



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN TIROSINASE SECARA *IN VITRO*
SERTA STABILITAS FISIK DAN STABILITAS KIMIA
SEDIAAN KRIM YANG MENGANDUNG ASAM AZELAT**

SKRIPSI

HASTRI MAHARDIKA

0806398291

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI FARMASI

DEPOK

JULI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN TIROSINASE SECARA *IN VITRO*
SERTA STABILITAS FISIK DAN STABILITAS KIMIA
SEDIAAN KRIM YANG MENGANDUNG ASAM AZELAT**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

HASTRI MAHARDIKA

0806398291

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI FARMASI

DEPOK

JULI 2012

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika dikemudian hari ternyata saya melakukan tindakan Plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 6 Juli 2012




Hastri Mahardika

HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS

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

Nama : Hastri Mahardika

NPM : 0806398291

Tanda Tangan : 





Tanggal : 6 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Hastri Mahardika
NPM : 0806398291
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Uji Penghambatan Tirosinase Secara *In Vitro* Serta Stabilitas Fisik dan Stabilitas Kimia Sediaan Krim yang Mengandung Asam Azelat

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Pharm.Dr.Joshita Djajadisastra, M.S., Ph.D ()
Pembimbing II : Dra. Azizahwati, M.S., Apt ()
Penguji I : Sutriyo, M.Si., S.Si. ()
Penguji II : Dr. Berna Elya, M.Si. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 6 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT. atas segala rahmat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi.

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dari berbagai pihak yang telah penulis terima, kiranya sulit bagi penulis untuk menyelesaikan penulisan ini tepat pada waktunya. Pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati penulis menyampaikan terima kasih yang tulus kepada :

1. Ibu Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, M.S., Ph.D. selaku dosen pembimbing I dan Ibu Dra. Azizahwati, M.S., Apt. selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan bantuan berupa bimbingan, nasehat, ilmu, dukungan dan motivasi selama penelitian berlangsung dan penyusunan skripsi.
2. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S. selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
3. Bapak Sutriyo, M.Si., S.Si., Apt. selaku pembimbing akademik yang telah banyak memberikan bimbingan dan nasehat selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
4. Seluruh staf pengajar, karyawan dan laboran Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah banyak membantu penulis selama masa pendidikan dan penelitian.
5. Keluargaku tercinta, Papa, mama, bang Ki dan dedek, atas banyaknya dukungan, kasih sayang, perhatian, kesabaran, dorongan semangat, dan do'a yang tidak henti-hentinya dan dana yang diberikan untuk penulis.
6. Teman-teman penelitian di KBI Farmasetika, serta teman-teman Farmasi UI angkatan 2008 atas dukungan dan kerja sama selama ini.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga terselesaikannya skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Akhir kata penulis mengharapkan semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2012



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

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

Nama : Hastri Mahardika
NPM : 0806398291
Program Studi : Sarjana Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya saya yang berjudul :

Uji Penghambatan Tirosinase secara *In Vitro* serta Stabilitas Fisik dan Stabilitas Kimia Sediaan Krim yang Mengandung Asam Azelat

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmeda/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan 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 : 6 Juli 2012

Yang menyatakan



(Hastri Mahardika)

ABSTRAK

Nama : Hastri Mahardika
Program Studi : Farmasi
Judul : Uji Penghambatan Tirosinase secara *In Vitro* serta Stabilitas Fisik dan Stabilitas Kimia Sediaan Krim yang Mengandung Asam Azelat

Asam azelat (*1,7-heptanedicarboxylic acid*) merupakan suatu asam dikarboksilat yang diduga memiliki aktivitas anti tirosinase dengan menghambat reaksi oksidasi l-tirosin dan l-DOPA dalam pembentukan melanin. Penelitian ini dilakukan untuk melihat aktivitas asam azelat murni dan krim asam azelat dalam menghambat tirosinase. Asam azelat diformulasikan menjadi krim dengan konsentrasi 5 dan 10 %. Uji kestabilan fisik dan kimia dilakukan dengan penyimpanan sediaan pada tiga suhu yang berbeda yaitu suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Pengukuran penghambatan tirosinase dilakukan dengan pengukuran dopakrom yang terbentuk secara *in vitro*. Hasil uji stabilitas fisik kedua krim asam azelat tidak menunjukkan pemisahan fase pada setiap suhu penyimpanan, pada uji mekanik memperlihatkan krim tahan pada gaya sentrifugasi selama satu tahun. Hasil uji stabilitas kimia menunjukkan bahwa kadar asam azelat yang terkandung didalam krim cenderung memperlihatkan penurunan. Hasil pengukuran penghambatan aktivitas tirosinase krim asam azelat 5 % dan 10 % berturut yaitu 26,50 % dan 51,54 %. Penghambatan aktivitas tirosinase krim mengalami penurunan setelah penyimpanan selama dua bulan pada suhu kamar. Krim asam azelat 5 % menurun aktivitasnya menjadi 22,44 % dan krim asam azelat 10 % menurun aktivitasnya menjadi 46,54 %. Penurunan aktivitas penghambatan tirosinase disebabkan karena asam azelat di dalam krim mengalami oksidasi selama penyimpanan.

Kata kunci : penghambatan aktivitas tirosinase, asam azelat, krim, stabilitas fisik, stabilitas kimia.
xvi + 65 hlm : 33 gambar; 11 tabel; 46 lampiran
Daftar acuan : 35 (1978-2011)

ABSTRACT

Name : Hastri Mahardika
Program Study : Pharmacy
Title : In Vitro Tyrosinase Inhibition Assay, Physical and Chemical Stability of Cream with Azelaic Acid

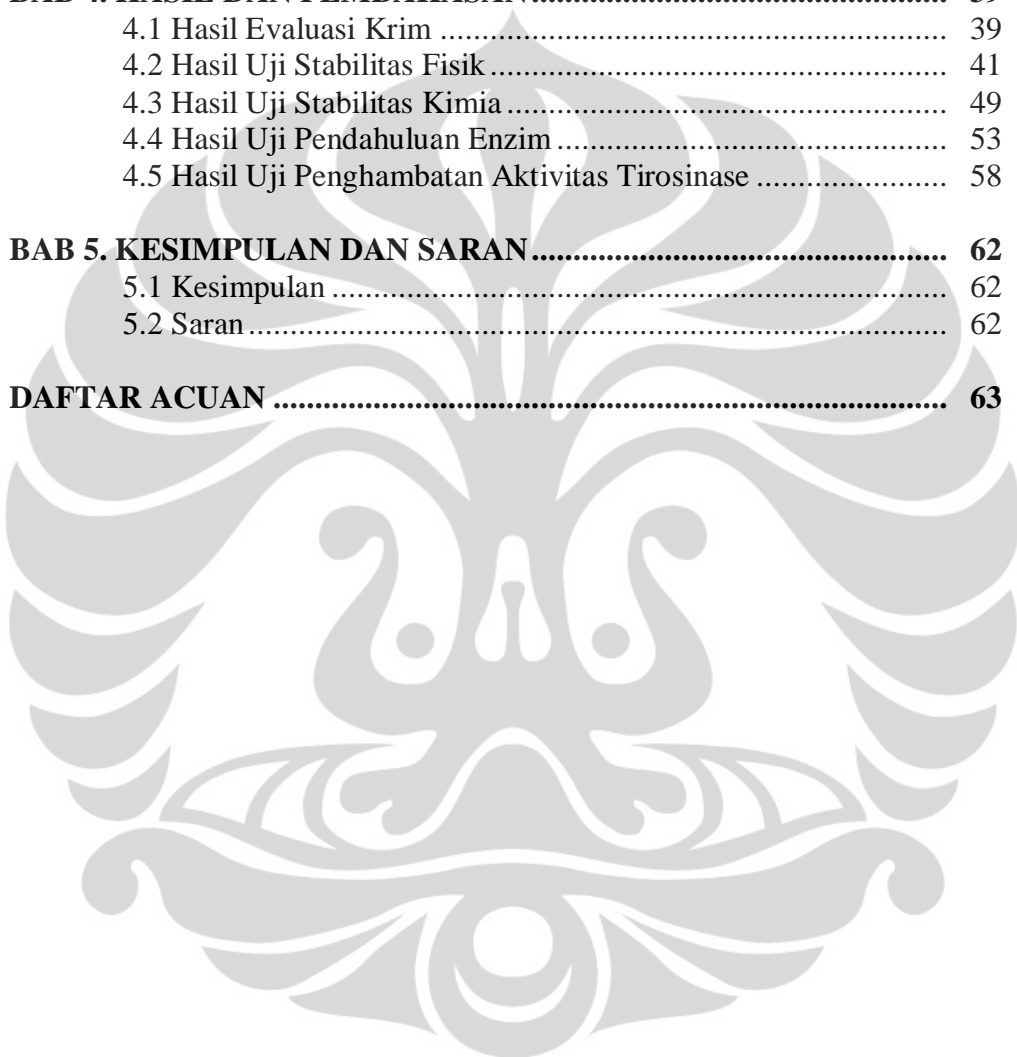
Azelaic acid (*1,7-heptanedicarboxylic acid*) is a dicarboxylic acid which is have to considered activity as tyrosinase inhibitors by inhibit is oxidation of l-tyrosine and l-DOPA in mechanism of melanogenesis. The study was conducted to investigate the inhibition tyrosinase activity of pure azelaic acid and azelaic acid in cream. Azelaic acid was formulated into creams with the concentration of 5 % and 10 %. Physical and chemical stability test of cream was conducted with storing the creams at three different temperatures, 4 ± 2 , 27 ± 2 and $40 \pm 2^\circ\text{C}$ respectively. Tyrosinase inhibitory activity was measured in vitro by measuring dopachrome. The result of physical stability test showed no phase separation on storage and endure with centrifugation energy in one year. The chemical stability test showed that azelaic acid was not stable stored at any temperature. The tyrosinase inhibition activity of creams 5 % and 10 % azelaic acid were 26,50 % and 51,54 % respectively. Tyrosinase inhibition activity of creams decreased after two month stored at ambient temperature. Tyrosinase inhibition activity of cream 5 % azelaic acid decreased to 22,44 %, and cream 10 % azelaic acid decreased to 46,54 %. The decreasing of tyrosinase inhibition activity is caused by azelaic acid oxidation in cream.

Keyword : tyrosinase inhibition activity, azelaic acid, cream, physical stability, chemical stability
xvi + 65 pages : 33 picture; 11 tables; 46 appendix
references : 35 (1978-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	viii
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACK.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Kulit	3
2.1.1 Struktur Kulit.....	3
2.1.2 Fisiologi Kulit.....	4
2.1.3 Mekanisme Pigmentasi Kulit	6
2.2 Asam Azelat.....	8
2.3 Enzim.....	9
2.3.1 Klasifikasi Enzim	9
2.3.2 Mekanisme Kerja Enzim.....	10
2.3.3 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	11
2.3.4 Persamaan Michaelis-Menten	11
2.3.5 Penghambatan Enzim	14
2.4 Tirosinase.....	15
2.5 Krim.....	16
2.6 Stabilitas Krim	22
2.6.1 Stabilitas Fisik	22
2.6.1 Stabilitas Kimia	25
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	27
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	27
3.2 Alat	27
3.3 Bahan	27
3.4 Cara Kerja	28
3.4.1 Formulasi dan Pembuatan Krim.....	28
3.4.2 Evaluasi Fisik Sediaan Krim	29

3.4.3 Uji Stabilitas Fisik	30
3.4.4 Uji Stabilitas Kimia	31
3.4.5 Pembuatan Larutan Pereaksi	32
3.4.6 Uji Pendahuluan Enzim	33
3.4.7 Penentuan Tipe Penghambatan Tirosinase.....	34
3.4.8 Uji Penghambatan Tirosinase (IC ₅₀) Asam Azelat.....	36
3.4.9 Uji Penghambatan Tirosinase dari Krim.....	37
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Hasil Evaluasi Krim	39
4.2 Hasil Uji Stabilitas Fisik	41
4.3 Hasil Uji Stabilitas Kimia	49
4.4 Hasil Uji Pendahuluan Enzim	53
4.5 Hasil Uji Penghambatan Aktivitas Tirosinase	58
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	62
5.1 Kesimpulan	62
5.2 Saran	62
DAFTAR ACUAN	63



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur kulit	4
Gambar 2.2	Sintesis melanin	7
Gambar 2.3	Struktur asam azelat	9
Gambar 2.4	Kurva pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim	12
Gambar 2.5	Kurva Lineweaver-Burk dari $1/V_i$ terhadap $1/[S]$	13
Gambar 2.6	Kurva Lineweaver-Burk inhibisi kompetitif (a) dan inhibisi Non kompetitif (b)	15
Gambar 2.7	Struktur asam stearat	18
Gambar 2.8	Struktur setil alkohol	18
Gambar 2.9	Struktur isopropil miristat	19
Gambar 2.10	Struktur trietanolamin	19
Gambar 2.11	Struktur gliseril monostearat	20
Gambar 2.12	Struktur propilen glikol	20
Gambar 2.14	Struktur propil paraben	21
Gambar 2.15	Struktur metil paraben	21
Gambar 2.16	Struktur butilhidroksitoluen	22
Gambar 4.1	Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada minggu ke-0	39
Gambar 4.2	Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu	41
Gambar 4.3	Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu	42
Gambar 4.4	Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu	42
Gambar 4.5	Hasil pengukuran pH tiap sediaan pada penyimpanan $4 \pm 2^\circ\text{C}$, $27 \pm 2^\circ\text{C}$ dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$	43
Gambar 4.6	Hasil pengukuran diameter globul tiap sediaan pada penyimpanan $4 \pm 2^\circ\text{C}$, $27 \pm 2^\circ\text{C}$ dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$	45
Gambar 4.7	Kurva sifat alir krim A dan krim B pada minggu ke-0 dan Minggu ke-8	46
Gambar 4.8	Foto hasil pengamatan setelah <i>cycling test</i>	48
Gambar 4.9	Foto hasil pengamatan setelah uji mekanik	49
Gambar 4.10	Kurva kalibrasi asam azelat dalam metanol	50
Gambar 4.11	Kurva stabilitas kimia asam azelat tiap sediaan pada penyimpanan $4 \pm 2^\circ\text{C}$, $27 \pm 2^\circ\text{C}$ dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$	52
Gambar 4.12	Penentuan panjang gelombang maksimum serapan Dopakrom	54
Gambar 4.13	Kurva penentuan konsentrasi optimum L-DOPA sebagai Substrat	55
Gambar 4.14	Kurva penentuan kondidi pH optimum	56
Gambar 4.15	Kurva Lineweaver-Burk tanpa dan dengan penghambat	58
Gambar 4.16	Struktur substrat dari tirosinase	59
Gambar 4.17	Kurva konsentrasi asam azelat (ppm) terhadap % Penghambatan	59

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Komposisi basis krim.....	17
Tabel 3.1	Persentase komposisi bahan dalam krim.....	28
Tabel 3.2	Komposisi larutan reaksi Kurva Lineweaver-Burk tanpa penghambat.....	34
Tabel 3.3	Komposisi larutan reaksi Kurva Lineweaver-Burk dengan penghambat.....	35
Tabel 3.4	Komposisi larutan reaksi IC ₅₀ dari asam azelat.....	36
Tabel 3.5	Komposisi laruta reaksi penghambatan tirosinase krim asam azelat	37
Tabel 4.1	Hasil pengamatan cycling test	47
Tabel 4.2	Hasil pengamatan uji mekanik	48
Tabel 4.3	Hasil perhitungan konstanta laju (k), waktu paruh (t _{1/2}) dan t ₉₀	53
Tabel 4.4	Perhitungan regresi linier Kurva Lineweaver-Burk.....	57
Tabel 4.5	Hasil pengukuran penghambatan tirosinase asam azelat pada Minggu ke-0 dan minggu ke-8 dengan spektrofotometer UV-Vis	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Foto alat-alat dan bahan yang digunakan	68
Lampiran 2.	Foto hasil pengamatan ukuran globul pada minggu ke-0....	70
Lampiran 3.	Foto hasil pengamatan ukuran globul pada suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu.....	71
Lampiran 4.	Foto hasil pengamatan ukuran globul pada suhu $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu.....	72
Lampiran 5.	Foto hasil pengamatan ukuran globul pada suhu $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu.....	73
Lampiran 6.	Tabel hasil evaluasi fisik kedua krim pada minggu ke-0	74
Lampiran 7.	Hasil pengamatan organoleptis krim A dan krim B pada suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu	75
Lampiran 8.	Hasil pengukuran pH krim A dan krim B pada suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu.....	77
Lampiran 9.	Hasil pengukuran diameter globul krim pada suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu.....	78
Lampiran 10.	Tabel hasil perhitungan viskositas krim A pada minggu ke-8.....	79
Lampiran 11.	Tabel hasil perhitungan viskositas krim B pada minggu ke-8.....	80
Lampiran 12.	Tabel hasil perhitungan viskositas krim A pada minggu ke-0.....	81
Lampiran 13.	Tabel hasil perhitungan viskositas krim B pada minggu ke-0.....	82
Lampiran 14.	Tabel data serapan kurva kalibrasi asam azelat dalam metanol	83
Lampiran 15.	Tabel data stabilitas kimia krim A dan krim B pada minggu ke-0.....	83
Lampiran 16.	Tabel data stabilitas kimia krim A dan krim B pada minggu ke-4.....	84
Lampiran 17.	Tabel data stabilitas kimia krim A dan krim B pada minggu ke-8.....	84
Lampiran 18.	Tabel data serapan optimasi substrat L-DOPA.....	85
Lampiran 19.	Tabel data serapan optimasi kondisi pH dapar fosfat	85
Lampiran 20.	Tabel data kurva Lineweaver-Burk tanpa dan dengan penghambat	86
Lampiran 21.	Perhitungan HLB krim	88
Lampiran 22.	Perhitungan aktivitas unit enzim.....	89
Lampiran 23.	Perhitungan diameter globul rata-rata minggu ke-0	90
Lampiran 24.	Perhitungan diameter globul rata-rata minggu ke-2	91
Lampiran 25.	Perhitungan diameter globul rata-rata minggu ke-4	94
Lampiran 26.	Perhitungan diameter globul rata-rata minggu ke-6	97
Lampiran 27.	Perhitungan diameter globul rata-rata minggu ke-8	100
Lampiran 28.	Perhitungan konstanta laju (k), waktu paruh ($t_{1/2}$) dan t_{90} krim A dan krim B pada suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$	103

Lampiran 29. Perhitungan konstanta laju (k), waktu paruh ($t_{1/2}$) dan t_{90} krim A dan krim B pada suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$	104
Lampiran 30. Perhitungan konstanta laju (k), waktu paruh ($t_{1/2}$) dan t_{90} krim A dan krim B pada suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$	105
Lampiran 31. Penentuan IC_{50} dari asam azelat	106
Lampiran 32. Penentuan IC_{50} dari asam askorbat sebagai kontrol positif	106
Lampiran 33. Perhitungan % penghambatan tirosinase dari krim asam azelat.....	107
Lampiran 34. Perhitungan % penghambatan tirosinase krim asam askorbat sebagai kontrol positif	109
Lampiran 35. Sertifikat analisis asam azelat	110
Lampiran 36. Sertifikat analisis tirosinase	111
Lampiran 37. Sertifikat analisis levodopa.....	112
Lampiran 38. Sertifikat analisis asam askorbat.....	113
Lampiran 39. Sertifikat analisis asam stearat.....	114
Lampiran 40. Sertifikat analisis gliseril monostearat	115
Lampiran 41. Sertifikat analisis isopropil miristat	117
Lampiran 42. Sertifikat analisis setil alkohol.....	119
Lampiran 43. Sertifikat analisis propilen glikol.....	120
Lampiran 44. Sertifikat analisis metil paraben.....	121
Lampiran 45. Sertifikat analisis propil paraben	122
Lampiran 46. Sertifikat analisis butil hidroksi toluen.....	123

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kulit merupakan suatu organ terluar dari tubuh yang berperan penting sebagai pertahanan terhadap bakteri, virus dan agen-agen toksik lainnya. Salah satu fungsi utamanya adalah melindungi kulit dari bahaya paparan sinar UV. Paparan sinar UV dalam waktu yang lama dengan frekuensi yang sering dapat menyebabkan gangguan pada kulit. Sinar UV dapat meningkatkan sintesis melanin di kulit dan menyebabkan hiperpigmentasi.

Hiperpigmentasi merupakan suatu gangguan pada pigmen kulit wajah yang umum terjadi karena adanya peningkatan proses melanogenesis yang dapat menyebabkan penggelapan dari warna kulit. Selain itu peningkatan sintesis melanin secara lokal atau tidak merata dapat menyebabkan pigmentasi lokal atau noda hitam pada bagian tertentu dari wajah (Cayce, McMichael & Feldman, 2004).

Salah satu cara untuk mencegah atau menghambat pembentukan melanin adalah dengan melakukan penghambatan aktivitas tirosinase (Lloyd, Jenna & Kammer, 2011). Tirosinase merupakan enzim yang berperan dalam pembentukan pigmen kulit dari seseorang karena terlibat dalam proses melanogenesis. Tirosinase berperan sebagai katalis pada dua reaksi yang berbeda yaitu proses hidroksilasi tirosin menjadi dihidroksi-fenilalanin (L-DOPA) dan oksidasi L-DOPA menjadi DOPA quinon (Fais, et al., 2009). Tirosinase pada jaringan kulit diaktivasi oleh radiasi sinar UV matahari sehingga mempercepat produksi melanin. Penghambatan pada aktivitas tirosinase memberikan efek yang menguntungkan pada beberapa individu, terutama pada kalangan wanita muda karena dengan adanya penghambatan tirosinase akan meningkatkan kecerahan kulit dengan mengurangi efek penggelapan kulit (Djajadisastra, 2003).

Saat ini telah banyak ditemukan bahan-bahan kimia baik bahan alam maupun sintetik yang memiliki efek dalam menghambat tirosinase. Beberapa contoh seperti hidrokuinon, asam kojat dan arbutin merupakan bahan-bahan kimia

yang biasa digunakan sebagai kosmetik pencerah kulit. Selain itu, terdapat bahan kimia lain yang memiliki potensi sebagai zat aktif pada kosmetik pencerah kulit yaitu *azelaic acid* atau asam azelat. Sebagai pencerah kulit asam azelat bersifat selektif dalam menekan pigmentasi kulit yang diinduksi oleh sinar UV. Smit, Vicanova & Pavel (2009) menyatakan bahwa asam azelat merupakan suatu agen pemutih yang dapat menghambat produksi melanin dan aktivitas tirosinase. Asam azelat dalam bentuk produk yang terdapat dipasaran lebih banyak digunakan untuk mengobati jerawat, melasma dan *rosacea*. Sedangkan aplikasinya sebagai kosmetik pencerah kulit masih belum banyak dipergunakan sehingga dibutuhkan pengembangan dan penelitian lebih lanjut untuk melihat aktivitasnya dalam mencerahkan kulit.

Asam azelat dibuat menjadi suatu sediaan kosmetik yang digunakan sebagai pemutih. Bentuk sediaan kosmetik pemutih yang sering digunakan adalah sediaan krim, terutama untuk kulit wajah. Bentuk sediaan krim ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan bentuk sediaan lainnya seperti penyebarannya yang merata dan mudah untuk dibersihkan, khususnya krim minyak dalam air (Ansel, 1989). Pertimbangan yang penting bagi sediaan farmasi dan kosmetik adalah stabilitas dari produk jadi. Sediaan kosmetik yang stabil masih berada dalam batas yang dapat diterima selama periode penyimpanan dan penggunaan, yaitu sifat dan karakteristiknya sama dengan saat dibuat (Djajadisastra, 2004). Adanya asam azelat kemungkinan dapat mempengaruhi kestabilan fisik krim sehingga perlu dilakukan uji kestabilan fisik krim. Selain itu selama penyimpanan dan penggunaan dapat memungkinkan berkurangnya konsentrasi zat aktif sehingga perlu dilakukan uji kestabilan kimia krim.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas asam azelat murni dan asam azelat dalam sediaan krim dalam menghambat aktivitas tirosinase, serta menguji stabilitas fisik dan kimia sediaan krim yang mengandung asam azelat tersebut.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit

2.1.1 Struktur Kulit

Kulit merupakan selimut yang menutupi permukaan tubuh dan memiliki fungsi utama sebagai pelindung dari berbagai macam gangguan dan rangsangan dari luar. Fungsi perlindungan terjadi melalui sejumlah mekanisme biologis, seperti pembentukan lapisan tanduk secara terus-menerus, respirasi dan pengaturan suhu tubuh, produksi sebum dan keringat, dan pembentukan melanin untuk melindungi kulit dari bahaya sinar ultraviolet matahari, sebagai peraba dan perasa, serta pertahanan terhadap tekanan dan infeksi dari luar. Luas permukaan kulit sekitar 2 m² dengan berat 10 kg jika dengan lemak atau 4 kg jika tanpa lemak (Tranggono & Latifah, 2007).

Kulit manusia terdiri atas tiga lapisan, yaitu lapisan epidermis, lapisan dermis dan lapisan subkutan. Lapisan epidermis dibentuk dari beberapa lapisan sel dengan ketebalan 0,1-1 mm dan berbeda-beda pada tiap bagian tubuh. Dari luar ke dalam lapisan epidermis terdiri dari lapisan tanduk (*stratum corneum*), lapisan jernih (*stratum lucidum*), lapisan berbutir-butir (*stratum granulosum*), lapisan malphigi (*stratum spinosum*) dan lapisan basal (*stratum germinativum*). Lapisan tanduk terdiri dari beberapa lapis sel yang pipih, mati, tidak memiliki inti, tidak mengalami proses metabolisme, tidak berwarna dan sangat sedikit mengandung air. Lapisan jernih merupakan lapisan yang tipis, jernih, mengandung eleidin, dan lapisan ini terlihat jelas pada telapak tangan dan telapak kaki. Pada lapisan berbutir-butir tersusun oleh sel-sel keratinosit yang berbentuk poligonal, berbutir kasar dan berinti mengkerut. Lapisan malphigi memiliki sel yang berbentuk kubus dan seperti berduri. Intinya besar dan oval. Setiap sel berisi filamen-filamen kecil yang terdiri atas serabut protein. Sedangkan pada lapisan basal juga terdapat sel-sel melanosit yang tidak mengalami keratinisasi dan berfungsi membentuk pigmen melanin (Tranggono & Latifah, 2007).

Pada lapisan kedua atau lapisan dermis memiliki ketebalan yang lebih daripada epidermis. Terbentuk oleh jaringan elastik dan fibrosa padat dengan elemen selular, kelenjar dan rambut sebagai adneksa kulit. Lapisan ini terdiri atas pars papilaris, bagian yang menonjol ke dalam epidermis berisi ujung serabut saraf dan pembuluh darah, dan pars retikularis, bagian bawah dermis yang berhubungan dengan lapisan subkutan. Terdiri atas serabut penunjang kolagen, elastin dan retikulin (Wasitaatmadja, 1997). Lapisan subkutan merupakan lapisan paling dalam dari kulit. Merupakan kelanjutan dermis, terdiri atas jaringan ikat longgar berisi sel-sel lemak di dalamnya. Sel lemak merupakan sel bulat, besar, dengan inti terdesak ke pinggir karena sitoplasma lemak yang bertambah. Tidak ada garis tegas yang memisahkan dermis dan subkutan (Wasitaatmadja, 1997)



Gambar 2.1. Struktur kulit (Subowo, 1992)

2.1.2 Fisiologi Kulit

Kulit memiliki fungsi yang cukup vital bagi tubuh kita, beberapa fungsi kulit diantaranya (Wasitaatmadja, 1997):

a. Fungsi proteksi

Kulit melindungi bagian dalam tubuh manusia terhadap gangguan fisik maupun mekanik, misalnya tekanan, gesekan, tarikan, gangguan kimiawi, seperti zat-zat kimia iritan (lisol, karbol, asam atau basa kuat lainnya), gangguan panas atau dingin, gangguan sinar radiasi atau sinar ultraviolet, gangguan kuman, jamur, bakteri, atau virus. Gangguan fisik dan mekanik ditanggulangi dengan adanya bantalan subkutis, tebalnya lapisan kulit, dan serabut penunjang yang berfungsi sebagai pelindung bagian luar tubuh.

Gangguan sinar ultra violet diatasi dengan sel melanin yang menyerap sebagian sinar tersebut. Gangguan kimia ditanggulangi dengan adanya lemak permukaan kulit yang berasal dari kelenjar palit kulit yang mempunyai pH 5-6,5.

b. Fungsi absorpsi

Kulit yang sehat tidak mudah menyerap air, larutan, maupun benda padat. Tetapi cairan yang mudah menguap lebih mungkin mudah diserap kulit, begitu pula zat yang larut dalam minyak. Kemampuan absorpsi kulit dipengaruhi oleh tebal tipisnya kulit, hidrasi, kelembaban udara, metabolisme, dan jenis pembawa zat yang menempel di kulit.

c. Fungsi ekskresi

Kelenjar-kelenjar pada kulit mengeluarkan zat-zat yang tidak berguna atau sisa metabolisme dalam tubuh misalnya NaCl, urea, asam urat, ammonia, dan sedikit lemak. Sebum yang diproduksi kelenjar palit kulit melindungi kulit dan menahan penguapan yang berlebihan sehingga kulit tidak menjadi kering.

d. Fungsi pengindra (sensori)

Kulit mengandung ujung-ujung saraf sensorik di dermis dan subkutis. Badan ruffini yang terletak di dermis menerima rangsangan dingin dan rangsangan panas yang diperankan oleh badan Krause. Badan taktil meissner yang terletak di papil dermis menerima rangsangan rabaan. Demikian pula badan Merkel-Renvier yang terletak di epidermis.

e. Fungsi pengaturan suhu tubuh (termoregulasi)

Kulit melakukan peran ini dengan cara mengeluarkan keringat dan mengerutkan otot dinding pembuluh darah kulit. Pada suhu tubuh yang meningkat, kelenjar kulit mengeluarkan banyak keringat ke permukaan kulit dan dengan penguapan keringat tersebut terbuang pula panas tubuh. Mekanisme termoregulasi ini diatur oleh sistem saraf simpatis yang mengeluarkan zat perantara asetilkolin.

f. Fungsi pembentukan pigmen (melanogenesis)

Sel pembentuk pigmen kulit (melanosit) terletak di lapisan basal epidermis. Sel ini berasal dari rige saraf, jumlahnya 1:10 dari sel basal. Jumlah melanosit serta jumlah dan besarnya melanin yang terbentuk menentukan warna kulit. Paparan sinar matahari mempengaruhi produksi melanin. Bila paparan bertambah, produksi melanin akan meningkat.

g. Fungsi keratinisasi

Keratinisasi dimulai dari sel basal yang kuboid, bermitosis ke atas berubah bentuk menjadi lebih poligonal yaitu sel spinosum, terangkat ke atas menjadi lebih gepeng, dan bergranula menjadi sel granulosum. Kemudian sel tersebut terangkat keatas lebih gepeng, dan granula serta intinya hilang dan akhirnya sampai di permukaan kulit menjadi sel mati, protoplasmanya mengering menjadi keras, gepeng, tanpa inti yang disebut sel tanduk. Proses ini berlangsung terus-menerus dan berguna untuk fungsi rehabilitasi kulit agar dapat melaksanakan fungsinya dengan baik.

h. Fungsi produksi vitamin D

Kulit juga dapat membuat vitamin D dari bahan baku 7-dihidroksikolesterol dengan bantuan sinar matahari. Namun produksi ini masih lebih rendah dari kebutuhan tubuh akan vitamin D dari luar makanan.

