absorbansi. Konsentrasi induk dibuat 10.000  $\mu\text{g/mL}$  untuk kemudian diencerkan menggunakan metanol sebagai pelarut secara berturut-turut sehingga didapatkan konsentrasi larutan uji sebesar 12,5; 25; 50; 75; 100; 125; dan 150  $\mu\text{g/mL}$ .

Pada proses pembuatan larutan uji ada perbedaan perlakuan antara ekstrak etanol 70% dan ekstrak air di mana dilakukan penyaringan pada ekstrak etanol 70%. Peneliti melakukan penyaringan dengan alasan larutan ekstrak etanol 70% masih berupa larutan keruh disebabkan adanya penambahan filler. Sedangkan kejernihan larutan merupakan salah satu syarat pada uji spektrofotometer (Harmita, 2006).

#### 4.5.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebelum pengujian aktivitas antioksidan dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum dengan menggunakan larutan kontrol yang ditambahkan DPPH. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer dengan interval panjang gelombang 400-600 nm. Hasil pengukuran menunjukkan panjang gelombang maksimum adalah 517,5 nm (Gambar 4.10).

#### 4.5.3 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan DPPH

Metode uji yang dilakukan, peneliti merujuk pada penelitian sebelumnya oleh Alam N. et al. (2010) di mana 4 mL larutan sampel ditambah 1 mL larutan DPPH. Konsentrasi DPPH pada penelitian sebelumnya adalah 0,2 mM namun pada penelitian ini, peneliti menaikkan konsentrasi DPPH menjadi 0,3 mM karena pada uji pendahuluan, penggunaan konsentrasi DPPH sebesar 0,2 mM, hasil absorbansi di bawah 0,1. Sedangkan absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya antara 0,2 sampai 0,8. Anjuran ini berdasarkan anggapan bahwa pada kisaran nilai absorbansi tersebut kesalahan fotometrik yang terjadi adalah paling minimal (Depkes, 2008).

Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% jamur tiram menghasilkan persentasi penghambatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak air.  $IC_{50}$  dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan persen penghambatan (% inhibisi) sebagai sumbu y.  $IC_{50}$  ekstrak air jamur tiram adalah 96,68  $\mu\text{g/mL}$  dan ekstrak etanol 70% adalah 79,03  $\mu\text{g/mL}$  (Tabel 4.1). Menurut Blois (1958) suatu bahan alam (*raw material*) dikatakan sebagai antioksidan kuat jika memiliki nilai  $IC_{50}$  kurang dari

200 µg/mL sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak jamur air jamur tiram maupun ekstrak etanol 70% memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.

Jika dibandingkan dengan asam askorbat (vitamin C), nilai  $IC_{50}$  adalah 1,41 µg/mL (Tabel 4.2) maka nilai  $IC_{50}$  adalah jauh lebih kecil dibandingkan ekstrak jamur tiram. Hal tersebut terjadi karena ekstrak bukan merupakan senyawa murni seperti vitamin C.

**Tabel 4.1** Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak jamur tiram dengan metode DPPH

Zat Uji	Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas peredaman (%)	Fungsi	$IC_{50}$ (µg/mL)
<b>Ekstrak air jamur tiram</b>	12.5	3,40	$y = 0,5380x - 0,8232$ $R^2 = 0,9952$	<b>94,4674</b>
	25	13,58		
	50	28,24		
	75	40,28		
	100	52,47		
	125	65,59		
	150	77,31		
<b>Ekstrak etanol 70% jamur tiram</b>	12.5	8,40	$y = 0,5886x + 3,4815$ $R^2 = 0,9846$	<b>79,0324</b>
	25	21,15		
	50	34,68		
	75	42,92		
	100	65,63		
	125	76,21		
	150	78,38		

**Tabel 4.2** Hasil uji aktivitas antioksidan asam askorbat dengan metode DPPH

Zat Uji	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas peredaman (%)	Fungsi	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
Asam askorbat	0,5	12,87	$Y = 40,86x - 7,491$ $R^2 = 0,996$	<b>1,41</b>
	0,75	24,66		
	1	31,01		
	1,5	54,96		
	2	73,99		

#### 4.6 Pengukuran Aktivitas Penghambatan Tirosinase

##### 4.6.1 Uji Pendahuluan

Sebelum uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase dilakukan, dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu yang bertujuan untuk mencari kondisi yang optimum untuk uji aktivitas. Variabel yang dioptimasi pada uji pendahuluan pada penelitian ini meliputi 2 (dua) hal yaitu konsentrasi enzim tirosinase dan konsentrasi L-DOPA sebagai substrat. Uji pendahuluan dilakukan dengan membuat variasi dan kombinasi konsentrasi enzim dan substrat yang mengacu pada penelitian serupa oleh Alam N. *et al.* (2010).

Pada penelitian ini penghambatan produk (dopakrom) oleh reaksi L-DOPA-tirosinase ditandai dengan terbentuknya warna coklat. Adanya inhibitor menyebabkan reaksi L-DOPA-tirosinase berjalan lambat yang ditandai dengan penurunan intensitas warna coklat. Penentuan intensitas warna coklat ini diukur dengan *microplate reader*. Serapan yang diperoleh (absorbansi) digunakan untuk mengetahui seberapa besar aktivitas ekstrak jamur tiram dalam menghambat reaksi L- DOPA- enzim tirosinase.

Uji pendahuluan pertama adalah optimasi konsentrasi enzim tirosinase. Konsentrasi enzim yang digunakan pada penelitian oleh Alam N. *et al.* (2010) adalah 31 U/mL sehingga peneliti mencoba membuat variasi konsentrasi enzim

menjadi 31; 15; 7,5 dan 3,25 U/mL. Konsentrasi enzim tersebut dipasangkan pada dua variasi konsentrasi substrat 5 dan 2,5 mM (Alam N. *et al.*, 2010). Dari uji yang dilakukan ternyata hasil absorbansi di bawah 0,1 sedangkan absorbansi yang terbaca pada *microplate reader* hendaknya antara 0,2 sampai 0,8. Anjuran ini berdasarkan anggapan bahwa pada kisaran nilai absorbansi tersebut kesalahan fotometrik yang terjadi adalah paling minimal.

Peneliti kemudian menaikkan jumlah unit enzim menjadi 310 U/mL di mana diharapkan penambahan enzim menjadi 10 kali lipat akan meningkatkan absorbansi dan ada penelitian sebelumnya yang menggunakan enzim tirosinase sampai 333 U/mL untuk uji aktivitas penghambatan tirosinase (Batubara, et al, 2010). Selanjutnya peneliti mencoba kembali membuat variasi konsentrasi enzim menjadi 310; 155 dan 75 U/mL yang dipasangkan pada dua variasi konsentrasi substrat yaitu 2,5 dan 5 mM.

Pada konsentrasi enzim 310 U/mL, data absorbansi yang terbaca pada *microplate reader* adalah 0,402 dan 0,548 pada konsentrasi substrat 2,5 dan 5 mM. Semakin kecil konsentrasi enzim, absorbansi makin rendah. Oleh karena itu, peneliti memilih konsentrasi enzim 310 U/mL karena data absorbansi tersebut dinilai cukup baik untuk digunakan pada uji aktivitas karena tidak terlalu tinggi sehingga masih dapat terbaca oleh *microplate reader* dan juga tidak terlalu rendah sehingga peningkatan aktivitas penghambatan enzim oleh sampel pada uji aktivitas dapat diamati. Hasil optimasi konsentrasi enzim dapat dilihat pada Tabel 4.32.

Uji pendahuluan yang kedua adalah optimasi konsentrasi L-DOPA sebagai substrat yang bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi substrat yang optimum. Konsentrasi substrat yang digunakan pada uji aktivitas diharapkan dapat memenuhi sisi aktif enzim tempat substrat berikatan dengan enzim. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 20; 10; 5; 2,5; 1,25; dan 0,625 mM. Hasil optimasi konsentrasi substrat dapat dilihat pada Tabel 4.33.

Data absorbansi yang didapat terlihat cukup stabil pada konsentrasi substrat 5; 10; dan 20 mM. Pada konsentrasi 2,5 mM terjadi penurunan data absorbansi yang terus menurun pada konsentrasi substrat 1,25 dan 0,625 mM. Hal ini menunjukkan pada konsentrasi 5 mM, 10 mM dan 20 mM sisi aktif enzim telah terisi penuh oleh

substrat. Sedangkan pada konsentrasi substrat 2,5 mM dan yang lebih kecil lagi, sisi aktif enzim belum terpenuhi. Hal ini menjadi alasan peneliti akhirnya memutuskan untuk menggunakan konsentrasi L-DOPA 5 mM sebagai substrat dalam uji aktivitas. Konsentrasi 10 mM dan 20 mM tidak dipilih karena pada konsentrasi 5 mM sisi aktif enzim dianggap sudah terpenuhi sehingga tidak dibutuhkan konsentrasi substrat yang lebih besar lagi.

#### 4.6.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebelum pengujian aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum dengan menggunakan larutan blanko. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* pada beberapa panjang gelombang (450; 490 dan 510 nm). Hasil pengukuran menunjukkan panjang gelombang maksimum adalah 490 nm.

#### 4.6.3 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase

Pada uji aktivitas, ada 4 (empat) jenis larutan yang diuji, yaitu larutan sampel, blanko sampel, kontrol dan blanko kontrol. Larutan sampel sendiri dibuat variasi konsentrasi yaitu 2000, 1000, 500, 250 dan 125  $\mu\text{g/mL}$ . Variasi konsentrasi dibuat agar dapat dibuat persamaan regresi untuk menghitung  $IC_{50}$  (*inhibitory concentration 50*).  $IC_{50}$  adalah konsentrasi yang mampu menghambat 50% aktivitas, dalam hal ini enzim tirosinase.

Larutan kontrol dibuat sebagai pembanding perbedaan data absorbansi antara larutan ekstrak yang diduga memiliki agen penghambat enzim tirosinase dengan yang tanpa agen penghambat enzim tirosinase. Sedangkan, larutan blanko baik untuk blanko kontrol maupun blanko sampel dibuat sebagai faktor koreksi.

Komponen-komponen yang ada dalam uji aktivitas ini adalah larutan dapar fosfat 0,1 M pH 6,8, 40  $\mu\text{L}$  larutan L-DOPA 5 mM sebagai substrat dan 40  $\mu\text{L}$  larutan enzim tirosinase sebanyak 310 U/mL dan 40  $\mu\text{L}$  larutan ekstrak. Volume total dalam *microplate reader* adalah 200  $\mu\text{L}$ . Selama uji aktivitas, larutan uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Suhu 37°C dipilih karena merupakan

suhu optimum bagi kerja enzim tirosinase. Dan waktu inkubasi 10 menit sudah dianggap cukup untuk enzim dapat bekerja.

Hasil uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh ekstrak air dan ekstrak etanol 70% jamur tiram secara terperinci dapat dilihat pada Tabel 4.3 Asam kojat dan asam askorbat digunakan sebagai pembanding dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4.4

**Tabel 4.3** Hasil uji penghambatan enzim tirosinase ekstrak jamur tiram

Zat Uji	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas peredaman (%)	Fungsi	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
<b>Ekstrak air jamur tiram</b>	125	18,37	$y = 32,01 x - 57,90$ $R^2 = 0,952$	<b>2,350</b>
	250	20,54		
	500	28,46		
	1000	34,42		
	2000	45,94		
<b>Ekstrak etanol 70% jamur tiram</b>	125	18,74	$y = 39,50 x - 70,52$ $R^2 = 0,996$	<b>1,125</b>
	250	24,14		
	500	36,21		
	1000	47,57		
	200	61,44		

Nilai IC<sub>50</sub> asam kojat yang didapatkan pada penelitian ini adalah 29,188  $\mu\text{g/mL}$  dan asam askorbat adalah 22,20  $\mu\text{g/mL}$ . Asam askorbat memiliki persentase penghambatan sedikit lebih tinggi dibandingkan asam kojat. Jika dibandingkan dengan nilai IC<sub>50</sub> kontrol positif (asam kojat dan asam askorbat), aktivitas

penghambatan oleh ekstrak air maupun etanol 70% jamur tiram lebih rendah yaitu 2,35 mg/mL dan 1,125 mg/mL. Hal ini disebabkan karena jamur tiram yang digunakan masih berbentuk *crude extract* sehingga kemungkinan masih banyak komponen yang berpengaruh.

**Tabel 4.4** Hasil uji penghambatan enzim tirosinase asam kojat dan asam askorbat

Zat Uji	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas peredaman (%)	Fungsi	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Asam kojat	2	8,75	$y = 35,96x - 2,690$ $R^2 = 0,994$	29,188
	5	24,03		
	10	31,16		
	20	42,69		
	50	70,57		
Asam askorbat	5	10,96	$y = 57,62x - 27,58$ $R^2 = 0,996$	22,20
	10	35,77		
	20	46,73		
	40	65,00		
	80	81,54		

Kemampuan menghambat enzim tirosinase tergantung dari gugus hidroksil dari komponen fenol yang terkandung pada ekstrak jamur tiram di mana ikatan hidrogen berikatan dengan sisi enzim yang kemudian menghambat aktivitas enzim. Ekstrak etanol 70% jamur tiram mempunyai kandungan total fenol yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak air dan hasil ini sebanding dengan aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase di mana nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol 70% lebih kecil dibandingkan ekstrak air.

### 4.6.3 Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim Tirosinase

Penentuan kinetika penghambatan enzim dilakukan dengan menggunakan 4 (empat) konsentrasi yang berbeda dari L-DOPA sebagai substrat dan 2 (dua) konsentrasi berbeda dari ekstrak etanol jamur tiram. Konsentrasi L-DOPA yang digunakan adalah 0,625; 1,25; 2,5 dan 5 mM. Sedangkan konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah konsentrasi 500 dan 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Variasi konsentrasi substrat dan larutan ekstrak dikombinasikan dan masing-masing diukur absorbansinya. Selain itu kontrol atau larutan tanpa ekstrak (penghambat) juga dibuat dan dikombinasikan dengan variasi konsentrasi substrat yang sama, kemudian diukur absorbansinya. Data absorbansi kinetika penghambatan enzim tirosinase dapat dilihat pada Tabel 4.38.

Mekanisme penghambatan kerja enzim tirosinase dapat diperkirakan melalui penentuan nilai konstanta *Michaelis-Menten* ( $K_m$ ) dan plot *Lineweaver-Burke*. Penghambat kompetitif memiliki nilai  $K_m$  yang meningkat dibandingkan tanpa penghambat, sedangkan penghambat non kompetitif memiliki nilai  $K_m$  yang lebih kecil dengan tanpa penghambat. Pada Tabel 4.39 dapat dilihat nilai  $K_m$  dari dua variasi konsentrasi larutan ekstrak terlihat bahwa lebih kecil dibandingkan kontrol.

Perbedaan plot *Lineweaver-Burke* antara penghambat kompetitif dan non kompetitif adalah kurva penghambat kompetitif-kontrol berpotongan di sumbu y dan kurva penghambat non kompetitif- kontrol berpotongan di sumbu x. Kurva plot *Lineweaver-Burke* konsentrasi larutan ekstrak dan kontrol dapat dilihat pada Gambar 4.22. Pada gambar tersebut terlihat bahwa perpotongan terjadi di sumbu x dan hal ini sesuai dengan nilai  $K_m$  dan disimpulkan bahwa tipe penghambatan oleh ekstrak etanol jamur tiram adalah non kompetitif.

## 4.7 Formulasi

Dari hasil uji aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase, peneliti melanjutkan ke formulasi di mana ekstrak etanol 70% jamur tiram yang digunakan untuk membuat formula gel karena dari hasil uji aktivitas menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan ekstrak air.

Peneliti memilih sediaan gel dengan alasan bentuk gel mempunyai beberapa keuntungan antara lain tidak lengket, mudah dioleskan, tidak meninggalkan lapisan berminyak pada kulit, viskositas gel tidak mudah mengalami perubahan selama penyimpanan (Lieberman,1989).

Pada formulasi, peneliti menggunakan Ultrez-20 sebagai *gelling agent*. Ultrez 20 adalah termasuk golongan karbomer. Alasan pemilihan Ultrez-20 sebagai *gelling agent* karena beberapa keuntungan dari karbomer ini antara lain (TDS-332, 2006) :

- a. Dalam pembuatan sediaan gel, Ultrez-20 mempunyai sifat cepat membasahi dan meningkatkan pengembangan gel (*swelling*)
- b. Ultrez-20 mempunyai viskositas sedang sampai tinggi dengan sifat aliran yang baik, juga rentang pH yang luas.
- c. Ultrez-20 memberikan kejernihan yang baik pada sediaan gel sehingga secara estetika sediaan gel terlihat halus dan bagus.
- d. Walaupun dalam konsentrasi tinggi, Ultrez-20 tetap memberikan kejernihan yang baik.
- e. Viskositas, kejernihan dan stabilitas dapat dipertahankan dengan adanya kombinasi elektrolit dan Ultrez-20 sehingga karbomer ini cocok dipakai untuk formula yang menggunakan bahan herbal maupun bahan dengan kandungan minyak tinggi.

Untuk konsentrasi formula, dibuat 3 (tiga) formula dengan konsentrasi 0,2; 0,4 dan 0,8%. Peneliti juga membuat formula sebagai kontrol negatif yaitu sediaan yang hanya mengandung basis gel dan formula sebagai kontrol positif yaitu yang mengandung asam askorbat dengan konsentrasi 0,5%.

#### **4.8 Uji Stabilitas Fisik**

Setelah terbentuk gel dilakukan evaluasi fisik dengan parameter-parameter yang meliputi pengamatan organoleptis, homogenitas, pengukuran pH, sifat aliran dan konsistensi dari sediaan gel.

#### 4.8.1 Pengamatan Organoleptis

Hasil evaluasi dari pengamatan organoleptis, ketiga konsentrasi gel mempunyai perbedaan warna di mana makin besar konsentrasi gel, warna gel lebih kuning (Tabel 4.40). Begitu pula dengan bau, makin besar konsentrasi bau khas jamur makin tercium. Ketiga formula tidak menunjukkan terjadi sineresis. Pemeriksaan homogenitas terhadap ketiga gel menunjukkan ketiga formula gel homogen secara fisik, hal ini menunjukkan bahwa bahan-bahan dalam gel terlarut dan bercampur sempurna secara homogen.

#### 4.8.2 Pengukuran pH

Perbedaan konsentrasi ekstrak jamur tiram diketahui dapat mempengaruhi pH sediaan. Dari hasil pengukuran pH sediaan dengan menggunakan pHmeter diperoleh nilai pH yang semakin kecil seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak jamur tiram dalam gel, yaitu gel dengan konsentrasi ekstrak 0,2% diperoleh pH sebesar 5,92; gel dengan konsentrasi 0,4% diperoleh pH sebesar 5,83; gel dengan konsentrasi ekstrak 0,8% diperoleh pH sebesar 5,81 (Tabel 4.40). Dari hasil pengukuran pH ini dapat disimpulkan bahwa bertambah tinggi konsentrasi ekstrak jamur tiram yang terdapat dalam gel maka pH gel akan bertambah asam dan ketiga formula gel tersebut memiliki pH yang sesuai dengan pH *balance* kulit yaitu antara 4,5 - 6,5.