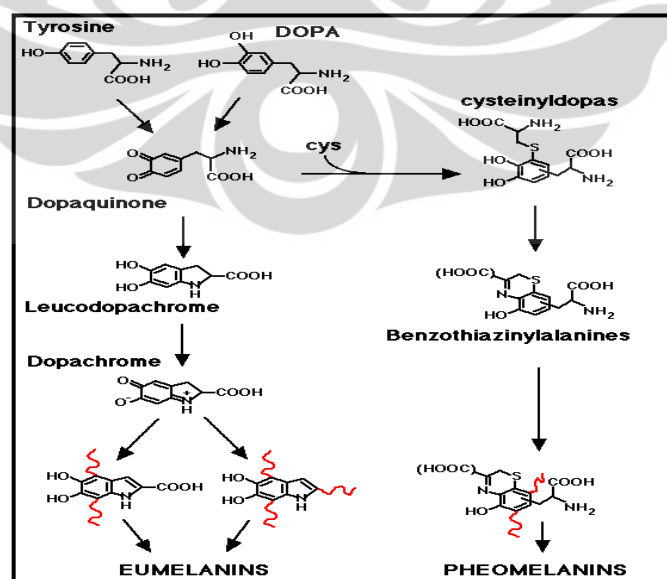
2.1.3 Mekanisme Pigmentasi Kulit

Warna kulit ditentukan oleh jumlah dan sebaran melanin yang dihasilkan oleh melanosom pada melanosit yang memberikan warna coklat pada kulit. Selain itu, juga ada beberapa zat lain yang menentukan warna kulit seseorang yaitu oxyhemoglobin pemberi warna merah, hemoglobin tereduksi yang berwarna merah kebiruan serta karoten pemberi warna kuning pada kulit (Tranggono & Latifah, 2007).

Proses pembentukan pigmen melanin terjadi pada butir-butir melanosom yang dihasilkan oleh sel-sel melanosit yang terdapat di antara sel-sel basal keratinosit di dalam lapisan basal (*stratum germinativum*). Melalui juluran lengan yang dinamakan dendrit, melanosit memberikan melanosom kepada

sejumlah sel-sel keratinosit. Melanosom yang terdapat di dalam keratinosit berbentuk partikel-partikel padat atau merupakan gabungan dari 3-4 buah partikel lebih kecil yang mempunyai membran, dinamakan melanosom kompleks (Tranggono & Latifah, 2007). Melanin terbentuk melalui rangkaian oksidasi dari asam amino tirosin dengan melibatkan tirosinase. Tirosinase menghidroksilasi tirosin menjadi dihidroksi fenilalanin atau DOPA dan selanjutnya DOPA mengalami oksidasi yang menghasilkan dopakuinon. Dopakuinon diubah menjadi dopakrom melalui autooksidasi sehingga menjadi dihidroksi indole (DHI) atau dihidroksi indole carboxy acid (DHICA) untuk membentuk eumelanin (pigmen berwarna coklat). Dengan adanya sistein atau glutation, dopakuinon diubah menjadi sisteinil dopa, reaksi ini membentuk feomelanin (pigmen berwarna kuning) (Parvez et al., 2006). Proporsi jumlah eumelanin dan feomelanin ini akan menentukan warna pada kulit yang bermacam-macam sehingga kulit manusia tidak hanya hitam atau putih saja.

Selain hal tersebut warna kulit seseorang dipengaruhi oleh banyak faktor, baik dari dalam tubuh maupun luar tubuh. Dari dalam tubuh misalnya faktor genetik dan hormonal, faktor genetik ini paling berpengaruh bukan karena jumlah sel melanosit yang berbeda, melainkan bergantung pada jumlah dan bentuk melanosom. Sedangkan faktor dari luar tubuh seperti sinar matahari, makanan, ataupun obat. Perpaduan faktor ini akan menghasilkan warna kulit tertentu.



Gambar 2.2. Sintesis Melanin (Jaques)

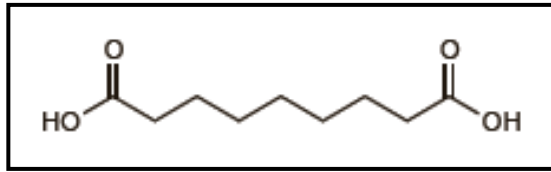
2.2 Asam Azelat

Asam azelat (*1,7-heptanedicarboxylic acid*) adalah suatu bahan kimia dengan struktur molekul rantai lurus, yang merupakan asam dikarboksilat yang terdiri dari sembilan atom karbon. Secara alami asam azelat terdapat pada ragi *Pityrosporum Ovale*, butir-butir padi, susu dan minyak jarak. Asam azelat pada ragi dihasilkan dari reaksi peroksidasi lemak bebas dan esterifikasi asam lemak ragi (Kim & Uyama, 2005). Selain itu asam azelat juga dapat dihasilkan dari oksigenasi asam oleat.

Formulasi asam azelat topikal memiliki aplikasi yang luas untuk mengobati berbagai penyakit, seperti jerawat, hiperpigmentasi, kerontokan rambut, kerutan, hiperhidrosis, inflamasi non jerawat dan infeksi. Asam azelat bersifat sangat sukar larut dalam pelarut air dimana angka kelarutan asam azelat sebesar 2,4 g/L air atau sebesar 0,24 % (w/w). Alkohol merupakan pelarut yang baik sebagai pelarut asam azelat seperti metanol dan etanol (Mather et al., 1999).

Asam azelat memiliki efek antibakteri, antiinflamasi dapat menghambat keratinisasi pada kulit. Uji secara *in vitro*, aplikasi asam azelat terhadap dermal dapat menghambat *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermis* (Bojar et al., 1994). Pada efek antimikotik terhadap variasi *dermatophytes* dan *Candida* diperlihatkan pada pH 4,8-5,5 pada uji *in vitro* dengan konsentrasi 0,5-4 % asam azelat (Brasch & Christophers, 1993).

Nazzaro-Porro dan Passi (1978) menyatakan bahwa beberapa fraksi lemak, yang sebagian besar merupakan asam dikarboksilat dengan atom karbon sembilan hingga sebelas, memiliki aktivitas dalam menghambat enzim tirosinase secara *in vitro*. Mereka menyatakan bahwa beberapa asam dikarboksilat yang diberikan secara lokal, dapat memberikan efek yang baik pada keadaan hiperpigmentasi. Pada kenyataannya, asam azelat sebuah asam dikarboksilat, mampu mengobati lentigo maligna dan melanoma. Kerja asam azelat dalam menghambat aktivitas tirosinase bersifat reversible dan kompetitif. Selain itu asam azelat bersifat selektif dalam memberikan efek sebagai pencerah kulit dengan meminimal atau menekan pigmentasi kulit (Parvez, 2006).



[sumber : Sweetman, 2009]

Gambar 2.3. Struktur Asam Azelat (telah diolah kembali)

2.3 Enzim

Enzim adalah polimer biologis yang mengkatalisis reaksi kimia. Enzim yang mengkatalisis perubahan satu atau lebih senyawa (substrat) menjadi satu atau lebih senyawa lain (produk) meningkatkan laju reaksinya setidaknya 10^6 kali dibandingkan jika tidak dikatalisis. Enzim tidak berubah secara permanen atau dikonsumsi sebagai konsekuensi dari keikutsertaannya dalam reaksi yang bersangkutan (Murray, Granner & Rodwell, 2006).

2.3.1 Klasifikasi Enzim

Menurut *International Union of Biochemists* (IUB), enzim dikelompokkan kedalam enam kelas:

- a. Oksidoreduktase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi dan reduksi yang terkait dalam transfer elektron
- b. Transferase, yaitu enzim yang mengkatalisis pemindahan atau transfer gugus fungsional yang bukan hidrogen antara suatu substrat dengan suatu senyawa penerima gugus.
- c. Hidrolase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi pemutusan ikatan kovalen dengan memecah satu molekul air dan memasukkan fragmen air ini kepada dua radikal pecahan substrat sehingga membentuk dua senyawa produk yang lebih kecil.
- d. Liase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi yang mengeluarkan suatu gugus dari substrat dengan cara yang bukan hidrolisis dan menghasilkan ikatan rangkap.
- e. Isomerase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan isomer, baik isomer optik, geometrik maupun isomer posisi.

- f. Ligase, yaitu enzim yang kerjanya menghasilkan molekul yang lebih besar daripada molekul substrat awal. Enzim ini mengkatalisis reaksi sintesis yang pada reaksi terjadi pemecahan ATP atau senyawa sejenisnya.

Banyak enzim mengandung berbagai molekul non protein kecil dan ion logam yang ikut serta secara langsung dalam katalisis atau pengikatan substrat. Molekul atau ion ini, yang disebut gugus prostetik, kofaktor dan koenzim. Gugus prostetik terintegrasi erat ke dalam struktur enzim. Contohnya antara lain adalah piridoksal fosfat, flavin mononukleotida (FMN), tiamin pirofosfat biotin dan ion logam Co, Cu, Mg, Mn, dan Zn. Sepertiga enzim mengandung ion-ion logam yang terikat erat yang disebut metaloenzim. Kofaktor memiliki fungsi serupa dengan gugus prostetik tetapi berikatan secara transien dan mudah terlepas dengan enzim atau substrat, misalnya ATP. Kofaktor harus terdapat dalam medium di sekitar enzim agar katalis dapat terjadi. Kofaktor yang paling umum adalah ion logam. Enzim yang memerlukan kofaktor ion logam disebut enzim yang diaktifkan oleh logam atau *metal activated enzymes*. Koenzim berfungsi sebagai pengangkut atau bahan pemindah gugus yang dapat di daur ulang dan memindahkan banyak substrat dari tempat pembentukannya ke tempat pemakaiannya (Murray, Granner & Rodwell, 2006).

2.3.2 Mekanisme Kerja Enzim

Terdapat dua mekanisme yang dapat menjelaskan proses pengikatan substrat terhadap enzim, yaitu mekanisme *Lock & Key* dan mekanisme *Induced-Fit*. Mekanisme *Lock & Key* dikemukakan oleh Emil Fischer pada tahun 1984 yang mana enzim dan substrat memiliki struktur geometrik tertentu yang saling komplemen satu sama lainnya. Model ini mampu menjelaskan sifat spesifik dari suatu enzim namun tidak dapat menjelaskan tingkat kestabilan yang mampu dicapai oleh kompleks teraktifkan enzim-substrat. Mekanisme *Induced-Fit* dikemukakan oleh Daniel Koshland pada tahun 1958 yang merupakan modifikasi dari mekanisme *Lock & Key*. Dalam mekanisme ini ikut dipertimbangkan struktur enzim yang relatif fleksibel dimana bagian sisi aktif enzim dapat terus mengalami perubahan ketika mulai terjadi interaksi. Enzim

akan menyesuaikan diri dengan geometri dari substrat sehingga pada akhirnya kedua geometri molekul yang terlibat saling komplemen.

2.3.3 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

2.3.3.1 Suhu

Reaksi katalis enzim sensitif terhadap perubahan suhu. Peningkatan suhu akan meningkatkan laju reaksi baik yang dikatalisis maupun yang tidak dikatalisis dengan meningkatkan energi kinetik dan frekuensi tumbukan molekul-molekul yang bereaksi. Namun, energi panas juga dapat meningkatkan energi kinetik enzim hingga ke suatu titik yang melebihi hambatan energi kinetik enzim untuk merusak interaksi nonkovalen. Rantai polipeptida enzim kemudian mulai terurai, atau mengalami denaturasi (Murray, Granner & Rodwell, 2006).

2.3.3.2 pH

Hampir semua laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim memperlihatkan ketergantungan yang signifikan terhadap pH. Hubungan aktivitas dengan pH memperlihatkan keseimbangan antara denaturasi enzim pada pH tinggi atau rendah dan efek pada keadaan yang bermuatan dari enzim, substrat, atau keduanya (Murray, Granner & Rodwell, 2006).

2.3.3.3 Konsentrasi Substrat

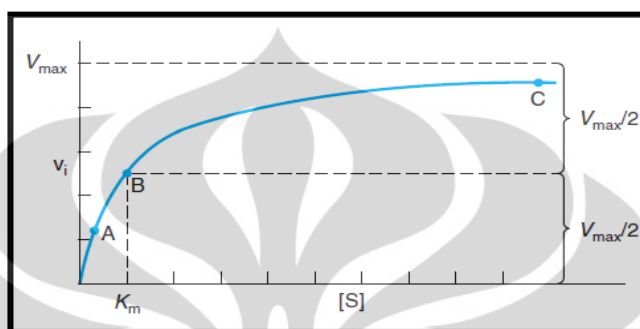
Untuk suatu enzim, peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan kecepatan reaksi (V) hingga tercapai kecepatan maksimal (V_{\max}). Jika dilakukan peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut maka tidak akan meningkatkan kecepatan reaksi dan enzim dikatakan jenuh karena bagian dari *active site* enzim telah terisi dengan adanya interaksi dengan substrat (Murray, Granner & Rodwell, 2006).

2.3.4 Persamaan Michaelis-Menten

Persamaan Michaelis-Menten memperlihatkan secara matematis hubungan antara kecepatan awal reaksi (V_i) dan konsentrasi substrat $[S]$ yang secara matematis diperlihatkan :

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

Konstanta Michaelis (K_m) adalah konsentrasi substrat dengan V_i adalah separuh dari kecepatan maksimal ($V_{\max}/2$) yang dapat dicapai pada konsentrasi tertentu enzim. Oleh karena itu, K_m memiliki besaran konsentrasi substrat.



[Sumber : Murray, Granner & Rodwell, 2006]

Gambar 2.4. Kurva pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim (telah diolah kembali)

Ketergantungan kecepatan reaksi awal pada $[S]$ dan K_m dapat diilustrasikan dengan mengevaluasi persamaan Michaelis-Menten dalam tiga kondisi :

- Bila $[S]$ jauh lebih kecil dari K_m atau konsentrasi substrat di bawah konsentrasi yang diperlukan untuk menghasilkan separuh-percepatan maksimal (nilai K_m), maka percepatan awal (V_i), akan bergantung pada konsentrasi substrat $[S]$. Pada gambar 2.4 dapat dilihat sebagai titik A.
- Bila konsentrasi substrat $[S]$ jauh melampaui K_m , maka percepatan awal V_i , merupakan percepatan maksimal (V_{\max}). Pada gambar 2.4 dapat dilihat sebagai titik C.
- Bila konsentrasi substrat sama dengan nilai K_m , maka percepatan awal V_i separuh dari percepatan maksimal. Pada gambar 2.4 dapat dilihat sebagai titik B.

Pengukuran langsung nilai numerik V_{\max} dalam menentukan perhitungan K_m akan membutuhkan konsentrasi substrat yang sangat tinggi untuk mencapai kondisi jenuh. Bentuk linier dari persamaan Michaelis-Menten dapat mengatasi masalah ini dan memungkinkan V_{\max} dan K_m diekstrapolasikan dari data

kecepatan awal yang diperoleh pada konsentrasi substrat yang lebih rendah dari pada konsentrasi jenuh. Dimulai pada persamaan :

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.2)$$

Persamaan dibalik :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} \quad (2.3)$$

selanjutnya difaktorkan :

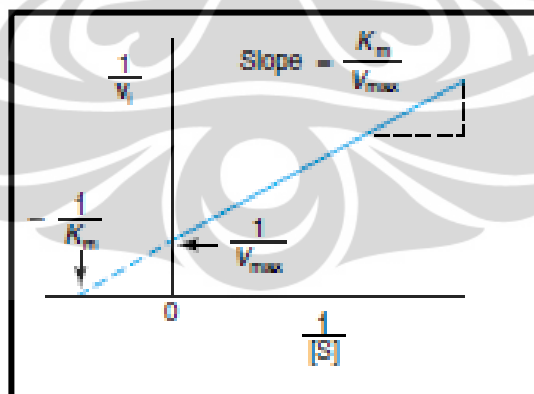
$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]} \quad (2.4)$$

dan persamaan disederhanakan menjadi :

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.5)$$

Persamaan diatas adalah persamaan untuk garis lurus, $y = ax + b$, dengan $y = 1/v_i$ dan $x = 1/[S]$. Oleh karena itu plot $1/v_i$ sebagai y yang merupakan fungsi dari $1/[S]$ sebagai x menghasilkan garis lurus yang memotong y pada $1/V_{\max}$ dengan kecuraman K_m/V_{\max} . Plot ini disebut plot timbal balik ganda atau plot Lineweaver-Burk. Dengan menempatkan $y = 0$ pada persamaan diatas dan menghitung x maka diperoleh bahwa garis memotong pada $-1/K_m$.

$$y = 0 \rightarrow 0 = ax + b; \text{ maka } x = -b/a = -1/K_m \quad (2.6)$$



[Sumber : Murray, Granner & Rodwell, 2006]

Gambar 2.5. Kurva Lineweaver-Burk dari $1/v_i$ terhadap $1/[S]$ (telah diolah kembali)

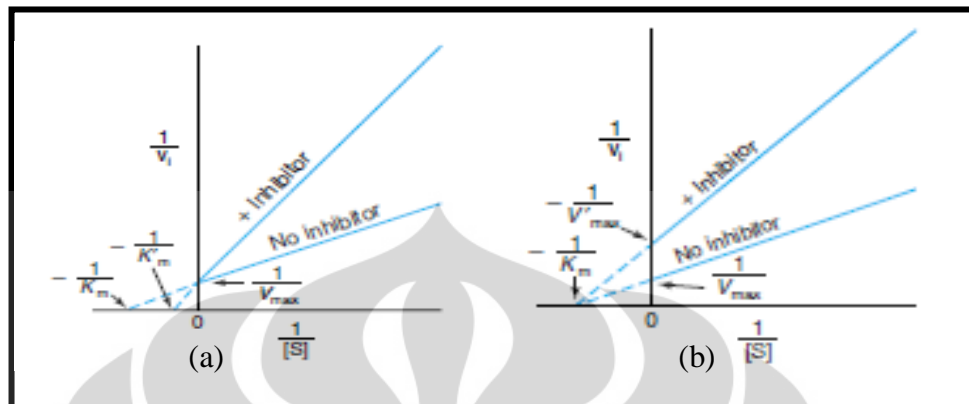
2.3.5 Penghambatan Enzim

Penghambat atau inhibitor enzim merupakan suatu zat yang dapat mengganggu kerja enzim karena dapat berinteraksi dengan molekul enzim baik pada sisi aktif enzim ataupun tidak. Inhibitor menyebabkan aktivitas enzim menjadi terhambat dan juga dapat merubah geometri sisi aktif enzim sehingga tidak bisa dimasuki oleh molekul substrat.

Penghambatan enzim dibedakan menjadi dua tipe yaitu penghambatan *reversible* dan penghambatan *irreversible*. Penghambatan *reversible* merupakan penghambatan antara suatu inhibitor terhadap sisi aktif enzim dimana ikatan diantaranya bersifat *reversible* dan dapat bebas atau digantikan dari enzim. Terdiri dari penghambatan kompetitif dan non kompetitif. Penghambatan kompetitif, inhibitor memiliki struktur kimia yang sama dengan substrat dan memiliki pengikatan pada sisi aktif yang sama. Sehingga inhibitor dan substrat bersaing untuk dapat menduduki sisi aktif dari enzim. Saat inhibitor dapat menduduki sisi aktif enzim maka kerja enzim akan terhambat. Efek penghambatan dapat diatasi dengan memperbanyak substrat sehingga substrat dapat melekat pada sisi aktif enzim. Pada penghambatan non-kompetitif, inhibitor bereaksi dengan enzim atau kompleks substrat-enzim dengan tempat pengikatan inhibitor tidak sama dengan tempat pengikatan substrat. Sedangkan pada penghambatan *irreversible*, ikatan antara inhibitor dan enzim terlalu kuat sehingga tidak dapat dilepaskan. Pada umumnya terjadi pengikatan secara kovalen dengan gugus fungsional (Bisswanger, 2002).

Plot Lineweaver-Burk dapat digunakan untuk membedakan antara penghambatan kompetitif dan penghambatan nonkompetitif serta mempermudah evaluasi konstanta inhibisi. Dilakukan penentuan v_i pada beberapa konsentrasi substrat baik dengan atau tanpa disertai inhibitor. Untuk inhibisi kompetitif, garis yang menghubungkan titik data eksperimen bertemu di sumbu y. Karena perpotongan garis di sumbu y sama dengan $1/V_{max}$, pola ini menunjukkan bahwa jika $1/[S]$ mendekati 0, nilai v_i tidak bergantung dengan adanya keberadaan inhibitor. Jadi pada inhibisi kompetitif tidak merubah nilai $1/V_{max}$ tetapi meningkatkan nilai $1/K_m$. Sedangkan pada inhibisi nonkompetitif, pengikatan inhibitor tidak memengaruhi pengikatan substrat, sehingga

kompleks EI dan EIS dapat terbentuk. Namun, efisiensinya dapat berubah substrat menjadi produk yang tercermin dengan berkurangnya nilai V_{\max} .



[Sumber : Murray, Granner & Rodwell, 2006]

Gambar 2.6. Kurva Lineweaver-Burk inhibisi kompetitif (a) dan inhibisi non kompetitif (b) (telah diolah kembali)

2.4 Tirosinase

Tirosinase adalah enzim monooksigenase yang berperan sebagai katalisator pada reaksi hidroksilasi monofenol menjadi bentuk difenol (monofenolase) dan oksidasi difenol menjadi quinon (difenolase). Tirosinase memainkan peranan penting dalam pembentukan melanin selama proses melanogenesis karena tirosinase mampu menghidroksilasi L-tirosin (monofenol) menjadi L-DOPA (difenol) dan mengoksidasi L-DOPA menjadi dopaquinon (senyawa quinon). Dopaquinon yang terbentuk akan bereaksi secara spontan membentuk dopakrom. Perannya dalam proses melanogenesis terjadi karena tirosinase memiliki gugus tembaga (Cu) yang merupakan suatu *active site* yang dapat berikatan dengan substrat pada proses pembentukan melanin (Ramsden & Riley, 2010).

Penghambatan terhadap aktivitas tirosinase merupakan salah satu cara untuk dapat mencerahkan kulit, karena dengan demikian melanin yang dihasilkan akan berkurang. Untuk mengetahui penghambatan aktivitas tirosinase sebagai pemutih kulit dapat dilakukan dengan tiga cara. Pertama, uji *in vivo* dengan mengukur warna kulit dan jumlah melanin menggunakan instrumen pada kulit yang telah diberikan sediaan. Kedua, uji *ex vivo* dengan menginkubasi kultur epidermis manusia dengan senyawa pemutih lalu

mengukur banyaknya dendrite yang terbentuk. Ketiga, uji in vitro dengan mengukur produk dopakrom. Cara ketiga merupakan cara yang paling mudah dilakukan karena tidak menggunakan manusia sebagai subjek atau kultur epidermis (Lintner & Sederma, 2010).

Prinsip kerja dari metode in vitro ini berdasarkan pada adanya produk dopakrom yang merupakan hasil oksidasi L-DOPA oleh enzim tirosinase. Senyawa pemutih kulit akan berkompetisi dengan L-DOPA tersebut untuk berikatan dengan enzim tirosinase. Kompetisi tersebut akan mengurangi jumlah produk dopakrom yang akan dihasilkan sehingga aktivitas penghambatan senyawa pemutih dapat dihitung. Dopakrom yang terbentuk akan berwarna jingga tua hingga merah sehingga dapat diukur serapannya dengan cara kolorimetri dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Lintner & Sederma, 2010).

Menurut Ozer et al.,(2007), persen inhibisi tirosinase dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{DK - DK'}{DK} \times 100 \% = \frac{A - B}{A} \times 100 \% \quad (2.7)$$

DK = dopakrom yang terbentuk tanpa adanya inhibitor

DK' = dopakrom yang terbentuk dengan adanya inhibitor

A = serapan larutan kontrol

B = serapan larutan sampel

Aktivitas penghambatan dari sampel uji ditentukan dengan IC_{50} , yaitu konsentrasi dimana sampel uji menghambat aktivitas enzim tirosinase sebesar 50%.

2.5 Krim

Menurut Farmakope Indonesia III, krim adalah sediaan setengah padat, berupa emulsi mengandung air tidak kurang dari 60 % dan dimaksudkan untuk pemakaian luar (Farmakope Indonesia, 1979). Sedangkan menurut FI IV, krim adalah bentuk sediaan setengah padat mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai. Krim dibagi atas dua macam, yaitu krim minyak dalam air dan krim air dalam minyak (Farmakope Indonesia, 1995).

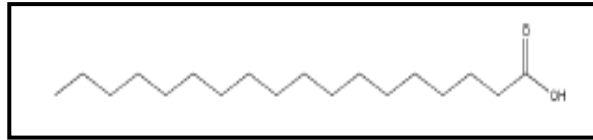
Krim adalah tipe emulsi dari campuran 2 cairan yang tidak bercampur, misal minyak dan air, dan dibuat menjadi suatu dispersi yang stabil dengan membuat fase pendispersi dan fase terdispersi menjadi satu dengan bantuan medium pendispersi. Sebagai sediaan semisolid, krim lebih stabil dan memiliki jangkauan yang lebih besar dibanding *milky dan oily lotion*. Humektan dan air juga dapat ditambahkan dalam proporsi dan rentang yang besar. Karena fungsinya tersebut, krim sangat penting pada kosmetik perawatan kulit (Rieger, 2000).

Basis krim yang digunakan pada basis ini sesuai pada Tabel 2.1 di bawah ini:

Tabel 2.1 Komposisi basis krim

No.	Bahan	Konsentrasi (%)
1	Asam stearat	5
2	Setil alkohol	3
3	Isopropil miristat	3
4	Trieanolamin	0,5
5	Gliseril monostearat	2
6	Propilen glikol	15
7	Metil paraben	0,18
8	Propil paraben	0,02
9	BHT	0,1
10	Alkohol 96 %	5
11	Aquadest	Ad 100

2.5.1 Asam stearat

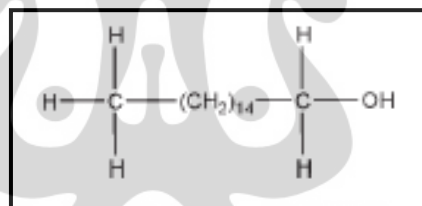


[sumber : Rowe, Sheskey & Quinn, 2009]

Gambar 2.7. Struktur asam stearat (telah diolah kembali)

Asam stearat dalam sediaan topikal digunakan sebagai bahan pengemulsi. Dalam pembuatan basis krim netral (anionik), asam stearat dinetralisasi dengan penambahan alkali. Bahan ini mudah larut dalam benzen, karbon tetraklorida, kloroform, dan eter; larut dalam etanol, heksan, dan propilen glikol; dan praktis tidak larut dalam air. Umumnya, bahan ini tidak toksik dan tidak menyebabkan iritasi. Titik lelehnya di atas 54°C. Konsentrasi yang umumnya digunakan dalam sediaan krim adalah sebesar 1-20 % (Rowe, Sheskey & Quinn, 2009).

2.5.2 Setil alkohol

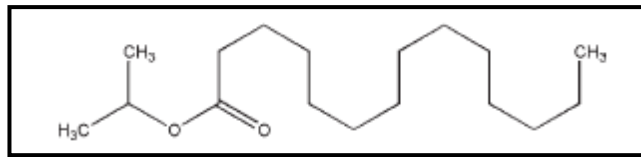


[Sumber : Rowe, Sheskey & Quinn, 2009]

Gambar 2.8. Struktur setil alkohol (telah diolah kembali)

Setil alkohol dalam krim digunakan sebagai bahan pengemulsi dan bahan pengeras dalam sediaan topikal (krim). Setil alkohol dapat meningkatkan viskositas krim dan meningkatkan kestabilan sediaan. Sebagai bahan pengeras, konsentrasi umum yang digunakan adalah 2-10 % dan sebagai bahan pengemulsi digunakan konsentrasi 2-5 %. Bahan ini sangat mudah larut dalam etanol 95 % dan eter. Kelarutannya akan meningkat jika suhunya dinaikkan. Titik lelehnya adalah 45-52°C (Rowe, Sheskey & Quinn, 2009).

2.5.3 Isopropil miristat

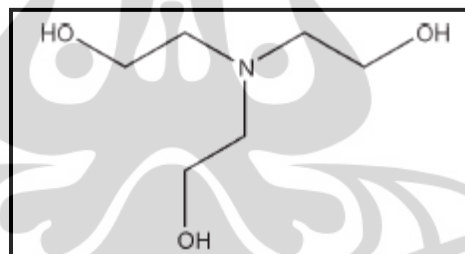


[sumber : Rowe, Sheskey & Quinn, 2009]

Gambar 2.9. Struktur isopropil miristat (telah diolah kembali)

Isopropil miristat merupakan bahan emolien, yaitu bahan yang dapat memberikan rasa halus dan nyaman ketika dipakai pada kulit dan juga mengurangi penguapan air dari kulit. Isopropil miristat dapat meningkatkan penetrasi kulit. Umumnya bahan ini tidak toksik dan tidak mengiritasi. Bahan ini mudah bercampur dengan aseton, kloroform, etanol, etil asetat, lemak, toluen, dan wax; praktis tidak larut dalam gliserin, propilen glikol, dan air. Titik bekunya adalah 3°C dan titik didihnya adalah 140,2°C pada tekanan 2 mmHg (Rowe, Sheskey & Quinn, 2009).

2.5.4 Trietanolamin (TEA)

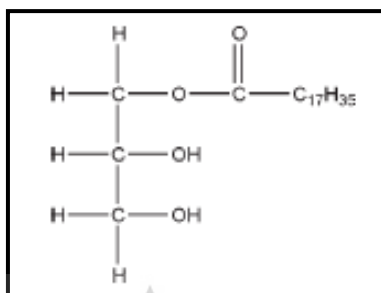


[sumber : Rowe, Sheskey & Quinn, 2009]

Gambar 2.10. Struktur trietanolamin (telah diolah kembali)

Trietanolamin (TEA) berupa cairan kental jernih berwarna kuning pucat sampai tidak berwarna dan berbau amoniak yang samar. Bahan ini banyak digunakan pada formulasi sediaan topikal terutama sebagai emulgator. Trietanolamin jika dicampurkan dengan asam lemak seperti asam stearat atau asam oleat akan membentuk sabun anionik yang dapat berguna sebagai pengemulsi untuk membentuk emulsi M/A yang stabil (Rowe, Sheskey & Quinn, 2009).