#### 4.8.3 Pengukuran Viskositas dan Sifat Alir

Pada hasil uji viskositas minggu awal (minggu ke-0) menunjukkan adanya peningkatan viskositas seiring dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak jamur tiram dalam gel (Tabel 4.43). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak jamur tiram mempengaruhi viskositas gel. Pada minggu ke-12, viskositas gel 0,8% mengalami penurunan (Tabel 4.50). Berdasarkan pada reogram yang dihasilkan dapat disimpulkan bahwa gel 0,2% memiliki sifat alir plastis pada minggu awal namun setelah penyimpanan 12 minggu sifat alir terlihat plastis tiksotropi (Gambar 4.31) sedangkan gel 0,4 dan 0,8% memiliki aliran plastis tiksotropi di minggu awal maupun setelah penyimpanan selama 12 minggu (Gambar 4.32 dan 4.33). Aliran

tiksotropik termasuk dalam sifat aliran cairan *non-Newton* (Martin, Swarbick dan Cammarata, 1983). Tiksotropi adalah suatu sifat yang diharapkan dalam suatu sediaan farmasetika, yaitu mempunyai konsistensi tinggi dalam wadah namun dapat dituang dan tersebar dengan mudah.

#### 4.8.4 Pengukuran Konsistensi

Sediaan yang baik memiliki nilai *yield value* di antara 100 – 1000 dyne/cm<sup>2</sup> (Martin, AN., Swarbick J., Cammarata, A. 1969). Semakin rendah nilai *yield value*, semakin mudah sediaan menyebar. Sebaliknya semakin tinggi nilai *yield value*, semakin sulit sediaan tersebar ketika diaplikasikan pada kulit. Hasil evaluasi dari gel 0,2% menunjukkan angka kedalaman penetrasi sebesar 380 1/10 mm, gel 0,4% menunjukkan angka kedalaman penetrasi sebesar 360 1/10 mm dan gel 0,8% menunjukkan angka kedalaman penetrasi sebesar 360 1/10 mm (Tabel 4.41).

#### 4.9 Uji Stabilitas Gel

Uji stabilitas dilakukan pada suhu penyimpanan yang berbeda-beda dengan memperhitungkan suhu dan kelembaban yaitu suhu rendah ( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) RH 65%, suhu kamar ( $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) RH 65%, dan suhu tinggi ( $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) RH 75%. Tujuan dilakukan uji stabilitas untuk mengetahui apakah terjadi perubahan fisik pada ketiga formula gel yang disimpan selama 12 minggu pada suhu yang berbeda-beda (Ansel, 1989). Pengamatan yang dilakukan meliputi organoleptis, pH, viskositas dan konsistensi.

##### 4.9.1 Penyimpanan pada suhu $4\pm 2$ , $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ RH 65%, dan $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ RH 75%

###### a. Pengamatan organoleptis dan homogenitas

Hasil pengamatan organoleptis ketiga gel pada suhu  $4\pm 2$ ,  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  RH 65%, dan  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  RH 75% selama 12 minggu tidak menunjukkan adanya sineresis dan tidak terjadi perubahan warna maupun bau (Tabel 4.44; Tabel 4.45 dan Tabel 4.46).

#### **b. Pengukuran pH**

Nilai pH dari suatu sediaan topikal harus berada dalam kisaran pH *balance* yang sesuai dengan pH kulit, yaitu 4,5-6,5. Nilai pH tidak boleh terlalu asam karena dapat menyebabkan iritasi kulit dan juga tidak boleh terlalu basa karena dapat menyebabkan kulit bersisik. Perubahan pH ketiga gel selama 12 minggu penyimpanan pada tiga suhu yang berbeda secara umum masih berada di dalam kisaran pH *balance* dan tidak terjadi perubahan yang cukup besar dari tiap minggunya. Perubahan PH pada penyimpanan suhu  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  dapat dilihat pada Tabel 4.47 dan Gambar 4.34, penyimpanan di suhu  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  pada Tabel 4.48 dan Gambar 4.35 dan penyimpanan di suhu  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  pada Tabel 4.49 dan Gambar 4.36.. Hal ini menunjukkan bahwa gel memiliki pH yang relatif stabil.

#### **4.9.2 Cycling test**

Tujuan dari *cycling test* adalah untuk mengetahui terbentuknya kristal atau tidak (Djajadisastra, 2004). Selain itu juga untuk mengetahui apakah terjadi sineresis atau tidak. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 4.42. Ketiga formula gel menunjukkan hasil yang stabil, yaitu tidak terbentuk adanya kristal. Selain itu ketiga formula gel tidak mengalami sineresis. Hal ini menunjukkan bahwa *gelling agent* karbomer dalam hal ini ultrez-20 stabil dan mampu mempertahankan penyerapan air dalam matriks.

#### **4.10 Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Gel**

Dari hasil uji terlihat bahwa persentase inhibisi ekstrak etanol 70% jamur tiram dalam sediaan gel lebih tinggi dibandingkan dalam bentuk *crude extract*. Hal ini mungkin disebabkan antioksidan dalam gel yaitu natrium metabisulfid masih ada dalam sediaan gel sehingga memberikan juga persentase penghambatan pada uji aktivitas antioksidan. Data juga menunjukkan bahwa semakin meningkat konsentrasi ekstrak, persentase inhibisi juga semakin meningkat (Tabel 4.5).

**Tabel 4.5** Hasil uji antioksidan sediaan gel ekstrak etanol 70% jamur tiram

Sediaan gel	Absorbansi	% inhibisi
Basis gel (kontrol)	0,342	
0,2%	0,162	52,63
0,4%	0,120	64,91
0,8%	0,101	70,47
Asam askorbat	0,011	96,78

#### 4.11 Uji Aktivitas Penghambatan Tirosinase Sediaan Gel

Data menunjukkan bahwa semakin meningkat konsentrasi ekstrak, persentase inhibisi juga semakin meningkat namun persentase inhibisi ekstrak pada sediaan gel lebih rendah dibandingkan dalam bentuk *crude extract* (Tabel 4.6).

**Tabel 4.6** Hasil uji aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase

Sediaan Gel	Absorbansi	% inhibisi
Basis gel (kontrol)	0,518	
0,2%	0,401	22,58
0,4%	0,370	29,15
0,8%	0,320	38,22
Asam askorbat	0,098	81,08

#### 4.12 Uji Keamanan kepada Sukarelawan

Sebelum dilakukan uji kemananan dilakukan terlebih dahulu skrining terhadap sukarelawan dengan cara mengisi data yang berisi daftar pertanyaan yang berkaitan dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Dari 14 orang sukarelawan, 12 orang yang memenuhi kriteria kemudian diminta membaca dan menandatangani *inform*

*consent* yang berisi penjelasan tentang prosedur uji, efek samping yang mungkin timbul dan hal-hal lain yang berkaitan dengan pengujian.

Setiap sukarelawan diolesi 2 (dua) macam gel yaitu yang berisi basis gel saja dan yang mengandung ekstrak jamur tiram. Pada 30 menit pertama, dilihat apakah ada reaksi seperti gatal atau kemerahan dan hasilnya dari 12 orang sukarelawan tidak menunjukkan reaksi yang disebutkan. Pengamatan dilanjutkan setelah 24 jam kemudian dan dari 12 orang sukarelawan tidak ada keluhan gatal atau nyeri dan pada pemeriksaan fisik tidak menunjukkan reaksi eritema maupun edema (Tabel 4.7). Para sukarelawan diolesi kembali dengan gel yang sama seperti di awal dan dilakukan pengamatan pada jam ke-48. Hasil pemeriksaan fisik menunjukkan tidak ditemukan adanya eritema maupun edema pada 12 orang sukarelawan (Gambar 4.37). Dilakukan skoring dari hasil uji untuk menghitung PII (*Primary Irritation Index*).

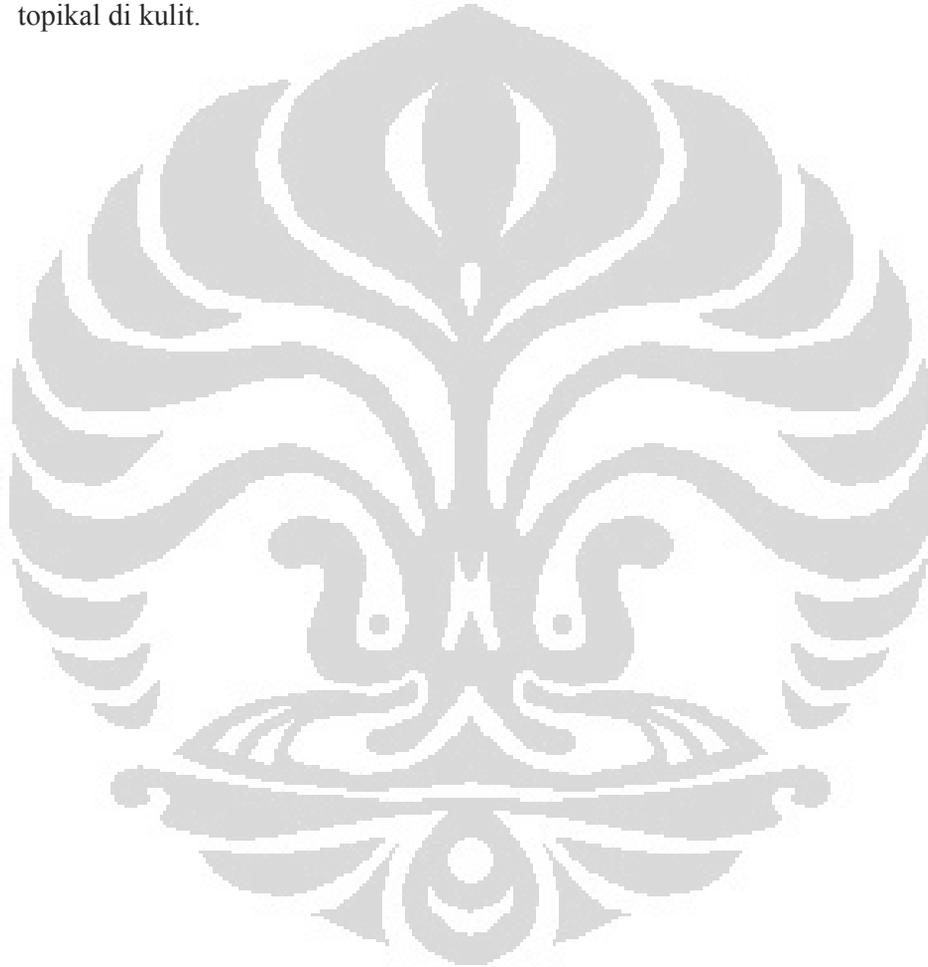
**Tabel 4.7** Hasil uji keamanan terhadap 12 orang sukarelawan

Sukarelawan	Skor			
	Jam ke-24		Jam ke-48	
	Basis Gel	Gel 0,8%	Basis Gel	Gel 0,8%
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0

$$PII = \frac{\text{Jumlah semua nilai eritema, eschar dan edema pada jam ke-24 dan 48}}{\text{Jumlah sukarelawan} \times \text{jumlah waktu pengamatan}}$$

$$PII = 0$$

Dari hasil perhitungan PII disimpulkan bahwa baik basis gel maupun sediaan gel 0,8% tidak menimbulkan reaksi iritasi sehingga aman untuk digunakan secara topikal di kulit.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

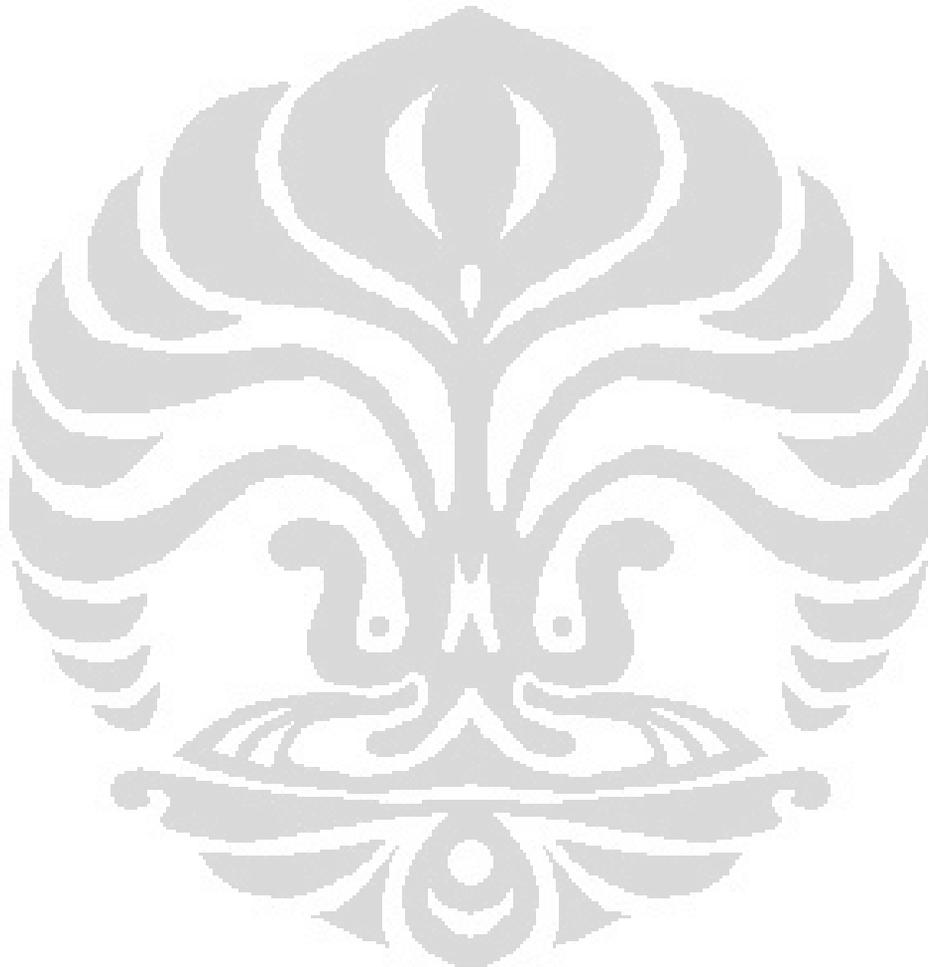
#### 5.1. Kesimpulan

- a. Hasil uji aktivitas antioksidan dan penghambatan terhadap enzim tirosinase, ekstrak etanol 70% menunjukkan nilai  $IC_{50}$  yang lebih baik ( $79,0324 \mu\text{g/mL}$ ;  $1,125 \text{ mg/mL}$ ) dibandingkan ekstrak air jamur tiram ( $94,4674 \mu\text{g/mL}$ ;  $2,350 \text{ mg/mL}$ ).
- b. Ekstrak etanol 70% jamur tiram dibuat sediaan gel dengan 3 (tiga) konsentrasi yaitu 0,2; 0,4 dan 0,8% dan hasil uji aktivitas antioksidan dan penghambatan terhadap enzim tirosinase pada formulasi gel menunjukkan persentase inhibisi sebagai berikut, gel 0,2% ( $52,63$ ;  $22,73\%$ ), gel 0,4% ( $64,9$ ;  $29,74\%$ ) dan gel 0,8% ( $70,47$ ;  $38,22\%$ ). Dari data dapat disimpulkan bahwa makin besar konsentrasi gel, persentase inhibisi makin meningkat.
- c. Hasil uji stabilitas fisik terhadap ketiga formula gel selama 12 minggu menunjukkan gel stabil pada kondisi penyimpanan suhu  $4\pm 2$ ;  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  RH 65 dan  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  RH 75.
- d. Hasil uji keamanan terhadap 12 orang sukarelawan terhadap gel 0,8% menunjukkan tidak ada iritasi sehingga aman digunakan secara topikal di kulit.

#### 5.2 Saran

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut meliputi fraksinasi dan karakteristik senyawa yang lebih spesifik dari ekstrak etanol 70% jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*).

- c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut meliputi penetapan kadar gel dan uji penetrasi ke kulit.
- d. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai uji manfaat gel jamur tiram pada manusia yang dalam hal ini sebagai pencerah kulit (*lightening agent*).



## DAFTAR PUSTAKA

- Alam.N. et al. (2010). Antioxidant activities and tyrosinase inhibitor effects of different extracts from *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *Mycobiology Journal*, 38 (4), 295 – 301.
- Alma M.H, Mavi A., Yildirim A., Digrak M. and Hirata T. (2003). Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biol. Pharm. Bull J.*, 26 (12), 1725 – 1729.
- Amiarsi D.,Yulianingsih dan Sabari SD. (2006). Pengaruh jenis dan perbandingan pelarut terhadap hasil ekstraksi minyak atsiri mawar. *Journal Horticultura*, 16 (4), 356 -359.
- Andayani R., Lisawati Y., Maimunah. (2008). Penentuan aktivitas antioksidan, kadar fenolat total dan likopen pada buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 13 (1), 1– 8.
- Ansel, C. H. (1989). *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi IV. Jakarta: UI-Press.
- ASEAN. (2005). ASEAN Guideline on Stability Study of Drug Product. Phillipines : ASEAN.
- Atkins, Peter, and Julio De Paula. (2006). *Physical Chemistry for the Life Sciences*. New York : W.H. Freeman and Company.
- Aulton, M. E. (1988). *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*. New York : Churchill Livingstone.
- Bagchi K., Puri S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 4, 350-360.
- Batubara I., Darusman L. K., Mitsunaga. Rahminiwati and Djauhari. E. (2010). Potency of Indonesian plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. *Journal of Biological Sciences*, 10 (2), 138 – 144.
- Bernatoniene J., et al. (2011). Topical application of *Calendula officinalis* (L.): Formulation and evaluation of hydrophilic cream with antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (6), 868 – 877.

- Bickers D., Athar M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 2565 – 2575
- Bozin B., Mimica Dukic N., Samojilik I., Goran A., Igetic R. (2008). Phenolics as antioxidant in garlic (*Allium sativum* L.). *Food Chemistry*, 111, 925 – 929.
- Chang T. Update review of tyrosinase inhibitors. (2009). *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2440 – 2475.
- Champe PC., Harvey RA. and Ferrier DR. (2005). *Biochemistry*. Philadelphia : Lippincot Williams and Wilkins.
- Chrinang P., Intrapichet K. (2009). Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *Science Asia Journal*, 35, 326 – 331.
- Colipa, the European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association. (1997). *Product test guidelines for the assessment of human skin compatibility*. European : Colipa.
- Darvin M., Yastrow L., Sterry W., Lademann J. (2006). Effect of supplement and topically applied antioxidant substances on human tissue. *Skin Pharmacol. Physio*, 19, 238 – 247.
- Debbie MP and Jennifer SK. (2010). Oxidative damage, skin aging, antioxidants and a novel antioxidant rating system. *Journal of Drugs in Dermatology*, 26 – 37.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2008). *Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi I. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Eka A dan Aprival H. (2010). Pengaruh konsentrasi etanol, suhu dan jumlah stage pada ekstraksi oleoresin jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) secara batch. Dalam skripsi untuk memperoleh gelar sarjana teknik. Fakultas Teknik Kimia Universitas Diponegoro.
- Enny K.A dan Fadilah. (2007). Pengaruh kecepatan putar dan suhu operasi pada ekstraksi tanin air jambu mete dengan pelarut aseton. *Ekuilibrum*, 6 (1), 33 - 38.