2.5.5 Gliseril monostearat

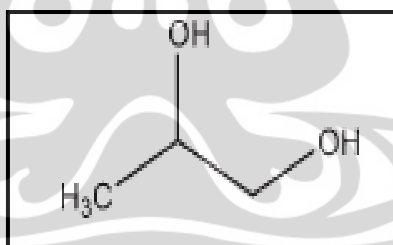


[sumber : Rowe, Sheskey & Quinn, 2009]

Gambar 2.11. Struktur gliseril monostearat (elah diolah kembali)

Gliseril monostearat dapat digunakan sebagai bahan pengemulsi nonionik, emolien, penstabil, pelarut, dan sebagai *plasticizer* dalam produk makanan, farmasetika, dan kosmetik. Bahan ini larut dalam etanol panas (95 %), eter, kloroform, aseton panas, dan minyak mineral; praktis tidak larut dalam air. Umumnya, bahan ini tidak toksik dan tidak menyebabkan iritasi. Sebagai bahan pengemulsi tunggal digunakan sebesar 5-20 % dari basis krim. Tidak lelehnya adalah 55-60°C (Rowe, Sheskey & Quinn 2009).

2.5.6 Propilen glikol

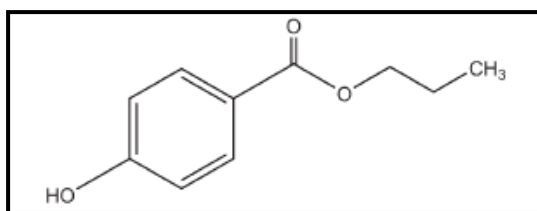


[sumber : Rowe, Sheskey & Quinn, 2009]

Gambar 2.12. Struktur propilen glikol (telah diolah kembali)

Propilen glikol berupa cairan kental, tidak berwarna, tidak berbau, rasa agak manis, dan higroskopik. Bahan ini dapat bercampur dengan air, etanol 95 %, aseton, kloroform, larut dalam 6 bagian eter, tetapi tidak dapat bercampur dengan minyak lemak. Propilen glikol digunakan sebagai humektan dengan konsentrasi hampir 15 % (Rowe, Sheskey & Quinn, 2009).

2.5.7 Propil paraben

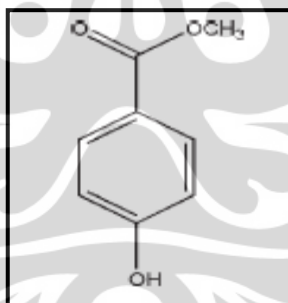


[Sumber : Rowe, Sheskey & Quinn, 2009]

Gambar 2.14. Struktur propil paraben (telah diolah kembali)

Propil paraben digunakan sebagai bahan pengawet. Aktivitas antimikroba ditunjukkan pada pH antara 4-8. Bahan ini secara luas digunakan sebagai bahan pengawet dalam kosmetik, makanan, dan produk farmasetika. Penggunaan kombinasi paraben dapat meningkatkan aktivitas antimikroba. Bahan ini sangat larut dalam aseton, eter, dan minyak; mudah larut dalam etanol dan metanol; sangat sedikit larut dalam air. Titik didihnya adalah 295°C (Rowe, Sheskey & Quinn, 2009).

2.5.8 Metil paraben

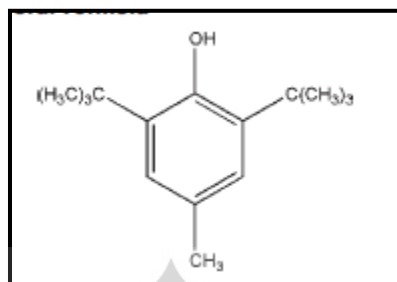


[sumber : Rowe, Sheskey & Quinn, 2009]

Gambar 2.15. Struktur metil paraben (telah diolah kembali)

Metil paraben dalam formulasi farmasetika, produk makanan, dan terutama dalam kosmetik biasanya digunakan sebagai bahan pengawet. Bahan ini dapat digunakan sendiri maupun dikombinasi dengan jenis paraben lain. Efektifitas pengawet ini berada pada rentang pH 4-8. Dalam sediaan topikal, konsentrasi yang umum digunakan adalah 0,02-0,3 %. Bahan ini sukar larut dalam air, larut dalam air panas, etanol 95 %, eter (1:10), dan metanol (Rowe, Sheskey & Quinn, 2009).

2.5.9 Butilhidroksitoluen



[sumber : Rowe, Sheskey & Quinn, 2009]

Gambar 2.16. Struktur butilhidroksitoluen (telah diolah kembali)

Butilhidroksitoluen berbentuk padatan kristalin atau serbuk dengan warna putih atau kuning pucat. Senyawa ini banyak digunakan pada formulasi sebagai antioksidan. Senyawa ini terutama digunakan untuk memperlambat atau mencegah oksidasi dari fase lemak dan minyak. Pada sediaan topikal, bahan ini biasa digunakan sebesar 0,0075-0,1 %. (Rowe, Sheskey & Quinn 2009).

2.6 Stabilitas Krim

Stabilitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu produk obat atau kosmetik untuk bertahan dalam spesifikasi yang diterapkan sepanjang periode penyimpanan dan penggunaan untuk menjamin identitas, kekuatan, kualitas, dan kemurnian produk. Sedangkan definisi sediaan kosmetik yang stabil adalah suatu sediaan yang masih berada dalam batas yang dapat diterima selama periode waktu penyimpanan dan penggunaan, dimana sifat dan karakteristiknya sama dengan yang dimilikinya pada saat dibuat. Sediaan kosmetik tidak dapat diterima lagi karena adanya perubahan fisika, perubahan kimia dan perubahan kandungan mikroorganisme (Djajadisastra, 2004).

2.6.1 Stabilitas Fisik

Ketidakstabilan fisika dari sediaan ditandai dengan adanya pemucatan warna atau munculnya warna, timbul bau, perubahan, atau pemisahan fase, pecahnya emulsi, pengendapan suspensi atau *caking*, perubahan konsistensi, pertumbuhan kristal, terbentuknya gas, dan perubahan fisik lainnya. Kestabilan

dari suatu emulsi ditandai dengan tidak adanya penggabungan fase dalam, tidak adanya creaming, dan memberikan penampilan, bau, warna, dan sifat-sifat fisik lainnya yang baik (Martin, Swarbick, dan Cammarata, 1993). Ketidakstabilan fisik suatu emulsi atau suspensi dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor yang mempengaruhi kestabilan kimia dari bahan pengemulsi (emulgator), suspending agent, antioksidan, pengawet, dan bahan aktif (Djajadisastra, 2004).

Gejala-gejala yang menjadi indikator terjadinya kerusakan emulsi antara lain (Djajadisastra, 2004; Martin, Swarbick, dan Cammarata, 1993):

- a. Creaming, merupakan proses pada emulsi dengan partikel yang kurang rapat cenderung ke atas permukaan sehingga terjadi pemisahan menjadi dua emulsi.
- b. Flokulasi, merupakan penggabungan globul yang bergantung pada gaya tolak menolak elektrostatis (zeta potential).
- c. Koalesen atau penggumpalan, merupakan proses dimana tetesan dua fase internal mendekat dan berkombinasi membentuk partikel yang lebih besar.
- d. Inversi, merupakan peristiwa dimana fase eksternal menjadi fase internal atau sebaliknya.

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

- a. Suhu yang dinaikkan

Setiap kenaikan suhu 10°C akan mempercepat reaksi 2 sampai 3 kalinya, namun secara praktis cara ini agak terbatas karena kenyataannya suhu yang

jauh di atas normal akan menyebabkan perubahan yang tidak pernah terjadi pada suhu normal.

b. Cycling test

Uji ini dilakukan untuk menguji produk terhadap kemungkinan mengalami kristalisasi dan untuk menguji emulsi dan krim sebagai indikator kestabilan emulsi. Uji ini dapat mendorong pertumbuhan partikel dan bisa menunjukkan keadaan yang mungkin terjadi di masa yang akan datang. Cycling test dilakukan dengan cara menaruh sediaan pada suhu 4° C selama 24 jam lalu dikeluarkan dan kemudian dipindahkan ke dalam oven dengan suhu 40° C selama 24 jam. Perlakuan ini adalah satu siklus dan percobaan ini diulang sebanyak enam siklus.

c. Uji mekanik (uji sentrifugasi)

Tujuan dilakukan uji sentrifugasi adalah untuk mengetahui terjadinya pemisahan fase dari emulsi. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 3800 rpm selama 5 jam atau 5000-10000 rpm selama 30 menit. Hal ini dilakukan karena perlakuan tersebut sama dengan besarnya pengaruh gaya sentrifugasi pada kecepatan tinggi cenderung dapat mengubah bentuk globul fase internal yang terdispersi dan memicu terjadinya koalesens.

Parameter-parameter yang digunakan dalam uji kestabilan fisik adalah:

a. Organoleptis atau penampilan fisik

Pemeriksaan ini bertujuan untuk mengamati adanya perubahan atau pemisahan emulsi, timbulnya bau atau tidak, dan perubahan warna.

b. Penentuan viskositas dan sifat alir

Viskositas suatu sediaan dipengaruhi oleh zat pengental, surfaktan, proporsi fase terdispersi, dan ukuran partikel. Penurunan viskositas dipengaruhi oleh peningkatan ukuran globul dan begitu juga sebaliknya (Eckmann et al., 2000). Secara umum kenaikan viskositas dapat meningkatkan kestabilan sediaan (berdasarkan Hukum Stokes) (Martin, Swarbick, Cammarata, 1993).

c. Ukuran partikel

Krim merupakan suatu sistem yang mempunyai energi bebas pada permukaan partikel terdispersinya. Partikel tersebut berenergi tinggi dan cenderung mengelompok kembali. Perubahan dalam ukuran partikel rata-rata atau distribusi ukuran globul merupakan tolak ukur penting untuk mengevaluasi emulsi, dimana pada emulsi keruh diameter globul berkisar antara 0,1-10 μm . Ukuran partikel merupakan indikator utama kecenderungan terjadinya creaming atau breaking. Terdapat hubungan antara ukuran partikel dengan viskositas, dimana kenaikan viskositas akan meningkatkan stabilitas sediaan (berdasarkan hukum Stokes). Semakin tinggi viskositas, maka semakin kecil ukuran partikel dan semakin besar volume rasio (Martin, Swarbrick, dan Cammarata, 1993).

d. Pemeriksaan pH

Krim sebaiknya memiliki pH yang sesuai dengan pH kulit, yaitu 4,5-6,5 karena jika krim memiliki pH yang terlalu basa maka dapat menyebabkan kulit menjadi bersisik, sedangkan jika pH terlalu asam maka yang terjadi adalah menimbulkan iritasi kulit.

e. Pengukuran konsistensi

Konsistensi adalah karakteristik fisik yang penting pada suatu sediaan semi solid. Pengukuran konsistensi untuk sediaan kosmetik seperti krim dilakukan dengan menggunakan penetrometer bentuk cone.

2.6.2 Stabilitas Kimia

Ketidakstabilan kimia sediaan ditandai dengan berkurangnya konsentrasi zat aktif karena terjadi reaksi atau interaksi kimia, rusaknya eksipien karena hidrolisis dan reaksi sejenis, serta pembentukan senyawa lain. Selama masa penyimpanan sediaan obat dapat terjadi beberapa reaksi yang dapat mempengaruhi stabilitas kimianya, yaitu :

a. Reaksi hidrolisis

Merupakan reaksi penguraian oleh air yang dapat dikatalisis oleh ion hidrogen (asam) atau ion hidroksil (basa).

b. Reaksi oksidasi

Merupakan reaksi penguraian obat yang meliputi hilangnya atau penambahan suatu atom elektronegatif, radikal atau elektron.

c. Reaksi isomerisasi

Merupakan reaksi perubahan suatu zat kimia menjadi isomer optis atau geometrisnya. Komposisi kimia dari obat akan tetap sama tetapi aktivitas biologis dari isomer-isomernya bisa berbeda.

d. Reaksi polimerisasi

Polimerisasi terjadi bila obat bergabung membentuk molekul primer yang rumit atau kompleks yang strukturnya yang diikuti oleh hilangnya aktivitas biologis.

Ketidakstabilan kimia dapat dilihat dengan melakukan penetapan kadar zat aktif secara berkala. Asam azelat dapat ditetapkan kadarnya dengan beberapa metode, yaitu dengan metode *Differential scanning calorimeter*, *X-ray diffractometry*, *GC-MS*, *GLC*, *RP-HPLC*, *LC-methods* dan spektrofotometri secara tidak langsung.

Penetapan kadar asam azelat dalam sediaan ditetapkan secara spektrofotometri secara tidak langsung dimana asam azelat terlebih dahulu direaksikan dengan metilen biru. Metode ini dipilih karena pada beberapa metode memerlukan waktu yang cukup lama sehingga pelaksanaannya tidak efisien.

Asam azelat dengan gugus molekul yang sederhana dan tidak memiliki gugus kromofor dapat direaksikan terlebih dahulu dengan metilen biru pada pelarut metanol. Pelarut metanol dipilih karena dapat melarutkan asam azelat dengan sempurna. Sebagai bahan pengekstrak digunakan kloroform dan juga dapat ammonium klorida pH 9,8. Larutan sampel diukur serapannya pada panjang gelombang 655 nm (Kishore, Jayaprakash, & Reddy, 2010).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasetika dan Kimia Kuantitatif, Departemen Farmasi Universitas Indonesia dari bulan Februari sampai dengan Mei 2012.

3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis – 1601 (Shimadzu, Jepang), pH meter tipe 510 (Eutech Instrument, Singapura), penetrometer (Herzoo, Jerman), mikroskop optik (Nikon model Eclipse E 200, Jepang), homogenizer (Omni-Multimix Inc., Malaysia), sentrifugator (Kubota 5100, Jepang), oven (Mettler, Jerman), penangas air (Mettler, Hongkong), timbangan analitik tipe 210-LC (Mettler, Amerika Serikat), mikropipet Eppendorf (Eppendorf, Switzerland) dan alat-alat gelas.

3.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tirosinase dari jamur *Agaricus bisporus* (Sigma, Amerika Serikat), L-DOPA (Sigma, Amerika Serikat), asam azelat (Sigma, Amerika Serikat), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Indonesia), dikalium hidrogen fosfat (Merck, Indonesia), metanol (Mallinckrodt, Swedia), asam askorbat (Brataco, Indonesia), asam stearat (Brataco, Indonesia), setil alkohol (Brataco, Indonesia), isopropil miristat (Cognis, Indonesia), trietanolamin (Brataco, Indonesia), gliseril monostearat (Cognis, Indonesia), metilparaben (Brataco, Indonesia), propilparaben (Brataco, Indonesia), butilhidroksitoluen (Brataco, Indonesia), propilen glikol (Brataco, Indonesia), metilen biru (Merck Indonesia), ammonium klorida (Mallinckrodt, Swedia) dan ammonium hidroksida (Merck, Indonesia)

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Formulasi dan Pembuatan Krim

Persentase komposisi bahan krim dapat dilihat seperti pada tabel berikut :

Tabel 3.1. Persentase komposisi bahan dalam krim

Bahan	Formula A (%)	Formula B (%)
Asam Azelat	5	10
Asam stearat	5	5
Setil alkohol	3	3
Isopropil miristat	3	3
Trieanolamin	0,5	0,5
Gliseril monostearat	2	2
Propilen glikol	15	15
Metil paraben	0,18	0,18
Propil paraben	0,02	0,02
BHT	0,1	0,1
Alkohol 96 %	5	5
Aquadest	Ad 100	Add 100

Semua bahan dalam formulasi disiapkan sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan. Aquadest dipanaskan untuk melarutkan bahan-bahan yang larut air yaitu trietanolamin dan metil paraben. Bahan-bahan yang larut dalam minyak berada dalam fase minyak yang meliputi asam stearat, setil alkohol, isopropil miristat, gliseril monostearat, propil paraben dan butil hidroksi toluen. Semua bahan tersebut dipanaskan pada suhu 70°C hingga melebur. Campuran fase minyak yang telah bercampur dengan fase air lalu diaduk dengan homogenizer pada suhu 70°C dengan kecepatan 3000 rpm. Asam azelat dilarutkan dengan alkohol 96 % dan propilenglikol. Larutan asam azelat dimasukkan ke dalam basis krim, campuran lalu diaduk kembali dengan homogenizer selama 10 menit hingga terbentuk krim yang homogen. Krim yang dihasilkan kemudian disimpan dalam wadah tidak tembus cahaya.

3.4.2 Evaluasi Fisik Sediaan Krim

Evaluasi dari masing-masing sediaan dilakukan untuk pengamatan organoleptis, homogenitas, pengukuran pH, sifat aliran, konsistensi, dan diameter globul.

3.4.2.1 Pengamatan organoleptis

Pengamatan organoleptis dilakukan dengan memeriksa warna, bau dan adanya pemisahan fase pada krim yang dibuat.

3.4.2.2 Pengamatan homogenitas

Pengamatan homogenitas dilakukan dengan mengamati sebaran partikel krim yang dijepit dengan dua kaca objek. Dari sebaran tersebut dapat dilihat apakah krim yang dibuat homogen atau tidak.

3.4.2.3 Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan menggunakan alat pH meter yang terlebih dahulu dikalibrasi dengan larutan dapar standar pH 7 dan 4. Kemudian elektroda dicelupkan ke dalam sediaan dan nilai pH akan muncul di layar.

3.4.2.4 Pengukuran viskositas dan sifat alir

Sifat alir ditentukan dengan mengukur viskositas dengan viskometer Brookfield dimana nomor spindel yang digunakan spindel 6 dan dicelupkan dalam beaker glass yang berisi krim. Kecepatan alat dipasang beragam yaitu 2; 2,5; 5; 10; 20 rpm dan kemudian dibalik menjadi 10; 5; 2,5; dan 2 rpm. Pembacaan skala dengan mengamati jarum merah di posisi stabil pada setiap kecepatan. Sifat alir dapat diperoleh dengan membuat kurva *shearing stress* berbanding dengan *rate of shear*. Pemeriksaan sifat alir dilakukan pada minggu ke-0 dan minggu ke-8 dengan penyimpanan pada suhu kamar.

3.4.2.5 Pemeriksaan konsistensi

Sediaan yang akan diperiksa dimasukkan ke dalam wadah khusus dan diletakkan pada meja penetrometer. Peralatan diatur hingga ujung kerucut menyentuh bayang permukaan krim yang dapat diperjelas dengan menghidupkan lampu. Batang pendorong dilepas dengan mendorong tombol

Universitas Indonesia

start. Angka penetrasi dibaca lima detik setelah kerucut menembus sediaan. Dari pengukuran konsistensi dengan penetrometer akan diperoleh *yield value*. Pemeriksaan konsistensi dilakukan pada minggu ke-0 dan minggu ke-8 dengan penyimpanan pada suhu kamar.

3.4.2.6 Pengukuran diameter globul rata-rata

Pengukuran ini dilakukan dengan memfoto krim dengan menggunakan mikroskop optik pada perbesaran 40 atau 1000 kali sehingga dapat dihitung ukuran globul emulsi dan distribusi ukurannya.

3.4.3 Uji Stabilitas Fisik (Djajadisastra, 2004)

3.4.3.1 Uji stabilitas pada suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$

Formulasi krim disimpan pada suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$ dan diukur parameter-peremeter kestabilannya seperti bau, warna, pH, dan diameter globul dievaluasi selama 8 minggu dengan pengamatan setiap 2 minggu.

3.4.3.2 *Cycling test*

Sampel krim disimpan pada suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 jam, lalu dipindahkan ke dalam oven yang bersuhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 jam (satu siklus). Uji dilakukan sebanyak 6 siklus kemudian diamati adanya pemisahan fase dan atau adanya kristalisasi.

3.4.3.3 Uji mekanik (*centrifugal test*)

Sampel krim dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi kemudian dimasukkan ke dalam alat sentrifugator dan disentrifugasi pada kecepatan 3800 rpm selama 5 jam. setelah disentrifugasi, diamati apakah terjadi pemisahan antara fase minyak dengan fase air.

3.4.4 Uji Stabilitas Kimia

Krim asam azelat diuji kestabilan kimianya dengan melakukan penetapan kadar asam azelat yang terdapat di dalam krim secara berkala. Sampel krim disimpan selama 8 minggu pada tiga kondisi suhu, yaitu pada suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Kadar asam azelat di dalam krim ditentukan dengan pengamatan setiap 4 minggu.

3.4.4.1 Pembuatan kurva kalibrasi asam azelat

Asam azelat ditimbang seksama sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 100,0 mL. Volume dicukupkan hingga garis batas dan dihasilkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Dibuat pengenceran larutan 100 ppm dengan memipet 25,0 mL larutan yang dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 mL dan dihasilkan larutan dengan konsentrasi 25 ppm. Dari larutan 25 ppm kemudian dibuat beberapa variasi konsentrasi dengan memipet larutan sebesar 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; dan 6,0 mL, dan masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Dihasilkan variasi konsentrasi larutan, yaitu 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; dan 15 ppm. Masing-masing larutan selanjutnya direaksikan dengan larutan metilen biru. Larutan dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian ditambahkan 1,0 mL larutan metilen biru, 1,0 mL larutan dapar amonium klorida pH 9,8 dan 10 mL kloroform. Dilakukan pengocokan larutan selama ± 2 menit dan diambil lapisan kloroformnya. Lapisan kloroform yang diambil diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 655 nm dan dihitung persamaan regresi liniernya .

3.4.4.2 Penetapan kadar asam azelat dalam sediaan krim

Krim asam azelat ditimbang seksama sebanyak kurang lebih 500 mg untuk krim A dan kurang lebih 250 mg untuk krim B, kemudian krim di ekstraksi dengan metanol dan di sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 40 menit. Setelah sentrifugasi, larutan supernatan dimasukkan kedalam labu ukur 25,0 mL dan volume dicukupkan dengan metanol hingga batas dan dihasilkan larutan 1000 ppm. Dilakukan beberapa kali pengenceran larutan 1000 ppm dan dihasilkan larutan 10 ppm. Larutan dimasukkan ke dalam

Universitas Indonesia

corong pisah, kemudian ditambahkan 1,0 mL larutan metilen biru, 1,0 mL larutan dapar amonium klorida pH 9,8 dan 10 mL kloroform. Selanjutnya dilakukan pengocokan larutan selama ± 2 menit dan diambil lapisan kloroformnya. Lapisan kloroform yang diambil diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 655 nm dan kadarnya dihitung dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi. Penetapan kadar asam azelat dilakukan sebanyak dua kali (duplo) agar didapatkan hasil yang lebih tepat.

3.4.5 Pembuatan Larutan Pereaksi

3.4.5.1 Pembuatan larutan dapar fosfat

a. Pembuatan larutan Dikalium Hidrogen Fosfat (K_2HPO_4) 1 M

Larutan Dikalium Hidrogen Fosfat dibuat dengan cara menimbang 8,71 gr K_2HPO_4 yang dilarutkan dalam air demineralisata bebas CO_2 dan volume dicukupkan hingga 50 mL.

b. Pembuatan larutan Kalium Dihidrogen Fosfat (KH_2PO_4) 1 M

Larutan Kalium Dihidrogen Fosfat dibuat dengan cara menimbang 6,80 gr KH_2PO_4 yang dilarutkan dalam air demineralisata bebas CO_2 dan volume dicukupkan hingga 50 mL.

c. Pembuatan Dapar Fosfat 50 mM pH 6,5

Pembuatan 400 mL Dapar Fosfat 50 mM pH 6,5 dibuat dengan cara mencampurkan 5,56 mL K_2HPO_4 dan 14,44 mL KH_2PO_4 yang dilarutkan dalam air demineralisata bebas CO_2 dan volume larutan dicukupkan hingga 400 mL. Selanjutnya pH larutan diperiksa dengan menggunakan pH meter.

3.4.5.2 Pembuatan larutan L-DOPA 2,5 mM

L-DOPA ditimbang seksama sebanyak 12,4 mg, kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat 50 mM pH 6,5 dalam labu ukur 25,0 mL dan volume larutan dicukupkan hingga batas. Pada saat preparasi hingga uji penghambatan tirosinase dilakukan, larutan dihindarkan dari cahaya.

3.4.5.3 Pembuatan larutan tirosinase

Tirosinase ditimbang seksama sebanyak 1,27 mg kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat 50 mM pH 6,5 dan volume dicukupkan hingga 10,0 mL. Tirosinase yang terlarut memiliki aktivitas 240 unit/mL. Setelah preparasi hingga uji penghambatan tirosinase, larutan disimpan pada suhu rendah (2-8°C).

3.4.5.4 Pembuatan larutan metilen biru

Larutan metilen biru yang dibuat dengan konsentrasi 0,2 % dimana metilen biru ditimbang sebanyak 200 mg dan dilarutkan dengan aquadest dan volume larutan dicukupkan hingga 100 mL.

3.4.5.5 Pembuatan larutan dapar amonium klorida pH 9,8

Untuk menyiapkan 100 mL dapar amonium klorida, amonium klorida ditimbang seksama sebanyak 7,0 gram, kemudian dilarutkan dalam aquadest. Larutan tersebut ditambahkan larutan NH_4OH sebanyak 6,8 mL dan volume dicukupkan hingga 100 mL. Selanjutnya pH larutan diperiksa dengan menggunakan pH meter.

3.4.6 Uji Pendahuluan Enzim

3.4.6.1 Pengukuran panjang gelombang maksimum

Untuk menentukan panjang gelombang maksimum, 2700 μL larutan dapar fosfat 50 mM (pH 6,5) dan 800 μL larutan L-DOPA dipipet kedalam tabung reaksi. Larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 500 μL larutan tirosinase kedalam tabung reaksi dan inkubasi kembali pada suhu kamar selama 25 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis untuk memperoleh serapan maksimum.

3.4.6.2 Optimasi konsentrasi substrat L-DOPA

Larutan dapar fosfat 50 mM pH 6,5 sebanyak 2700 μL dimasukkan kedalam 4 tabung reaksi, lalu ditambahkan masing-masing 800 μL larutan substrat L-DOPA dengan konsentrasi 1; 2; 2,5 dan 3 mM dan di inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan larutan 500 μL larutan

tirosinase, dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* dan diinkubasi kembali pada suhu kamar selama 25 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

3.4.6.3 Optimasi pH larutan dapar fosfat

Larutan dapar fosfat 50 mM pH 6,2; 6,5; 6,8; dan 7,0 sebanyak 2700 μL , masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu masing-masing tabung reaksi ditambahkan 800 μL larutan L-DOPA 2,5 mM dan di inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan larutan 500 μL larutan tirosinase, dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* dan diinkubasi kembali pada suhu kamar selama 25 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

3.4.7 Penentuan tipe penghambatan tirosinase oleh asam azelat

Tipe penghambatan tirosinase oleh asam azelat ditentukan dengan membandingkan kurva Lineweaver-Burk L-DOPA dengan dan tanpa inhibitor atau penghambat.

a. Tanpa penghambat

Siapkan larutan L-DOPA 2,5 mM, larutan dapar fosfat 50 mM pH 6,5, larutan tirosinase (240 unit/mL), dan 4 tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi terdiri dari :

Tabel 3.2. Komposisi larutan reaksi Kurva Lineweaver-Burk tanpa penghambat

Bahan	Tabung (μL)			
	1	2	3	4
Larutan dapar fosfat	3000	2800	2700	2500
L-DOPA	500	700	800	1000
Tirosinase	500	500	500	500

Larutan dapar fosfat dan L-DOPA dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan larutan tirosinase ke dalam tabung reaksi, dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* dan inkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

b. Dengan penghambat

Siapkan larutan L-DOPA 2,5 mM, larutan dapar fosfat 50 mM (pH 6,5), larutan penghambat (asam azelat) 50 ppm, larutan tirosinase (240 unit/mL) dan 4 tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi terdiri dari :

Tabel 3.3. Komposisi larutan reaksi Kurva Lineweaver-Burk dengan penghambat

Bahan	Tabung (μL)			
	1	2	3	4
Larutan dapar fosfat	2800	2600	2500	2300
L-DOPA	500	700	800	1000
Tirosinase	500	500	500	500
Penghambat	200	200	200	200

Larutan dapar fosfat, L-DOPA dan penghambat dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan larutan tirosinase ke dalam tabung reaksi, dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* dan inkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

3.4.8 Uji penghambatan tirosinase (IC_{50}) dari asam azelat

Asam azelat ditimbang secara seksama, kemudian dilarutkan dalam metanol dan dibuat menjadi beberapa konsentrasi 15 ppm, 30 ppm, 45 ppm, dan 60 ppm. Disiapkan larutan L-DOPA 2,5 mM, larutan dapar fosfat 50 mM (pH 6,5), larutan tirosinase (240 unit/mL), dan 2 buah tabung reaksi A dan B. Masing-masing tabung reaksi terdiri dari :

Tabel 3.4. Komposisi larutan reaksi IC_{50} dari asam azelat

Bahan	Tabung A (μ L)	Tabung B (μ L)
Larutan dapar fosfat	2700	2500
L-DOPA	800	800
Tirosinase	500	500
Inhibitor (lar. asam azelat)	-	200

Tabung A, larutan dapar fosfat dan L-DOPA dipipet ke dalam tabung reaksi, dihomogenkan dengan *vortex mixer* kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan larutan tirosinase ke dalam tabung reaksi, dihomogenkan dan inkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Tabung B, larutan dapar fosfat, L-DOPA dan larutan asam azelat dipipet ke dalam tabung reaksi, dihomogenkan dengan *vortex mixer* kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan larutan tirosinase ke dalam tabung reaksi, dihomogenkan dan inkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Dihitung persen penghambatannya dan dibuat kurva % inhibisi terhadap konsentrasi asam azelat. Persamaan linear dicari dan dihitung IC_{50} nya.

3.4.9 Uji penghambatan tirosinase dari sediaan krim asam azelat

Sampel krim diambil sebanyak kurang lebih 500 mg kemudian diekstraksi dengan metanol dan di sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 40 menit. Larutan filtrat diambil untuk diuji aktivitasnya sebagai inhibitor tirosinase. Disiapkan larutan L-DOPA 2,5 mM, larutan dapar fosfat 50 mM (pH 6,5), larutan tirosinase (240 unit/mL), dan 2 buah tabung reaksi A dan B. Masing-masing tabung reaksi terdiri dari :

Tabel 3.5. Komposisi larutan reaksi penghambatan tirosinase krim asam azelat

Bahan	Tabung A (μL)	Tabung B (μL)
Larutan dapar fosfat	2500	2500
L-DOPA	800	800
Tirosinase	500	500
Filtrat krim (asam azelat)	200 (blank negatif)	200

Tabung A, larutan dapar fosfat, L-DOPA dan filtrat krim (blank negatif) dipipet ke dalam tabung reaksi, dihomogenkan dengan *vortex mixer* kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan larutan tirosinase ke dalam tabung reaksi, dihomogenkan dan inkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Tabung B, larutan dapar fosfat, L-DOPA dan filtrat krim dipipet ke dalam tabung reaksi, dihomogenkan dengan *vortex mixer* kemudian inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan larutan tirosinase ke dalam tabung reaksi, dihomogenkan dan diinkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Nilai persen inhibisi tirosinase diperoleh dengan menghitung penghambatan dopakrom yang terbentuk menggunakan rumus persamaan. Untuk mengetahui pengaruh penyimpanan terhadap aktivitas asam azelat, maka uji penghambatan aktivitas tirosinase dilakukan pada minggu ke-0 dan minggu ke-8 dari sediaan krim yang disimpan pada suhu kamar.