- Farnsworth NR. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 255 – 276.
- Fountoulakis et al. (2007). Removal of phenolics in olive mill wastewater using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res*, 36, 4735 – 4744.
- Gallibro J.M., Olsson M.J. (2011). The melanogenesis and mechanism of skin lightening agent- existing and new approach. *International Journal of Cosmetic Science*, 33, 210 –218.
- Gamse, T. (2002). *Liquid-Liquid Extraction and Solid-Liquid Extraction*. Graz University of Technology.
- Gembong T. (1986). *Toksonomi Tumbuhan*. Cetakan ke-1. Jakarta : Bharata Karya Aksara.
- Guo C., Yang J., Wei J., Li Y., Xu J., Jiang Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23, 1719-1726.
- Harbone J.B. (1987). *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung : Penerbit ITB.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Jakarta : Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Herrling T., Jung K., Fuchs J. (2007). The important role of melanin as protector against free radicals in skin. *SOFW Journal*, 133, 26- 32.
- Hirano R., et al. (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 47, 357-362.
- Ibekwe V.I., Azubuike P.I., Ezeji E.U., Chinakwe E.C. (2008). Effects of Nutrient Sources and Environmental Factors on the Cultivation and Yield of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(2), 349-351.
- Iswari Retno, Latifah. (2007). *Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik*. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Iwalokun B. A., Usen U.A., Otunba A.A., Olukoya D.K. (2007). Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*, 6 (15), 1732 – 1739
- Jacob RA. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, 15, 755-766.

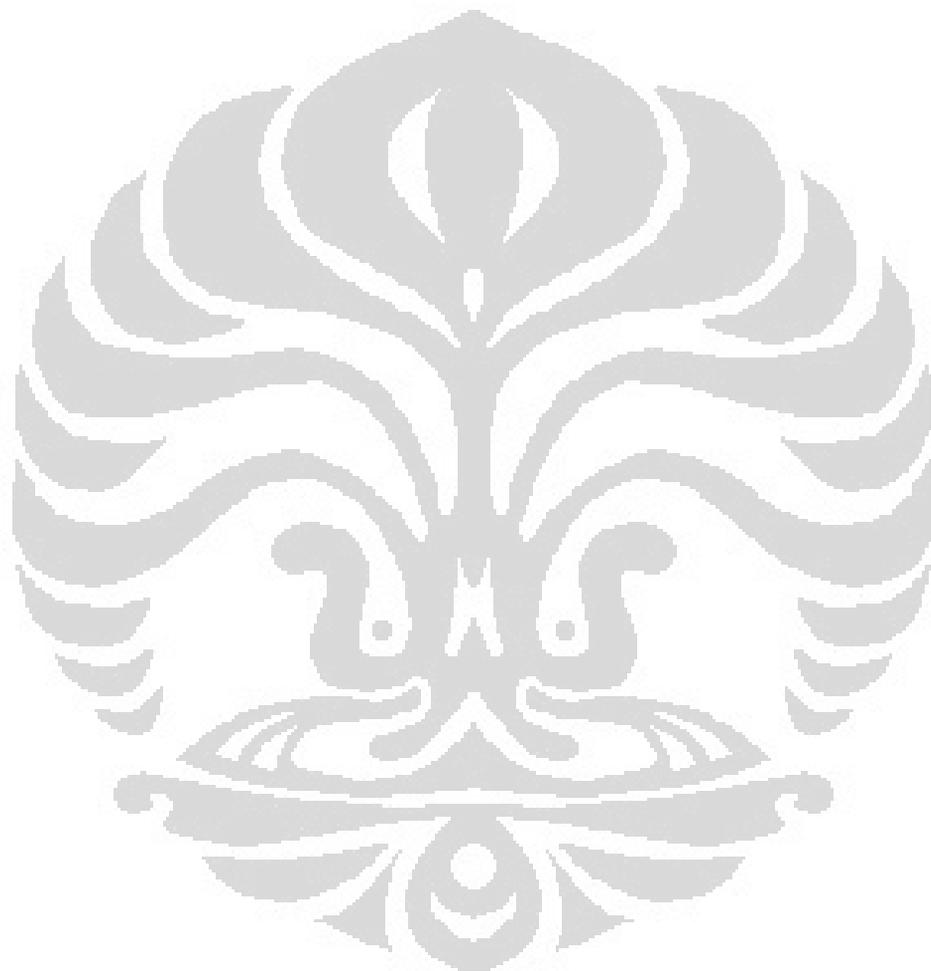
- Jayakumar T., Thomas PA., Geraldine P. (2007). Protective effect of an extract the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol*, 42, 183-91.
- Jeong-H. K, Sun-J.K, Hae -Ryong P., Jong-In C, Young-Cheoul J, Ki-Chang N, Suk-Ju K. and Seung-Cheol L. (2009). The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushroom. *Journal of Medicinal Plant Research*, 3 (12), 1016-1020.
- Jimenez-Escrig, Rincon M., Pulido R., Saura-Calixto. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5489 – 5493.
- Lin J. W., Chiang H.S., Lin Y.C., Wen K.C. (2008). Natural products with skin-whitening effects. 2008. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(2),1 -10.
- Lindequist U. (2005). The pharmacological potentials of mushrooms. *eCAM*, 2, 285 – 299.
- Lucas, Howard J., David Pressman. (1949). *Principles and Practice In Organic Chemistry*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Macrini DJ., Barbosa I., Varella A. D., Younes R.D., Ohara M.T. (2009). Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase in vitro evaluation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, 45, 715 – 721.
- Martin, AN., Swarbick J., Cammarata, A. (1969). *Physical Pharmacy*. 2<sup>nd</sup> Edition. London : Lea & Febiger Publisher.
- Masaki H. (2010). Role of antioxidant in the skin : Anti aging effects. *Journal Dermatology of Sciences*, 58, 85 – 90.
- McPherson RA. and Pincus MR. (2007). *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 21<sup>th</sup> Edition. Philadelphia : Elsevier.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Research*, 26, 195-199.
- Miller, H.E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A., and Kanter, M. (2000) Antioxidant Activity. *J. Am. Coll. Nutr.*, 19, 312S-319S.
- Mitsui T. (1997). *New Cosmetic Science*. Amsterdam : Elsevier Science B.V.

- Moon J. Y., Yim E. Y., Song G., Lee N. H., Hyun C. G. (2010). Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju island plants. *Eur Asian Journal of Bio Sciences*.
- Morganti P. Bruno C., Guarneri E., Cardillo A., Del Ciotto P.m Valenzano E. (2002). Role of topical and nutritional supplement to modify the oxidative stress. *International Journal Cosmetic of Science*, 24, 331 – 339.
- Narisa K., Narong M. and Charoen T. (2007). Screening of some tropical vegetables for anti-tyrosinase activity. *The Pharmaceutical and Health Science Journal*, 2, 15 – 19.
- Nithya N., Arun D., Balakhrisnan K.P. (2011). Screening of some medicinal plants for antityrosinase and antioxidant activities. *International Journal of Pharmtech Research*, 3 (2), 1107 – 1112.
- Nico S., Jana V., Stan P. (2009). The hunt for natural skin whitening agents. *International Molecular of Science*, 10, 5326 – 5349.
- Nwanze PI., Kahu AU., Ameh JB., Umoh VJ. (2005). The effects of interaction of various oil types and rates on the mycelia wet and dry weights of *Lentinus squarrosulus* (Mont.) singer and *Psathyrella atroumbonata* Pegler in submerged liquid culture. *African. Journal Biotechnology*, 4, 620 -626.
- Parvez S., et al. (2006). Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother Res Journal*, 20 (11), 921- 34.
- Patmashini L., Arulnandhy. R. S Wilson. (2008). Cultivation of oyster mushroom (*Pleorotus ostreatus*) on sawdust. *Cey J. Sci (Bio Sci.)*, 37, 177 – 182.
- Paul Stamets. (2005). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. 1<sup>st</sup> Edition. Canada : Ten Speed Press.
- Pham Huy et al. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health, *International Journal of Biomedical Science*.
- Poli G., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarpotto E. (2004). Oxidative stress and cell signaling, *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1163–1182.
- Pouillot A., et al. (2011). *Natural antioxidants and their effects on the skin. Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products*, 1<sup>st</sup> Edition. London : John Wiley & Sons, Inc.

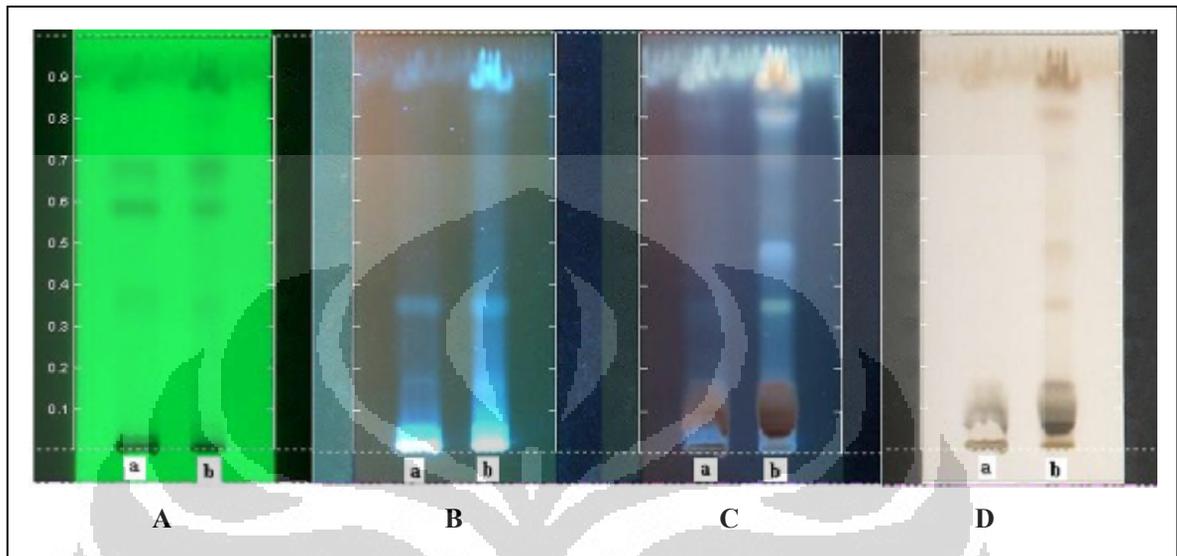
- Pratiwi E. (2009). Aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi aktif temu kunci (*Boesenbergia pandurata* Roxb.).
- Prior R.L., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B., Jacob R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (*oxygen radical absorbance capacity* (ORAC) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3273 – 3279.
- Qiushi C. (2009). Evaluate the effectiveness of the natural cosmetic product compared to chemical-based product. *International Journal of Chemistry*, 1, 57-59.
- Rahimah S.B., Sastramihardja H.S., Sitorus T.D. (2010). Efek antioksidan jamur tiram putih pada kadar malondialdehid dan kepadatan permukaan sel paru tikus yang terpapar asap rokok. *MKB*, 42 (4), 195 – 202.
- Redaksi Agromedia. (2009). *Bertanam jamur untuk konsumsi*. Cetakan I. Jakarta : PT. Agromedia Pustaka.
- Rieger M.M.(2000). *Harry's Cosmeticology*. 8<sup>th</sup> Edition. New York. : Chemical Publishing Co, Inc.
- Rowe R.W., Sheskey P.J., Quinn M. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipient*. 6<sup>th</sup> Edition. UK : Pharmaceutical Press.
- Rusdiana T., Musfiroh I., Nawang A. (2007). Formulasi antioksidan dari ekstrak seledri (*Apium graveolens* L.) dengan menggunakan Aqupec HV-505. *Makalah pada Kongres Ilmiah XV ISFI*.
- Sadick N., Lupo M., Berson D.S., Draelos Z.D. (2010). *Cosmeceutical Science in Clinical Practise*. UK : Informa Healthcare.
- Samuelsson G. (1999). *Drugs of natural origin*. 4<sup>th</sup> Edition. Stockholm : Swedish Pharmaceutical Press.
- Scientific Committee on Consumer Products. (2006). *The SCCP's notes on guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation*. 6<sup>th</sup> Revision.
- Sen S., Raja Chakraborty, C. Sridhar, Y. S. R. Reddy, Biplab De. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicine. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 3: 91 – 100.

- Sermakkani and Thangapandian. (2010). Phytochemical screening for active compounds in *Pedaliium murex* L. *Recent Research and Science Technology Journal*, 2 (1),110-114.
- Shai A., Maibach H., Baran R. (2009). *Handbook of Cosmetic Skin Care*. 2<sup>th</sup> Edition. UK : Informa Healthcare.
- Sharma Om P., Bhat Tej K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Journal of Food Chemistry*, 113, 1202 – 1205.
- Sies H., Stahl W., Sundquist AR. (1992). Antioxidant function of vitamins, vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids, *Annals of the New York Academy of Science*, 669, 7-20.
- Smit N., Vicanova J., Pavel S. (2009). The hunt for natural skin whitening agents. *Int J. Mol Sci*, 10, 2440 – 2475.
- Sudipta D., Haldar P.K., Pramanik. (2011). Formulation and evaluation of herbal gel containing *Clerodendron infotunatum* leaves extracts. *Int. Journal of PharmTech Research*, 3 (1), 140- 143.
- Tardiff RG, Hubner RP, Graves CG. (2003). Harmonization of thresholds for primary skin irritation from results of human repeated insult patch tests and laboratory animal skin irritation tests. *J Appl Toxicol* .23(4), 279-81.
- Tjokrokusumo D. (2008). Jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) untuk meningkatkan ketahanan pangan dan rehabilitasi lingkungan. *JRL*, 4, 53 – 62.
- Trease and Evans. (1989). *A Textbook of Pharmacognosy*. 8<sup>th</sup> Edition. London : Bailliere, Tindall and Cox.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. (2009). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.
- Venkatakrishnan, Shenbhagaraman R., Kaviyarasan V., Gunasundari D., Randhika K., Dandapani R., Jagadish L. (2010). Antioxidant and antiproliferative effect of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Phytology*, 2 (1), 22 – 28.
- Vinayak B., Randive. (2007). Natural ingredients for creating food textured cosmetics. *Cosmetic Science Technology Journal*.
- Westerhof W. and Kooyers TJ. (2005). Hydroquinone and its analogues in dermatology- a potential health risk. *Journal of Cosmetic Dermatology*.

Zhu W., Gao Jie. (2008). The use of botanical extracts as topical skin lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *Journal of Dermatology*, 3, 20 – 24.



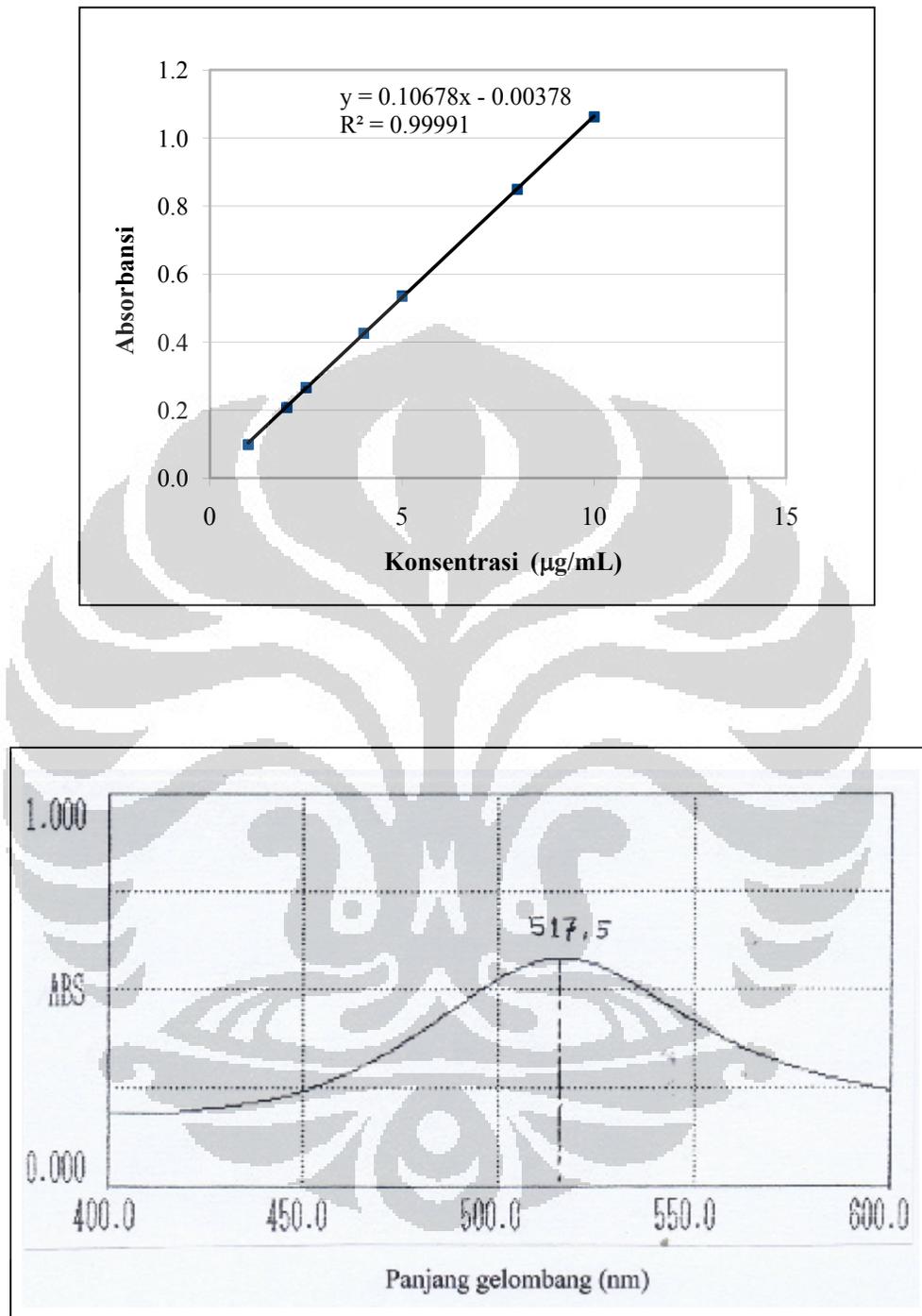




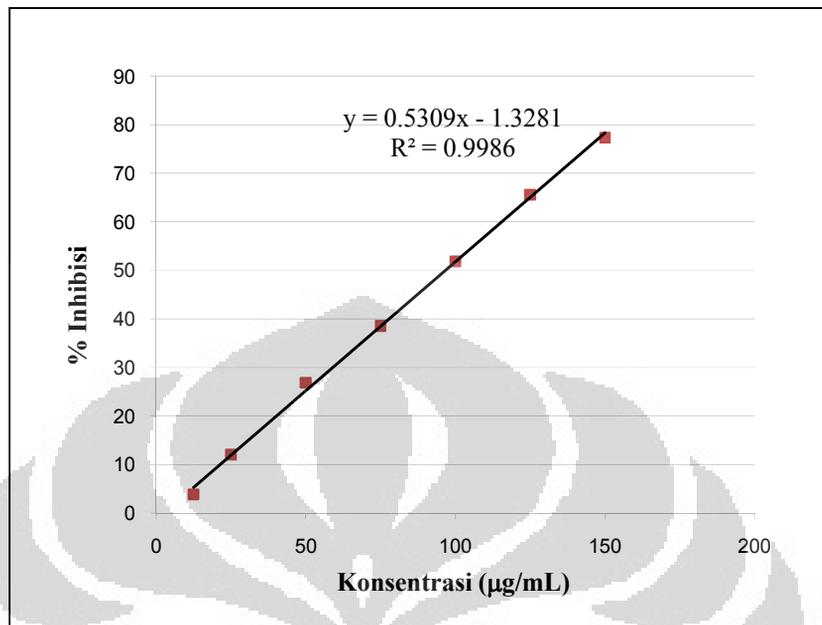
Keterangan : Kromatogram pada lempeng KLT silica gel G60 F<sub>254</sub> dengan eluen butanol : asam asetat : air = 100:10:10, volume penotolan 10  $\mu$ L, jarak elusi 8 cm, (a) Ekstrak air; (b) Ekstrak etanol 70% jamur tiram diamati :

A. di bawah sinar UV  $\lambda = 254$  nm ; B. di bawah sinar UV  $\lambda = 366$  nm; C. di bawah sinar UV  $\lambda = 366$  nm setelah disemprot dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% ; D. di bawah sinar *visible* setelah disemprot dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%.

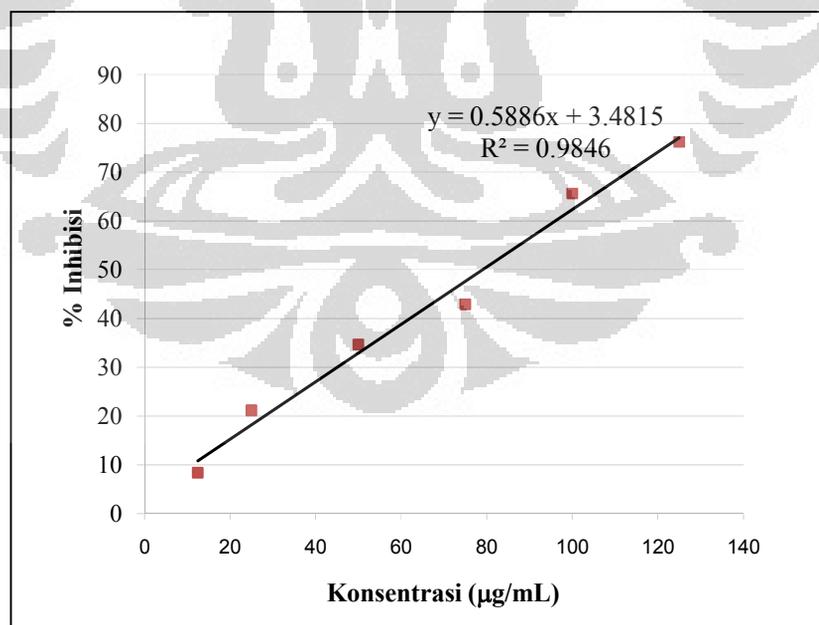
**Gambar 4. 8** Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak jamur tiram



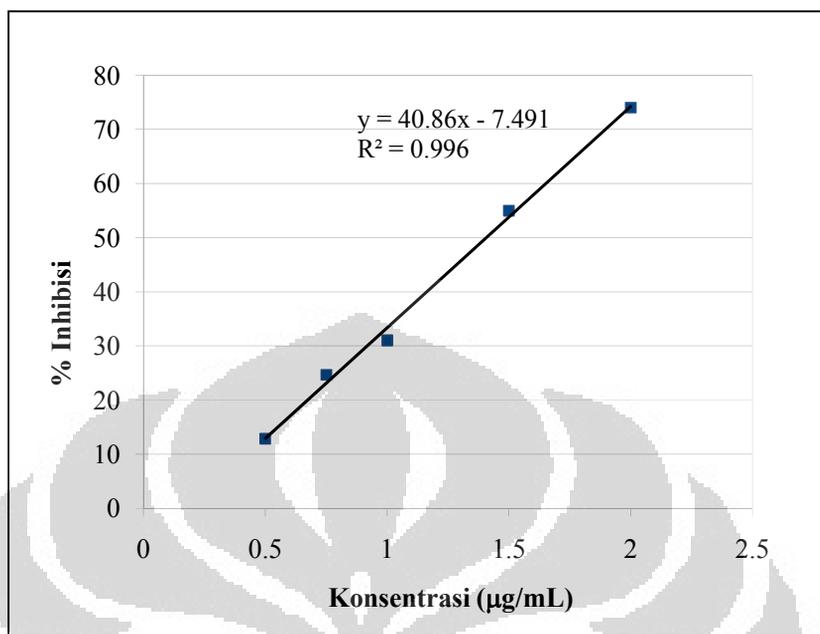
**Gambar 4.10** Kurva panjang gelombang maksimum DPPH



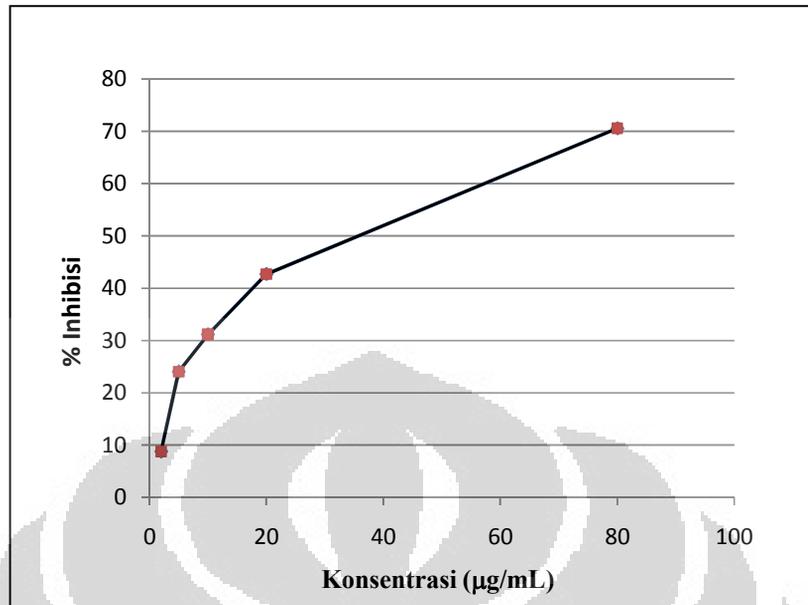
**Gambar 4.11** Kurva aktivitas antioksidan ekstrak air jamur tiram



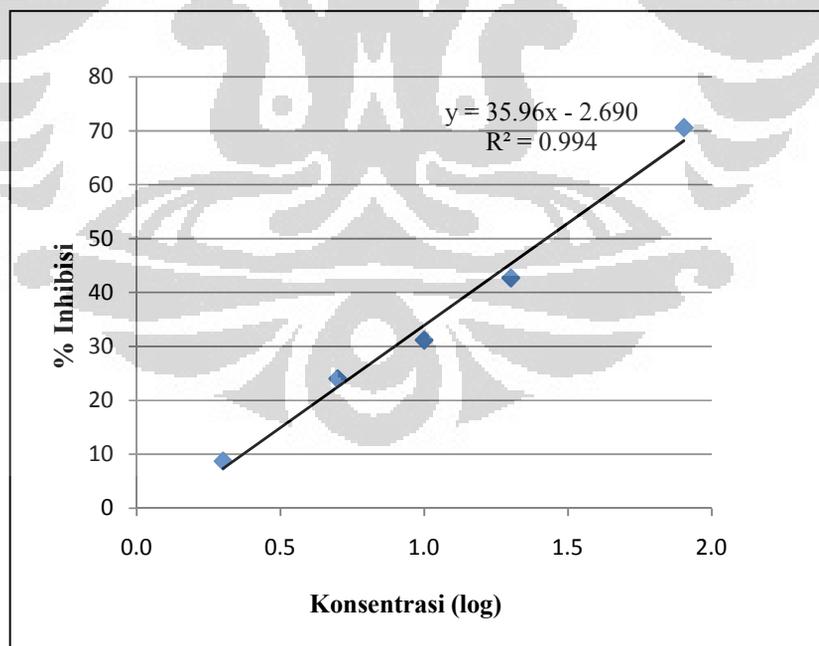
**Gambar 4.12** Kurva aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% jamur tiram



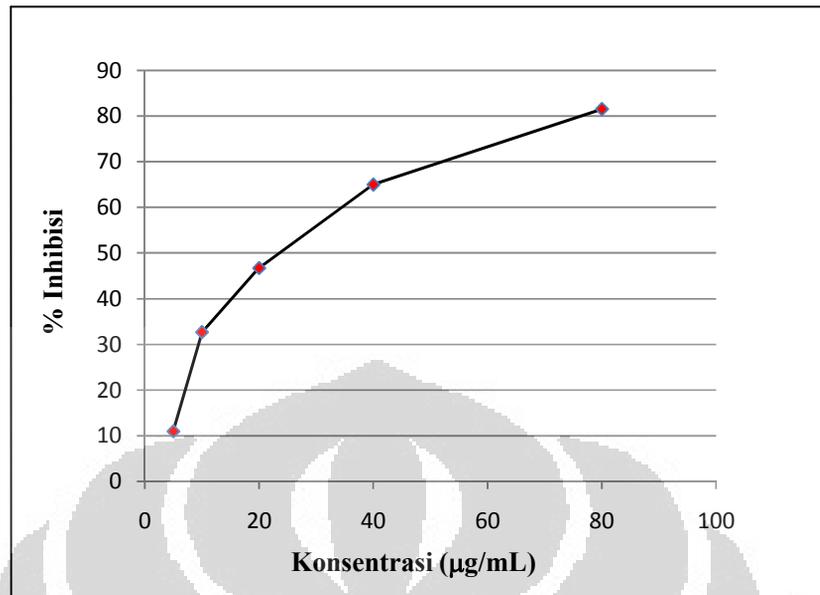
**Gambar 4.13** Kurva persentase inhibisi asam askorbat



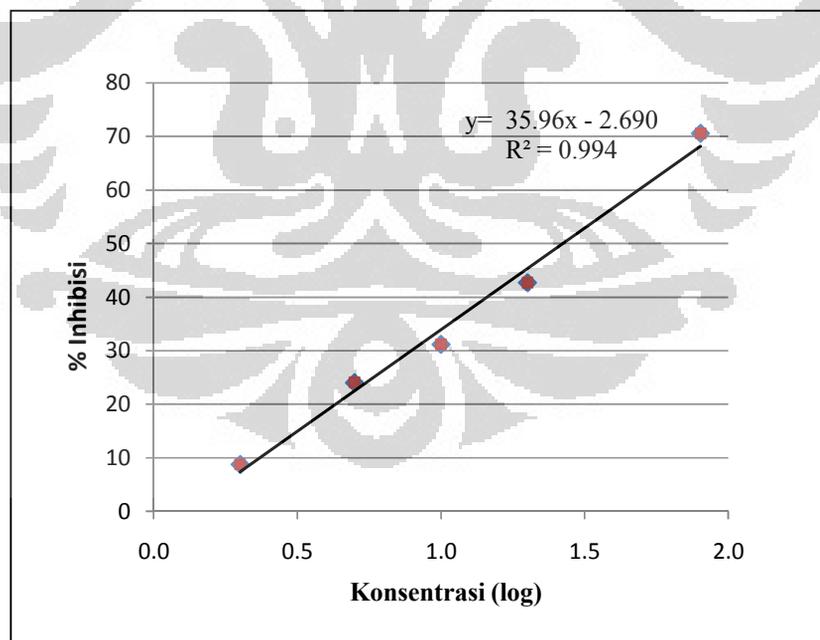
**Gambar 4.14** Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh asam kojat dalam konsentrasi µg/mL



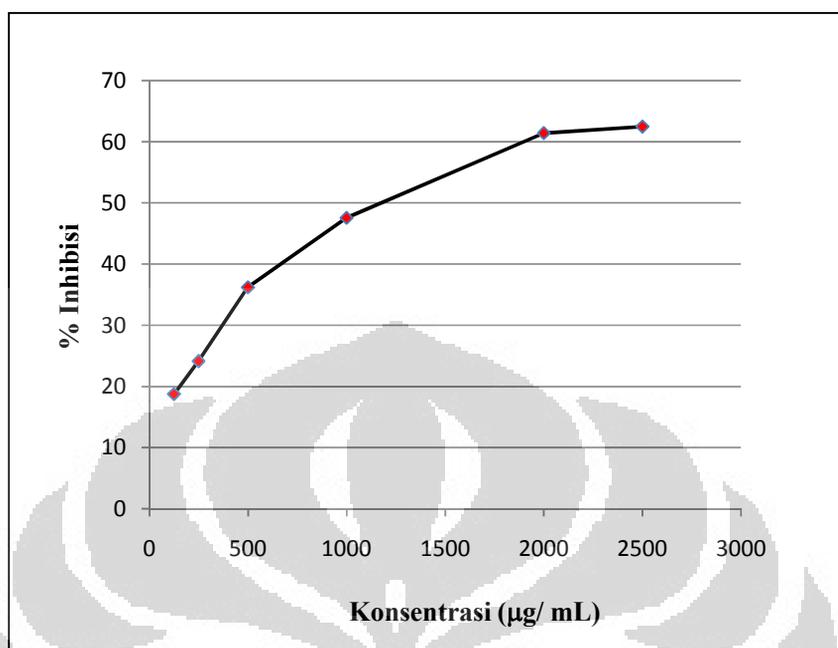
**Gambar 4.15** Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh asam kojat dalam konsentrasi logaritma



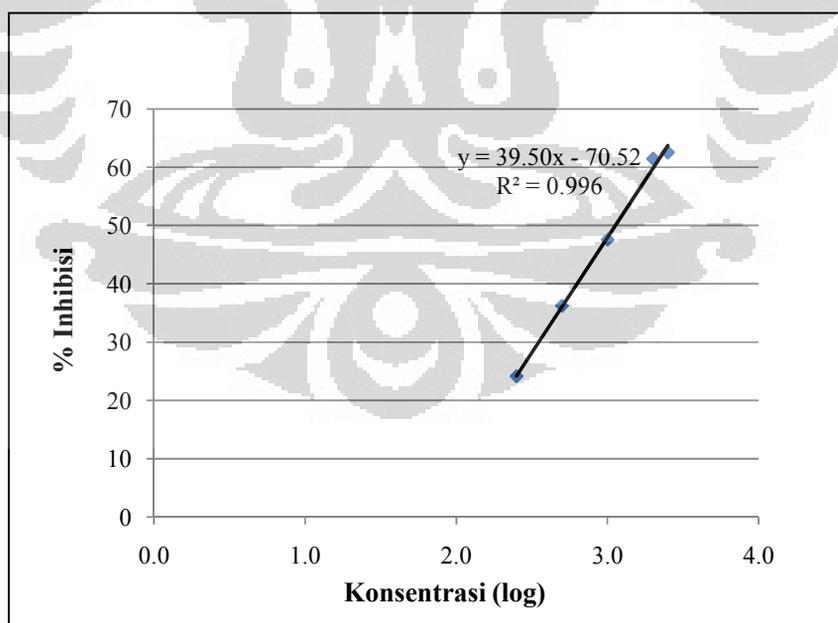
**Gambar 4.16** Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh asam askorbat dalam konsentrasi µg/ml



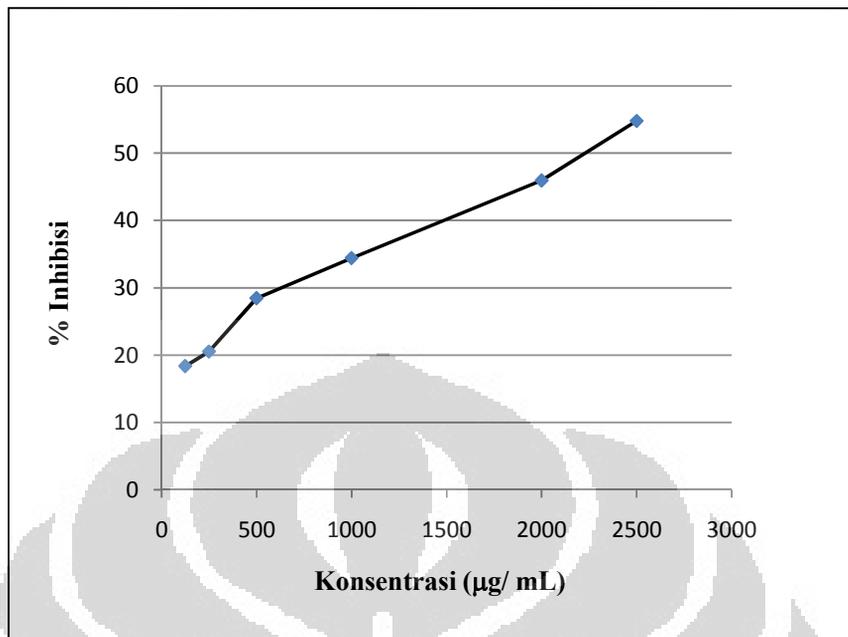
**Gambar 4.17** Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh asam askorbat dalam konsentrasi logaritma



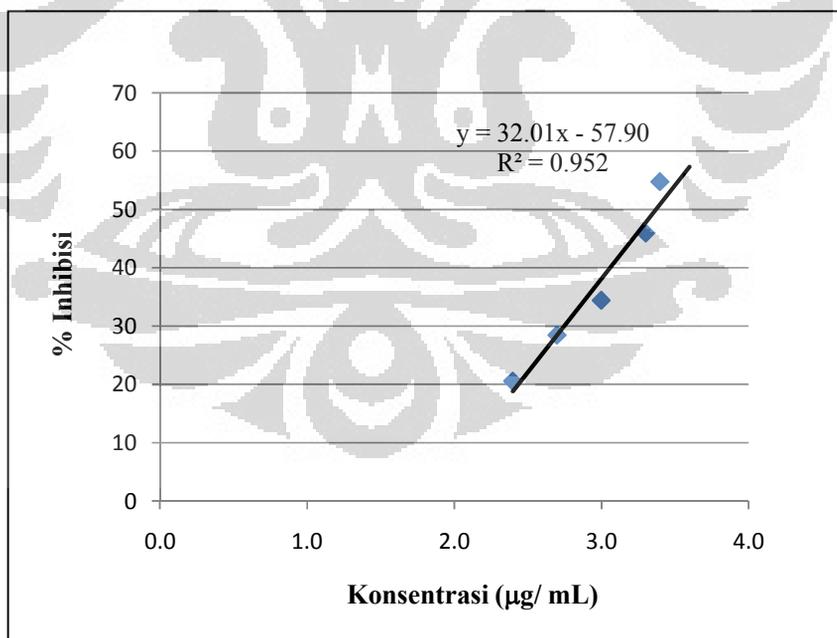
**Gambar 4.18** Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh ekstrak etanol 70% jamur tiram dalam konsentrasi µg/ml