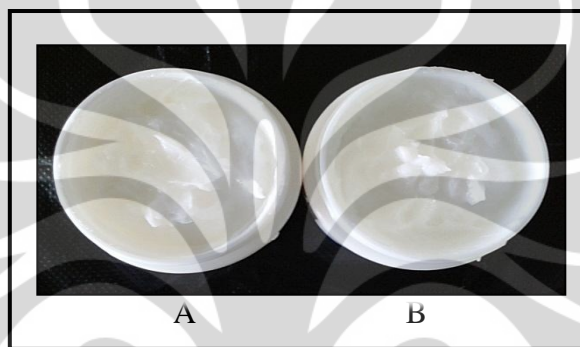


BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Evaluasi Krim

Hasil dari evaluasi semua krim pada awal penyimpanan (minggu ke-0) didapatkan krim yang lembut, mudah dioleskan, membentuk konsistensi setengah padat, dan mudah menyebar di kulit. Hasil pengamatan evaluasi awal krim dapat dilihat pada Lampiran 6 dan penampilan fisik krim dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Keterangan : A = krim asam azelat 5 %

B = krim asam azelat 10 %

Gambar 4.1. Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada minggu ke-0

Warna krim yang dihasilkan sesuai dengan asam azelat yang ditambahkan. Pada formula A dan formula B tidak ada perbedaan warna krim yang dihasilkan yaitu berwarna putih, karena asam azelat yang ditambahkan berwarna putih. Berdasarkan hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa semua krim homogen dengan ditandai semua partikel dalam kaca objek terdispersi secara merata. Kedua formula krim tidak memiliki bau yang khas dan tidak menimbulkan bau yang tengik.

pH yang terukur dari kedua formula yaitu formula A 4,11 dan formula B 4,03. Kedua krim menunjukkan pH ke arah asam, hal ini disebabkan oleh asam azelat yang bersifat asam kuat yang mana pH sediaan yang mengandung asam azelat berkisar 2,5-4,0 (Mather et al, 1999). Sifat asam ini lebih kuat dari kebasaaan yang dimiliki oleh basis *vanishing cream* yang digunakan sehingga membawa pH krim ke arah asam.

Konsistensi yang dimiliki kedua krim yaitu formula A 360×10^{-1} mm dan formula B 405×10^{-1} mm. Angka penetrasi tersebut memenuhi kriteria sediaan krim sehingga terasa mudah dioleskan dan disebarkan di kulit. Konsistensi yang dihasilkan dipengaruhi oleh banyaknya bahan penambah konsistensi seperti setil alkohol dan asam stearat yang merupakan alkohol rantai panjang berbentuk padat, semakin banyak setil alkohol yang dipakai maka semakin tinggi konsistensinya.

Hasil pengukuran viskositas dan sifat alir pada minggu ke-0 dapat dilihat pada Lampiran 12-13. Dari pengukuran dihasilkan nilai viskositas krim A dan krim B berturut-turut 30000 cps dan 29000 cps. Krim A memiliki viskositas yang lebih besar daripada krim B. Besarnya viskositas krim A terjadi diduga karena perbedaan tingkat keasaman dari kedua krim. Krim B yang bersifat lebih asam karena mengandung asam azelat 2 (dua) kali krim A menyebabkan terjadinya hidrolisis atau pemutusan ikatan dari polimer pada basis krim sehingga struktur krim kurang rapat dan konsistensinya menjadi lebih rendah dibandingkan krim A. Hal ini berbanding lurus dengan hasil pengukuran konsistensi. Rendahnya konsistensi krim B dibandingkan krim A menyebabkan angka penetrasi krim B lebih besar daripada krim A yang memiliki konsistensi lebih tinggi.

Pada Gambar 4.7 menunjukkan bahwa sifat alir dari kedua krim bersifat pseudoplastis tiksotropik dimana krim memiliki konsistensi lebih rendah pada setiap gaya per satuan luas (*rate of shear*) sehingga menandakan adanya pemecahan struktur yang tidak terbentuk kembali dengan segera jika *stress* tersebut dihilangkan atau dikurangi. Hal ini merupakan sifat yang diperlukan pada krim dimana konsistensinya yang tinggi tetapi dapat dengan mudah dioleskan.

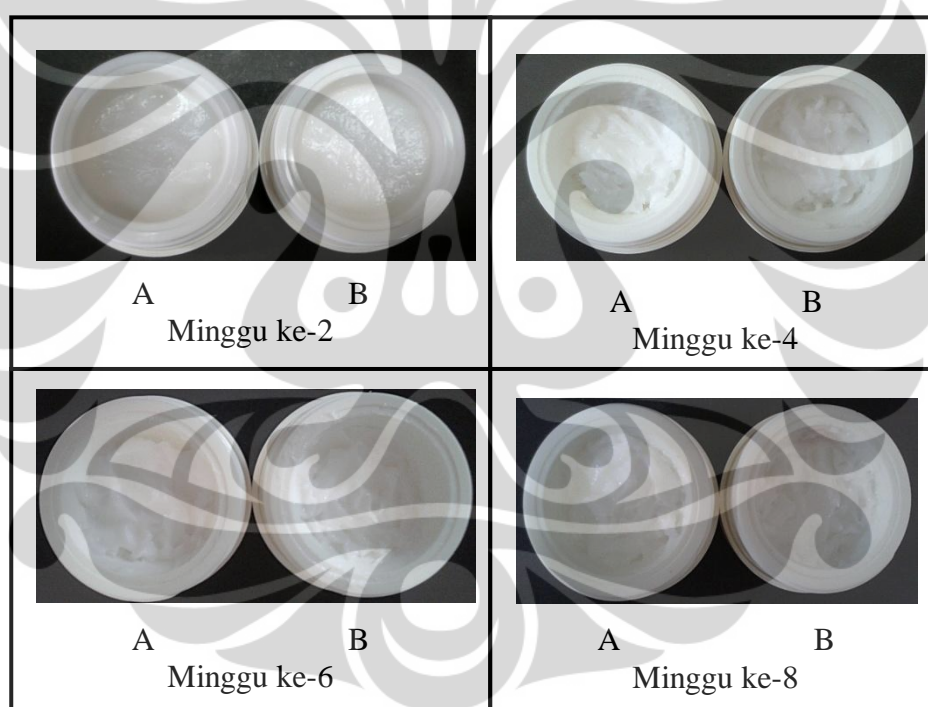
Hasil pengukuran diameter globul rata-rata yaitu formula A sebesar 0,485 μm dan formula B sebesar 0,481 μm . Hal tersebut memenuhi persyaratan ukuran diameter globul emulsi karena berada dalam kisaran 0,1-10 μm (Martin, Swarbick, dan Cammarata, 1993). Bentuk dan ukuran globul ini dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti pengadukan dan jumlah emulgator yang digunakan.

4.2 Hasil Uji Stabilitas Fisik

4.2.1 Penyimpanan krim pada suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$

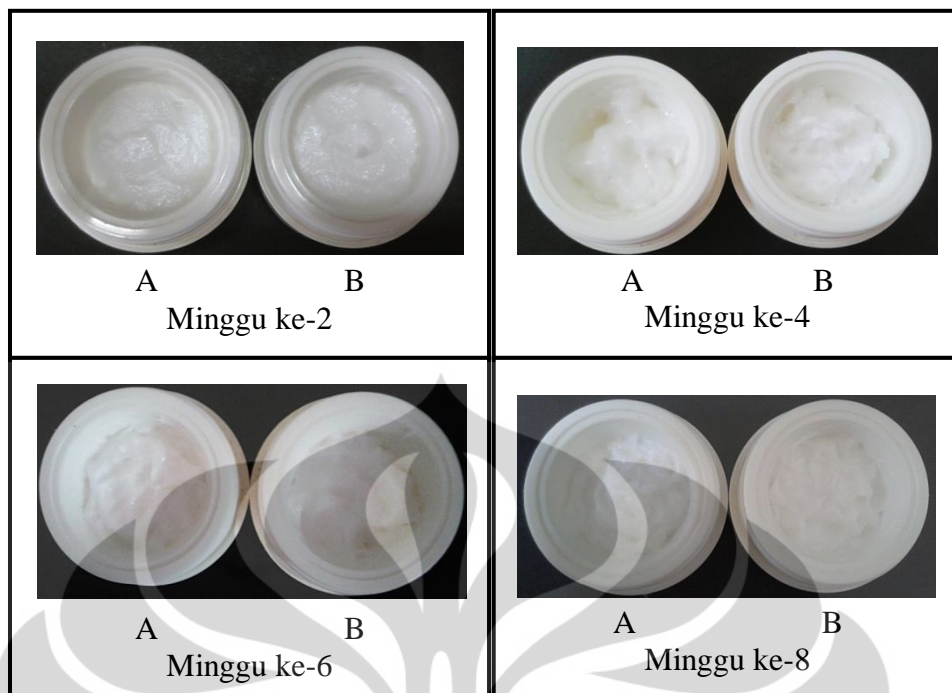
Hasil pengamatan organoleptis pada kedua krim yang diuji pada penyimpanan dalam suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$ dapat dilihat pada Lampiran 7 dan Gambar 4.2-4.4.

Pada penyimpanan dalam suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$ dari minggu awal (minggu ke-0) sampai minggu terakhir (minggu ke-8) tidak terlihat adanya pemisahan fase minyak dan fase air. Selain itu juga tidak terjadi perubahan warna pada masing-masing krim pada penyimpanan dalam suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Sediaan krim yang disimpan selama 8 minggu tidak menimbulkan bau tengik dan juga tidak memiliki bau yang khas.



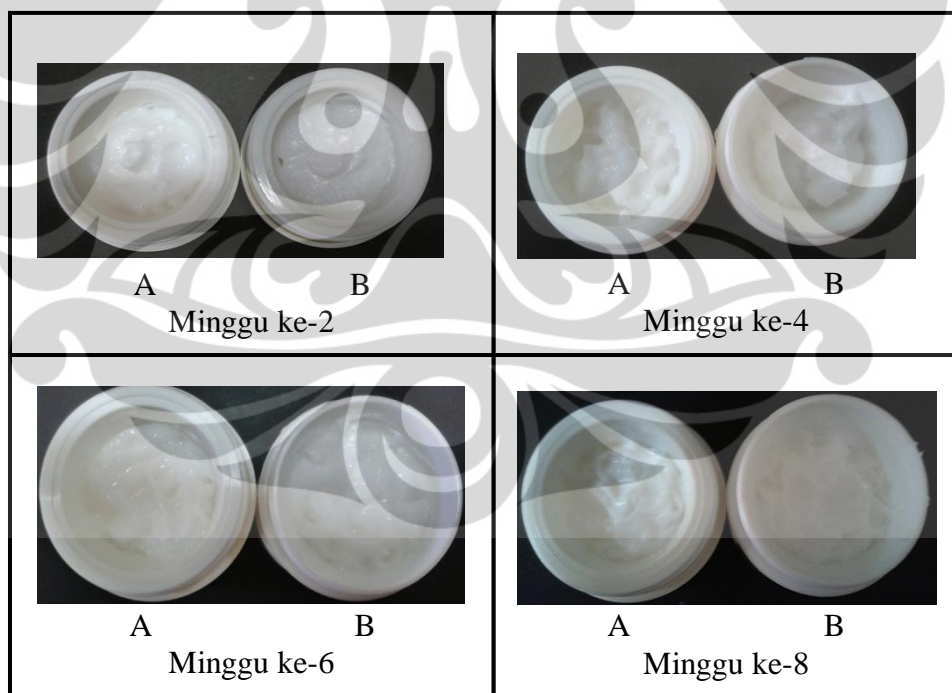
Keterangan : A = krim asam azelat 5 %
B = krim asam azelat 10 %

Gambar 4.2. Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu



Keterangan : A = krim asam azelat 5 %
B = krim asam azelat 10 %

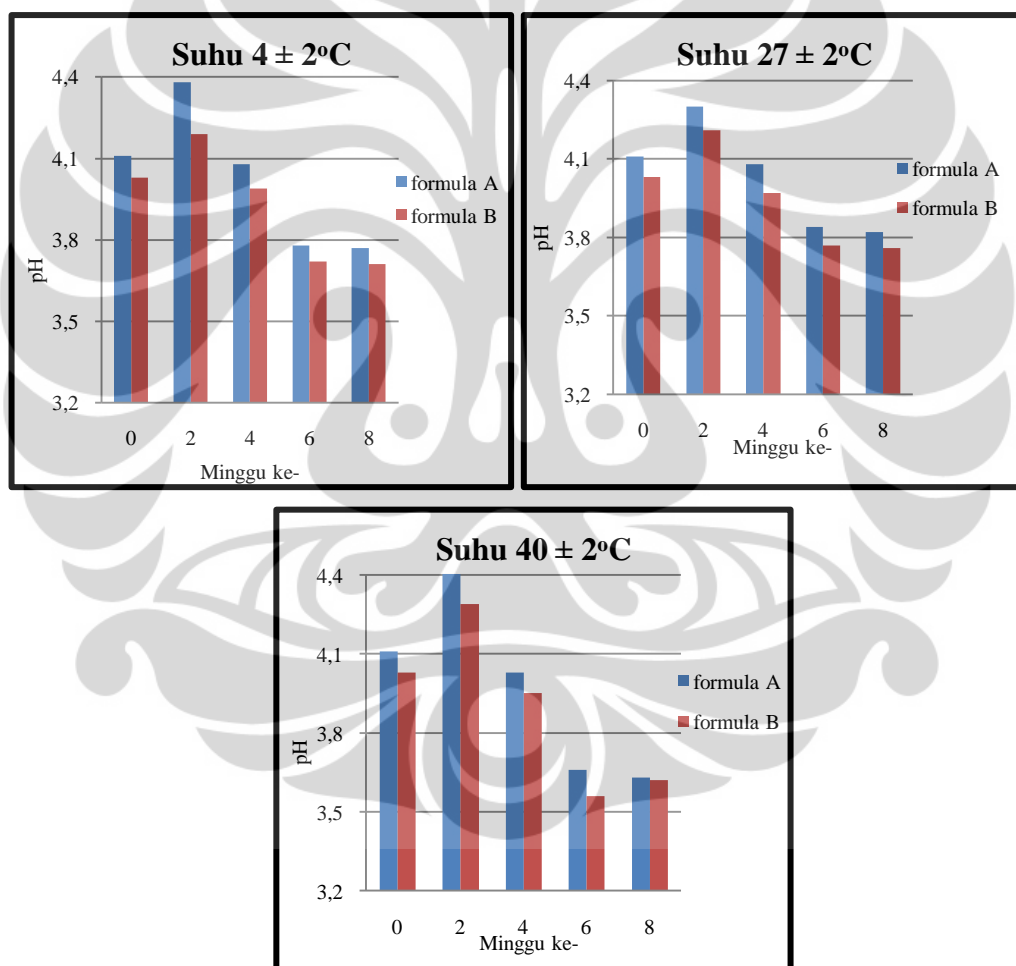
Gambar 4.3. Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada suhu $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu



Keterangan : A = krim asam azelat 5 %
B = krim asam azelat 10 %

Gambar 4.4. Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada suhu $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu

Hasil pengukuran pH pada ketiga suhu menghasilkan krim dengan pH mengarah kepada pH asam. Hal ini disebabkan terjadinya reaksi oksidasi senyawa polifenol menjadi senyawa kuinon yang sifatnya asam. Berdasarkan reaksi yang terjadi, saat pembentukan senyawa kuinon terlepas ion H^+ (proton) sehingga menyebabkan pH menjadi turun (Yong & Lee, 2003). Pada minggu ke-2 terjadi peningkatan pH kedua formula krim pada tiga kondisi penyimpanan yaitu pada suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ C$. Namun pada minggu ke-4 dan seterusnya terjadi penurunan pH pada kedua formula krim. Harga pH kedua krim pada penyimpanan tiga suhu yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 8 dan Gambar 4.5.



Keterangan : A = krim asam azelat 5 %

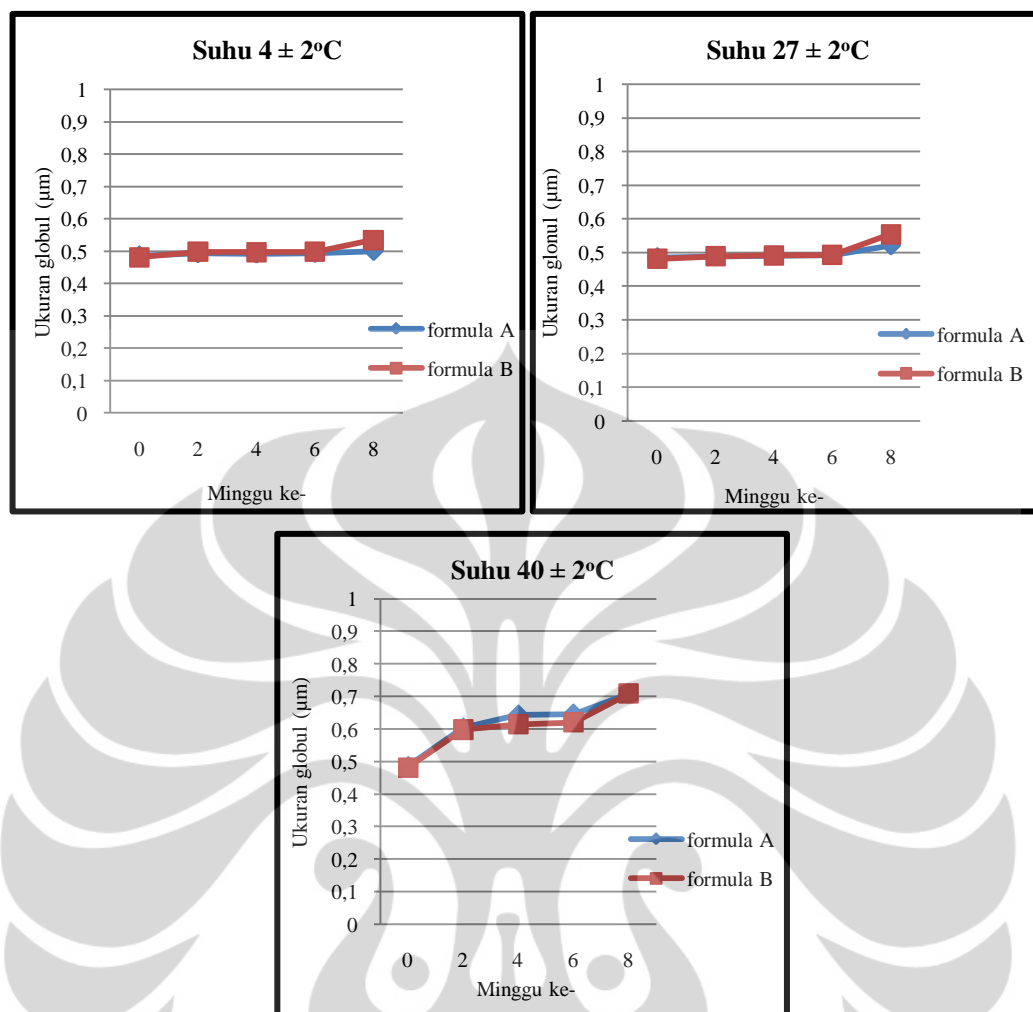
B = krim asam azelat 10 %

Gambar 4.5. Hasil pengukuran pH tiap sediaan pada penyimpanan 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ C$

Hasil pengamatan diameter globul dari krim pada tiap penyimpanan secara umum memperlihatkan kecenderungan menjadi lebih besar. Krim yang disimpan pada suhu $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ memperlihatkan peningkatan ukuran diameter globul yang cukup jelas, yang terjadi diduga disebabkan faktor suhu yang meningkatkan kecepatan globul untuk bergabung menjadi globul yang lebih besar. Besarnya ukuran diameter globul krim A dan krim B dapat dilihat pada Lampiran 9 dan Gambar 4.6. Dari hasil di atas, dapat disimpulkan bahwa sediaan krim yang dibuat tergolong stabil sebab perubahan diameter globul rata-rata yang terjadi masih berada dalam rentang diameter diameter globul untuk emulsi, yaitu $0,1-10 \mu\text{m}$ (Martin, Swarbick, Cammarata, 1993).

Krim merupakan suatu sistem yang mempunyai energi bebas permukaan pada partikel terdispersinya. Partikel tersebut berenergi tinggi dan cenderung untuk mengelompokkan diri kembali sedemikian rupa untuk mengurangi permukaan total dan memperkecil energi bebas permukaannya (Martin, Swarbick, Cammarata, 1993). Hal ini disebabkan karena kecenderungan suatu benda untuk menuju ke bentuk dan keadaan yang stabil. Pengadukan pada saat pembuatan krim sebenarnya merupakan suatu transfer energi kepada krim dan krim tersebut akan mempunyai kecenderungan untuk mengelompokkan diri agar mencapai tingkat energi terendah (*ground state*). Oleh karena itu ukuran globul pada krim selalu bertambah setiap minggunya.

Selain itu peningkatan diameter globul disebabkan oleh adanya kenaikan suhu selama penyimpanan. Kenaikan suhu dapat menurunkan efektifitas bahan penstabil dan meningkatkan laju pemisahan fase. Dengan meningkatkannya suhu maka stabilitas bahan pengemulsi menurun sehingga lapisan yang menyelubungi globul dapat terpecah dan mengakibatkan globul-globul minyak cenderung berdekatan dan akhirnya globul-globul tersebut bersatu dan membentuk globul yang lebih besar. Semakin lama maka terjadi pembentukan lapisan yang baru dengan diameter globul yang lebih besar yang disebut *creaming*.

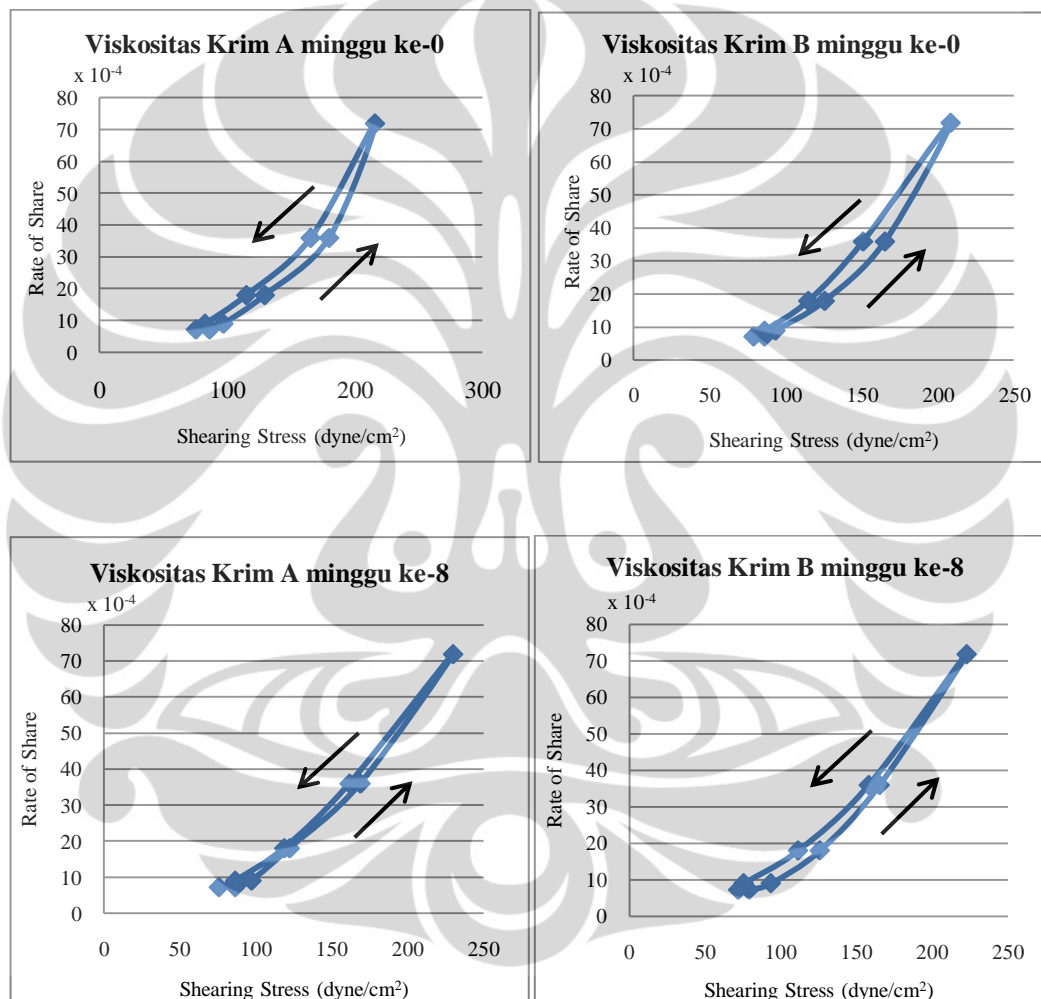


Keterangan : A = krim asam azelat 5 %
 B = krim asam azelat 10 %

Gambar 4.6. Hasil pengukuran diameter globul tiap sediaan pada penyimpanan 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$

Hasil pengukuran viskositas dan sifat alir masing-masing krim pada minggu awal (minggu ke-0) dan setelah penyimpanan selama 8 minggu pada suhu kamar dapat dilihat pada Lampiran 10-13 dan Gambar 4.7. Pengukuran viskositas pada minggu ke-8 memperlihatkan adanya peningkatan nilai viskositas pada kedua formula krim, contohnya viskositas krim A 30000 cps menjadi 32000 cps setelah penyimpanan 8 minggu dan viskositas krim B 29000 cps menjadi 31000 cps setelah penyimpanan 8 minggu pada kecepatan 20 rpm. Hal ini dapat disebabkan adanya peristiwa tiksotropik saat krim baru dibuat pada minggu ke-0. Pada proses pembuatan, krim tersebut mengalami proses

pengadukan yang menyebabkan struktur pada basis krim lebih renggang sehingga saat baru terbentuk krim memiliki viskositas yang lebih rendah dibandingkan dengan viskositas krim yang telah didiamkan selama 8 minggu, dimana krim menjadi lebih kental karena telah kembali pada struktur yang sebenarnya. Pada krim juga terdapat alkohol 96 %, yang diduga pada minggu ke-8 terjadi penguapan yang menyebabkan viskositas krim menjadi lebih besar dibandingkan viskositas pada minggu ke-0.



Keterangan : Krim A = krim asam azelat 5 %

Krim B = krim asam azelat 10 %

Gambar 4.7. Kurva sifat alir krim A dan krim B pada minggu ke-0 dan ke-8

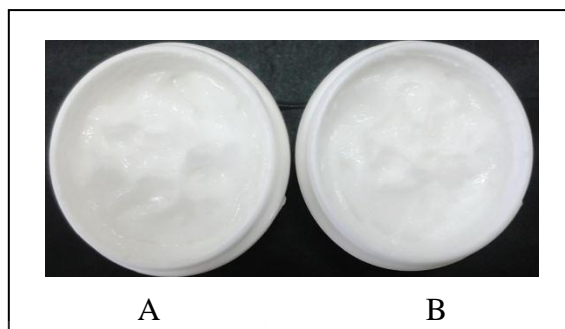
Pemeriksaan konsistensi kedua formula krim dilakukan dengan menggunakan penetrometer. Pemeriksaan konsistensi dilakukan pada minggu ke-0 dan minggu ke-8 pada penyimpanan suhu kamar. Hasil penetrasi pada minggu ke-0 yaitu formula A 360×10^{-1} mm dan formula B 405×10^{-1} mm, sedangkan hasil penetrasi setelah penyimpanan 8 minggu yaitu formula A 327×10^{-1} mm dan formula B 385×10^{-1} mm. Pemeriksaan ini bertujuan untuk memeriksa konsistensi sediaan sehingga dapat diketahui apakah sediaan yang dihasilkan termasuk semipadat yang mudah diaplikasikan kepada kulit atau tidak. Dari hasil pemeriksaan konsistensi kedua krim menunjukkan bahwa masing-masing sediaan mengalami penurunan angka kedalaman penetrasi kerucut yang menunjukkan adanya peningkatan konsistensi pada minggu ke-8 jika dibandingkan minggu ke-0. Hal ini berhubungan dengan peristiwa tiksotropik yang tampak pada peningkatan viskositas pada minggu ke-8. Dengan bertambahnya viskositas, konsistensi krim juga meningkat sehingga angka kedalaman penetrasi kerucut dari penetrometer berkurang.

4.2.2 Pengamatan *Cycling Test*

Pengamatan *cycling test* dilakukan selama 6 siklus antara suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$ dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$. *Cycling test* dilakukan untuk menguji produk terhadap kemungkinan mengalami kristalisasi sebagai indikator kestabilan emulsi. Pada pengamatan *cycling test* kedua formula yang diuji menunjukkan hasil yang stabil karena tidak menunjukkan adanya pemisahan fase antara fase minyak dan fase air Hasil pengamatan *cycling test* dapat dilihat pada Gambar 4.8 dan Tabel 4.1. Uji ini dilakukan dengan menyimpan masing-masing sediaan pada suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 jam kemudian dipindahkan ke dalam oven pada suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Perlakuan ini disebut satu siklus dan siklus dilakukan sebanyak 6 kali untuk memperjelas perubahan yang terjadi.

Tabel 4.1. Hasil pengamatan *cycling test*

Formula	Awal siklus	Akhir siklus
A	Stabil	Stabil (tidak terjadi pemisahan fase)
B	Stabil	Stabil (tidak terjadi pemisahan fase)



Keterangan : A = krim asam azelat 5 %

B = krim asam azelat 10 %

Gambar 4.8. Foto hasil pengamatan setelah *cycling test*

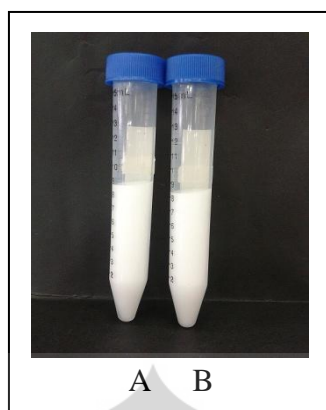
4.2.3 Pengamatan Uji Mekanik

Uji mekanik atau uji sentrifugasi merupakan salah satu indikator kestabilan fisik sediaan semipadat. Hukum Stokes menunjukkan bahwa pembentukan krim merupakan suatu fungsi gravitasi dan kenaikan gravitasi dapat mempercepat pemisahan fase. Efek gaya sentrifugal yang diberikan oleh sentrifugator dengan kecepatan 3800 rpm selama 5 jam dianggap setara dengan efek gaya gravitasi yang akan diterima krim dalam penyimpanan selama setahun.