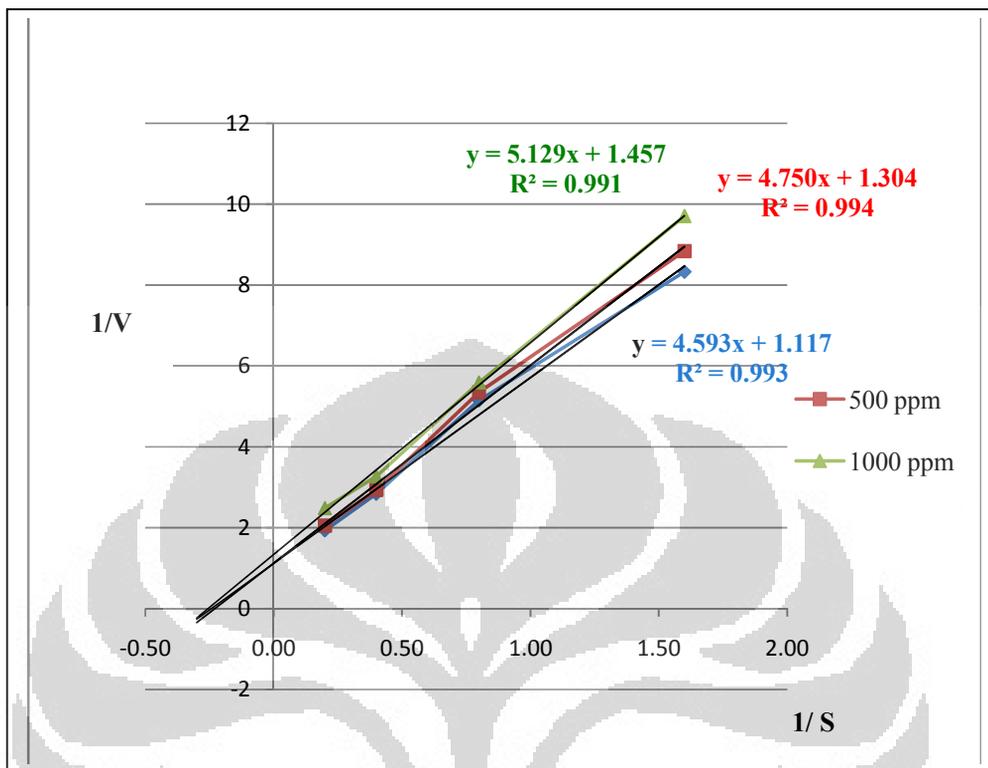
**Gambar 4.19** Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh ekstrak etanol 70% jamur tiram dalam konsentrasi logaritma



**Gambar 4.20** Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh ekstrak air jamur tiram dalam konsentrasi µg/mL



**Gambar 4.21** Kurva persentase inhibisi tirosinase oleh ekstrak air jamur tiram dalam konsentrasi logaritma



**Gambar 4.22** Kurva *Lineweaver- Burke* larutan ekstrak etanol 70% jamur tiram, konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$  1000  $\mu\text{g/mL}$  dan blanko (B)



**Gambar 4. 1** Jamur Tiram (*Pleurotus ostreatus*)



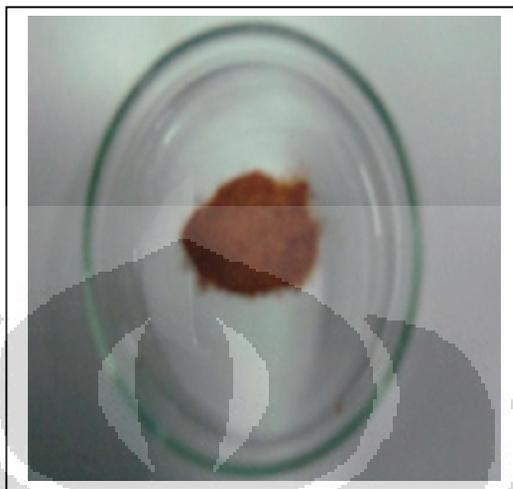
**Gambar 4. 2** Media tumbuh jamur



**Gambar 4. 3** Jamur tiram yang sudah dikeringkan



**Gambar 4. 4** Jamur tiram yang dibuat serbuk



**Gambar 4.5** Ekstrak kering air



**Gambar 4.6** Ekstrak kering etanol 70%



**a.** Evaporator



**b.** Timbangan analitik



**c.** Alat ukur total solid



**d.** Oven



**e.** Thin layer Chromatography



**f.** Alat ukur BJ



g. Inkubator



h. Alat sonikasi



i. Shaker



j. Spektrometer



k. pHmeter



l. Vorteks



m. 96- well plate



n. Microplate reader



o. Labu ukur



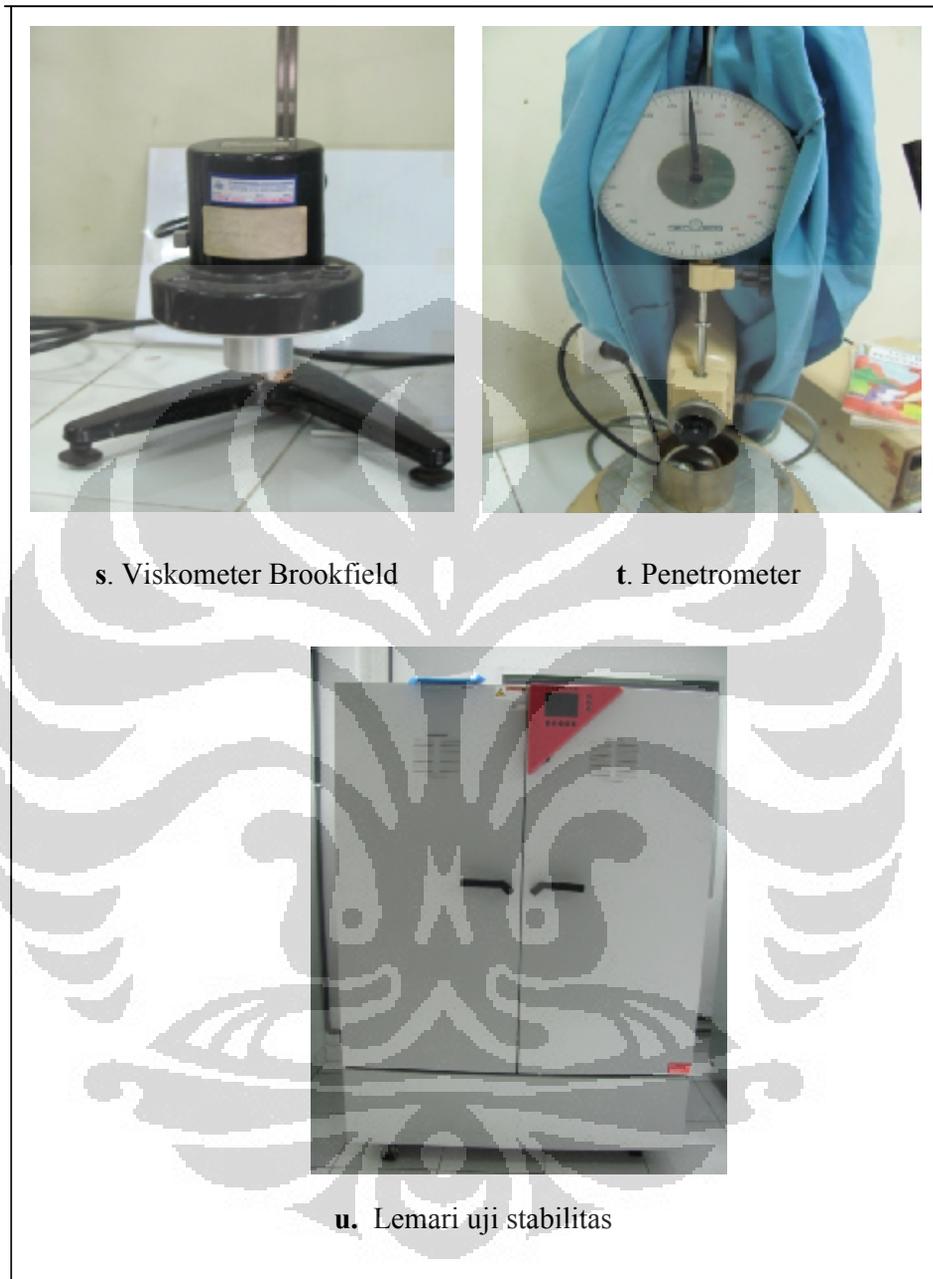
p. Centrifuge



q. Pipet mikro



r. Pipet eppendorf



**Gambar 4.7.** Alat-alat yang digunakan selama penelitian

Tabel 4.32. Hasil optimal konsentrasi enzim tyrosinase

Konsentrasi Enzim (U/ml)	Konsentrasi Substrat									
	2,5 mM					5 mM				
	Dengan Enzim	Rata-rata	Jangka Waktu	Rata-rata	D - T	Dengan Enzim	Rata-rata	Jangka Waktu	Rata-rata	D - T
310	0,402	0,402	0,033	0,030	0,372	0,547	0,548	0,050	0,030	0,518
	0,403		0,033			0,550		0,050		
155	0,326	0,325	0,030	0,020	0,296	0,410	0,412	0,029	0,029	0,383
	0,324		0,030			0,414		0,029		
75	0,120	0,120	0,030	0,030	0,090	0,145	0,145	0,020	0,030	0,115
	0,121		0,030			0,115		0,030		

Tabel 4.33. Hasil optimal konsentrasi substrat dengan konsentrasi enzim 310 U/ml

	Konsentrasi Substrat (mM)									
	0,075	1,75	7,5	5	10	70				
Dengan Enzim	0,150	0,223	0,382	0,558	0,532	0,543				
	0,150	0,225	0,381	0,557	0,530	0,542				
Rata-rata	0,150	0,224	0,381	0,560	0,531	0,542				
	0,030	0,030	0,030	0,030	0,037	0,034				
Tanpa Enzim	0,030	0,030	0,030	0,030	0,037	0,034				
	0,030	0,030	0,030	0,030	0,037	0,034				
Rata-rata	0,030	0,030	0,030	0,030	0,037	0,034				
	0,120	0,104	0,352	0,527	0,494	0,508				
D - T										

Tabel 4.34. Hasil uji aktivitas inhibisi eritrosit menggunakan oleh asam klorat sebagai kontrol positif

$B_1$	$B_0$	$B$	Konsentrasi sampel dalam larutan uji ( $\mu\text{g/mL}$ )	Konsentrasi sampel dalam larutan uji ( $\mu\text{g/mL}$ )	$S_1$	$S_2$	$S$	% Inhibisi: $B_0 - S_1 / B_0 \times 100$	Persamaan Regresi: $y = 35,96x - 2,690$ $R^2 = 0,594$	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
C <sub>1</sub> 540	0,030	10	2	0,504	0,031	0,474	0,75			
				0,507	0,032					
				0,506	0,032					
C <sub>1</sub> 541	0,030	25	5	0,427	0,030	0,593	21,01			
				0,428	0,030					
				0,428	0,031					
C <sub>1</sub> 541	0,031	50	10	0,389	0,031	0,553	31,16			29,188
				0,388	0,031					
				0,389	0,031					
C <sub>1</sub> 541	0,031	100	20	0,329	0,030	0,593	42,69			
				0,329	0,032					
				0,328	0,031					
C <sub>1</sub> 541	0,031	250	50	0,183	0,035	0,353	70,57			
				0,192	0,034					
				0,188	0,035					

Tabel 4.15 Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak asam askorbat sebagai kontrol positif

$E_1$	$B_0$	$B_1$	Konsentrasi sampel dalam larutan uji ( $\mu\text{g/mL}$ )	$S_1$	$S_0$	$S$	% inhibisi ( $\frac{S_1 - S}{S_0} \times 100\%$ )	Parameter Regresi	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
0,540	C,050	9,500	25	0,497	0,030	0,463	11,94	$y = 57,62x - 27,58$ $R^2 = 0,996$	21,20
				0,495	0,034				
				0,498	0,034				
0,540	C,050	9,500	50	0,385	0,034	0,350	12,71	$y = 57,62x - 27,58$ $R^2 = 0,996$	21,20
				0,387	0,034				
				0,380	0,034				
0,541	C,051	9,500	100	0,310	0,034	0,317	-6,73	$y = 57,62x - 27,58$ $R^2 = 0,996$	21,20
				0,308	0,034				
				0,312	0,033				
0,541	C,051	9,500	200	0,218	0,033	0,187	63,00	$y = 57,62x - 27,58$ $R^2 = 0,996$	21,20
				0,215	0,032				
				0,212	0,033				
0,541	C,051	9,500	400	0,129	0,030	0,096	88,24	$y = 57,62x - 27,58$ $R^2 = 0,996$	21,20
				0,129	0,032				
				0,127	0,032				



Tabel 4.37. Hasil uji aktivitas inhibisi enzim tiroksinase oleh ekstrak etanol 70% jamaur tiram

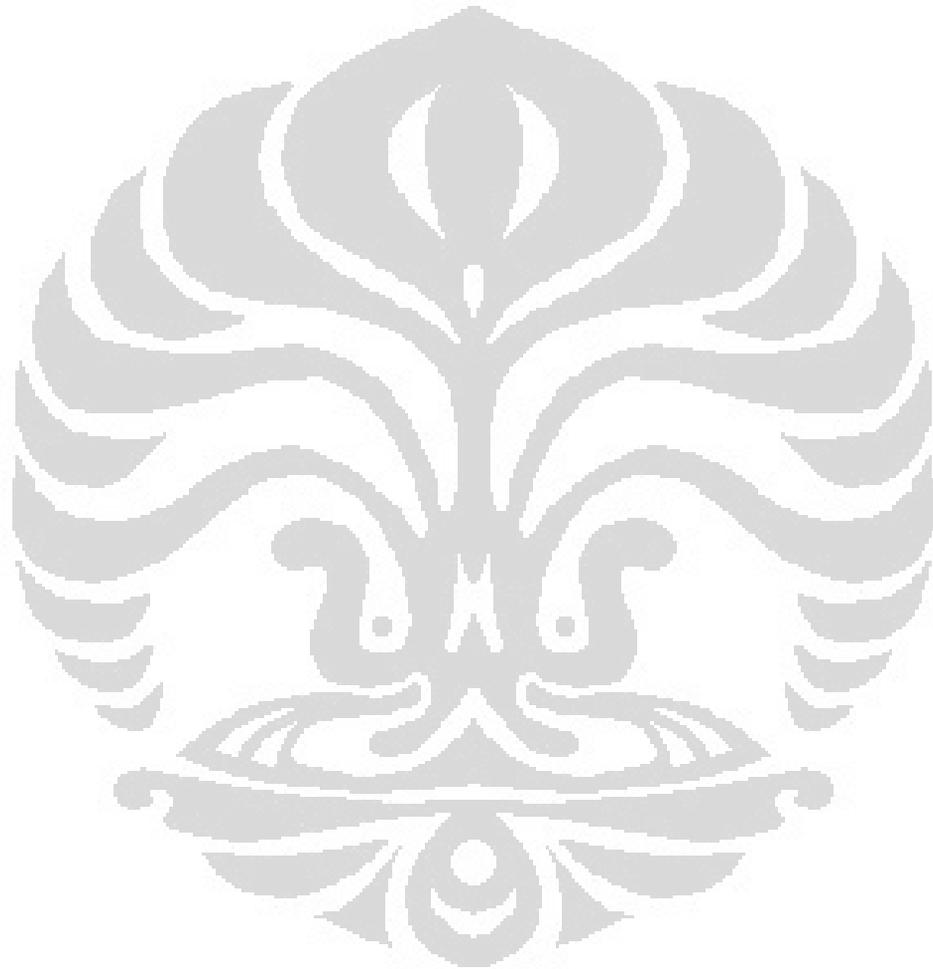
$E_1$	$E_0$	B	Konsentrasi sampel ( $\mu\text{g/ml}$ )	Konsentrasi sampel dalam larutan uji ( $\mu\text{g/ml}$ )	$S_1$	$S_0$	S	% Inhibisi $(R_s / R_0 \times 100\%)$	Persamaan Regresi	$IC_{50}$ ( $\text{ng/ml}$ )
0,584	0,030		625	125	0,492	0,036	0,451	18,74		
					0,487	0,036				
					0,483	0,037				
			1250	250	0,465	0,047	0,421	24,14		
					0,467	0,045				
					0,470	0,045				
					0,420	0,064				
			2500	500	0,414	0,062	0,354	36,21		
					0,417	0,062				
					0,360	0,070				
			5000	1000	0,374	0,072	0,291	47,37		
					0,352	0,070				
					0,529	0,314				
			10000	2000	0,530	0,314	0,214	61,44		
					0,527	0,316				
									$y = 39,50x - 76,52$ $R^2 = 0,996$	1,126

Tabel 4.18. Data kinerika penghambatan enzim tirosinase oleh ekstrak etanol 70% jamur tiram

Konsentrasi substrat	Absorbansi			1/S	1/B	1/V <sub>1</sub>	1/V <sub>2</sub>
	Blanko	500 µg/mL (V <sub>1</sub> )	1000 µg/mL (V <sub>2</sub> )				
0,625	0,120	0,113	0,103	1,60	8,33	8,84	9,71
1,25	0,194	0,187	0,179	0,80	5,15	5,35	5,59
2,5	0,324	0,342	0,321	0,40	2,84	2,93	3,11
5	0,518	0,426	0,356	0,20	1,93	2,05	2,48

Tabel 4.19. Hasil perhitungan konstanta Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>) dan V<sub>max</sub>

	A	b	r	K <sub>m</sub> (b/a)	V <sub>max</sub> (1/a)
Blanko	1,117	4,593	0,993	4,112	0,895
500 µg/mL (V <sub>1</sub> )	1,304	4,750	0,994	3,643	0,767
1000 µg/mL (V <sub>2</sub> )	1,457	5,129	0,991	3,520	0,686





Gambar 4.23 Bentuk sediaan gel



Gambar 4.24 Foto awal tiga macam sediaan gel dan blanko negatif



**Gambar 4.25** Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-2



**Gambar 4.26** Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-4



**Gambar 4.27** Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-6



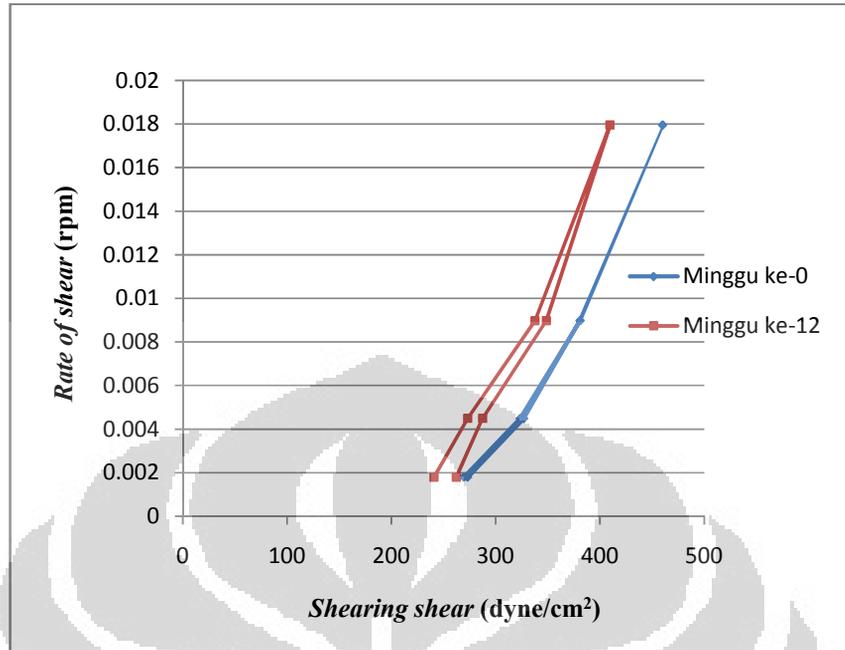
**Gambar 4.28** Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-8



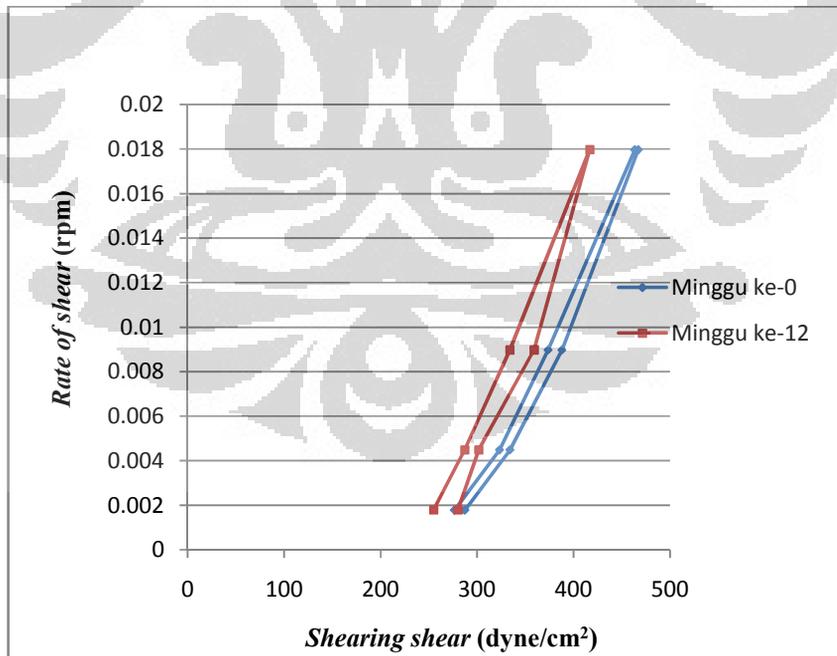
**Gambar 4.29** Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-10



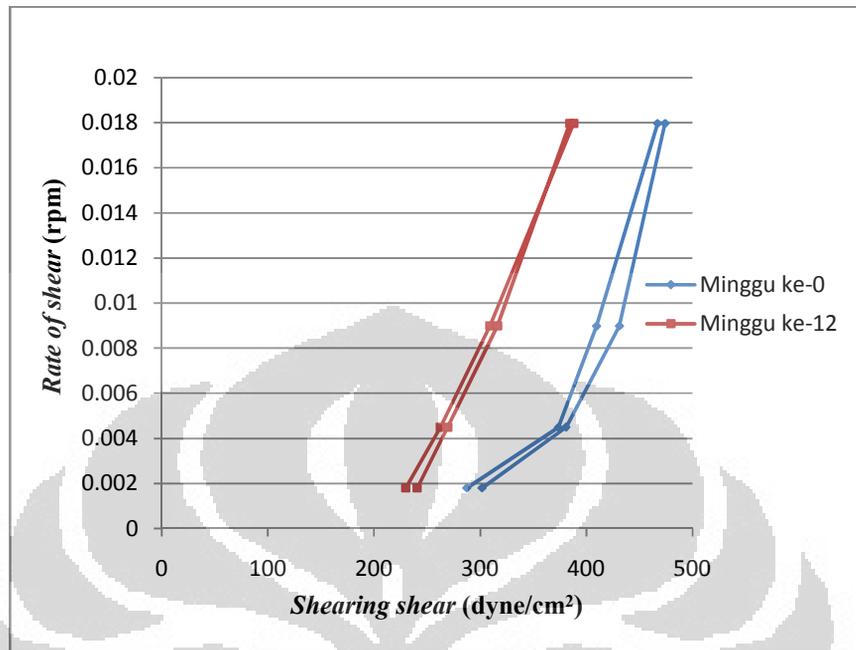
**Gambar 4.30** Foto gel jamur tiram uji stabilitas minggu ke-12



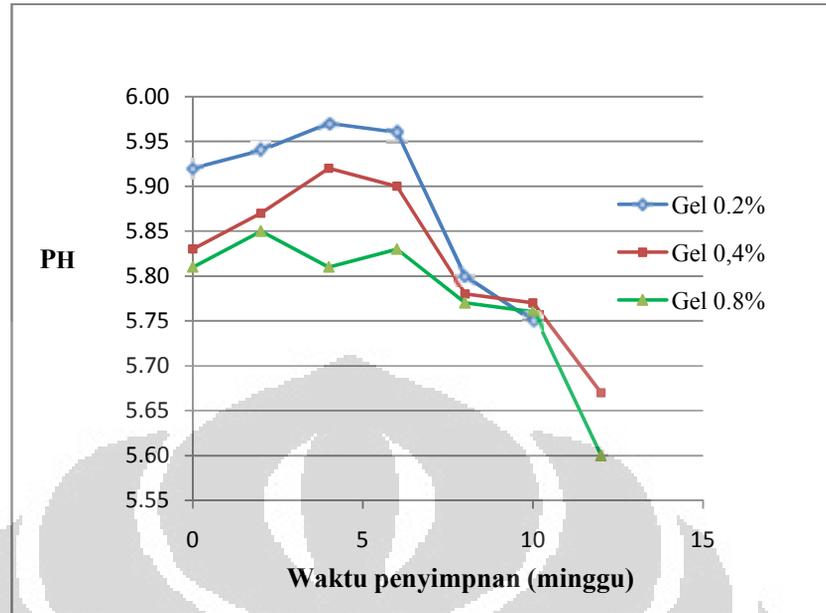
**Gambar 4.31** Kurva aliran gel 0,2% minggu ke-0 dan ke-12



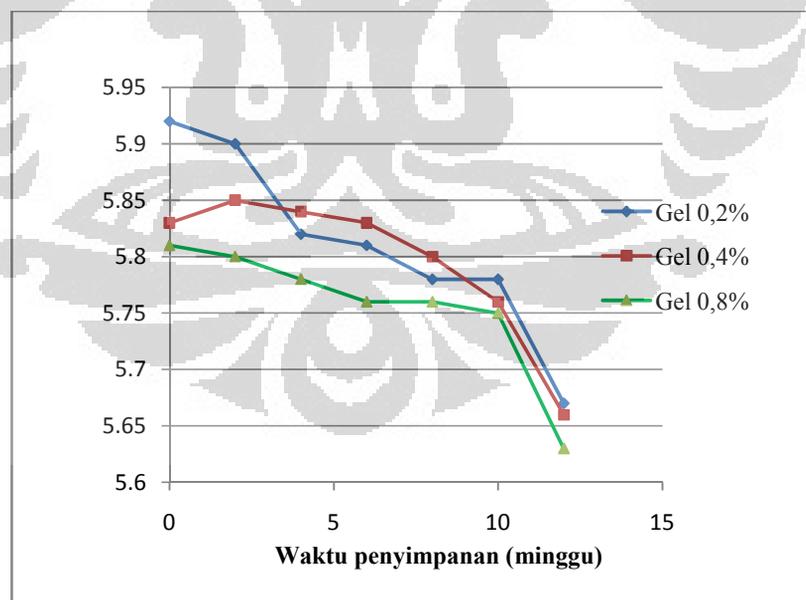
**Gambar 4.32** Kurva aliran gel 0,4% minggu ke-0 dan ke-12



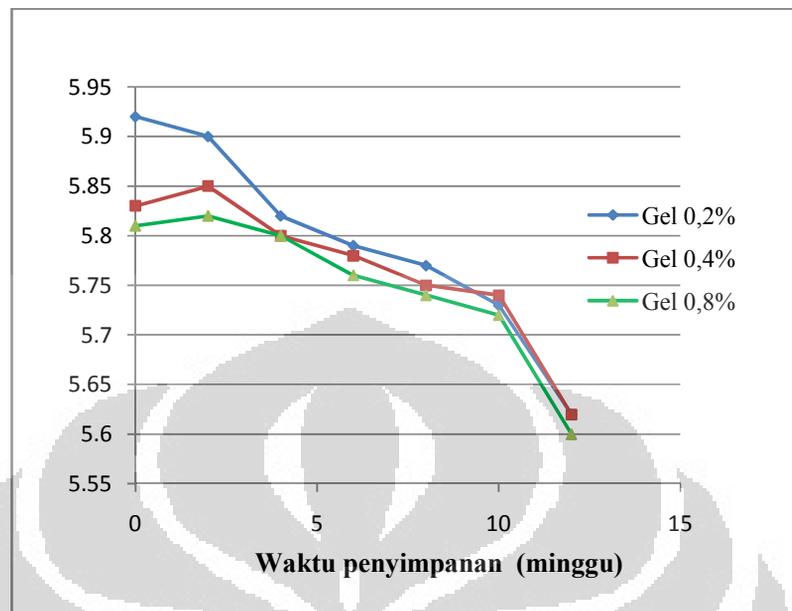
**Gambar 4.33** Kurva aliran gel 0,8% minggu ke-0 dan ke-12



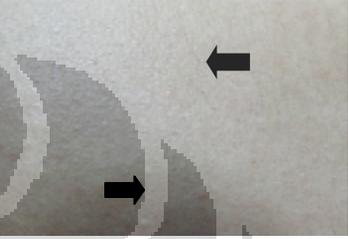
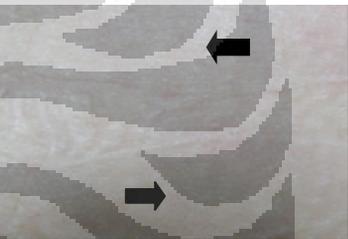
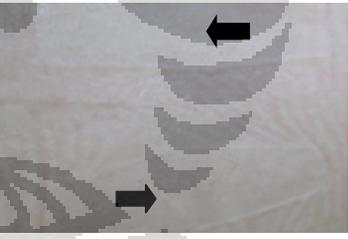
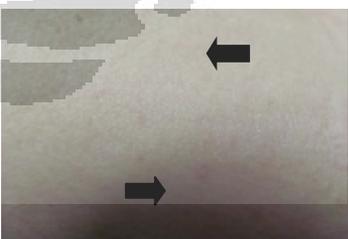
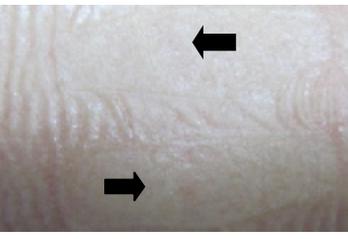
**Gambar 4.34** Kurva perubahan pH pada penyimpanan suhu  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 12 minggu

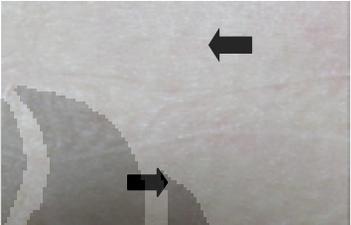
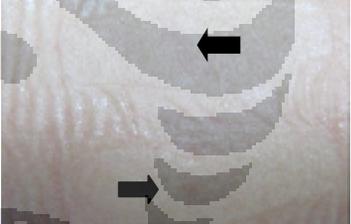
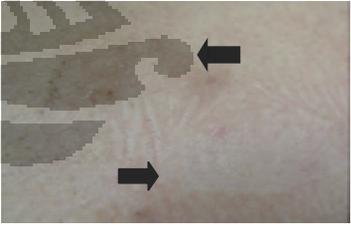
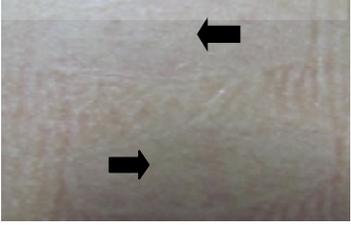


**Gambar 4.35** Kurva perubahan pH pada penyimpanan suhu  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 12 minggu



**Gambar 4.36** Kurva perubahan pH pada penyimpanan suhu  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 12 minggu

Sukarelawan	Sebelum (hari ke-1)	Setelah 48 jam
1		
2		
3		
4		
5		
6		

Sukarelawan	Sebelum (hari ke-1)	Setelah 48 jam
7		
8		
9		
10		
11		
12		

**Gambar 4.37** Foto hasil uji keamanan terhadap 12 orang sukarelawan

**Tabel 4.8** Data identifikasi organoleptik simplisia jamur tiram

<b>Simplisia jamur tiram</b>	<b>Pemerian</b>
Jamur tiram bentuk kering	serbuk kasar, warna putih dan kecoklatan, bau aromatis, rasa pahit

**Tabel 4.9** Data identifikasi alkaloid simplisia jamur tiram

<b>Metode</b>	<b>Uji</b>	<b>Perubahan warna</b>	<b>Hasil</b>
<b>Bouchardat</b>	I	Ada endapan coklat	Positif
	II	Ada endapan coklat	Positif
	III	Ada endapan coklat	Positif
<b>Mayer</b>	I	Ada endapan putih	Positif
	II	Ada endapan putih	Positif
	III	Ada endapan putih	Positif
<b>Dragendroff</b>	I	Ada endapan merah jingga	Positif
	II	Ada endapan merah jingga	Positif
	III	Ada endapan merah jingga	Positif

**Tabel 4.10** Data identifikasi saponin simplisia jamur tiram

<b>Uji</b>	<b>Perubahan warna</b>	<b>Hasil</b>
I	Buih tidak hilang	Positif
II	Buih tidak hilang	Positif
III	Buih tidak hilang	Positif

**Tabel 4. 11** Data identifikasi flavonoid simplisia jamur tiram

Uji	Perubahan warna	Hasil
I	Larutan amil alkohol berwarna putih	Negatif
II	Larutan amil alkohol berwarna putih	Negatif
III	Larutan amil alkohol berwarna putih	Negatif

**Tabel 4. 12** Data identifikasi senyawa fenol simplisia jamur tiram

Uji	Perubahan warna	Hasil
I	Hijau	Positif
II	Hijau	Positif
III	Hijau	Positif

**Tabel 4. 13** Data identifikasi senyawa tanin simplisia jamur tiram

Uji	Perubahan warna	Hasil
I	Kuning kecoklatan	Negatif
II	Kuning kecoklatan	Negatif
III	Kuning kecoklatan	Negatif

**Tabel 4.14** Data susut pengeringan simplisia jamur tiram

Bobot simplisia (g)	Bobot sisa pengeringan (g)	Susut kering (%)	Susut kering rata-rata (%)
2,0001	1,7997	10,02	9,92
2,0002	1,8017	9,90	
2,0001	1,8030	9,85	

**Tabel 4.15** Data kadar abu simplisia jamur tiram

<b>Bobot simplisia (g)</b>	<b>Bobot abu (g)</b>	<b>Kadar abu (%)</b>	<b>Kadar abu rata-rata (%)</b>
2,0008	1,8510	7,49	7,47
2,0010	1,8500	7,50	
2,0008	1,8521	7,43	

**Tabel 4.16** Data kadar sari larut air dari simplisia jamur tiram

<b>Bobot simplisia (g)</b>	<b>Bobot senyawa terlarut air (g)</b>	<b>Senyawa terlarut air (%)</b>	<b>Senyawa terlarut air rata-rata (%)</b>
5,0008	0,5122	40,97	40,76
5,0010	0,5132	41,06	
5,0007	0,5033	40,26	

**Tabel 4.17** Data kadar sari larut etanol dari simplisia jamur tiram

<b>Bobot simplisia (g)</b>	<b>Bobot senyawa terlarut etanol (g)</b>	<b>Senyawa terlarut etanol (%)</b>	<b>Senyawa terlarut etanol rata-rata (%)</b>
5,0008	0,0506	4,05	4,10
5,0007	0,0518	4,14	
5,0008	0,0514	4,11	

**Tabel 4.18** Data identifikasi organoleptik ekstrak kering jamur tiram

<b>Ekstrak kering jamur tiram</b>	<b>Pemerian</b>
Dalam air suhu 70 <sup>0</sup> C	serbuk, warna coklat, bau aromatis, rasa pahit
Dalam etanol 70% suhu 50 <sup>0</sup> C	serbuk, warna coklat muda, bau aromatis, rasa pahit

**Tabel 4.19** Data identifikasi alkaloid ekstrak jamur tiram

<b>Metode</b>	<b>Uji</b>	<b>Ekstrak air</b>		<b>Ekstrak etanol 70%</b>	
		<b>Perubahan warna</b>	<b>Hasil</b>	<b>Perubahan warna</b>	<b>Hasil</b>
<b>Bouchardat</b>	I	Ada endapan coklat	Positif	Ada endapan coklat	Positif
	II	Ada endapan coklat	Positif	Ada endapan coklat	Positif
	III	Ada endapan coklat	Positif	Ada endapan coklat	Positif
<b>Mayer</b>	I	Ada endapan putih	Positif	Ada endapan putih	Positif
	II	Ada endapan putih	Positif	Ada endapan putih	Positif
	III	Ada endapan putih	Positif	Ada endapan putih	Positif
<b>Dragendorff</b>	I	Tidak ada endapan	Positif	Ada endapan merah jingga	Positif
	II	Tidak ada endapan	Negatif	Ada endapan merah jingga	Positif
	III	Tidak ada endapan	Negatif	Ada endapan merah jingga	Positif

**Tabel 4.20** Data identifikasi saponin ekstrak jamur tiram

Uji	Ekstrak air		Ekstrak etanol 70%	
	Buih	Hasil	Buih	Hasil
I	Buih tidak hilang	Positif	Terbentuk buih tapi hilang setelah penambahan HCl 2N	Negatif
II	Buih tidak hilang	Positif	Terbentuk buih tapi hilang setelah penambahan HCl 2N	Negatif
III	Buih tidak hilang	Positif	Terbentuk buih tapi hilang setelah penambahan HCl 2N	Negatif

**Tabel 4.21** Data identifikasi flavonoid ekstrak jamur tiram

Uji	Ekstrak air		Ekstrak etanol 70%	
	Perubahan warna	Hasil	Perubahan warna	Hasil
I	Larutan amil alkohol berwarna putih	Negatif	Larutan amil alkohol berwarna putih	Negatif
II	Larutan amil alkohol berwarna putih	Negatif	Larutan amil alkohol berwarna putih	Negatif
III	Larutan amil alkohol berwarna putih	Negatif	Larutan amil alkohol berwarna putih	Negatif