Pada kedua formula krim tidak tampak adanya pemisahan antara fase air dan fase minyak setelah dilakukan uji mekanik menggunakan alat sentrifugator dengan kecepatan 3800 rpm selama 5 jam. Hal ini disebabkan penggunaan emulgator yang cukup untuk menjaga krim agar tahan terhadap perlakuan yang diberikan (berupa gaya sentrifugal yang setara dengan gaya gravitasi selama setahun). Hasil uji mekanik ini menunjukkan bahwa kedua formula krim tahan terhadap efek gravitasi selama satu tahun. Hasil pengamatan uji mekanik dapat dilihat pada Gambar 4.9 dan Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Hasil pengamatan uji mekanik

Formula	Hasil
A	Tidak terjadi pemisahan fase
B	Tidak terjadi pemisahan fase



Keterangan : A = krim asam azelat 5 %

B = krim asam azelat 10 %

Gambar 4.9. Foto hasil pengamatan setelah uji mekanik

4.3 Hasil Uji Stabilitas Kimia

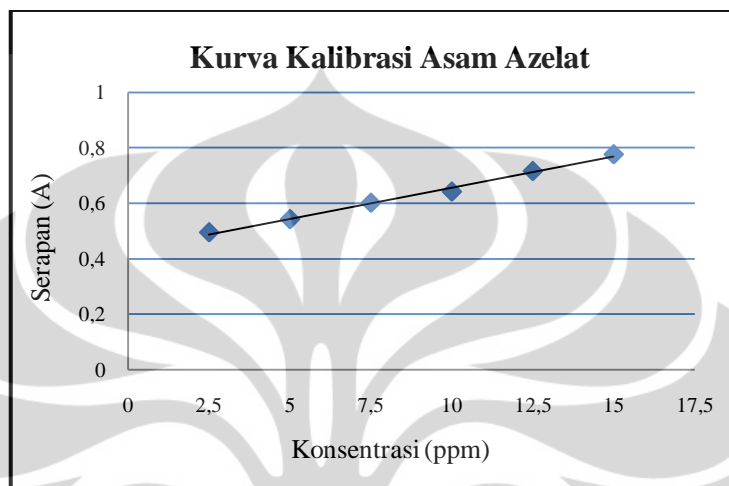
Uji stabilitas kimia sediaan krim dilakukan dengan melakukan pengukuran kadar asam azelat dalam sediaan. Pengukuran kadar dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometer UV-Vis. Krim yang telah diekstraksi dengan metanol direaksikan terlebih dahulu dengan metilen biru, dengan zat pengekstrak kloroform. Sebelum reaksi dengan metilen biru, diberikan larutan dapar amonium klorida pH 9,8 yang bertujuan untuk mengubah molekul COOH menjadi bentuk ionnya sehingga dapat bereaksi dengan metilen biru dan memberikan serapan saat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Perlakuan asam azelat yang direaksikan terlebih dahulu karena asam azelat merupakan senyawa kimia dengan rumus molekul sederhana yang tidak memiliki gugus kromofor dan tidak memberikan warna sehingga tidak dapat diukur secara langsung dengan spektrofotometer UV-Vis.

Penetapan kadar senyawa aktif asam azelat dilakukan pada kedua formula, yaitu formula A dan formula B. Formula A dan formula B disimpan pada beberapa suhu yaitu suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 8 minggu. Pengukuran dilakukan setiap 4 minggu yang dimulai pada minggu ke-0.

4.3.1 Kurva Kalibrasi Asam Azelat

Konsentrasi larutan standar asam azelat dalam pelarut metanol yang digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi adalah 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; dan 15

ppm. Data serapan asam azelat dalam metanol pada tiap konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 25. Berdasarkan perhitungan regresi linier, persamaan regresi asam azelat yang diperoleh adalah $y = 0,432 + 0,0022x$ dengan nilai koefisien korelatif (R^2) adalah 0,9969. Kurva kalibrasi asam azelat dapat dilihat pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10. Kurva kalibrasi asam azelat dalam metanol

4.3.2 Penetapan Kadar Asam Azelat dalam Krim

Pengukuran kadar pada minggu ke-0 didapatkan kadar bahan aktif asam azelat dalam formula A 5,19 % dan formula B 10,4 %. Hasil tersebut lebih besar dari persentase bahan aktif yang dimasukkan ke dalam sediaan krim yaitu formula A 5 % dan formula B 10 %. Hal ini terjadi diduga karena pada sediaan krim terdapat alkohol 96 % yang memungkinkan terjadi penguapan. Penguapan alkohol 96 % ini menyebabkan sediaan krim menjadi lebih kental atau konsistensinya meningkat. Peningkatan konsistensi ini menyebabkan konsentrasi asam azelat di dalam krim menjadi lebih pekat.

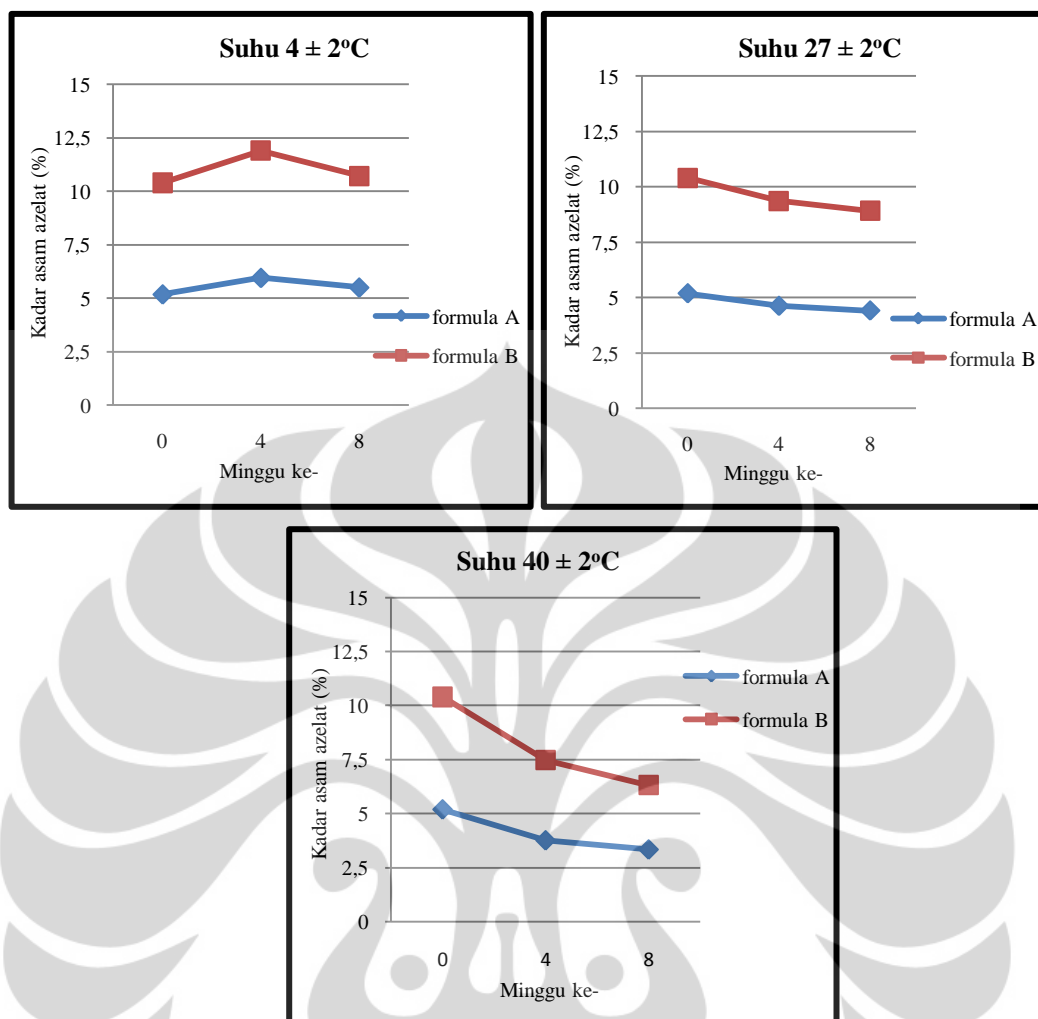
Hasil yang didapatkan pada penetapan kadar bahan aktif formula A dan formula B selama waktu penyimpanan pada beberapa suhu selama 8 minggu didapatkan adanya peningkatan maupun penurunan kadar pada pengukuran. Sediaan krim yang disimpan pada suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$ mengalami peningkatan kadar. Peningkatan kadar asam azelat ini terjadi diduga karena pada kondisi suhu rendah, sediaan krim mengalami peningkatan konsistensi. Peningkatan

konsistensi ini menyebabkan konsentrasi asam azelat menjadi lebih pekat sehingga terjadi peningkatan kadar asam azelat.

Sediaan krim yang disimpan pada suhu $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dan $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ mengalami penurunan kadar pada setiap pengukuran. Ada beberapa faktor yang menyebabkan terjadinya penurunan kadar zat aktif dalam sediaan selama kondisi penyimpanan, seperti pengaruh suhu, kelembaban, cahaya, pelarut, kekuatan ion, katalitis, tetapan dielektrik, teori tabrakan dan teori keadaan transisi (Dajadisastra, 2008). Pengaruh kondisi penyimpanan, kelembaban, cahaya dan pelarut dapat menyebabkan terjadinya beberapa reaksi, seperti reaksi hidrolisis dan oksidasi dimana hidrolisis merupakan reaksi yang dikatalisis oleh asam basa spesifik yang menyebabkan degradasi dari suatu senyawa (Martin, Swarbick & Cammarata, 1993).

Pengaruh faktor suhu dapat meningkatkan suatu kecepatan reaksi 2-3 kalinya tiap kenaikan suhu 10°C yang mana hal ini diperlihatkan pada persamaan Arrhenius. Persamaan Arrhenius memiliki hubungan empirik antara suhu dan konstanta laju. Suhu dapat mempengaruhi gerak suatu molekul, yang mana jika pergerakan suatu molekul menyimpang dari jalan semula akibat pengaruh suhu maka akan terjadi tabrakan terhadap molekul lain yang menyebabkan kedua molekul bergerak dengan arah dan kecepatan yang berbeda dan hal ini disebut teori tabrakan. Salah satu alternatif dalam mengatasi teori tabrakan adalah teori keadaan transisi, di mana suatu kesetimbangan dianggap terjadi antara molekul-molekul reaktan normal dan kompleks teraktivasinya (Martin, Swarbick & Cammarata, 1993).

Data serapan asam azelat pada minggu ke 0; 4; dan 8 dapat dilihat pada Lampiran 26-28 dan kurva kadar bahan aktif asam azelat dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11. Kurva stabilitas kimia asam azelat tiap sediaan pada penyimpanan 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$

Untuk melihat kestabilan krim asam azelat maka dilakukan perhitungan terhadap konstanta laju (k), waktu paruh ($t_{1/2}$) dan t_{90} pada sediaan setiap suhu penyimpanan. Hal ini dilakukan untuk mengetahui apakah krim asam azelat dapat memenuhi spesifikasi jika dilakukan penyimpanan pada kondisi dan wadah yang digunakan.

Konstanta laju (k) merupakan suatu konstanta yang terdapat di dalam hukum laju yang digabung dengan reaksi elementer yang disebut konstanta laju spesifik. Setiap perubahan dalam kondisi reaksi, seperti temperatur atau pelarut dapat menyebabkan hukum laju reaksi mempunyai harga yang berbeda untuk konstanta laju spesifik. Satu perubahan konstanta laju spesifik berhubungan terhadap perubahan dalam kemiringan garis yang diberikan oleh persamaan

Universitas Indonesia

laju. Variasi dalam konstanta laju spesifik merupakan kebermaknaan fisik yang penting, karena perubahan pada konstanta ini menggambarkan suatu perubahan pada tingkat molekul sebagai akibat variasi dalam kondisi reaksi. Waktu paruh ($t_{1/2}$) merupakan waktu yang dibutuhkan untuk meluruh atau hilangnya zat menjadi separuhnya sedangkan t_{90} merupakan waktu atau umur suatu sediaan tetap baik sampai waktu dimana senyawa dalam sediaan telah terurai sampai 90 % dari konsentrasi mula. Krim memperlihatkan sifat orde satu dan hasil perhitungan konstanta laju (k), waktu paruh ($t_{1/2}$) dan t_{90} dapat dilihat pada Lampiran 28-30 dan Tabel 4.3.

Tabel 4.3. Hasil perhitungan konstanta laju (k), waktu paruh ($t_{1/2}$) dan t_{90}

Suhu penyimpanan	Krim A			Krim B		
	k (/hari)	$t_{1/2}$ (hari)	t_{90} (hari)	k (/hari)	$t_{1/2}$ (hari)	t_{90} (hari)
$4 \pm 2^\circ\text{C}$	-0,001068	649	98	-0,000387	11791	271
$27 \pm 2^\circ\text{C}$	0,002908	238	36	0,002742	253	38
$40 \pm 2^\circ\text{C}$	0,007818	89	13	0,008896	78	12

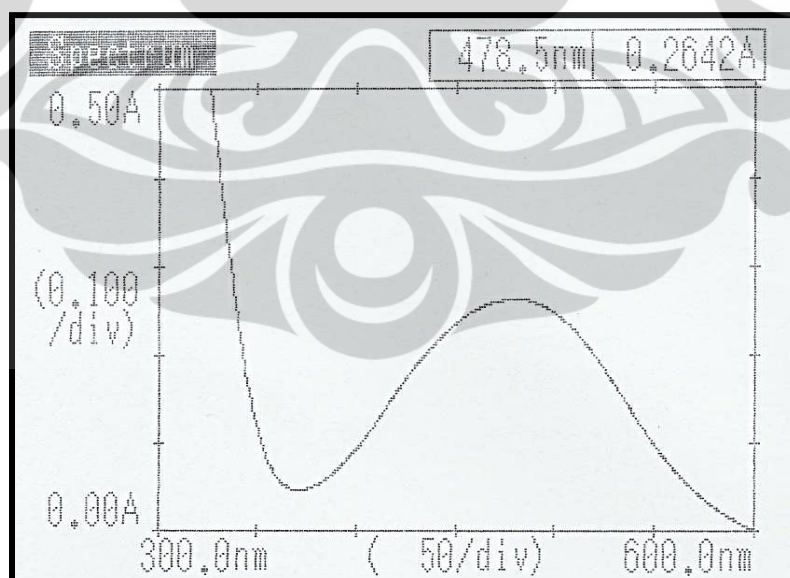
4.4 Hasil Uji Pendahuluan Enzim

Sebelum uji penghambatan aktivitas tirosinase dilakukan, terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan yang bertujuan untuk mencari kondisi yang optimum untuk uji penghambatan aktivitas. Variabel yang dioptimasi pada uji pendahuluan pada penelitian ini meliputi 2 (dua) hal yaitu konsentrasi L-DOPA sebagai substrat dan kondisi pH dapar fosfat pada saat pengujian. Sedangkan untuk kondisi suhu pada saat inkubasi tidak dilakukan optimasi karena adanya kesulitan dalam pengaturan suhu yang diinginkan yang disebabkan karena keterbatasan alat. Oleh karena itu ditetapkan bahwa kondisi suhu yang digunakan pada saat inkubasi yaitu pada suhu kamar ($\pm 25^\circ\text{C}$) berdasarkan *certificate of analysis* yang dikeluarkan Sigma Aldrich.

Unit aktivitas tirosinase yang digunakan sebesar 240 unit/ml. Unit aktivitas ini ditentukan berdasarkan penelitian oleh Kartika, N. J. (2011), dimana unit tirosinase yang digunakan sebesar 496 unit/ml. Dari jumlah solid tirosinase yang dimiliki peneliti mencoba memperkecil unit enzim yang digunakan dengan menggunakan setengah unit tirosinase dari penelitian terdahulu. Dari pengukuran didapatkan bahwa serapan yang dihasilkan tidak terlalu kecil sehingga digunakan unit aktivitas tirosinase sebesar 240 unit/ml.

4.4.1 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum

Sebelum uji pendahuluan dilakukan, terlebih dahulu ditentukan panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk menentukan panjang gelombang pada pengukuran serapan untuk pengujian selanjutnya, termasuk penentuan kondisi optimum dan uji sampel terhadap penghambatan aktivitas tirosinase. Berdasarkan hasil pengukuran, telah didapatkan panjang gelombang maksimum yaitu pada panjang gelombang 478,5 nm. Pada panjang gelombang ini didapatkan puncak serapan yang tinggi, artinya terjadi pembentukan dopakrom yang paling banyak. Hasil pengukuran ini dilakukan 2 (dua) kali. Panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Gambar 4.12.



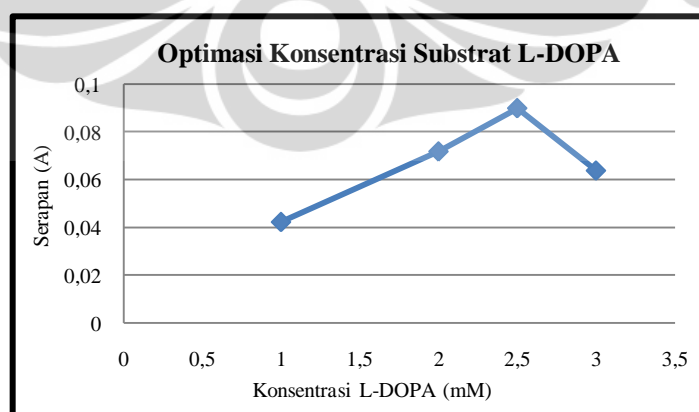
Gambar 4.12. Penentuan panjang gelombang maksimum serapan dopakrom.

4.4.2 Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum

Optimasi konsentrasi konsentrasi L-DOPA sebagai substrat bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi substrat yang optimum. Konsentrasi substrat yang dilakukan diharapkan dapat memenuhi sisi aktif enzim tempat substrat berikatan dengan enzim. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 1; 2; 2,5; dan 3 mM. Hasil optimasi konsentrasi substrat dapat dilihat pada Lampiran 29 dan gambar kurva dapat dilihat pada Gambar 4.13.

Data absorbansi yang diperoleh terlihat adanya peningkatan mulai dari konsentrasi 1 mM; 2 mM; dan 2,5 mM sedangkan pada konsentrasi 3 mM terjadi penurunan data absorbansi. Hal ini menunjukkan pada konsentrasi 2,5 mM sisi aktif enzim telah terisi penuh oleh substrat. Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan jumlah enzim-substrat. Namun, pada konsentrasi tertentu, ketika jumlah enzim-substrat sudah jenuh dan tidak ada lagi sisi aktif enzim bebas yang tersedia, peningkatan laju konsentrasi substrat tidak lagi meningkatkan laju pembentukan enzim-substrat (Murray, Granner & Rodwell, 2006).

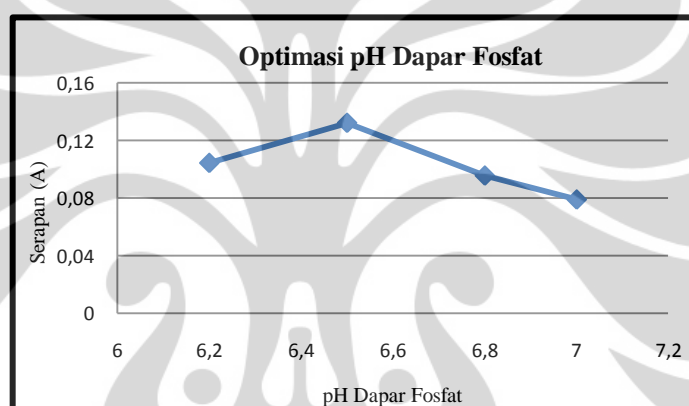
Penurunan absorbansi pada konsentrasi 3 mM dapat disebabkan oleh adanya penghambatan aktivitas enzim oleh dopakrom sebagai produk. Penghambatan yang dilakukan produk dikarenakan produk memiliki struktur yang sama dengan struktur substrat. Penghambatan oleh produk tidak selalu konstan, tetapi penghambatannya dapat meningkat seiring dengan meningkatnya pembentukan produk (Bisswanger, 2002).



Gambar 4.13. Kurva penentuan konsentrasi optimum L-DOPA

4.4.3 Penentuan Kondisi pH Optimum

Optimasi kondisi pH dilakukan bertujuan untuk mendapatkan kondisi pH yang optimum. Pada optimasi pH, variasi kondisi pH yang digunakan adalah pH 6,2; 6,5; 6,8; dan 7,0. Dari hasil pengukuran diperlihatkan bahwa kondisi optimum ditunjukkan pada pH 6,5 dengan data absorbansi paling besar dibandingkan pada kondisi pH lainnya. Rendahnya aktivitas pada kondisi pH 6,2; 6,8; dan 7,0 dikarenakan peristiwa denaturasi enzim pada kondisi tersebut yang disebabkan ketidaksesuaian enzim terhadap kondisi konsentrasi ion hidrogen. Hasil optimasi kondisi pH dapat dilihat pada Lampiran 30 dan kurva penentuan kondisi pH optimum dapat dilihat pada Gambar 4.14.



Gambar 4.14. Kurva penentuan kondisi pH optimum

4.4.4 Penentuan Tipe Penghambatan Tirosinase oleh Asam Azelat

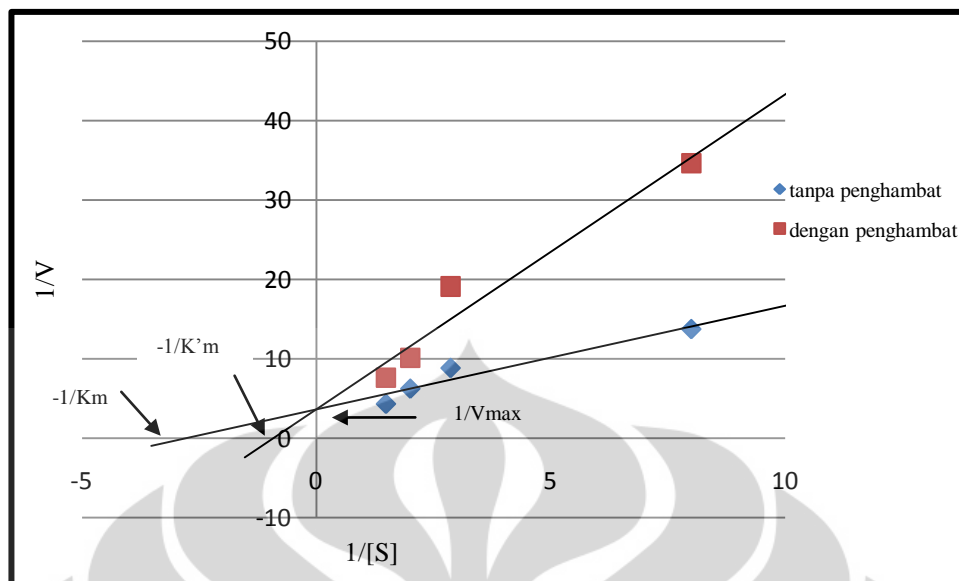
Penentuan tipe penghambatan tirosinase oleh asam azelat dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi L-DOPA sebagai substrat. Tipe penghambatan dianalisis dengan membuat dua kurva Lineweaver-Burk tirosinase dan L-DOPA dengan dan tanpa inhibitor. Dalam hal ini inhibitor adalah asam azelat. Dari hasil pengukuran ditentukan nilai $1/V_{max}$ dan $1/K_m$ pada kurva tanpa penghambat maupun dengan penghambat. Hasil data kurva Lineweaver-Burk dapat dilihat pada Lampiran 31 dan Tabel 4.4.

Tabel 4.4. Perhitungan regresi linier Kurva Lineweaver-Burk

Kurva Lineweaver-Burk	a	b	Regresi linier	Vmax	Km
Tanpa penghambat	3,6439	1,3057	$y = 3,6439 + 1,3057x$	0,2744	0,3583
Dengan penghambat	3,6609	3,9621	$y = 3,6609 + 3,9621x$	0,2731	1,0822

Berdasarkan hasil perhitungan regresi linier Lineweaver-Burk terlihat bahwa kedua kurva memiliki nilai $1/V_{max}$ yang sama sedangkan memiliki nilai $1/K_m$ yang berbeda. Pada Gambar 4.15 terlihat bahwa kedua kurva memotong sumbu y ($1/v$) pada titik yang sama dan memperjelas bahwa kedua kurva memiliki nilai $1/V_{max}$ yang sama dan dapat disimpulkan bahwa asam azelat merupakan suatu penghambat kompetitif dari tirosinase. Diketahui bahwa suatu penghambat kompetitif tidak berefek pada V_{max} , tapi meningkatkan nilai K_m . Tapi pada penghambat nonkompetitif menurunkan nilai V_{max} dan tidak mempengaruhi K_m karena pada penghambat kompetitif kompleks enzim-penghambat tetap dapat mengikat substrat, namun efisiensinya mengubah substrat menjadi produk yang tercermin oleh V_{max} berkurang.

Mekanisme penghambatan terjadi karena asam azelat akan berkompetisi untuk berikatan dengan *active site* tirosinase, dalam hal ini pada bagian atom Cu-nya. Produk yang dihasilkan dari reaksi dengan substrat adalah dopakrom yang berwarna jingga tua hingga merah sedangkan produk yang dihasilkan dari reaksi dengan inhibitor tidak berwarna sehingga persen penghambatan aktivitas tirosinase dapat dihitung dengan mengurangi serapan yang terbentuk tanpa penghambat dengan penghambat yang terbentuk dengan penambahan penghambat.

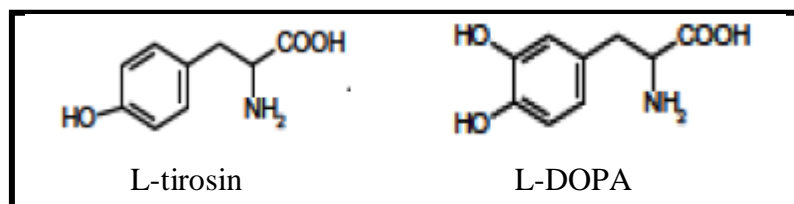


Gambar 4.15. Kurva Lineweaver Burk tanpa dan dengan penghambat

4.5 Hasil Uji Penghambatan Aktivitas Tirosinase

Tirosinase adalah monooksigenase yang mengandung Cu dimana enzim ini berperan sebagai katalisator pada reaksi o-hidroksilasi monofenol menjadi bentuk difenol (monofenole) dan oksidasi difenol menjadi o-quinon (difenol). Tirosinase memainkan peranan penting dalam pembentukan melanin selama proses melanogenesis karena tirosinase mampu menghidroksilasi L-tirosin (monofenol) menjadi L-DOPA (difenol) dan mengoksidasi L-DOPA menjadi dopaquinon (senyawa kuinon). Dopaquinon yang terbentuk akan bereaksi spontan membentuk dopakrom (Ramsden & Riley, 2010).

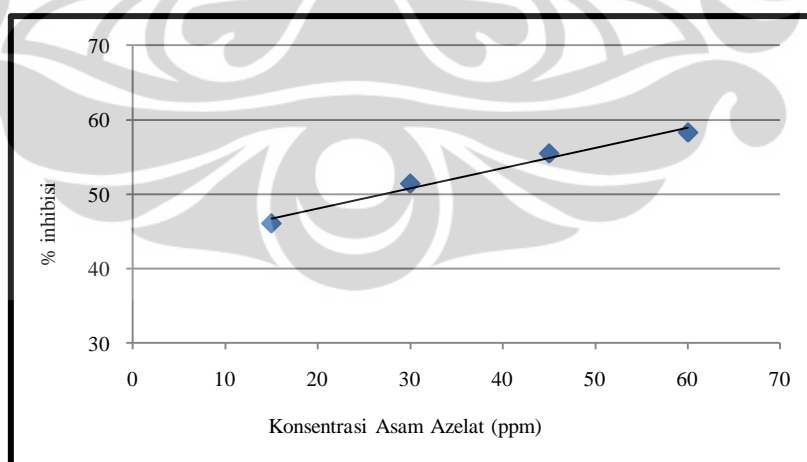
Dalam pelaksanaan reaksi enzimatik, pemilihan substrat menjadi hal yang sangat penting karena dapat mempengaruhi hasil pengukuran. Dalam reaksi enzimatik terdapat 2 substrat yang berperan, yaitu L-tirosin dan L-DOPA (Rodriquez & Flurkey, 1992). Pada pelaksanaan substrat yang dipilih adalah L-DOPA karena produk dopakrom dapat diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm, sedangkan jika substrat L-tirosin yang dipilih maka produk yang terbentuk adalah L-DOPA dan dopakrom. L-DOPA tidak dapat diukur serapannya dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.



Gambar 4.16. Struktur substrat dari tirosinase

4.5.1 Pengukuran Penghambatan Aktivitas Tirosinase (IC_{50}) dari Asam Azelat

Pengukuran IC_{50} dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi asam azelat yang digunakan dari 15-60 ppm. Kemudian diukur serapannya dan dihitung % penghambatannya. Plot ke dalam kurva antara konsentrasi asam azelat vs % penghambatan. Dari persamaan linier yang didapat dari kurva tersebut, dapat dihitung IC_{50} , yaitu konsentrasi asam azelat yang mempunyai aktivitas penghambatan aktivitas tirosinase sebesar 50 %. Hasil pengukuran IC_{50} dari asam azelat adalah 27,14 ppm. Sebagai kontrol positif digunakan asam askorbat, dimana dari pengukuran yang dilakukan didapatkan nilai IC_{50} asam askorbat sebesar 21,77 ppm. Hal tersebut memperlihatkan bahwa asam azelat memiliki aktivitas penghambatan yang lebih rendah jika dibandingkan dengan asam askorbat. Kurva konsentrasi asam azelat (ppm) vs % penghambatan dapat dilihat pada Gambar 4.17. Dari kurva tersebut didapatkan persamaan linier .



Gambar 4.17. Kurva konsentrasi asam azelat (ppm) terhadap % penghambatan

4.5.2 Pengukuran Penghambatan Tirosinase dari Krim Asam Azelat

Untuk menghindari pengaruh bahan eksipien yang digunakan dalam formulasi krim pada uji aktivitas, maka digunakan krim blanko negatif dengan kandungan bahan eksipien yang sama dengan krim yang mengandung asam azelat, yaitu 200 μ l. Posisi fenol dari senyawa aktif asam azelat berikatan dengan atom Cu pada *active site* tirosinase menyebabkan tidak terjadi reaksi oksidasi yang dikatalisis tirosinase sehingga pembentukan senyawa dopakrom menjadi berkurang.

Dalam pengukuran digunakan pula krim blanko positif yang mengandung asam askorbat dengan konsentrasi 5 % dan 10 % sesuai dengan konsentrasi dari asam azelat yang digunakan. Asam askorbat saat ini digunakan sebagai zat aktif dalam sediaan kosmetika pemutih di pasaran yang memiliki mekanisme kerja sebagai penghambat tirosinase. Penggunaan krim blanko positif bertujuan untuk membandingkan besarnya aktivitas penghambatan tirosinase dengan krim yang mengandung asam azelat.