**Tabel 4.22** Data identifikasi senyawa fenol ekstrak jamur tiram

Uji	Ekstrak air		Ekstrak etanol 70%	
	Perubahan warna	Hasil	Perubahan warna	Hasil
I	Hijau	Positif	Hijau tua	Positif
II	Hijau	Positif	Hijau tua	Positif
III	Hijau	Positif	Hijau tua	Positif

**Tabel 4.23** Data identifikasi senyawa tanin ekstrak jamur tiram

Uji	Ekstrak air		Ekstrak etanol 70%	
	Perubahan warna	Hasil	Perubahan warna	Hasil
I	Kuning	Negatif	Kuning	Negatif
II	Kuning	Negatif	Kuning	Negatif
III	Kuning	Negatif	Kuning	Negatif

**Tabel 4.24** Data PH, berat jenis (BJ) dan total solid ekstrak kental jamur tiram

Uji	Ekstrak air			Rata-rata	Ekstrak etanol 70%			Rata-rata
	I	II	III		I	II	III	
<b>PH</b>	5,98	5,92	5,96	<b>5,95</b>	5,58	5,51	5,75	<b>5,61</b>
<b>BJ</b>	1,023	1,021	1,020	<b>1,021</b>	1,084	1,065	1,059	<b>1,069</b>
<b>Total solid (%)</b>	21,34	20,28	20,16	<b>20,59</b>	22,5	18,22	17,30	<b>19,34</b>

**Tabel 4.25** Data rendemen ekstrak kering jamur tiram

Ekstrak kering jamur tiram		Rendemen (%)	Rata-rata rendemen (%)
<b>Ekstrak air</b>	<b>I</b>	16,2	15,75
	<b>II</b>	15,3	
<b>Ekstrak etanol 70%</b>	<b>II</b>	12,5	
	<b>III</b>	11,7	12,1

Keterangan : Ekstrak etanol 70% memakai filler dengan perbandingan 25% zat aktif dan 75% filler

**Tabel 4.26** Data kelarutan dalam air dan etanol ekstrak kering jamur tiram

<b>Ekstrak kering jamur tiram</b>		<b>Kelarutan dalam air</b>	<b>Kelarutan dalam etanol 96%</b>
<b>Ekstrak air</b>	<b>I</b>	Mudah larut	Sukar larut
	<b>II</b>	Mudah larut	Sukar larut
	<b>III</b>	Mudah larut	Sukar larut
<b>Ekstrak etanol 70%</b>	<b>I</b>	Agak sukar larut	Sukar larut
	<b>II</b>	Agak sukar larut	Sukar larut
	<b>III</b>	Agak sukar larut	Sukar larut

**Tabel 4.27** Data susut pengeringan ekstrak kering jamur tiram

<b>Ekstrak</b>	<b>Bobot ekstrak (g)</b>	<b>Bobot sisa pengeringan (g)</b>	<b>Susut kering (%)</b>	<b>Susut kering rata-rata (%)</b>
<b>Ekstrak air</b>				5,09
I	2,3002	2,1838	5,05	
II	2,3004	2,1834	5,07	
III	2,3202	2,2000	5,17	
<b>Ekstrak etanol 70%</b>				5,01
I	2,2004	2,0906	4,97	
II	2,2000	2,0900	5,00	
III	2,2002	2,0888	5,06	

**Tabel 4.28** Penetapan kadar total fenol ekstrak air jamur tiram

<b>Parameter</b>	<b>Hasil</b>
<b>Bobot sampel</b>	100 mg
<b>Absorbansi</b>	0,198
	0,196
	0,195
<b>Total fenol sampel</b>	<b>2,23</b>

**Tabel 4.29** Penetapan kadar total fenol ekstrak etanol 70% jamur tiram

<b>Parameter</b>	<b>Hasil</b>
<b>Bobot sampel</b>	100 mg
<b>Absorbansi</b>	0,472
	0,473
	0,470
<b>Total fenol sampel</b>	<b>5,57</b>

Keterangan : Pembanding digunakan Asam Galat 500 ppm

**Tabel 4.30** Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak air jamur tiram

Konsentrasi deret sampel ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi	Absorbansi	Absorbansi	Rata-rata	% inhibisi
Kontrol	0,646	0,645	0,645	0,645	
12,5	0,623	0,623	0,623	0,623	3,86
25	0,570	0,570	0,570	0,570	12,04
50	0,474	0,474	0,474	0,474	26,85
75	0,398	0,398	0,398	0,398	38,58
100	0,312	0,312	0,312	0,312	51,85
125	0,278	0,278	0,278	0,223	65,59
150	0,244	0,244	0,244	0,147	77,31

**Tabel 4.31** Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% jamur tiram

Konsentrasi deret sampel ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi	Absorbansi	Absorbansi	Rata-rata	% inhibisi
Kontrol	0,643	0,643	0,643	0,643	
12,5	0,589	0,589	0,589	0,589	8,40
25	0,507	0,507	0,507	0,507	21,15
50	0,420	0,420	0,420	0,420	34,68
75	0,367	0,367	0,367	0,367	42,92
100	0,221	0,221	0,221	0,221	65,63
125	0,153	0,153	0,153	0,153	76,21
150	0,139	0,139	0,139	0,139	78,38

**Tabel 4.40** Hasil pengamatan sediaan gel pada minggu ke-0

Sediaan Gel	Warna	Bau	PH	Homogenitas	Sineresis
0,2%	Bening	Khas	5,92	Homogen	Tidak terjadi sineresis
0,4%	Kuning muda	Khas	5,83	Homogen	Tidak terjadi sineresis
0,8%	Kuning tua	Khas +	5,81	Homogen	Tidak terjadi sineresis

**Tabel 4.41** Hasil uji konsistensi pada minggu ke-0

Sediaan gel	1/10 mm	Yield (dyne/cm <sup>2</sup> )
0,2%	360	2848,4149
0,4%	360	2848,4149
0,8%	380	2556,4721

**Tabel 4.42** Hasil pengamatan *cycling test*

Sediaan gel	Pengamatan		
	Awal	Siklus ke-6	
	Warna	Warna	Sineresis
0,2%	Bening	Bening	Tidak terjadi sineresis
0,4%	Kuning muda	Kuning muda	Tidak terjadi sineresis
0,8%	Kuning tua	Kuning tua	Tidak terjadi sineresis

Tabel 4.43. Hasil uji viskositas gel ekstrak etanol 70% jamur tiram pada minggu ke-0

Konsentrasi Spindel	Kecepatan (rpm)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas $\eta = dr \times f$	Shearing test $F/A = dr \times 7.187$ (dyne / cm <sup>2</sup> )	Rate of shear $dv/dr = F/A \times L/\eta$
0,2%	5	38	4000	152000	273,106	0,0017968
		455	1600	72800	327,009	0,004919
		53	800	42400	380,911	0,0089838
	20	64	400	25600	459,968	0,0179675
		64	400	25600	459,968	0,0179675
		53	800	42400	380,911	0,0089838
	4	45	1600	72000	323,415	0,004919
		375	4000	150000	269,512	0,0017968

Konsentrasi	Spindel	Kecepatan (rpm)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas $\eta = dr \times f$	Shearing test $F/A = dr \times 7,187$ (dyne / cm <sup>2</sup> )	Rate of shear $dv/dr = F/A \times l$
0,4%	5	2	40	4000	160000	287,480	0,00179675
		4	46,5	1500	74400	334,196	0,00449188
		10	54	800	43200	388,098	0,00898375
		20	65	400	26000	467,155	0,01796750
		20	65	400	25800	467,155	0,01796750
		10	52	800	41600	373,724	0,00898430
		4	45	1500	72000	323,415	0,00449223
		2	38,5	4000	154000	276,699	0,00179575

Konsentrasi Spindel	Kecepatan (rpm)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas $\eta = dr \times f$	Shearing test $F/A = dr \times 7.187$ (dyne / cm <sup>2</sup> )	Rate of shear $\dot{\gamma} = F/A \times 1/\eta$
0,8%	2	42	4000	168000	301,854	0,001796750
	4	53	1600	84800	380,911	0,004491875
	10	60	800	48000	431,220	0,008983750
	20	66	400	26400	474,342	0,017967500
	20	65	400	26000	467,155	0,017967500
	10	57	800	45600	409,659	0,008905830
	4	52	1600	83200	373,724	0,004484890
	2	40	4000	160000	287,480	0,01811240

**Tabel 4.44** Hasil pengamatan organoleptis sediaan gel pada suhu  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  RH 65 selama 12 minggu

Gel	Minggu ke-	Pengamatan			
		Warna	Bau	Homogen	Sineresis
0,2%	2	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	4	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	6	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	8	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	10	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	12	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
0,4%	2	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	4	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	6	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	8	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	10	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	12	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
0,8%	2	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	4	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	6	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	8	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	10	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	12	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis

**Tabel 4.45** Hasil pengamatan organoleptis sediaan gel pada suhu  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  RH 65 selama 12 minggu

Gel	Minggu ke-	Pengamatan			
		Warna	Bau	Homogen	Sineresis
0,2%	2	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	4	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	6	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	8	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	10	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	12	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
0,4%	2	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	4	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	6	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	8	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	10	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	12	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
0,8%	2	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	4	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	6	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	8	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	10	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	12	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis

**Tabel 4.46** Hasil pengamatan organoleptis sediaan gel pada suhu  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  RH 75 selama 12 minggu

Gel	Minggu ke-	Pengamatan			
		Warna	Bau	Homogen	Sineresis
0,2%	2	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	4	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	6	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	8	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	10	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	12	Bening	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
0,4%	2	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	4	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	6	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	8	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	10	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	12	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
0,8%	2	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	4	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	6	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	8	Kuning tua	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	10	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis
	12	Kuning muda	Khas	Homogen	Tidak terjadi sineresis

**Tabel 4.47** Hasil pengamatan pH sediaan gel pada suhu  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 12 minggu

Gel	Minggu ke-						
	0	2	4	6	8	10	12
<b>0,2%</b>	5,92	5,94	5,97	5,96	5,80	5,75	5,68
<b>0,4%</b>	5,83	5,87	5,92	5,90	5,78	5,77	5,67
<b>0,8%</b>	5,81	5,85	5,81	5,83	5,77	5,76	5,60

**Tabel 4.48** Hasil pengamatan PH sediaan gel pada suhu  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 12 minggu

Gel	Minggu ke-						
	0	2	4	6	8	10	12
<b>0,2%</b>	5,92	5,90	5,82	5,81	5,78	5,78	5,67
<b>0,4%</b>	5,83	5,85	5,84	5,83	5,80	5,76	5,66
<b>0,8%</b>	5,81	5,80	5,78	5,76	5,76	5,75	5,63

**Tabel 4.49** Hasil pengamatan PH sediaan gel pada suhu  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 12 minggu

Gel	Minggu ke-						
	0	2	4	6	8	10	12
<b>0,2%</b>	5,92	5,90	5,82	5,79	5,77	5,73	5,62
<b>0,4%</b>	5,83	5,85	5,80	5,78	5,75	5,74	5,62
<b>0,8%</b>	5,81	5,82	5,80	5,76	5,74	5,72	5,60

Tabel 4.51 Hasil uji viskositas gelembak etanol 70% jamar tiram pada minggu ke-12

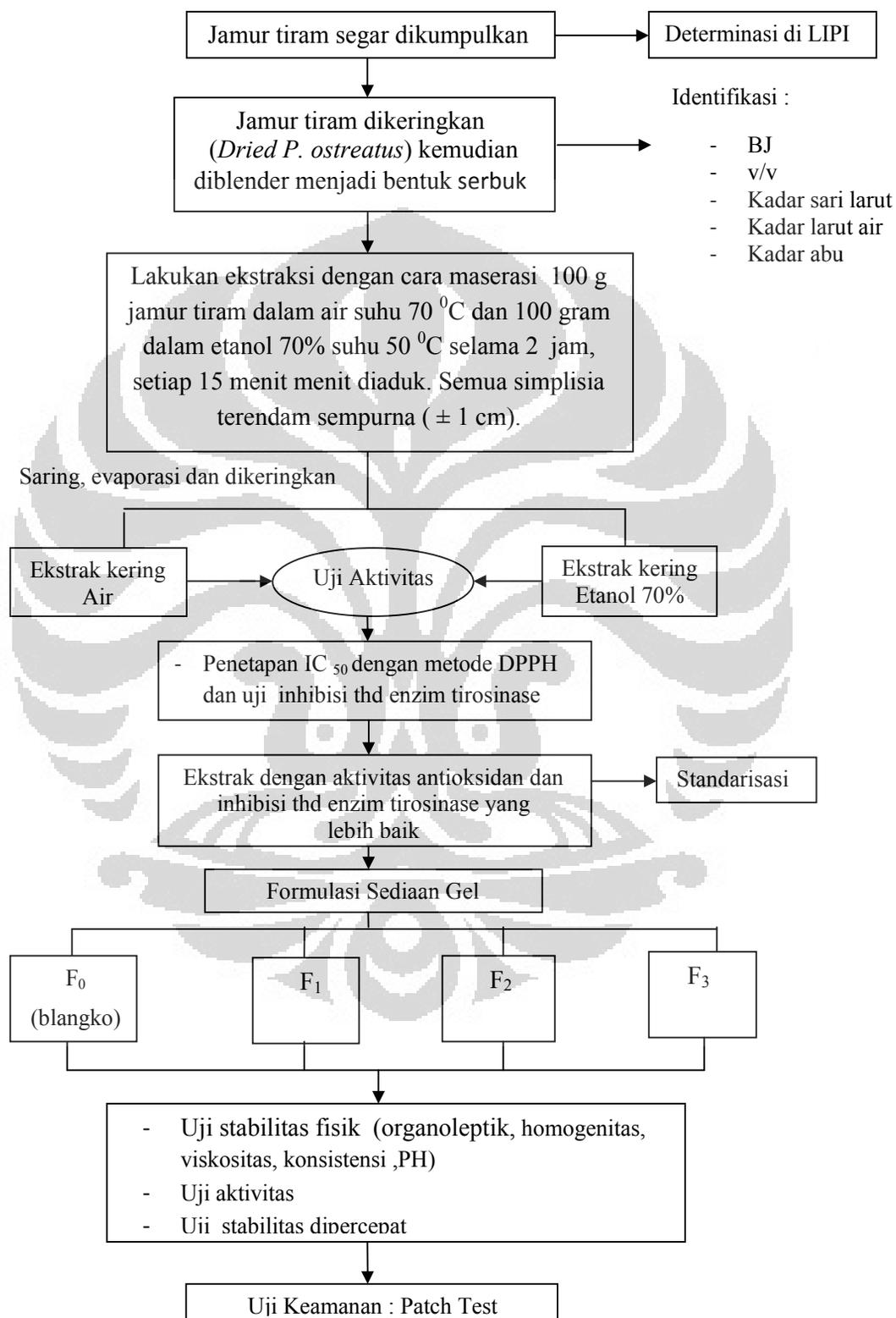
Konsentrasi	Spindel	Kecapatan (rpm)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas $\eta = dr \times f$	Shearing test $F/A = dr \times 7,187$ (dyne / cm <sup>2</sup> )	Rate of shear $dy/dr = F/A \times L/\eta$
0,2%	5	2	36,5	4000	146000	262,326	0,00179693
		4	40	1600	64000	287,48	0,00449331
		10	48,5	800	38800	348,567	0,00898257
		20	57	400	22800	409,659	0,01796764
		20	57	400	22800	409,659	0,01796764
		10	47	800	37600	337,785	0,00898519
		4	38	1600	60800	273,106	0,00449259
		2	33,5	4000	134000	240,765	0,00179611

Konsentrasi	Spindel	Kecepatan (rpm)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas $\eta = dr \cdot x f$	Shearing test $F/A = dr \cdot x 7,187$ (dyne / cm <sup>2</sup> )	Rate of shear $dv/dr = F/A \cdot x 1/\eta$
0,4%	5	2	39	4000	156000	280,293	0,00179668
		4	42	1600	67200	301,854	0,00449159
		10	50	800	40000	359,350	0,00898375
		20	38	400	23200	416,846	0,01795606
		20	58	400	23200	416,846	0,01795635
		10	46,5	800	37200	334,196	0,00898319
		4	40	1600	64000	287,48	0,00449331
		2	33,5	4000	142000	255,139	0,00179618

Konsentrasi Spindel	Kecepatan (rpm)	Dial reading (dr)	Faktor koreksi (f)	Viskositas $\eta = dr \times f$	Shearing test $F/A = dr \times 7,187$ (dyne / cm <sup>2</sup> )	Rate of shear $dv/dr = F/A \times 1/\eta$
0,8%	2	33,5	4000	134000	240,765	0,00179611
	4	37,5	1600	60000	269,513	0,00449278
	10	44	800	35200	316,228	0,00898404
	20	53,5	400	21400	384,505	0,01796792
	20	54	400	21600	388,058	0,01796894
	10	43	800	34400	309,041	0,00898382
	4	36,5	1600	58400	262,226	0,00449102
	2	32	4000	128000	229,984	0,00179618



### Lampiran 1. Alur Penelitian



Lampiran 2. Hasil identifikasi/ determinasi jamur tiram dari LIPI



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**  
( Indonesian Institute of Sciences )  
**PUSAT PENELITIAN BIOLOGI**  
( Research Center for Biology )

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 48 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong  
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

---

Cibinong, 12 Agustus 2011

Nomor : 1175/IPH.Y.02/II.8/VIII/2011  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.  
Bpk./Ibu/Sdr(i). dr. Riani Hapsari  
NPM : 1006787262  
Mhs. Univ. Indonesia  
Fak. MIPA  
Kampus UI Depok, 16424

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Jamur tiram	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pleurotaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

  
 Kepala Bidang Botani  
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,  
 Dr. Joeni Setiyo Raharjo  
 NIP. 196706241993032004

D:\Ident 2011\Dr. Riani Hapsari.doc\Atik

Page 1 of 1

**Lampiran 3.** Surat Keterangan Lolos Kaji Etik dari Universitas Indonesia

**UNIVERSITAS INDONESIA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat  
Pos. Box 1336 Jakarta 10430  
Kampus Salemba Telp. 31930371, 31997073, 3902997, 3927660, 3912437, 3155236, Fax. 31593572, 3157238, e-mail: office@ui.ac.id

---

Nomor **618/PTU2.FKETHK/2011**

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK**  
**ETHICAL CLEARANCE**

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:*

**“Uji Stabilitas Fisik dan Uji Keamanan Sediaan Gel untuk *Lightening Agent* Yang Mengandung Ekstrak Jamur Tiram (*Pleurotus Ostreatus*)”.**

**Peneliti Utama** : dr. Riani Hapsari Nawawi  
*Principal Investigator*

**Nama Institusi** : FMIPA Universitas Indonesia  
*Name of the Institution*

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.  
*And approved the above-mentioned protocol.*

  
Prof. Dr. dan Rianto Setiabudy, SpFK

\*Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan  
\*\*Peneliti bertanggung jawab