Setelah dilakukan pengukuran serapan dopakrom pada tiap sampel krim, maka diperoleh hasil persen penghambatan aktivitas tirosinase dari masing-masing krim. Besarnya nilai persen penghambatan tirosinase dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5. Hasil pengukuran penghambatan tirosinase asam azelat pada minggu ke-0 dan minggu ke-8 dengan spektrofotometer UV-Vis.

Larutan Sampel	Rata-rata (%) penghambatan aktivitas tirosinase	
	Minggu ke-0	Minggu ke-8
Krim A (asam azelat 5 %)	26,50	22,44
Krim B (asam azelat 10 %)	51,54	46,54

Dari Tabel 4.5 didapatkan bahwa persen penghambatan tirosinase krim A yang mengandung asam azelat 5 % sebesar 26,50 % sedangkan krim B yang mengandung asam azelat 10 % sebesar 51,54 %. Besarnya nilai persen

penghambatan bergantung pada konsentrasi asam azelat yang digunakan. Krim B yang mengandung asam azelat lebih banyak memiliki persen penghambatan tirosinase yang lebih besar dibanding dengan krim A. Krim blanko positif yang mengandung asam askorbat dengan konsentrasi 5 % dan 10 % memiliki persen penghambatan tirosinase sebesar 39,09 % dan 76,31 %. Besarnya nilai persen penghambatan tirosinase krim blanko positif lebih besar nilainya dibandingkan dengan krim yang mengandung asam azelat sehingga dapat dikatakan krim yang mengandung asam azelat memiliki penghambatan aktivitas tirosinase yang lebih rendah dibandingkan krim yang mengandung asam askorbat pada konsentrasi yang sama.

Selain itu, untuk mengetahui pengaruh penyimpanan maka uji penghambatan tirosinase dilakukan pada minggu ke-8 pada krim yang disimpan pada suhu kamar. Setelah penyimpanan 8 minggu, nilai persen penghambatan tirosinase dari kedua krim mengalami penurunan. Nilai persen penghambatan tirosinase dari krim A menurun menjadi 22,44 %, sedangkan krim B menurun menjadi 46,54 %. Penurunan ini disebabkan krim tidak stabil selama penyimpanan. Berkurangnya konsentrasi senyawa aktif dalam krim asam azelat terjadi karena reaksi oksidasi dengan suhu dan udara. Hasil oksidasi tersebut menghasilkan senyawa kuinon yang tidak dapat berikatan dengan *active site* tirosinase. Jumlah senyawa aktif yang berikatan dengan tirosinase berkurang sehingga penghambatan aktivitas tirosinase menjadi menurun.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Asam azelat memiliki efek inhibisi tirosinase dengan nilai IC_{50} 27,14 ppm. Sediaan krim yang mengandung asam azelat 5 % dan 10 % memiliki aktivitas penghambatan tirosinase berturut-turut sebesar 26,50 % dan 51,54 %. Penyimpanan selama 2 bulan, krim yang mengandung asam azelat 5 % dan 10 % mengalami penurunan penghambatan aktivitas tirosinase berturut-turut menjadi 22,44 % dan 46,54 %. Hasil uji kestabilan fisik, krim yang mengandung asam azelat 5 % dan 10 % tidak menunjukkan adanya pemisahan fase pada penyimpanan dan pada uji mekanik memperlihatkan bahwa krim memiliki masa simpan mencapai satu tahun karena tahan terhadap gaya gravitasi. Pada uji kestabilan kimia memperlihatkan terjadinya kecenderungan penurunan kadar pada krim A maupun krim B selama penyimpanan.

5.2 Saran

Asam azelat dapat dijadikan pilihan di masa mendatang sebagai pencerah kulit karena memiliki penghambatan aktivitas tirosinase. Untuk perbaikan sebaiknya dilakukan pengembangan pada formulasi sediaan karena adanya penurunan aktivitas dan kadar asam azelat pada penyimpanan. Uji secara *in vivo* sebaiknya juga dilakukan agar diketahui besarnya efikasi jika digunakan pada kulit manusia.

DAFTAR ACUAN

- Ansel, H. C. (1989). *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, edisi keempat. Terj. dari *Introduction to Pharmaceutical Dosage Form*, oleh Farida Ibrahim. Jakarta : UI Press
- Arung, E. T., I. W. Kusuma., Y. M. Iskandar., S. Yasutake., K. Shimizu., R. Kondo. (2005). Screening of Indonesian Plants for Tyrosinase Inhibitory Activity. *The Japan Wood Research Society vol 51* : 520-525
- Bisswanger, H. (2002). *Enzyme Kinetics : Principles and Methods*. German : Wiley-VCH, Inc.
- Bojat, et al. (1994). A Possible Mechanism for the Antibacterial Action of Azelaic Acid in *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy vol 34* : 321-330.
- Brasch, J. & Christophers E. (1993). Azelaic Acid has Antimycotic Properties In Vitro. *Jurnal of Dermatology*, 186 : 55-8
- Cayce, K. A., Amy, J. M., & Steven, R. F. (2004). Hyperpigmentation : An Overview of the Common Afflictions. *Dermatol Nurs 16(5)* : 401-416.
- Copeland, R.A. (2000). *Enzymes : A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Wiley-VCH, Inc.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta.
- Djajadisastra, J. (2003). *Pemutih yang Tepat dan Aman bagi Wanita Indonesia*. Disampaikan pada Pharmacy Beauty & Health. 12 September 2003.
- Djajadisastra, J. (2004). *Cosmetic Stability*. Disampaikan pada “Seminar Setengah Hari HIKI” Rabu, 20 Nofember 2004, Hotel Menara Peninsuki, SLIPI, Jakarta.
- Fais, A. et al. (2009). Tyrosinase Inhibitor Activity of Coumarin-Resveratrol Hybrids. *Molecules 14* : 2514-2520.
- Frampton, J.E & Wagstaff, A.J. (2004). Azelaic Acid 15 % : Gel In the Treatment of Papulopustular Rosacea. *Am J Clin Dermatol*, 5 : 57-64.

- Khan, M.T.H. (2007). Molecular Design of Tyrosinase Inhibitors : A Critical Review of Promising Novel Inhibitors from Synthetic Origin. *Pure Appl. Chem.*, vol 79 : 2277-2295.
- Kim, J & H. Uyama. (2005). Tyrosinase Inhibitors From Natural and Synthetic Sources : Structure, Inhibition mechanism and Perspective For The Future. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62 : 1707-1723.
- Kishore, M., M. Jayaprakash., T.V. Reddy. (2010). Spectrophotometric Determination of Azelaic Acid in Pharmaceutical Formulations. *Journal of Pharmacy Research*, vol.3 : 3090-3092.
- Lachman, L. (1994). *Teori dan Praktek Farmasi Industri. Edisi ke-3*. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia, UI Press.
- Lintner, Karl & Sederma France. (n.d). *Substantions of Skin Whitening Claims*. Diambil dari : www.incosmeticsasia.com/files/pres_wkshp1_substantiation_of_skin_whitening_claims.pdf diakses pada tanggal 17 Januari 2012.
- Lloyd, H. W., Jenna, N., & Kammer, BA. (2011). Treatment of Hyperpigmentation. *Semin Cutan Med Surg* 30 : 171-175.
- Martin, A., J. Swarbick., A. Cammarata. (1993). *Farmasi Fisik, edisi ketiga*. Terj dari Physical Pharmacy, oleh Joshita., Jakarta : UI Press.
- Mather, et al. (1999). Topical Vehicles Containing Solubilized and Stabilized Azelaic Acid. USA : *US Patent* 5,925,679.
- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes. (2006). *Harper's Biochemistry ed. 27*.
- Parvez, et.al. (2006). Survey and Mechanism of Skin Depigmenting and Lightening Agent. *Phytother. Res.*, 20 : 921-934.
- Porro, M.N & S. Passi. (1978). Identification of Tyrosinase Inhibitors in Cultures of of Pityrosporum. *The Journal of Investigative Dermatology*, 71 : 205-208.
- Ramsden, C. A & Patrick, A. R. (2010). Mechanistic Studies of Tyrosinase Suicide Inactivation. *Special Issue Reviews and Accounts* : 260-274
- Rieger, M. (2000). *Harry's Cosmticology 8th Ed*. New York : Chemical Publishing CO. Inc.
- Rodriquez, M. O. & William, H. F. (1992). A Biochemistry Project to Study Mushroom Tyrosinase. *Indiana State University*. Vol. 69.

- Rowe, R.C., P.J. Sheskey, M.E.Quinn. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients 6th Ed.* London : American Pharmaceutical Association.
- Sang, H. J, Kim K.H., Koh J.U., Kong K.H. (2005). Inhibitory Effect on L-DOPA Oxidation of Tyrosinase by Skin Whitening Agents. *Bull. Korean Chem. Soc.* Vol 26.
- Subowo. (1992). *Histologi Umum edisi I.* Jakarta : Bumi Aksara
- Smit, N., J. Vicanova., S. Pavel. (2009). The Hunt for Natural Skin Whitening Agents. *Int. J. Mol. Sci.* 10 : 5326-5349.
- Sweetman, S. C. (2009). *Martindale The Complete Drug Reference 36th Ed.* London : Pharmaceutical Press, 1589.
- Tranggono, RIS. & Fatma Latifah. (2007). *Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik.* Jakarta : PT Gramedia Pustaka Utama
- Wasitaatmadja, S.M. (1997). *Penuntun Ilmu Kosmetik Medik.* Jakarta : UI Press.
- Yong, D.P., & Lee, J. R. (2003). An new continuous Spectrophotometric Assay Method for DOPA Oxidase Activity of Tyrosinase. *Journal of Protein Chemistry.* Vol 22.

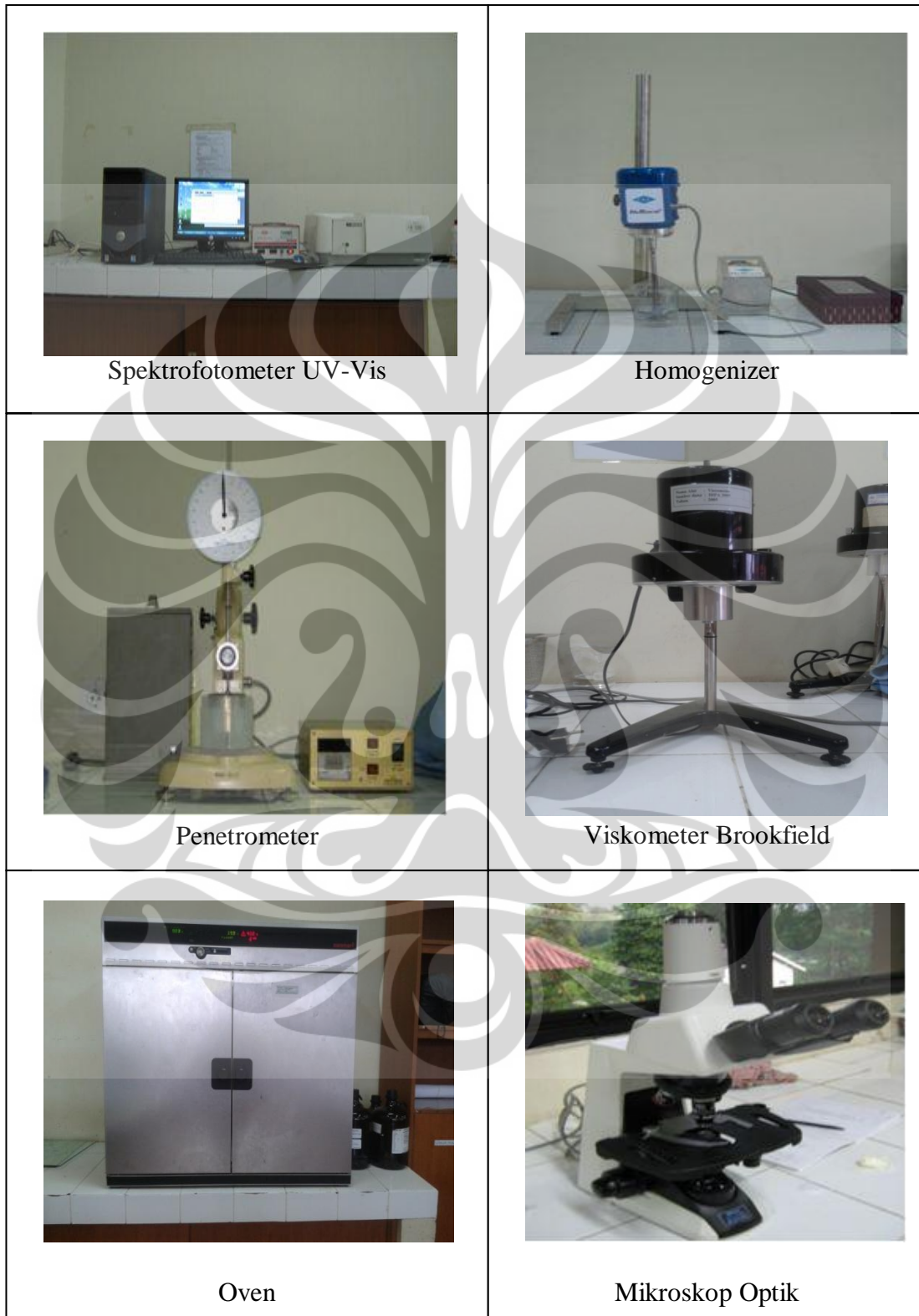


LAMPIRAN

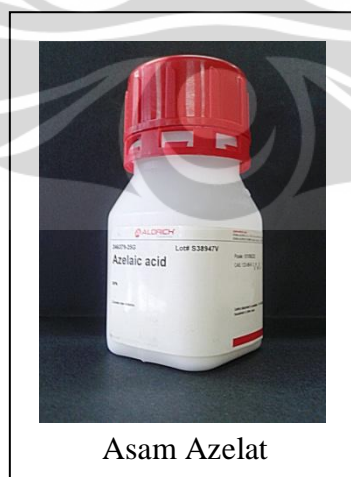
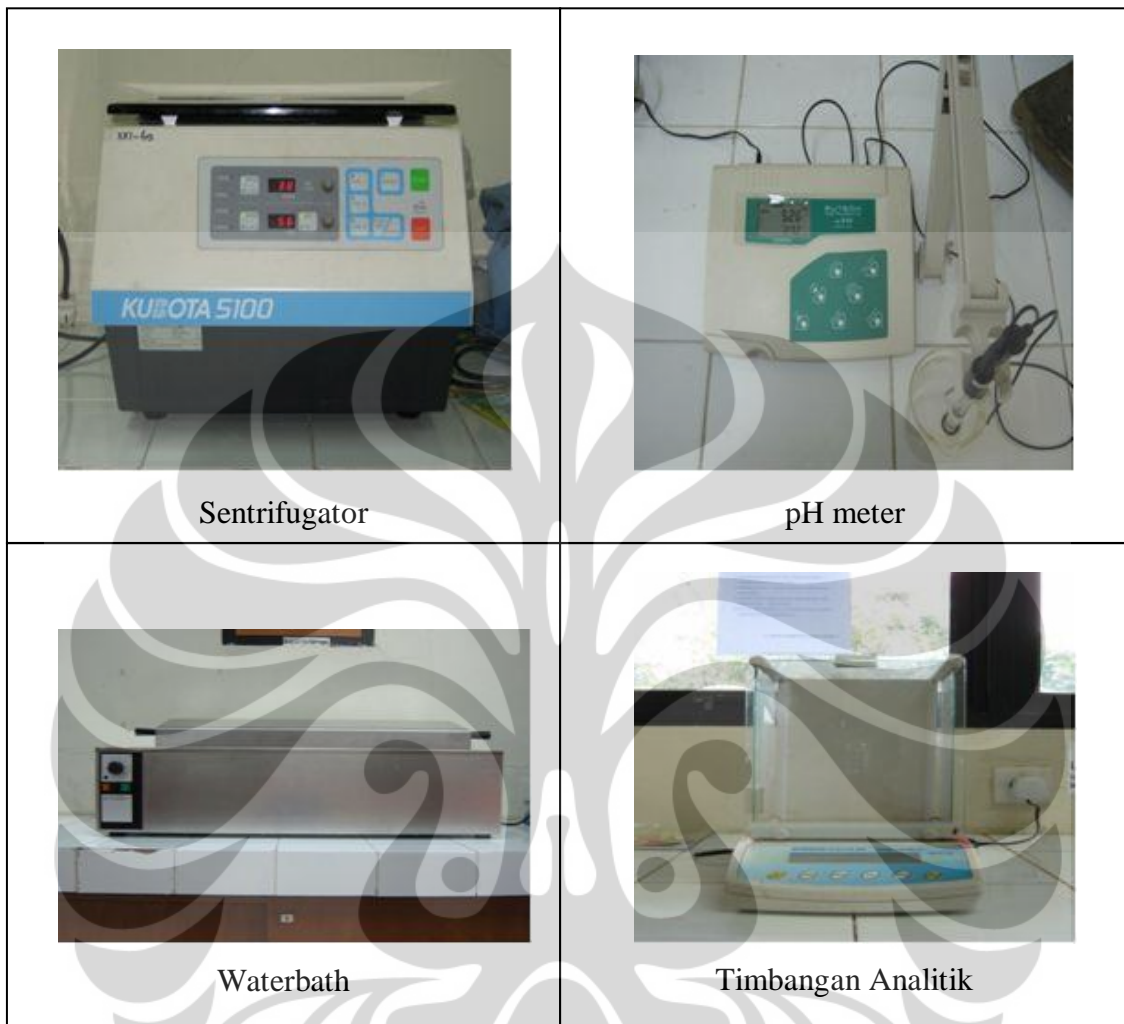


Daftar Lampiran

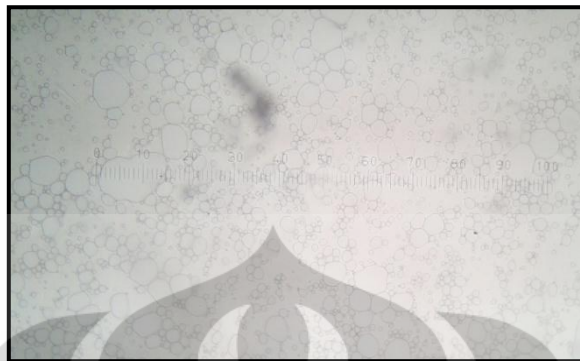
Lampiran Gambar	1-5
Lampiran Tabel	6-20
Lampiran Rumus Perhitungan	21-34
Lampiran Sertifikat	35-46

Lampiran 1. Foto alat-alat dan bahan yang digunakan

(lanjutan)



Lampiran 2. Foto hasil pengamatan ukuran globul pada minggu ke-0



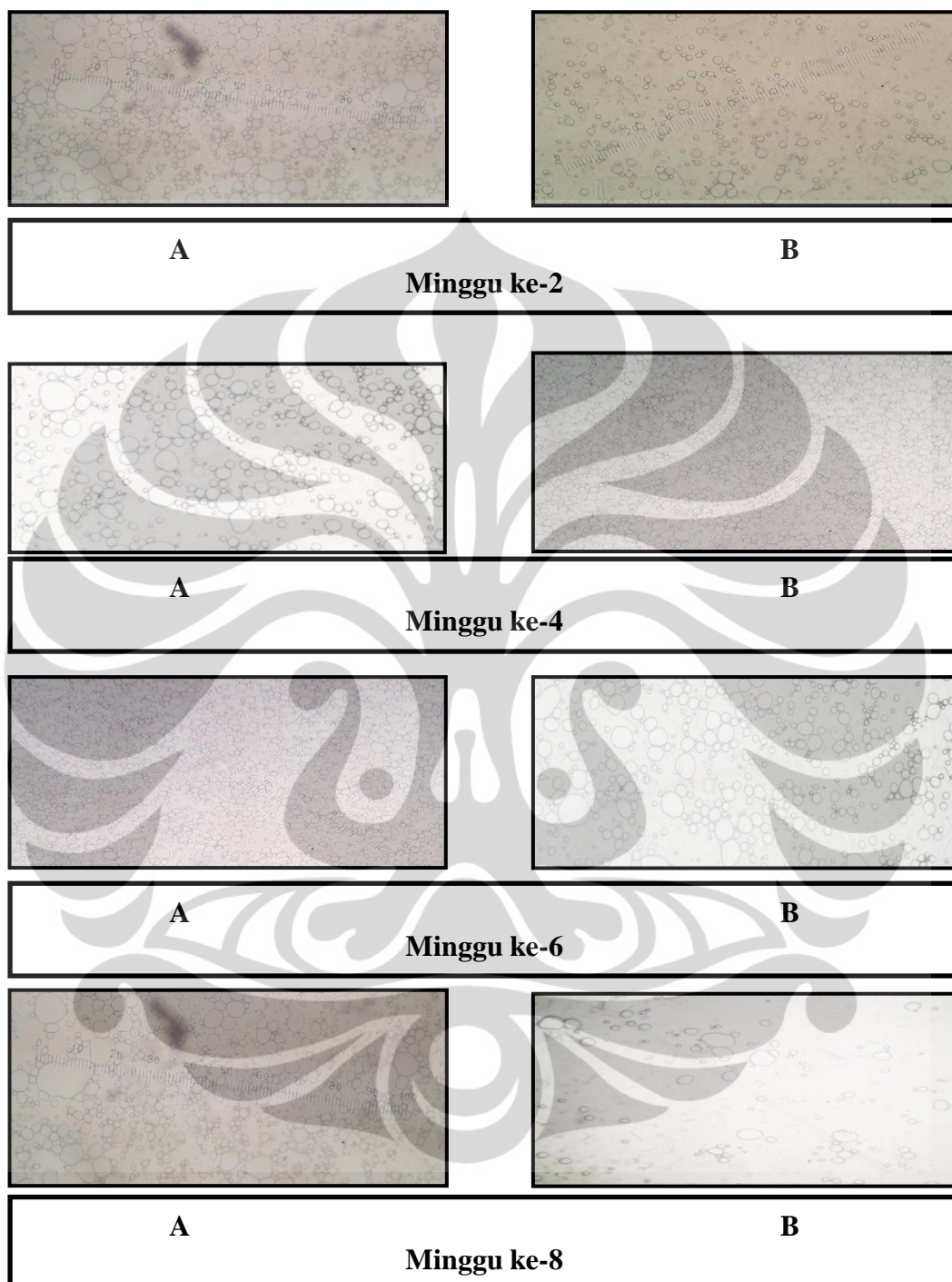
Krim A



Krim B

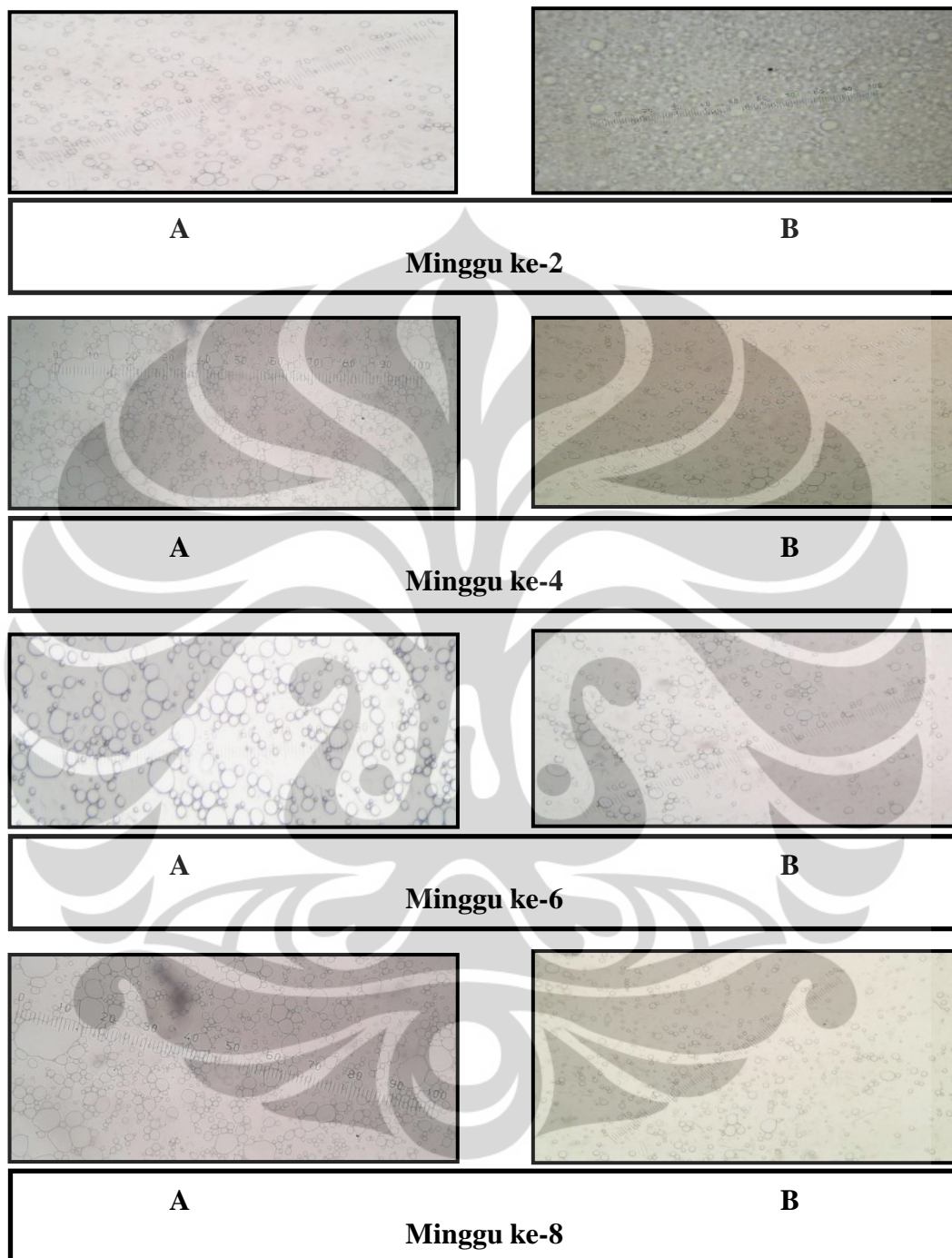
Keterangan : A = krim asam azelat 5 %
B = krim asam azelat 10 %

Lampiran 3. Foto hasil pengamatan ukuran globul krim pada suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu



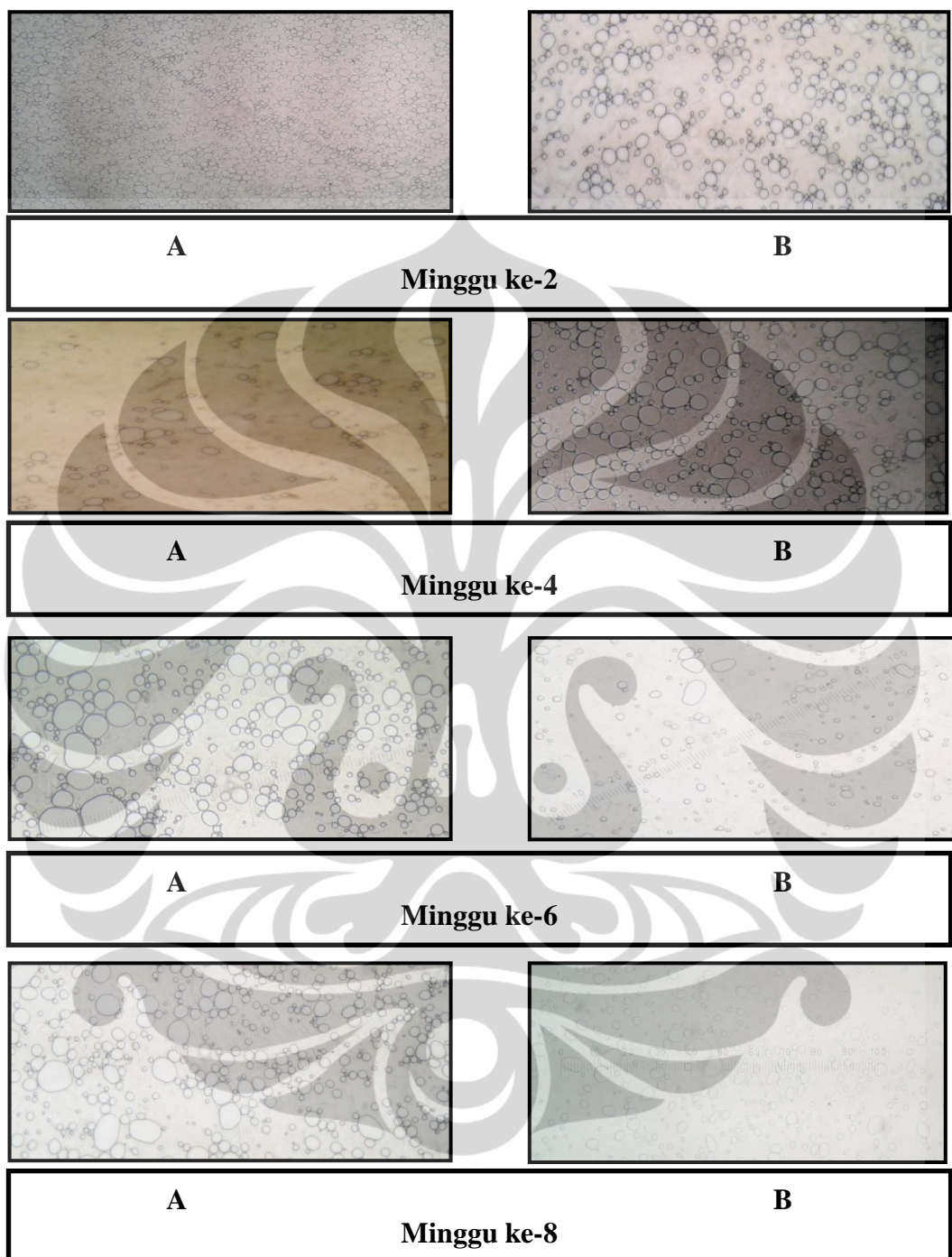
Keterangan : A = krim asam azelat 5 %
B = krim asam azelat 10

Lampiran 4. Foto hasil pengamatan ukuran globul krim pada suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu



Keterangan : A = krim asam azelat 5 %
B = krim asam azelat 10 %

Lampiran 5. Foto hasil pengamatan ukuran globul krim pada suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu



Keterangan : A = krim asam azelat 5 %
B = krim asam aazelat 10%

Lampiran 6. Tabel hasil evaluasi fisik kedua krim pada minggu ke-0

Pengamatan	Krim A	Krim B
Organoleptis	Warna putih, tidak berbau, homogen	Warna putih, tidak berbau, homogen
pH	4,11	4,03
Angka kedalaman penetrasi kerucut (1/10 mm)	360	405
Viskositas pada 20 rpm (cps)	30000	29000
Diameter globul rata-rata (μm)	0,485	0,481

Lampiran 7. Hasil pengamatan organoleptis krim A dan krim B pada suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu

Tabel pengamatan organoleptis krim A pada suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$

Minggu ke	Warna	Bau	Homogenitas
2	Putih	Tidak berbau	Homogen
4	Putih	Tidak berbau	Homogen
6	Putih	Tidak berbau	Homogen
8	Putih	Tidak berbau	Homogen

Tabel pengamatan organoleptis krim B pada suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$

Minggu ke	Warna	Bau	Homogenitas
2	Putih	Tidak berbau	Homogen
4	Putih	Tidak berbau	Homogen
6	Putih	Tidak berbau	Homogen
8	Putih	Tidak berbau	Homogen

Tabel pengamatan organoleptis krim A pada suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$

Minggu ke	Warna	Bau	Homogenitas
2	Putih	Tidak berbau	Homogen
4	Putih	Tidak berbau	Homogen
6	Putih	Tidak berbau	Homogen
8	Putih	Tidak berbau	Homogen

Tabel pengamatan organoleptis krim B pada suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$

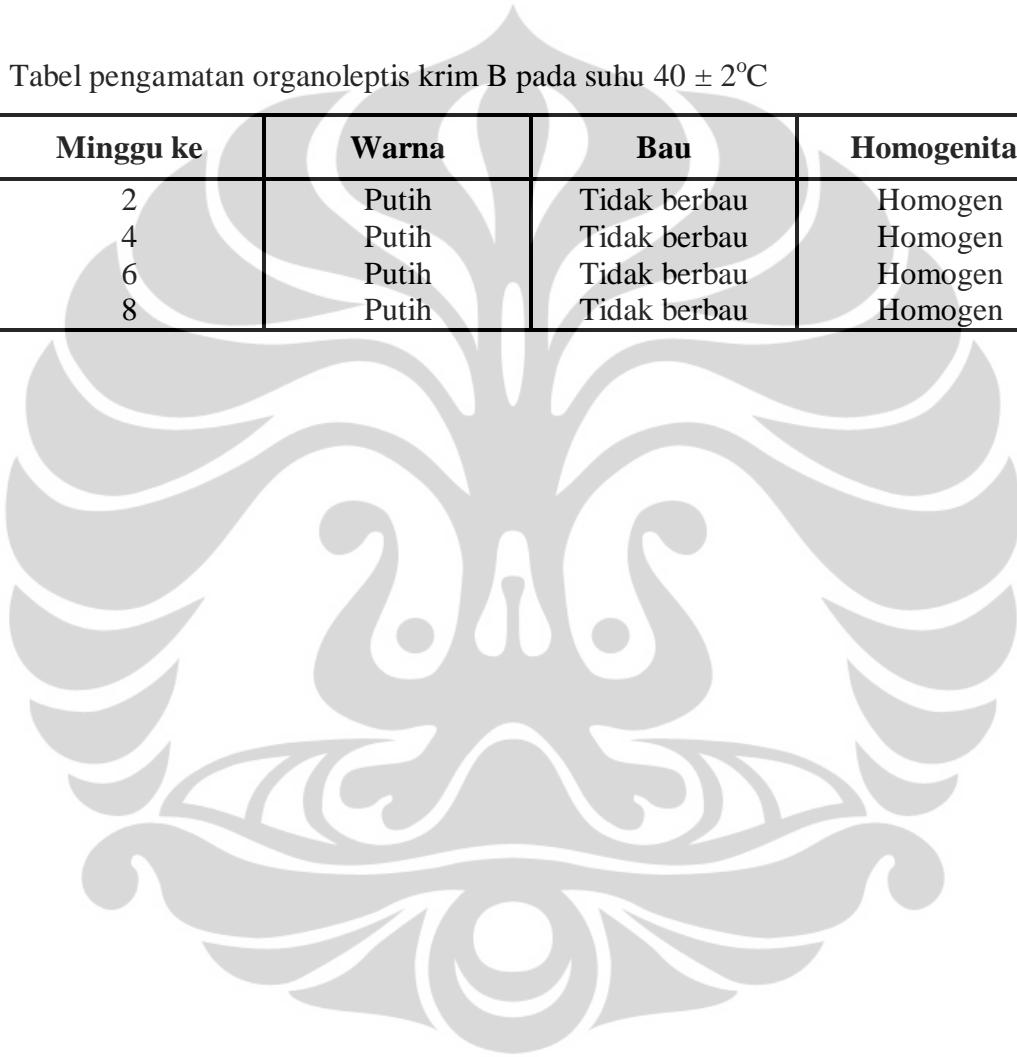
Minggu ke	Warna	Bau	Homogenitas
2	Putih	Tidak berbau	Homogen
4	Putih	Tidak berbau	Homogen
6	Putih	Tidak berbau	Homogen
8	Putih	Tidak berbau	Homogen

Tabel pengamatan organoleptis krim A pada suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$

Minggu ke	Warna	Bau	Homogenitas
2	Putih	Tidak berbau	Homogen
4	Putih	Tidak berbau	Homogen
6	Putih	Tidak berbau	Homogen
8	Putih	Tidak berbau	Homogen

Tabel pengamatan organoleptis krim B pada suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$

Minggu ke	Warna	Bau	Homogenitas
2	Putih	Tidak berbau	Homogen
4	Putih	Tidak berbau	Homogen
6	Putih	Tidak berbau	Homogen
8	Putih	Tidak berbau	Homogen



Lampiran 8. Hasil pengukuran pH krim A dan krim B pada suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu

Tabel hasil pengukuran pH krim A dan krim B pada suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$

Minggu ke-	Krim A	Krim B
2	4,38	4,19
4	4,08	3,99
6	3,78	3,72
8	3,77	3,71

Tabel hasil pengukuran pH krim A dan krim B pada suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$

Minggu ke-	Krim A	Krim B
2	4,30	4,21
4	4,08	3,97
6	3,84	3,77
8	3,82	3,76

Tabel hasil pengukuran pH krim A dan krim B pada suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$

Minggu ke-	Krim A	Krim B
2	4,46	4,29
4	4,03	3,95
6	3,66	3,56
8	3,63	3,52

Lampiran 9. Hasil pengukuran diameter globul krim pada suhu 4 ± 2 , 27 ± 2 dan $40 \pm 2^\circ\text{C}$ selama penyimpanan 8 minggu

Tabel hasil pengukuran diameter globul krim pada suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$

Formula	Formula A	Formula B
Minggu ke-		
2	0,493	0,498
4	0,492	0,497
6	0,494	0,498
8	0,500	0,535

Tabel hasil pengukuran diameter globul krim pada suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$

Formula	Formula A	Formula B
Minggu ke-		
2	0,488	0,489
4	0,490	0,492
6	0,492	0,493
8	0,521	0,554

Tabel hasil pengukuran diameter globul krim pada suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$

Formula	Formula A	Formula B
Minggu ke-		
2	0,603	0,598
4	0,643	0,614
6	0,646	0,620
8	0,708	0,709

Lampiran 10. Tabel hasil perhitungan viskositas krim A pada minggu ke-8

Spindel	Kecepatan	Dial Reading	Faktor	Viskositas $\eta = dr \times f$ (cps)	Shearing Stress $F/A = dr \times 7,187$ (dyne/cm ²)	Rate of Shear $dv/dr = F/A \times 1/\eta$
6	2	12	10000	120000	86,244	0,0007187
	2,5	13,5	8000	108000	97,024	0,0008984
	5	17	4000	68000	122,179	0,0017967
	10	23,5	2000	47000	168,894	0,0035935
	20	32	1000	32000	229,984	0,0071870
	10	22,5	2000	45000	161,707	0,0035934
	5	16,5	4000	66000	118,585	0,0017967
	2,5	12	8000	96000	86,244	0,0008984
	2	10,5	10000	105000	75,463	0,0007178

Lampiran 11. Tabel hasil perhitungan viskositas krim B pada minggu ke-8

Spindel	Kecepatan	Dial Reading	Faktor	Viskositas $\eta = dr \times f$ (cps)	Shearing Stress $F/A = dr \times 7,187$ (dyne/cm ²)	Rate of Shear $dv/dr = F/A \times 1/\eta$
6	2	11	10000	110000	79,057	0,0007187
	2,5	13	8000	104000	93,431	0,0008983
	5	17,5	4000	70000	125,772	0,0017967
	10	23	2000	46000	165,301	0,0035935
	20	31	1000	31000	222,797	0,0071870
	10	22	2000	44000	158,114	0,0035935
	5	15,5	4000	62000	111,398	0,0017967
	2,5	10,5	8000	84000	75,463	0,0008984
	2	10	10000	100000	71,870	0,0007178

Lampiran 12. Tabel hasil perhitungan viskositas krim A pada minggu ke-0

Spindel	Kecepatan	Dial Reading	Faktor	Viskositas $\eta = dr \times f$ (cps)	Shearing Stress $F/A = dr \times 7,187$ (dyne/cm ²)	Rate of Shear $dv/dr = F/A \times 1/\eta$
6	2	12	10000	120000	86,244	0,0007187
	2,5	13,5	8000	108000	97,024	0,0008983
	5	18	4000	72000	129,366	0,0017967
	10	25	2000	50000	179,675	0,0035935
	20	30	1000	30000	215,610	0,0071870
	10	23	2000	46000	165,301	0,0035935
	5	16	4000	64000	114,992	0,0017967
	2,5	11,5	8000	92000	82,651	0,0008983
	2	10,5	10000	105000	75,463	0,0007186

Lampiran 13. Tabel hasil perhitungan viskositas krim B pada minggu ke-0

Spindel	Kecepatan	Dial Reading	Faktor	Viskositas $\eta = dr \times f$ (cps)	Shearing Stress $F/A = dr \times 7,187$ (dyne/cm ²)	Rate of Shear $dv/dr = F/A \times 1/\eta$
6	2	12	10000	120000	86,244	0,0007187
	2,5	13	8000	104000	93,431	0,0008983
	5	17,5	4000	70000	125,772	0,0017967
	10	23	2000	46000	165,301	0,0035935
	20	29	1000	29000	208,423	0,0071870
	10	21	2000	42000	150,927	0,0035935
	5	16	4000	64000	114,992	0,0017967
	2,5	12	8000	96000	86,244	0,0008937
	2	11	10000	110000	79,057	0,0007187

Lampiran 14. Tabel data serapan kurva kalibrasi asam azelat dalam metanol

Konsentrasi asam azelat (ppm)	Serapan (A)
2,5	0,4946
5	0,5421
7,5	0,6012
10	0,6414
12,5	0,7155
15	0,7758

Lampiran 15. Tabel data stabilitas kimia krim A dan krim B pada minggu ke-0

Formula	Krim ditimbang (gr)	Serapan	Kadar (%)	Rata-rata
Krim A	2,0441	0,6621	5,11	5,19 %
	2,0014	0,6698	5,28	
Krim B	1,0194	0,6604	10,18	10,4
	1,0208	0,6703	10,62	

Lampiran 16. Tabel data stabilitas kimia krim A dan krim B pada minggu ke-4

Suhu (°C)	Krim A			Krim B		
	Serapan	Kadar (%)	Rata-rata	Serapan	Kadar (%)	Rata-rata
4 ± 2	0,7019	6,00	5,96 %	0,6914	11,55	11,73 %
	0,6981	5,92		0,6997	11,91	
27 ± 2	0,6491	4,77	4,62 %	0,6489	9,52	9,37 %
	0,6352	4,47		0,6423	9,23	
40 ± 2	0,5981	3,72	3,77 %	0,6011	7,55	7,47 %
	0,6022	3,82		0,5974	7,39	

Lampiran 17. Tabel data stabilitas kimia krim A dan krim B pada minggu ke-8

Suhu (°C)	Krim A			Krim B		
	Serapan	Kadar (%)	Rata-rata	Serapan	Kadar (%)	Rata-rata
4 ± 2	0,6842	5,54	5,51 %	0,6610	10,35	10,72 %
	0,6808	5,49		0,6776	11,09	
27 ± 2	0,6362	4,63	4,41 %	0,6377	9,18	8,92%
	0,6171	4,19		0,6261	8,66	
40 ± 2	0,5770	3,19	3,35 %	0,5726	6,39	6,32 %
	0,5923	3,52		0,5695	6,25	

Lampiran 18. Tabel data serapan optimasi substrat L-DOPA

Konsentrasi Substrat (mM)	Serapan (A)
1	0,0422
2	0,0717
2,5	0,0898
3	0,0637

Lampiran 19. Tabel data serapan optimasi kondisi pH dapar fosfat

pH Dapar Fosfat	Serapan (A)
6,2	0,1040
6,4	0,1324
6,8	0,0958
7,0	0,0792

Lampiran 20. Tabel data Kurva Lineweaver-Burk tanpa dan dengan penghambat

Tanpa Penghambat				
Vol. DOPA (μl)	[S] DOPA (mM)	A	1/[S] (mM ⁻¹)	1/v
500	0,125	0,0726	8,00	13,77
700	0,350	0,1125	2,86	8,88
800	0,500	0,1592	2,00	6,28
1000	0,75	0,2114	1,48	4,37

Perhitungan regresi linier

Persamaan regresi linier : $y = a + bx$, $y = 1/v$ dan $x = 1/[S]$

Persamaan Michaelis-menten : $\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V_{\max}} + \left(\frac{K_m}{V_{\max}}\right) \frac{1}{[S]}$

- $a = \frac{1}{V_{\max}} \rightarrow V_{\max} = \frac{1}{a}$
- $b = \frac{K_m}{V_{\max}} \rightarrow K_m = b \times V_{\max} \rightarrow K_m = \frac{b}{a}$

Dari perhitungan di dapat persamaan regresi linier : $y = 3,6439 + 1,3057x$

- $a = 3,6439$ dan $b = 1,3057$
- $V_{\max} = \frac{1}{3,6439} = 0,2744$
- $K_m = \frac{1,3057}{3,6439} = 0,3583$

Dengan Penghambat					
Vol. DOPA (μl)	Vol. Inhibitor (μl)	[S] DOPA (mM)	A	1/[S] (mM ⁻¹)	1/v
500	200	0,125	0,0289	8,00	34,60
700	200	0,350	0,0523	2,86	19,12
800	200	0,500	0,0987	2,00	10,13
1000	200	0,75	0,1314	1,48	7,61

Perhitungan regresi linier

Persamaan regresi linier $\rightarrow y = a + bx$, $y = 1/v$ dan $x = 1/[S]$

Persamaan Michaelis-menten $\rightarrow \frac{1}{v_i} = \frac{1}{V_{max}} + \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) \frac{1}{[S]}$

- $a = \frac{1}{V_{max}} \rightarrow V_{max} = \frac{1}{a}$
- $b = \frac{K_m}{V_{max}} \rightarrow K_m = b \times V_{max} \rightarrow K_m = \frac{b}{a}$

Dari perhitungan di dapat persamaan regresi linier : $y = 3,6609 + 3,9621x$

- $a = 3,6609$ dan $b = 3,9621$

- $V_{max} = \frac{1}{3,6609} = 0,2731$

- $K_m = \frac{3,9621}{3,6609} = 1,0822$

Lampiran 21. Perhitungan HLB Krim

Fase minyak yang digunakan :

- Asam stearat (HLB 15,0) = 5 %
- Setil alkohol (HLB 15,0) = 3 %
- Isopropil miristat (HLB 11,5) = $\frac{3\%}{11\%} +$

Konsentrasi % fase minyak yang dibutuhkan :

- Asam stearat = $\frac{5}{11} \times 100\% = 45,45\%$
- Setil alkohol = $\frac{3}{11} \times 100\% = 27,27\%$
- Isopropil miristat = $\frac{3}{11} \times 100\% = 27,27\%$

HLB butuh fase minyak :

- Asam stearat = $45,45\% \times 15,0 = 6,82$
 - Setil alkohol = $27,27\% \times 15,0 = 4,1$
 - Isopropil miristat = $27,27\% \times 11,5 = 3,14$
- HLB butuh $\underline{14,06}$

Jumlah emulgator yang dibutuhkan :

Trietanolamin HLB = 12 $\frac{14,06}{12} = 10,2$

Gliseril monostearat HLB = 3,8 $\frac{2,06}{3,8} = 0,54$

$\underline{12,26}$

Jumlah trietanolamin yang digunakan = $2,06 / 12,26 \times 2,5\% = 0,42\%$

Jumlah gliseril monostearat yang digunakan = $10,2 / 12,26 \times 2,5\% = 2,08\%$

Lampiran 22. Perhitungan aktivitas unit enzim

Pada kemasan tercantum :

Tyrosinase from Mushroom
Lyophilized powder :
13,29 mg solid, 1881 unit/mg solid

- Aktivitas tirosinase yang digunakan : 240 unit/ml
- Solid tirosinase yang ditimbang :

$$\frac{1881 \text{ unit}}{1 \text{ mg solid}} = \frac{240 \text{ unit /ml}}{\text{solid ditimbang}}$$

$$\rightarrow \text{solid ditimbang} = \frac{1 \text{ mg solid} \times 240 \text{ unit /ml}}{1881 \text{ unit}} = 0,127 \text{ mg / 1 ml pelarut}$$

Untuk 10 ml pelarut, solid ditimbang :

$$\rightarrow 0,127 \times 10 = 1,27 \text{ mg}$$

Lampiran 23. Perhitungan diameter globul rata-rata minggu ke-0

Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-0

No.	Rentang (µm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	142	31,666
2	0,317-0,503	0,410	80	32,800
3	0,504-0,690	0,597	120	71,640
4	0,691-0,876	0,784	30	23,520
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	25	28,95
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	1	1,532
9	1,626-1,812	1,719	-	-
10	1,813-1,999	1,906	2	3,812
Total (Σ)			400	193,920

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (193,920 / 400) = 0,485 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-0

No.	Rentang (µm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	130	28,990
2	0,317-0,503	0,410	95	38,950
3	0,504-0,690	0,597	90	53,730
4	0,691-0,876	0,784	80	62,720
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	-	-
7	1,252-1,438	1,345	1	1,345
8	1,439-1,625	1,532	3	4,596
9	1,626-1,812	1,719	-	-
10	1,813-1,999	1,906	1	1,906
Total (Σ)			400	192,237

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (192,237 / 400) = 0,481 \mu\text{m}$$

Lampiran 24. Perhitungan diameter globul rata-rata pada minggu ke-2Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-2 suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	104	23,192
2	0,317-0,503	0,410	125	52,250
3	0,504-0,690	0,597	110	65,670
4	0,691-0,876	0,784	45	35,280
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	12	13,896
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	1	1,532
9	1,626-1,812	1,719	2	3,438
10	1,813-1,999	1,906	1	1,906
Total (Σ)			400	197,164

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (197,164 / 400) = 0,493 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-2 suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	115	25,645
2	0,317-0,503	0,410	90	36,900
3	0,504-0,690	0,597	108	64,476
4	0,691-0,876	0,784	82	64,288
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	-	-
7	1,252-1,438	1,345	1	1,345
8	1,439-1,625	1,532	2	3,064
9	1,626-1,812	1,719	-	-
10	1,813-1,999	1,906	2	3,812
Total (Σ)			400	199,530

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (199,530 / 400) = 0,498 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-2 suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	135	30,105
2	0,317-0,503	0,410	90	36,900
3	0,504-0,690	0,597	115	68,655
4	0,691-0,876	0,784	30	23,520
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	27	31,266
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	2	3,064
9	1,626-1,812	1,719	-	-
10	1,813-1,999	1,906	1	1,906
Total (Σ)			400	195,416

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (195,416 / 400) = 0,488 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-2 suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	91	20,293
2	0,317-0,503	0,410	153	62,730
3	0,504-0,690	0,597	82	48,954
4	0,691-0,876	0,784	67	52,528
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	-	-
7	1,252-1,438	1,345	3	4,035
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	2	3,438
10	1,813-1,999	1,906	2	3,812
Total (Σ)			400	195,790

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (195,790 / 400) = 0,489 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-2 suhu $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	75	16,725
2	0,317-0,503	0,410	89	36,490
3	0,504-0,690	0,597	102	60,894
4	0,691-0,876	0,784	90	70,560
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	35	40,530
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	3	5,157
10	1,813-1,999	1,906	6	11,436
Total (Σ)			400	241,387

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (241,387 / 400) = 0,603 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-2 suhu $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	81	18,063
2	0,317-0,503	0,410	87	35,670
3	0,504-0,690	0,597	99	59,103
4	0,691-0,876	0,784	89	69,776
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	34	39,372
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	1	1,153
9	1,626-1,812	1,719	4	6,876
10	1,813-1,999	1,906	5	9,530
Total (Σ)			400	239,543

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (239,543 / 400) = 0,598 \mu\text{m}$$

Lampiran 25. Perhitungan diameter globul rata-rata pada minggu ke-4Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-4 suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	110	24,530
2	0,317-0,503	0,410	62	25,420
3	0,504-0,690	0,597	185	110,445
4	0,691-0,876	0,784	40	31,360
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	-	-
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	1	1,532
9	1,626-1,812	1,719	-	-
10	1,813-1,999	1,906	2	3,812
Total (Σ)			400	197,099

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (197,099 / 400) = 0,492 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-4 suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	124	27,652
2	0,317-0,503	0,410	73	29,930
3	0,504-0,690	0,597	162	96,714
4	0,691-0,876	0,784	5	3,920
5	0,878-1,064	0,971	17	16,507
6	1,065-1,251	1,158	15	17,37
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	1	1,532
9	1,626-1,812	1,719	3	5,157
10	1,813-1,999	1,906	-	-
Total (Σ)			400	198,782

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (198,782 / 400) = 0,497 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-4 suhu $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	133	29,659
2	0,317-0,503	0,410	105	43,050
3	0,504-0,690	0,597	107	63,879
4	0,691-0,876	0,784	23	18,032
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	21	24,318
7	1,252-1,438	1,345	6	8,070
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	2	3,438
10	1,813-1,999	1,906	3	5,718
Jumlah (Σ)			400	196,164

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (196,164 / 400) = 0,490 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-4 suhu $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	98	21,854
2	0,317-0,503	0,410	132	54,120
3	0,504-0,690	0,597	99	59,103
4	0,691-0,876	0,784	65	50,960
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	-	-
7	1,252-1,438	1,345	2	2,690
8	1,439-1,625	1,532	1	1,532
9	1,626-1,812	1,719	4	6,876
10	1,813-1,999	1,906	-	-
Total (Σ)			401	197,135

$$K = 1 + 3,322 \log 401 = 9,65$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (197,135 / 400) = 0,492 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-4 suhu $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	70	15,610
2	0,317-0,503	0,410	79	32,390
3	0,504-0,690	0,597	121	72,237
4	0,691-0,876	0,784	87	68,208
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	38	44,004
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	10	15,320
9	1,626-1,812	1,719	6	10,413
10	1,813-1,999	1,906	5	9,530
Total (Σ)			416	267,712

$$K = 1 + 3,322 \log 416 = 9,70$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (267,712/400) = 0,643 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-4 suhu $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	77	17,171
2	0,317-0,503	0,410	101	41,410
3	0,504-0,690	0,597	98	58,506
4	0,691-0,876	0,784	91	71,344
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	38	44,004
7	1,252-1,438	1,345	2	2,690
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	4	6,876
10	1,813-1,999	1,906	8	15,248
Total (Σ)			419	257,249

$$K = 1 + 3,322 \log 419 = 9,71$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (257,249/400) = 0,614 \mu\text{m}$$

Lampiran 26. Perhitungan diameter globul rata-rata pada minggu ke-6Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-6 suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	119	26,537
2	0,317-0,503	0,410	112	45,920
3	0,504-0,690	0,597	98	58,506
4	0,691-0,876	0,784	43	33,712
5	0,878-1,064	0,971	27	26,217
6	1,065-1,251	1,158	-	-
7	1,252-1,438	1,345	3	4,035
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	2	3,438
10	1,813-1,999	1,906	1	1,906
Total (Σ)			405	200,271

$$K = 1 + 3,322 \log 405 = 9,66$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (197,099/400) = 0,494 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-6 suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	115	25,645
2	0,317-0,503	0,410	92	37,720
3	0,504-0,690	0,597	146	87,162
4	0,691-0,876	0,784	22	17,248
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	21	24,318
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	4	6,876
10	1,813-1,999	1,906	-	-
Total (Σ)			400	198,969

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (198,782/400) = 0,498 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-6 suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	136	30,324
2	0,317-0,503	0,410	99	40,590
3	0,504-0,690	0,597	123	73,431
4	0,691-0,876	0,784	18	14,112
5	0,878-1,064	0,971	8	7,768
6	1,065-1,251	1,158	14	16,212
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	2	7,660
9	1,626-1,812	1,719	-	-
10	1,813-1,999	1,906	5	9,530
Jumlah (Σ)			405	199,627

$$K = 1 + 3,322 \log 405 = 9,66$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (196,164/400) = 0,492 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-6 suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	123	27,429
2	0,317-0,503	0,410	97	39,770
3	0,504-0,690	0,597	112	66,864
4	0,691-0,876	0,784	52	40,768
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	14	16,212
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	2	3,438
10	1,813-1,999	1,906	2	3,812
Total (Σ)			402	198,293

$$K = 1 + 3,322 \log 402 = 9,65$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (197,135/400) = 0,493 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-6 suhu $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	65	14,495
2	0,317-0,503	0,410	80	32,800
3	0,504-0,690	0,597	106	63,282
4	0,691-0,876	0,784	86	67,424
5	0,878-1,064	0,971	11	10,681
6	1,065-1,251	1,158	38	44,004
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	12	20,628
10	1,813-1,999	1,906	3	5,718
Total (Σ)			401	259,032

$$K = 1 + 3,322 \log 401 = 9,66$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (267,712/400) = 0,646 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-6 suhu $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	74	16,502
2	0,317-0,503	0,410	95	38,950
3	0,504-0,690	0,597	98	58,506
4	0,691-0,876	0,784	88	68,992
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	39	45,162
7	1,252-1,438	1,345	2	2,690
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	4	6,876
10	1,813-1,999	1,906	8	15,248
Total (Σ)			408	252,926

$$K = 1 + 3,322 \log 408 = 9,67$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (257,249/400) = 0,620 \mu\text{m}$$

Lampiran 27. Perhitungan diameter globul rata-rata pada minggu ke-8Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-8 suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	128	28,544
2	0,317-0,503	0,410	101	41,410
3	0,504-0,690	0,597	113	67,461
4	0,691-0,876	0,784	52	40,768
5	0,878-1,064	0,971	28	27,188
6	1,065-1,251	1,158	-	-
7	1,252-1,438	1,345	2	2,69
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	1	1,718
10	1,813-1,999	1,906	2	3,812
Total (Σ)			427	213,591

$$K = 1 + 3,322 \log 427 = 9,73$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (197,099/400) = 0,500 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-8 suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	115	25,645
2	0,317-0,503	0,410	92	37,720
3	0,504-0,690	0,597	126	75,222
4	0,691-0,876	0,784	29	22,736
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	24	27,792
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	8	13,752
10	1,813-1,999	1,906	6	11,436
Total (Σ)			400	214,303

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,64$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (198,782/400) = 0,535 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-8 suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	131	29,213
2	0,317-0,503	0,410	95	38,950
3	0,504-0,690	0,597	108	64,476
4	0,691-0,876	0,784	-	-
5	0,878-1,064	0,971	34	33,014
6	1,065-1,251	1,158	23	26,634
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	6	9,192
9	1,626-1,812	1,719	-	-
10	1,813-1,999	1,906	4	7,624
Jumlah (Σ)			401	209,103

$$K = 1 + 3,322 \log 405 = 9,66$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (196,164/400) = 0,521 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-8 suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	98	21,854
2	0,317-0,503	0,410	95	38,950
3	0,504-0,690	0,597	110	65,670
4	0,691-0,876	0,784	59	46,256
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	28	32,424
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	3	4,596
9	1,626-1,812	1,719	7	12,033
10	1,813-1,999	1,906	-	-
Total (Σ)			400	221,783

$$K = 1 + 3,322 \log 402 = 9,65$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (197,135/400) = 0,554 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim A pada minggu ke-8 suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	54	12,042
2	0,317-0,503	0,410	85	34,850
3	0,504-0,690	0,597	79	47,163
4	0,691-0,876	0,784	82	64,288
5	0,878-1,064	0,971	23	22,333
6	1,065-1,251	1,158	56	64,848
7	1,252-1,438	1,345	-	-
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	13	22,347
10	1,813-1,999	1,906	8	15,248
Total (Σ)			400	283,119

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,66$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (267,712/400) = 0,708 \mu\text{m}$$

Perhitungan diameter globul krim B pada minggu ke-8 suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$

No.	Rentang (μm)	Nilai tengah (d)	n	nd
1	0,130-0,316	0,223	60	13,380
2	0,317-0,503	0,410	90	36,900
3	0,504-0,690	0,597	77	45,969
4	0,691-0,876	0,784	80	62,720
5	0,878-1,064	0,971	-	-
6	1,065-1,251	1,158	43	49,794
7	1,252-1,438	1,345	34	45,730
8	1,439-1,625	1,532	-	-
9	1,626-1,812	1,719	10	17,73
10	1,813-1,999	1,906	6	11,436
Total (Σ)			400	283,659

$$K = 1 + 3,322 \log 400 = 9,66$$

$$\text{Diameter rata-rata} = \Sigma nd / \Sigma n = (257,249/400) = 0,709 \mu\text{m}$$

Lampiran 28. Perhitungan konstanta laju (k), waktu paruh ($t_{1/2}$) dan t_{90} krim A dan krim B pada suhu $4 \pm 2^\circ\text{C}$

Perhitungan konstanta laju (k), $t_{1/2}$ dan t_{90} krim A

- $k = \frac{2,303}{t} \log \frac{c_0}{c}$
- $\rightarrow \frac{2,303}{56 \text{ hari}} \log \frac{5,19}{5,51} \rightarrow k = -0,001068/\text{hari}$
- $t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \rightarrow \frac{0,693}{0,001068/\text{hari}} \rightarrow t_{1/2} = 648,51 \text{ hari} \sim 649 \text{ hari}$
- $t_{90} = \frac{0,105}{k} \rightarrow \frac{0,105}{0,001068/\text{hari}} \rightarrow t_{90} = 98,31 \text{ hari} \sim 98 \text{ hari}$

Perhitungan konstanta laju (k), $t_{1/2}$ dan t_{90} krim B

- $k = \frac{2,303}{t} \log \frac{c_0}{c}$
- $\rightarrow \frac{2,303}{56 \text{ hari}} \log \frac{10,49}{10,72} \rightarrow k = -0,000387/\text{hari}$
- $t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \rightarrow \frac{0,693}{0,000387/\text{hari}} \rightarrow t_{1/2} = 1790,69 \text{ hari} \sim 11791 \text{ hari}$
- $t_{90} = \frac{0,105}{k} \rightarrow \frac{0,105}{0,000387/\text{hari}} \rightarrow t_{90} = 271,32 \text{ hari} \sim 271 \text{ hari}$

Lampiran 29. Perhitungan konstanta laju (k), waktu paruh ($t_{1/2}$) dan t_{90} krim A dan krim B pada suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$