1. Menaga keberhasilan ilmiah proyek penelitian
2. Menandatangani surat persetujuan apabila
  - a. Semua aspek berkecukupan keterangan lisan ke: etik, penelitian sosial, bio etis, dalam hal ini adalah: wawancara, home tipsy, rekam
  - b. Dapat di lakukan di tempat jalan
3. Melaporkan ke instansi atau yang terkait di lingkungan Fakultas apabila ada masalah
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian telah di persetujui secara resmi

### Lampiran 4. Hasil uji mikrobiologi

**DLBS** 

Sampel : Jamur Urem  
No. Batch : -

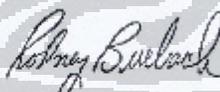
Uji	Spesifikasi (cfu/g)	Pengenceran	Hasil			Kesimpulan
			I	II	Rata-rata	
Total Aerobic Microbial Count (TAMC)	$\leq 10^4$	$10^1$ $10^2$	TBUII 25100	TBUII 21700	TBUII 23400	MS
Total Yeast & Mold Count (TYMC)	$\leq 10^4$	$10^1$ $10^2$	90 200	50 100	70 150	MS

Identifikasi	Deskripsi Hasil Positif	Hasil	Catatan	Kesimpulan
<i>Escherichia coli</i>		-		<i>E. coli</i>
MacConkey Broth	Larutan berwarna kuning dan muncul gas	Sampel - Kontrol (-)	- -	terjadi ungu keruh
MacConkey Agar	Koloni merah hingga merah ungu	Sampel + Kontrol (-)	+ -	tumbuh koloni ungu
Uji Kovacs	Terbentuk cincin merah	Sampel - Kontrol (+) Kontrol (-)	- + -	tidak terbentuk cincin merah
<i>Salmonella</i>				<i>Salmonella</i>
XLD Agar	Koloni merah dengan zona terdapat warna hitam pada bagian tengah koloni	Sampel - Kontrol (-)	- -	tumbuh koloni kuning
TSA agar miring	Bebas tarakan Luntak kehitaman dengan stam turpa gas, koloni pada permukaan berwarna merah	Sampel - Kontrol (+) Kontrol (-)	- + -	
<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Staph. Aureus</i>
Microbial Salt Agar	Koloni kuning atau putih dengan di keliling atau kuning	Sampel - Kontrol (-)	- -	tidak ada pertumbuhan
Uji koagulase	Terjadi perpadatan/pengentalan 1% kagasinol setelah	Sampel - Kontrol (-) Kontrol (-)	- - -	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>P. aeruginosa</i>
Cetrimide Agar	Koloni kehijauan dan berfluoresensi di bawah UV	Sampel - Kontrol (-)	- -	tidak ada pertumbuhan
Uji Oksidasi	Terbentuk warna violet atau violet biru	Sampel - Kontrol (+) Kontrol (-)	- + -	

DINS-FIA-QCL-007 (Rev 04) ed. date Oct 2011

**Lampiran 5. Certificate of Analysis L-DOPA**

Certificate of Analysis		
SIGMA-ALDRICH		
Product Name	3,4-Dihydroxy-L-phenylethylamine	
Product Number	09628	
Product Brand	SIGMA	
CAS Number	59-90-7	
Molecular Formula	$(\text{H}_2)_2\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$	
Molecular Weight	157.19	
TEST	SPECIFICATION	LOT 096m1712v RESULTS
Appearance (Color)	White to Off-White	Off-White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless to Light Yellow	Very Faint Yellow
Solubility (Turbidity)	Clear to Slightly Hazy	Clear
Infrared spectrum	50 mg/ml, 0.5 N HCl	Conforms
Carbon	Confirms to Structure	Conforms
Nitrogen	59.7 - 55.0 %	64.4 %
Specific Rotation	6.8 - 7.4 %	7.1 %
Purity (TLC)	-12.5 - -10.5 °	-10.7 °
Specification Date:	(C = 1 in 1 M HCl, 25 deg C)	
Date of QC Release:	≥80 %	100 %
Print Date:		SEP 2010
		SEP 2010
		SEP 13 2010
 Rodney Burbach, Manager Quality Control St. Louis, Missouri USA		

## Lampiran 6. Certificate of Analysis asam askorbat

ASCORBIC ACID		DSM	
CERTIFICATE OF ANALYSIS			
Product code : 048020			
Lot No. : T6.010207			
Analysis No. : 08138170			
Test	Result	Limits / Specifications	Dimension / Units
Appearance	powder		
Color	white	white slightly yellow	
Solution in Water (20:5) (vis. sol)	clear colorless	clear colorless	
pH (2.5% in water)	9.2	8.9 to 9.5	
Specific Rotation (20 in Water) (25°C, 20 deg. C, 15)	20.8	21.5 to 21.8	D
Loss on Drying (105 deg. C, 4 hours)	0.01	0.02 to 0.1	%
Identity	corresponds		
Infrared (solid)	corresponds		
Sulfated Ash (solid)	corresponds	max. 0.1	%
Heavy Metals (cobaltimetric comparison to Pb standard)	corresponds	max. 10	ppm
Iron	corresponds	max. 20	ppm
Copper (Atomic Absorption)	corresponds	max. 5.0	ppm
Lead (Atomic Absorption)	corresponds	max. 2	ppm
Zinc (Atomic Absorption)	corresponds	max. 25	ppm
Arsenic (cobaltimetric comparison to As standard)	corresponds	max. 5	ppm
Mercury (Atomic Absorption)	corresponds	max. 1	ppm
Oxalic Acid (mercurimetric comparison to standard)	corresponds	max. 0.2	%
Acidity (dry residue) (dry residue)	90.1	87.0 to 102.5	%
Slime Test (through USP 20 (60µm))	100	100 to 100	%
(dry residue) (through USP 40 (125µm))	24	2 to 70	%
(dry residue)			
DSM Nutritional Products, Inc. 11111 Troy, NY 12182 USA DSM 020-010			

## Lampiran 6. (lanjutan)

ASCORBIC ACID		DSM 	
CERTIFICATE OF ANALYSIS			
Product code : 040866			
Lot No. : TL0100387			
Analysis No. : 06136575			
Test	Result	Limits / Specifications	Dimension / Units
through USP 200 (70g) or 10 sieves	4	0 to 20	%
Ethanol	corresponds*	max. 1000	mg/kg
Methanol	corresponds*	max. 2000	mg/kg
Unspecified Imp. (Total)	0.08	max. 0.15	%
Impurity D by HPLC	0.02	max. 0.15	%
Unspecified Imp. (Total) (by HPLC)	not present	not present	
Total (by HPLC) (by HPLC)	0.06	max. 0.2	%
<p>*I checked at regular intervals  This lot was analyzed and released by our authorized Quality Control Department and was found to meet the specifications as given above.  This product meets all requirements of the following valid compendia when tested accordingly:  USP + FCC + Ph. Eur.</p>			
<p>DSM Nutritional Products (JII) Ltd.  The Quality Assurance Manager</p> <p>  Stefan Fisser</p>			
DSM Nutritional Products (JII) Ltd. City: 401012 Breda UK: 020 211		2/2	Release Date : 25-Mar-2010

## Lampiran 7. Certificate of Analysis mushroom tirosinase

**SIGMA-ALDRICH**  
 3153 Denon Street, St. Louis, MO 63103 USA  
 Aldrich: www.sigmaaldrich.com  
 Email: USA: techsup@sigma.com  
 Outside USA: techsup@sigma.com

**Certificate of Analysis**

**Product Name:**  
 Tyrosinase from mushroom - lyophilized powder >1000 IU/mg solid

**Product Number:** T8674  
**Lot Number:** 1201W311  
**Brand:** SIGMA  
**CAS Number:** 9007-10-3  
**MDL Number:** MWL00020118  
**Storage Temperature:** Store at 25 °C  
**Quality Assurance Date:** 16 APR 2011  
**Recommended Retail Date:** APR 2014

Test	Specification	Result
<b>Activity (solid)</b> Tyrosinase Activity Unit Definition: One unit will release tyrosine in 20% of 0.20% per minute at pH 6.5 at 25 deg C in a 2 ml reaction mix containing L-tyrosine	≥ 1000	1361
<b>Activity (20 °C)</b> Tyrosinase Activity Unit Definition: One unit will release tyrosine in 20% of 0.20% per minute at pH 6.5 at 25 deg C in a 2 ml reaction mixture containing L-tyrosine and hydroxyphenylacetic acid (HOPA)	≥ 30000	38231
<b>Activity (solid)</b> Control: Relative Activity Unit Definition: One unit will release tyrosine in 20% of 0.20% per minute at pH 6.5 at 25 deg C in a 2 ml reaction mixture containing tyrosine and ascorbic acid	≥ 200000	219250

**Recommended Retail Period:**  
3 Years

*Robert Barbach*  
 Robert Barbach, Manager  
 Analytical Services  
 St. Louis, Missouri, US

Significant variations from the terms of the quality certificate or subsequent manufacturing order will be referred to the information contained in the COA only. This cannot be held as a guarantee of the product. For further inquiries, please contact Technical Services. Analytical Services may not be available for the product for its portion of the manufacturing cycle of the manufacturing site for different terms and conditions of sale.

Master Number: 1 Page 1 of 1

## Lampiran 8. Certificate of Analysis asam kojat

SIGMA-ALDRICH		SIGMA L'Abord The World's Most Complete Chemical Supplier Tel: 41-81-26311 Fax: 41-81-25544
<b>Certificate of Analysis</b>		
Product Name:	KOJIC ACID	
Product Number:	K3125	
Product Brand:	S9702	
Molecular Formula:	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
Molecular Mass:	142.11	
CAS Number:	541-39-4	
<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>LOT 1363411V RESULTS</b>
APPEARANCE (COLOR):	WHITE TO TAN TO YELLOW	PAINT YELLOW
APPEARANCE (FORM):	Powder	FINE CRYSTALS
PURITY (HPLC AREA %):	> 99.9 %	100.0 %
SOLUBILITY (COLOR):	COLORLESS TO BROWNISH YELLOW	VERY PAINTLY YELLOW
SOLUBILITY (TURBIDITY):	CLEAR	CLEAR (4.5.5 NTU)
SOLUBILITY (METHOD):	50 MG/ML IN WATER	-
CARDOL CONTENT:	45.3 % - 51.6 %	50.46 %
INFRARED SPECTRUM:	CONSISTENT WITH STRUCTURE	CONSISTENT
GC RELEASE DATE:	2/20/02	
 Edmund Schwabke - Manager Quality Control Berlin, Germany		
<p><small>Sigma-Aldrich is not responsible for the quality of material that is used in the synthesis of a product. The quality of a product is the responsibility of the manufacturer. Sigma-Aldrich is not responsible for the quality of a product that is used in the synthesis of a product. The quality of a product is the responsibility of the manufacturer.</small></p>		
Sigma-Aldrich	Certificate of Analysis - Product K3125 Lot 1363411V	Page 1 of 1

## Lampiran 9. Certificate of Analysis Na-EDTA

08230080  
20101925  
**MERCK**

## Certificate of Analysis

#MS pub/certificate/merck/tdo

Date of print: 10.08.2006

---

1.00418.0000 - Triplets II CR for analysis  
(ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt  
dihydrate) AGS/SD, Reag. Fl. Eur.

Batch: K57075615 v

	Spec. Value	Batch Value
Assay (complementary calculation of actual value)	99.0 - 101.2 %	99.8 %
Identity	complies	complies
Appearance	white, crystalline powder	yellowish powder
Formulation of solution (0.1 g/l in water, 20°C)	clear, colorless solution	yellowish solution
Titrimetric: free base (acid)	≤ 0.001 %	≤ 0.001 %
Chloride (Cl)	≤ 0.004 %	≤ 0.001 %
Sulfate (SO <sub>4</sub> )	≤ 0.001 %	≤ 0.001 %
Cyanide (CN)	≤ 0.001 %	≤ 0.001 %
Heavy metals (m/m)	≤ 0.0005 %	≤ 0.0003 %
Ca (Calcium)	≤ 0.0001 %	complies
Co (Copper)	≤ 0.0003 %	≤ 0.0001 %
Fe (Iron)	≤ 0.0003 %	≤ 0.0001 %
Pb (Lead)	≤ 0.0001 %	≤ 0.0001 %
Nickel residue (DTPC)	≤ 0.001 %	≤ 0.001 %
Loss on drying (105/2 h/30)	8.7 - 11.4 %	9.3 %

Merck KGaA 64271 Darmstadt (Germany) Tel. 049 451/2 0 Page 1 of 2





Lampiran 11. Certificate of Analysis Na metabisulfit

MERCCK

## Certificate of Analysis

http://certificates.merck.de

Date of print: 05/11/2010

---

1.05598.1000 Sodium disulfite (anhydrous) GR for analysis  
 ACS, Hestg. 175 East

Batch: K40721300

---

	Spec. value	Unit	Test value	Unit
Appearance	white powder		white powder	
Appearance of solution	clear, colorless		clear, colorless	
Water content (Karl Fischer)	≤ 0.10	%	0.05	%
Residue on ignition	≤ 0.10	%	0.05	%
Loss on drying (105°C)	≤ 0.10	%	0.05	%
Total Ash (550°C)	≤ 0.10	%	0.05	%
Acidity (0.1M NaOH)	≤ 0.001	%	0.0005	%
Chloride (Cl <sup>-</sup> )	≤ 0.005	%	0.002	%

Total: 100.0000      100.0000  
 Maximum: 100.0000      100.0000

Dr. Andrea Lang  
 Deputy Director, Quality Control

If you have any questions, please contact us at 0049 69 275 10000

Merck KGaA, Postfach 2003, 64233 Darmstadt (Germany) | Fax: 06181 39-1      Page 1 of 1  
 Website: www.merck.com | www.merck.de

## Lampiran 12. Certificate of Analysis propilen glikol

Particulars	Units	Results	Limits	Method	Remarks
Acidity	%	0.00	0.00	Current USP	✓
Alkalinity	%	0.00	0.00	Current USP	✓
Chlorides	%	0.00	0.10	Current USP	✓
Heavy Metals	ppm	5.0	10	Current USP	✓
Identification	Results			Current USP	✓
Residue on Ignition	%	0.00	0.10	Current USP	✓
Residue on Ignition	%	0.00	0.10	Current USP	✓
Specific Gravity		1.036	1.035	Current USP	✓
Sulfate	%	0.00	0.005	Current USP	✓
Water Content	%	0.00	0.005	Current USP	✓
Ethylene Glycol	%	0.00	0.00	Current USP	✓
Diethylene Glycol	%	0.00	0.00	Current USP	✓
Boiling Point	°C	124	124	Current USP	✓
Freezing Point	°C	-120	-120	Current USP	✓
Refractive Index		1.431	1.431	Current USP	✓
Relative Density		1.036	1.035	Current USP	✓
Distilled Ash	%	0.005	0.010	Current USP	✓

It is hereby certified that the material indicated above has been inspected and tested in accordance with the conditions and requirements of the contract or purchase order and, unless shown otherwise, conforms in all respects to the specification relevant thereto and in meets all requirements of the current United States Pharmacopoeia, current Food Chemical Codex, current European Pharmacopoeia and current Pharmacopoeia of Japan.

For inquiries please contact Customer Service or local sales.

## Lampiran 13. Certificate of Analysis gliserin

**PT SUMI ASIH**  
OLEOCHEMICALS INDUSTRY

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

ORDER NO. : 1408  
 D.O. NUMBER :  
 PRODUCT : GLYCERINE  
 TYPE : 3025  
 QUANTITY : 2,500 Kgs  
 LOT NUMBER : S01120  
 MANUFACTURING DATE : AUGUST, 2010  
 EXPIRY DATE : AUGUST, 2012

Items	Specification	Results
- Appearance	Liquid	Liquid
- General Content	99.5 Min	99.72
- Specific Gravity at 20°C	1.2626 Min	1.2613
- Alkalinity / Acidity, Eq. NaOH	0.0013 Max	0.0000
- Free Acid & Ester, ml of 0.5 N NaOH	1 Max	0.35
- Chloride	10 Max	0.22
- Chlorinated Compounds	70 Max	Less than 10
- Arsenic	1.5 Max	Less than 1.5
- Heavy Metals	5 Max	Less than 5.0
- Water Content	0.3 Max	0.17
- Colour in APHA	10 Max	6.0

\* Test Method in AOC'S and USP

Bekas, August 10, 2011

**P. CHAEMI**  
Quality Assurance

## Lampiran 14 Certificate of Analysis Ultrez-20

<b>Lubrizol</b>	<b>CERTIFICATE OF ANALYSIS CERTIFICAT D'ANALYSE</b>			
7701 TRADE PORT DRIVE LOUISVILLE KY 40258 USA	Date: November 13, 2009			
Phone No./No. de Téléphone: 502 395-1070	Certificate Receipt/Certificat à l'Attention de LUBRIZOL ADVANCED MATERIALS INC C/O CHEM MARKETING-NEW MILFORD 300 PICKETT DISTRICT RD NEW MILFORD CT 06776 USA			
12 Star Order No./No. LE Commande Client: 4501199403				
Carte PD No./No. Cde. Arret:				
Delivery No./No. de Livraison: B1348352	Material/Produit: CARDOPOL® ULTREZ 20 POLYMER, BOX			
Ex-Mano Order/Date d'Expédition: November 18, 2009	Qty/Qté: 1.0 CT			
Delivery Point/Lieu de Livraison: NEW MILFORD	Batch No./No. Lot Mfg: 0100761321			
Transportation Mode de Véhicule:	Mfg. Date: September 09, 2009			
Compartment/Conteneur/Boîte:	Country of Origin: BE			
Sold To/Client d'origine:	Ship-to/Client Livré: LUBRIZOL ADVANCED MATERIALS INC C/O CHEM MARKETING-NEW MILFORD 300 PICKETT DISTRICT RD NEW MILFORD CT 06776 USA			
Characteristics/Caractéristiques	Product Specifications/Spécifications Produit			
	Minimum	Typical Typique	Maximum	Result Résultat
BROOKFIELD VIS, 1.0% MURCHAGE @ 25 C	cP	47000	67000	56000
BROOKFIELD VIS, 1.0% W/DR SALT @ 25 C >	cP	4000		5600
BROOKFIELD VIS, 3.0% DISPERSION @ 25 C	cP	3500		8000
CLARITY, % TRANSMITTANCE	%	90.0	100.0	95.3
ETHYL ACETATE	%		0.45	0.16
CYCLOHEXANE	%		0.45	0.01
TOTAL RESIDUAL SOLVENT	%		0.45	0.27
MELTING TIME (MINUTES)	min		10	5
LOSS ON DRYING	%		2.00	Not Reported
EMULSIFYING, 1% IN 70% NAX				Pass
<p>Where actual values for Loss on Drying (Oven/10 lots) and Heavy Metals (Oven/200 lots) are not given, Lubrizol Advanced Materials, Inc. certifies that each batch/lot meets requirements for the characteristics based on historical process and product data. Because these characteristics are tested on a ship-to test frequency as indicated on the product specification, results are not reported on the Certificate of Analysis.</p>				
<p>We guarantee that the above analytical results are in conformity with the agreed upon specifications. Nous garantissons que les résultats d'analyse analytiques ci-dessus sont conformes aux spécifications agréées.</p>				
Approved by: LUBRIZOL QUALITY ASSURANCE				