Perhitungan konstanta laju (k), $t_{1/2}$ dan t_{90} krim A

- $k = \frac{2,303}{t} \log \frac{c_0}{c}$
- $\frac{2,303}{56 \text{ hari}} \log \frac{5,19}{4,41} \rightarrow k = 0,002908/\text{hari}$
- $t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \rightarrow \frac{0,693}{0,002908/\text{hari}} \rightarrow t_{1/2} = 238,24 \text{ hari} \sim 238 \text{ hari}$
- $t_{90} = \frac{0,105}{k} \rightarrow \frac{0,105}{0,002908/\text{hari}} \rightarrow t_{90} = 36,11 \text{ hari} \sim 36 \text{ hari}$

Perhitungan konstanta laju (k), $t_{1/2}$ dan t_{90} krim B

- $k = \frac{2,303}{t} \log \frac{c_0}{c}$
- $\frac{2,303}{56 \text{ hari}} \log \frac{10,49}{8,92} \rightarrow k = 0,002742/\text{hari}$
- $t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \rightarrow \frac{0,693}{0,002742/\text{hari}} \rightarrow t_{1/2} = 252,76 \text{ hari} \sim 253 \text{ hari}$
- $t_{90} = \frac{0,105}{k} \rightarrow \frac{0,105}{0,002742/\text{hari}} \rightarrow t_{90} = 38,29 \text{ hari} \sim 38 \text{ hari}$

Lampiran 30. Perhitungan konstanta laju (k), waktu paru ($t_{1/2}$) dan t_{90} krim A dan krim B pada suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$

Perhitungan konstanta laju (k), $t_{1/2}$ dan t_{90} krim A

- $k = \frac{2,303}{t} \log \frac{c_0}{c}$
- $\rightarrow \frac{2,303}{56 \text{ hari}} \log \frac{5,19}{3,35} \rightarrow k = 0,007818/\text{hari}$
- $t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \rightarrow \frac{0,693}{0,007818/\text{hari}} \rightarrow t_{1/2} = 88,64 \text{ hari} \sim 89 \text{ hari}$
- $t_{90} = \frac{0,105}{k} \rightarrow \frac{0,105}{0,007818/\text{hari}} \rightarrow t_{90} = 13,43 \text{ hari} \sim 13 \text{ hari}$

Perhitungan konstanta laju (k), $t_{1/2}$ dan t_{90} krim B

- $k = \frac{2,303}{t} \log \frac{c_0}{c}$
- $\rightarrow \frac{2,303}{56 \text{ hari}} \log \frac{10,49}{6,32} \rightarrow k = 0,008896/\text{hari}$
- $t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \rightarrow \frac{0,693}{0,008896/\text{hari}} \rightarrow t_{1/2} = 77,90 \text{ hari} \sim 78 \text{ hari}$
- $t_{90} = \frac{0,105}{k} \rightarrow \frac{0,105}{0,008896/\text{hari}} \rightarrow t_{90} = 11,80 \text{ hari} \sim 12 \text{ hari}$

Lampiran 31. Penentuan IC₅₀ dari asam azelat

Konsentrasi asam azelat (ppm)	% penghambatan
15	45,04
30	51,41
45	55,48
60	58,31

Lampiran 32. Penentuan IC₅₀ dari asam askorbat sebagai kontrol positif

Konsentrasi asam azelat (ppm)	% penghambatan
10	43,28
20	47,34
30	57,51
40	59,42

Lampiran 33. Perhitungan % penghambatan tirosinase dari krim asam azelat

Perhitungan % penghambatan tirosinase krim A dan krim B pada minggu ke-0

Krim	Serapan		% penghambatan	Rata-rata
	Tabung A	Tabung B		
A (asam azelat 5 %)	0,1292	0,0956	26,01 %	26,50 %
	0,1278	0,0978	26,99 %	
B (asam azelat 10 %)	0,1252	0,0594	52,55 %	51,54 %
	0,1310	0,0648	50,53 %	

Persen penghambatan krim A :

$$\frac{0,1292 - 0,0956}{0,1292} \times 100 \% = 26,01 \%$$

$$\frac{0,1278 - 0,0978}{0,1278} \times 100 \% = 26,99 \%$$

Persen penghambatan rata-rata krim A :

$$\frac{26,01 \% + 26,99 \%}{2} = 26,5 \%$$

Persen penghambatan krim B :

$$\frac{0,1252 - 0,0594}{0,1252} \times 100 \% = 52,55 \%$$

$$\frac{0,1310 - 0,0648}{0,1310} \times 100 \% = 50,53 \%$$

Persen penghambatan rata-rata krim B :

$$\frac{52,55 \% + 50,53 \%}{2} = 51,54 \%$$

Perhitungan % penghambatan tirosinase krim A dan krim B pada minggu ke-8

Krim	Serapan		% penghambatan	Rata-rata
	Tabung A	Tabung B		
A (asam azelat 5 %)	0,1270	0,0997	21,49 %	22,44 %
	0,1372	0,1051	23,39 %	
B (asam azelat 10 %)	0,1362	0,0716	47,43 %	46,54 %
	0,1255	0,0682	45,66 %	

Persen penghambatan krim A:

$$\frac{0,1270 - 0,0997}{0,1270} \times 100 \% = 21,49 \%$$

$$\frac{0,1372 - 0,1051}{0,1372} \times 100 \% = 23,39 \%$$

Persen penghambatan rata-rata krim A :

$$\frac{21,49 \% + 23,39 \%}{2} = 22,44 \%$$

Persen penghambatan krim B :

$$\frac{0,1362 - 0,0716}{0,1362} \times 100 \% = 47,43 \%$$

$$\frac{0,1255 - 0,0682}{0,1255} \times 100 \% = 45,66 \%$$

Persen penghambatan rata-rata krim B :

$$\frac{47,43\% + 45,66 \%}{2} = 46,54 \%$$

Lampiran 34. Perhitungan % penghambatan tirosinase krim asam askorbat sebagai kontrol positif

Konsentrasi asam askorbat	Serapan		% penghambatan	Rata-rata
	Tabung A	Tabung B		
5 %	0,2141	0,1294	39,56 %	39,09 %
	0,2071	0,1271	38,62 %	
10 %	0,1992	0,0457	77,06 %	76,31 %
	0,2103	0,0514	75,56 %	

Persen penghambatan krim asam askorbat 5 % :

$$\frac{0,2141 - 0,1294}{0,2141} \times 100 \% = 39,56 \%$$

$$\frac{0,2071 - 0,1271}{0,2071} \times 100 \% = 38,62 \%$$

Persen penghambatan rata-rata krim asam askorbat 5 % :

$$\frac{39,56 \% + 38,62 \%}{2} = 39,09 \%$$

Persen penghambatan krim asam askorbat 10 % :

$$\frac{0,1992 - 0,0457}{0,1992} \times 100 \% = 77,06 \%$$

$$\frac{0,2103 - 0,0514}{0,2103} \times 100 \% = 75,56 \%$$

Persen penghambatan rata-rata krim asam askorbat 10 % :

$$\frac{77,06 \% + 75,56 \%}{2} = 76,31 \%$$

Lampiran 35. Sertifikat analisis asam azelat

Certificate of Analysis	
SIGMA-ALDRICH	
Product Name	Azelaic acid, 98%
Product Number	246379
Product Brand	ALDRICH
CAS Number	123-99-9
Molecular Formula	HO ₂ C(CH ₂) ₇ CO ₂ H
Molecular Weight	188.22
TEST LOT S38947V RESULTS	
QC Acceptance date	5-DEC-2006
APPEARANCE - COLOUR	WHITE
APPEARANCE - STATE	POWDER
IR SPECTROSCOPY - FTIR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE
TITRATION VS NaOH - PURITY	99.2%
SOLUBILITY - CONCENTRATION	5% IN ETHANOL
SOLUBILITY - COLOUR	COLOURLESS
SOLUBILITY - CLARITY	CLEAR
GAS CHROMATOGRAPHY - PURITY	99.8%

Claudia Mayer

Claudia Mayer, Manager
Quality Control
Steinheim Germany

1 of 1

4/5/2012 8:30 AM

Lampiran 36. Sertifikat analisis tirosinase

SIGMA-ALDRICH® *sigma-aldrich.com*


3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: Tyrosinase from mushroom – lyophilized powder, ≥ 1000 unit/mg solid

Product Number: **T3824**
 Lot Number: **120M7001**
 Brand: **SIGMA**
 CAS Number: 9002-10-2
 MDL Number: MFCD00082118
 Storage Temperature: Store at -20 °C
 Quality Release Date: 08 APR 2011
 Recommended Retest Date: APR 2014

Test	Specification	Result
units/mg solid Tyrosinase Activity Unit Definition: One unit will cause an increase in A280 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C in a 3 mL reaction mix containing L-tyrosine	≥ 1000	1881
units/mg solid Polyphenol Oxidase Activity Unit Definition: One unit will cause a decrease in A265 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C. In a 3 mL reaction mixture containing L-Beta-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA)	≥ 30000	39254
units/mg solid Catechol Oxidase Activity Unit Definition: One unit will cause a decrease in A265 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C in a 3 mL reaction mixture containing catechol and ascorbic acid	≥ 200000	273065
Recommended Retest Period		
3 Years		


 Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1 Page 1 of 1

Lampiran 37. Sertifikat analisis levodopa

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine
Product Number	D9628
Product Brand	SIGMA
CAS Number	59-92-7
Molecular Formula	(HO) ₂ C ₆ H ₃ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H
Molecular Weight	197.19

TEST	SPECIFICATION	LOT 080M1712V 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
	50 mg/mL, 0.5 M HCl	
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Carbon	53.7 - 55.9 %	54.4 %
Nitrogen	6.8 - 7.4 %	7.1 %
Specific Rotation	-12.5 - -10.5 °	-10.7 °
	(C = 1 in 1 M HCl, 25 deg C)	
Purity (TLC)	≥98 %	100 %
Specification Date:		SEP 2010
Date of QC Release:		SEP 2010
Print Date:		SEP 16 2010

Rodney Burbach
 Rodney Burbach, Manager
 Quality Control
 St. Louis, Missouri USA

1 of 1 03/02/2012 9:48

Lampiran 38. Sertifikat analisis asam askorbat

PROB : PT. BRATACO CHEMICALS
 No. 16, 4
 Jul. 17 2009 11:49PM P3

Sp. Ardiyaningrum *Kp. Sianggih*

HASIL PEMERIKSAAN

BRATACO CHEMIKA

Nama Bahan : Asam Askorbat Uncoated
 Batch : J 17477 (0706411094)
 Ex : China
 E.D : 05-2009

Jenis pemeriksaan	Persyaratan	Hasil
Pemerian	Habur atau serbuk habur putih atau agak kuning oleh cahaya lembat, soon menjadi galap dalam keadaan kering stabil di udara, dalam larutan cepat teroksidasi	sesuai
Kelarutan	Mudah larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol, tidak larut dalam kloroform, dalam eter dan dalam benzena	sesuai
Identifikasi	Larutan 1:50 mereduksi jambaga (II) ferat alkali LP secara perlahan = lahan pada suhu kamar, tetapi lebih cepat bila dipanaskan	positif
Sisa pempijaran	Tidak lebih dari 0.1%	0.06%
Titik lebur	Lebih kurang 190 °C	190.8°C
Kadar	99.0% - 100.5%	99.72%

Kesimpulan : Memenuhi syarat

Cekarang, 17 November 2007
 Padangjaya JawaB

Pemeriksa
Nur Komarwati, S. Ri
 Analis

Dr. N. K. S. I. K. 3635B
 Apoteker
 S.I.K. 3635B

KANTOR KUSAT : J. Cikembar Barat No. 70, JawaB, Kusat 10160, Telp. (021) 9022760 (Hunting 5 Lines)
 Fax. (021) 9022761 E-mail : kusat@pusat.kemkes.go.id
 KANTOR CABANG :
 * JAKARTA : J. Mangrove Besar V No. 5, Jakarta 10130
 Telp. (021) 8120110 (Hunting 5 Lines), (021) 8290143 (Hunting 3 Lines) Fax. (021) 8290439
 * SURABAYA : J. Tidar No. 69 Telp. (031) 8429441, 8429442, 8429443, 8429447 Fax. (031) 8429448
 * SEMARANG : J. Pahlawan Pongkor No. 4 Telp. (021) 414444 414445 Fax. (021) 414446
 * BANDUNG : J. Cikarang No. 8 Telp. (022) 671131, 671132, 671133 Fax. (022) 671134
 * BEKASI : J. Tenjalar Jakarta No. 71 D Telp. (021) 7102177, 7102028-029 Fax. (021) 7102177
 * PADANG : J. Ardian Lela No. 27 A J Telp. (081) 675055, 642841 Fax. (081) 643041
 KANTOR PERUSAHAAN : MELUBANG, PADANG, LAMPUNG, BANGKAPAL, GUNUNG PANDANG, BANGKAMARTEN, MENDOHE dan DESAPASAR

Lampiran 39. Sertifikat analisis asam stearat

FROM : PT. BRATACO CHEMICALS
 up. 18u titik Haranu Sari (Kawi)


BRATACO CHEMIKA


HASIL PEMERIKSAAN

Nama Bahan : Acid Stearic lokal
 Batch : J 739/07 (2022701)
 Ex : lokal
 E.D : 3-2009

Jenis pemeriksaan	Persyaratan	Hasil
Pemerian	Zat padat mengkilat menunjukkan susunan hablur, putih atau kuning pucat, mirip lemak lain	butiran, putih
Kelarutan	Praktis tidak larut dalam air, larut dalam 2 bagian kloroform, larut dalam 20 bagian ethanol 95% dan dalam 3 bagian eter	sesuai
Suhu lebur	54° C	54,6° C
Bilangan asam		210,5
Bilangan sabun		211,3

Kesimpulan : Memenuhi syarat

Pemeriksa : 
 Nur Komarawati, S. Si
 Analis

Cikarang, 3 Mei 2007
 Penanggung Jawab : 
 Dra. Tri Hartati
 Apoteker
 S.I.K. 3836/B

KANTOR PUSAT : J. Cikarang Barat No. 18 Jakarta Pusat 50150, Telp. : (021) 3522733 (Hunting 5 Lines)
 Fax. : (021) 3452625, E-mail : brataco@brata.net.id

KANTOR CABANG :

- JAKARTA : Jl. Mangga Besar V No. 5, Jakarta 11180
 Telp. : (021) 6120312 (Hunting 3 Lines), (021) 6290113 (Hunting 3 Lines), Fax. : (021) 6262430
- SURABAYA : J. Tidar No. 88, Telp. (031) 8322087, 8487667, 8325057, Fax. : (031) 8319485
- SEMARANG : Jl. Petroning Timur No. 4, Telp. (021) 414560, 412300, Fax. : (021) 412300
- BANDUNG : Jl. Klemeng No. 8, Telp. : (022) 871129, 630607, 630803, Fax. : (022) 631979
- MEDAN : Jl. Terusan Jakarta No. 77 G, Telp. : (030) 7161277, 7210008-310, Fax. : (030) 7101277

KANTOR PERWAKILAN : PALEMBANG, PADANG, LAMPUNG, BALKRAPAN, UJUNG RANDANG, BANJARMASIN, MANADO dan DENPASAR

Lampiran 40. Sertifikat analisis gliseril monostearat

carechemicals

Product Data Sheet
CUTINA® GMS

General characterisation
Chemical description
 Glyceryl monostearate
Ester distribution:
 mono glyceride 48 - 54 %
 di glyceride 38 - 40 %
 tri glyceride 8 - 10 %

Labeling information
INCI name(s)
 Glyceryl Stearate

Registrations

Ingredient	CASR-No.	EINECS/ELINCS-No.
	67701-33-1	2669526

Officially listed in / Quality conforms to
 JCI-C: Glyceryl Monostearate, Lipophilic (Ingredient Code 102544)

Product properties
Appearance
 CUTINA® GMS is a white to slightly yellowish, hydrophilic wax which is supplied as powder.

Example of use
 On account of its consistency giving characteristics it is mainly used for the viscosity adjustment in cosmetic O/W emulsions.

Characteristic values
 The specifications stated in the paragraphs 'Quality control data' and 'Additional product descriptive data' finally and conclusively describe the properties of the Product.

Provisional quality control data
 (Data which is used for quality release and is certified for each batch.)

Appearance	conforms to standard
Odour	conforms to standard
Water	max. 2 %
Capillary tube	58 - 61°C

DGF C-III 13a
DGF C-IV 3a

1 / 2

rise melting point		
Acid value	max. 2	DGF C-V 2
Saponification value	167 - 175	DGF C-V 3
Iodine number	max. 0.5	DGF C-V 11d
Total monoester content	46 - 54 %	Cognis Method 95005801 (Q-C 2097.0)
Free glycerin	max. 2 %	DGF E-III 3a

Additional product descriptive data
(Data which is proven statistically but not determined regularly.)

Storage and transportation
In sealed original containers, protected from moisture and at temperatures below 40° C, CUTINA® GMS remains stable for at least one year.

All products in the text marked with an ® are trademarks of the Cognis group.
The information on product specifications provided herein is only binding to the extent contained by Cognis in a written Sales Agreement. COGNIS EXPRESSLY DISCLAIMS ANY RESPONSIBILITY FOR THE SUITABILITY OF THE PRODUCTS FOR ANY SPECIFIC OR PARTICULAR PURPOSES INTENDED BY THE USER. Suggestions for the use and application of the products and guide formulations are given for information purposes only and without commitment. Such suggestions do not absolve Cognis' customers from testing the products as to their suitability for the customer's intended processes and purposes. Cognis does not assume any liability or risk involved in the use of its products as the conditions of use are beyond its control. The user of the products is solely responsible for compliance with all laws and regulations applying to the use of the products, including intellectual property rights of third parties.

Rev. 5.1

Cognis,
Care Chemicals

CUTINA® GMS

cognis

2 / 2

Lampiran 41. Sertifikat analisis isoprpopil miristat

carechemicals
Product Datasheet
ISOPROPYL MYRISTATE

General characterisation
Chemical description
Myristic acid isopropylester

Labeling information
INCI name(s)
Isopropyl Myristate (EU)
Isopropyl Myristate (CTFA)

Ingredient information
Ingredient: Isopropyl Myristate
CASR-No.: 110-27-0
EINECS/ELINCS-No.: 203-751-4
Officially listed in / Quality conforms to
JCIC: Isopropyl Myristate (Ingredient Code 009100)

Product properties
Appearance
ISOPROPYLMYRISTATE is a clear, colourless, almost odourless oil of medium polarity with a mean molecular weight.
Example of use
Traditional, fast spreading emollient for modern cosmetic applications.

Rev. 9.0
Cognis, Care Chemicals
ISOPROPYL MYRISTATE
cognis
1/2

Characteristic values

The specifications stated in the paragraphs 'Quality control data' and 'Additional product descriptive data' finally and conclusively describe the properties of the product.

Quality control data

(Data which is used for quality release and is certified for each batch.)

Odor evaluation versus standard	corresponds to the standard	
Visual appearance versus standard	corresponds to the standard	
Isopropyl myristate	92 - 100 %	QC2507.0
Acid number	≤ 0,1	DGF C-V 2
Saponification value	205 - 211	DGF C-V 3
Density (20 °C)	0,850 - 0,855 g/cm ³	DIN 51757
Refraction index (20 °C)	1,4335 - 1,4355	DGF C-IV 5

Additional product descriptive data

(Data which is proven statistically but not determined regularly.)

Iodine number	≤ 0,5	DGF C-V 11A
Hydroxyl number	≤ 2,0	DGF C-V 17A,B
Cloud point	< 2,0 °C	Cognis Method 93005201
Viscosity (dynamic) (20 °C)	5,0 - 6,0 mPas	DGF C-IV 7

Storage and transportation

Shelf life

24 months

Storage temperature

< + 30 °C

Storage conditions

In original sealed containers and protected from moisture.

Disclaimer

All products in the text marked with an ®- and ®-symbols of the Cognis group. The information on product specifications provided herein is only binding to the extent confirmed by Cognis in a written Sales Agreement. COGNIS EXPRESSLY DISCLAIMS ANY RESPONSIBILITY FOR THE SUITABILITY OF THE PRODUCTS FOR ANY SPECIFIC OR PARTICULAR PURPOSES INTENDED BY THE USER. Suggestions for the use and application of the products and guide formulations are given for information purposes only and without commitment. Such suggestions do not release Cognis customers from testing the products as to their suitability for the customer's intended processes and purposes. Cognis does not assume any liability or risk involved in the use of its products as the conditions of use are beyond its control. The user of the products is solely responsible for compliance with all laws and regulations applying to the use of the products, including intellectual property rights of third parties.

Rev. 9.0

Cognis
Care Chemicals

ISOPROPYL MYRISTATE

cognis

2/2

Lampiran 42. Sertifikat analisis setil alkohol

HASIL PEMERIKSAAN		PT. BRATACO	
Nama Bahan	Setil Alkohol		
Batch	J.0122/10 (G.69345748)		
Ek	Cognis		
Grade	Forma		
E.O	09-2011		
Jenis pemeriksaan	Syarat USP/NF19		Hasil
Pemerian	Masa seperti lilin, berbentuk serpih, granul atau flake berwarna putih, tak berasa, bau lemon		sesuai
Kelarutan	Maksimal tidak larut dalam air, mudah larut dalam etanol 90% dan dalam eter		sesuai
Suhu leleh	46-52 °C		49,5
Bilangan Asam	≤2,0		1,5
Bilangan Sabun	≤2,1		0,22
Kesimpulan	Mempenuhi syarat		
Diperiksa		Cekung 25-01-2010	
Nr. Kompartemen Analisa		Responing Jawab	
		Dim. T. H. H. H.	
		Apoteker	
		S.I.K. 3836R	

BRATACO PT. BRATACO
 Jember, Indonesia
 Telp: (031) 8222222
 Fax: (031) 8222222
 Email: brataco@brataco.com
 www.brataco.com

Lampiran 43. Sertifikat analisis propilen glikol

HASIL PEMERIKSAAN

PT. BRATA CO

Nama Bahan: Propylene Glycol
No Batch: J 0672/09 (XJ-0602/020)
Ex: Dow Chemical Co.
E D: 05-2011
Grade: Farma

Jenis Pemeriksaan	Persyaratan USP NF 19	Hasil
Pemeriksaan	Cairan kental putih, tidak berwarna, tidak berbau, rasa agak manis, higroskopik	sesuai
Kelarutan	Dapat bercampur dgn air, dengan etanol dan dengan kloroform	sesuai
Index Bias	1,431 - 1,433	1,432
Bobot per-ml	1,035 g - 1,037 g/ml	1,0358 g/ml
pH		6,32
Keasaman	10 ml + 50 ml aquades + indikator brom timol biru 3%. Lisisi dengan NaOH 0,1 atau H ₂ SO ₄ 0,1 N, kurang dari 0,3 ml	0,1 ml NaOH

Kesimpulan: Memenuhi Syarat

Pemeriksa: [Tanda Tangan] (Tanda Pratiama Akba) Analis

Diabaring 26-10-2009 Penanggungjawab: [Tanda Tangan] (Dra H. Hartuti) Apoteker SKK 3836/H

PT. BRATA CO
Jl. Widyadarmasari No. 1, Depok, Jawa Barat 16147
Telp. (021) 62270000, Fax. (021) 62270001, E-mail: info@brataco.com
Kantor Pusat: Jl. Widyadarmasari No. 1, Depok, Jawa Barat 16147
Telp. (021) 62270000, Fax. (021) 62270001
Kantor Cabang: Jl. Raya Bogor No. 100, Jakarta Timur 13133
Telp. (021) 62270000, Fax. (021) 62270001
Kantor Cabang: Jl. Raya Bogor No. 100, Jakarta Timur 13133
Telp. (021) 62270000, Fax. (021) 62270001
Kantor Cabang: Jl. Raya Bogor No. 100, Jakarta Timur 13133
Telp. (021) 62270000, Fax. (021) 62270001

Lampiran 44. Sertifikat analisis metil paraben

14 Agustus 2013
HASIL PEMERIKSAAN

PT. BRATACO

Nama Bahan : Metil Paraben (MParaben)
 No Batch : J 0096/10 (MP-103/08-09)
 Ex : India
 E.D : 10-2013
 Grade : farmasi


Jenis Pemeriksaan	Persyaratan IIV	Hasil Pemeriksaan
Pemeriksaan	Serbuk putih halus kecil, tidak berwarna, Putih, tidak berbau atau berbau khas lemah, mempunyai sedikit rasa tertakar	Sesuai
Kelarutan	Sukar larut dalam air, benzena; mudah larut dalam etanol dan eter	Sesuai
Identifikasi	Diduliskan 10 mg dengan 10 ml air, dinginkan, tambahkan 0,05 ml larutan besi (III) klorida P; terjadi warna ungu kemerahan	Positif
Keasaman	Panaskan 750 mg dalam 15 ml air pada suhu 80° C selama 1 menit, dinginkan dan saring; pada 10 ml filtrat, tambahkan 0,2 ml NaOH 0,1 N dan 2 tetes merah metil LP; larutan berwarna kuning	Sesuai
Jarak Lebur	123° C - 124° C	127° C
Kadar	99,0% - 100,5%	99,6%
Kesimpulan : Memenuhi Syarat		
Pemeriksa		Cikarang 25 - 01 - 2013 Penanggung Jawab PT. BRATACO CHEMIA DR. Tri Hartono Apoteker SIK 3876/13
Klini Pratama Aktiva		
Analisis		

HEAD OFFICE
 BRANCH OFFICE

PT. BRATACO CHEMIA
 Jl. Raya Cikarang - Bandung
 Cikarang, Jawa Barat 40132
 Telp. (0261) 8000000, 8000001, 8000002, 8000003, 8000004, 8000005, 8000006, 8000007, 8000008, 8000009, 8000010, 8000011, 8000012, 8000013, 8000014, 8000015, 8000016, 8000017, 8000018, 8000019, 8000020, 8000021, 8000022, 8000023, 8000024, 8000025, 8000026, 8000027, 8000028, 8000029, 8000030, 8000031, 8000032, 8000033, 8000034, 8000035, 8000036, 8000037, 8000038, 8000039, 8000040, 8000041, 8000042, 8000043, 8000044, 8000045, 8000046, 8000047, 8000048, 8000049, 8000050, 8000051, 8000052, 8000053, 8000054, 8000055, 8000056, 8000057, 8000058, 8000059, 8000060, 8000061, 8000062, 8000063, 8000064, 8000065, 8000066, 8000067, 8000068, 8000069, 8000070, 8000071, 8000072, 8000073, 8000074, 8000075, 8000076, 8000077, 8000078, 8000079, 8000080, 8000081, 8000082, 8000083, 8000084, 8000085, 8000086, 8000087, 8000088, 8000089, 8000090, 8000091, 8000092, 8000093, 8000094, 8000095, 8000096, 8000097, 8000098, 8000099, 8000100

Lampiran 45. Sertifikat analisis profil paraben

PT. BRATACO





HASIL PEMERIKSAAN

Nama Bahan : Nipazol/ Propyl Paraben
 Batch : J 0126/10 (PP-26/08-09)
 Ex : GUJARAT
 E.D : 09-2013
 Grade : Farma

Jenis pemeriksaan	Persyaratan	Hasil
Pemerian	Serbuk putih, atau hablur kecil, tidak berwarna	sesuai
Kelarutan	Sangat sukar larut dalam air dan air mendidih, mudah larut dalam etanol dan dalam eter	sesuai gumpal
Identifikasi	Didihkan 10 mg zat dengan 10 ml air, dinginkan, tambahkan 3 tetes larutan FeCl ₃ LP; terjadi warna ungu kemerahan	sesuai
Keasaman	Panaskan 750 mg dalam 16 ml air pada suhu 80° C selama 1 menit, dinginkan dan saring pada 10 ml filtrat, tambahkan 0,2 ml NaOH 0,1 N dan 2 tetes merah metil LP; Larutan berwarna kuning	sesuai
pH 10% b/v	4,5-7,5	6,0
Suhu lebur	Antara 95° - 96° C	98,0°
Susut pengeringan	Tidak lebih dan 0,5%	0,5%
Kadar	99,0% - 101,0%	99,685%

Kesimpulan : Memenuhi syarat FI IV

Pemeriksa : 
Rian Pratama Akha
 Analis

Cikarang, 26 - 11 - 2009
 Penanggung Jawab

Dra. Tri Hartati
 Apoteker
 S.I.K. 3836/B

HEAD OFFICE : Jl. Cikang Barat No. 15, Jakarta Pusat, 14191, Telp. (021) 2827933 (Pusat) Fax : (021) 3223774, E-mail : brataco@brataco.com

BRANCH OFFICE :

- JAKARTA : Jl. Mahadewa Deso'v No.8, Jakarta 11180 Telp. (021) 6290110 (Pusat) G. Iwaj, Fax. (021) 6926948
- BANDUNG : Jl. Pajadaran Raya No. 192 Hk. s. Jakarta 10240 Telp. (021) 8534800-66 Fax. (021) 4120818
- SOERABAYA : Jl. Klatenring No. 9, Bandung Raya (021) 4077929, 4299998 Fax. (021) 3021873
- SEMARANG : Jl. Tangkah Jakarta No. 77D, Semarang, Telp. (021) 1191277, 720308 Fax. (021) 7218813
- SURABAYA : Jl. Ronggo, Jember No. 77D, Semarang, Telp. (021) 1191277, 720308 Fax. (021) 8414000
- TEGAYAN : Jl. Ronggo, Jember No. 77D, Semarang, Telp. (021) 1191277, 720308 Fax. (021) 8414000
- TROKAR : Jl. Ronggo, Jember No. 77D, Semarang, Telp. (021) 1191277, 720308 Fax. (021) 8414000
- WIDYADARMA : Jl. Ronggo, Jember No. 77D, Semarang, Telp. (021) 1191277, 720308 Fax. (021) 8414000
- YOGYAKARTA : Jl. Ronggo, Jember No. 77D, Semarang, Telp. (021) 1191277, 720308 Fax. (021) 8414000

THE BRANCH OFFICE : TANGERANG, BOGOR, CIKARANG, CIPURUH, INDRAMAYU, SOLO, PURWOREJO, TEGAYAN, MALANG, @DOYAK, DEHPARE, PALERANG, MANARAS

The International Chemical and Ingredients Group

Lampiran 46. Sertifikat analisis butil hidroksi toluen

HASIL PEMERIKSAAN

PT. BRATACO

Nama Bahan : BHT/Ionol
 Batch : J 0177/10 (110)
 Ex : SPP Chemical
 Grede : Fama
 E. ID : 06-2011

Jenis pemeriksaan	Persyaratan, FI IV	Hasil
Pemilihan	Habur atau kristal, putih atau putih kekuningan, bau khas lemah	sesuai
Kelarutan	Praktis tidak larut dalam air, glycerin, propylen glycol, mudah larut dalam etanol 95%, eter dan kloroform	sesuai
Suhu lebur	269,2°C	70,1°C
Susut Pengeangan	≤ 0,2%	0,2%

Kesimpulan : *Memenuhi syarat*

Cikarang, 03 - 03 - 2010
Pananggung Jawab

Pemeriksa : *[Signature]*
Nian Pratama Akon
Analis

Drs. Iri Hartati
Apoteker
S.I.K. 3836/B

PT. BRATACO
 Jember, Indonesia
 Telp. (0331) 822733
 Fax. (0331) 822734
 Email: info@brataco.com