

**FORMULASI SERUM ANTI-AGING MINYAK ATSIRI LADA
HITAM (*Piper Nigrum L.*) DAN UJI AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN METODE DPPH**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
gelar Sarjana Sains (S.Si.) Program Studi Kimia
pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia**



Diajukan oleh:

ASTRI ASTUTI

No. Mahasiswa: 16612049

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JOGJAKARTA
2020**

**FORMULASI SERUM ANTI-AGING MINYAK ATSIRI LADA
HITAM (*Piper Nigrum L.*) DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN
MENGUNAKAN METODE DPPH**

SKRIPSI

yang diajukan oleh:

ASTRI ASTUTI
No Mhs : 16612049

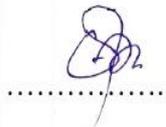
Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian Skripsi
Prodi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal: 4 September 2020

Dewan Penguji

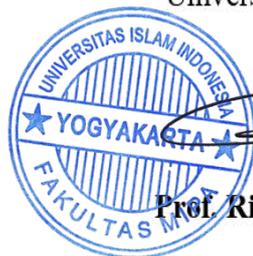
1. Dr. Noor Fitri, M. Si.
2. Dhina Fitriastuti, M. Sc.
3. Dr. Habibi Hidayat, M. Si.

Tanda tangan



Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia




Prof. Riyanto, M. Si., Ph. D.

SURAT PERNYATAAN

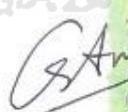
Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Astri Astuti
NIM : 16612049
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Judul Skripsi : Formulasi Serum Anti-Aging Minyak Atsiri Lada Hitam
(*Piper Nigrum L.*) dan Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode
DPPH

Menyatakan bahwa skripsi ini adalah benar merupakan hasil karya sendiri, bebas dari peniruan terhadap karya orang lain. Kutipan pendapat dan tulisan orang lain dirujuk sesuai dengan cara-cara penulisan karya ilmiah sebagai acuan. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa dalam skripsi ini ciri-ciri plagiat dan bentuk-bentuk peniruan lain yang dianggap melanggar peraturan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Yogyakarta, 4 September 2020

Yang membuat pernyataan.



Astri Astuti

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya serta shalawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad *Shallallahu 'Alaihi wa Sallam*, sehingga penulis dapat melaksanakan dan menyelesaikan laporan skripsi yang berjudul “Formulasi Serum Anti-Aging Minyak Atsiri Lada Hitam (*Piper Nigrum L.*) dan Uji Aktivitas Antioksidan dengan Menggunakan Metode DPPH” dengan lancar dan baik. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains (S.Si.) Program Studi Ilmu Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.

Penulis menyadari dalam penyelesaian dan penyusunan laporan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan pihak lain yang turut membantu kelancaran dan pembuatannya, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi serta penyusunan laporan dengan lancar.
2. Orang tua dan keluarga yang telah mendukung baik secara moril maupun materil, doa serta nasihatnya untuk setiap kegiatan yang penulis lakukan.
3. Bapak Prof. Riyanto S.Pd., M.Si., Ph.D., selaku dekan FMIPA UII Yogyakarta.
4. Bapak Dr. Dwiwarso Rubiyanto, S.Si., M.Si., selaku ketua Prodi Kimia FMIPA UII.
5. Ibu Dr. Noor Fitri, M.Si., selaku pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan arahan serta motivasi selama penyusunan proposal penelitian, dan penyusunan skripsi.
6. Segenap Dosen Jurusan Kimia FMIPA UII yang telah memberika ilmunya kepada penulis.

7. Teman seperjuangan serta sahabat-sahabat lainnya yang telah memberikan semangat dan doanya.
8. Ka Enjel, Arlin, Nada, Fitri, Faldi, Sekar, dan Tisia yang telah membantu saya dalam menyelesaikan penelitian dan telah memberikan semangat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
9. Segenap civitas laboran laboratorium riset kimia Universitas Islam Indonesia yang telah membantu penyelesaian penelitian dan penyusunan skripsi dengan baik.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna karena masih banyak kekurangan yang ada pada penulis. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan pembaca umumnya.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Jogjakarta, Agustus 2020

Penulis



HALAMAN PERSEMBAHAN



Tugas Akhir ini saya persembahkan untuk *kedua* orang tua saya, yang telah melahirkan dan merawat saya hingga sampai dititik ini.

Juga untuk kakak-kakak dan adik-adik saya yang menjadi motivasi dan dorongan bagi saya.

Dan tak lupa abang yang senantiasa mendampingi saya hingga sekarang dan selalu menyemangati disaat titik terendah.

Kalian adalah alasan saya segera menyelesaikan tugas akhir ini.

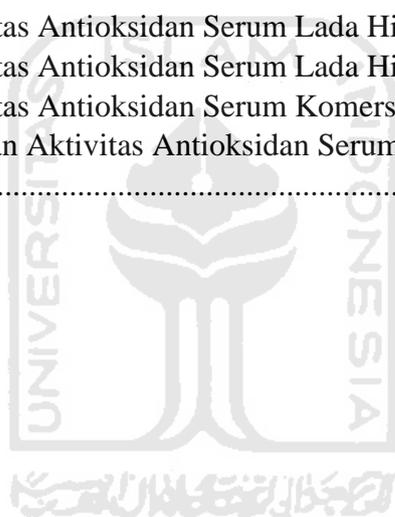
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
INTISARI.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
BAB III. DASAR TEORI	6
3.1 Minyak Atsiri	6
3.2 Lada Hitam	6
3.3 Minyak Lada Hitam.....	7
3.4 Metode Isolasi Minyak Atsiri	8
3.5 Radikal Bebas dan Antioksidan.....	9
3.5.1 Sumber Antioksidan dan Mekanisme Kerja	10
3.6 Anti-Aging.....	11
3.7 Metode DPPH.....	12
3.9 Spektrofotometri UV-Vis	13
3.10 GC-MS.....	14
3.11 Uji Iritasi.....	15
3.12 Uji Hedonik.....	16
3.13 Uji Homogenitas	16
BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN	17

4.1 Bahan	17
4.2 Alat.....	17
4.3 Cara Kerja	18
4.3.1 Destilasi Minyak Atsiri Lada Hitam.....	18
4.3.2 Uji Kualitatif Minyak Atsiri	18
4.3.3 Uji Karakterisasi	18
4.3.3.1 Penentuan Massa Jenis.....	18
4.3.3.2 Pengukuran Indeks Bias	19
4.3.3.3 Penentuan Bilangan Asam	19
4.3.4 Pembuatan Serum	19
4.3.5 Ethical Clearance	21
4.3.6 Uji Hedonik.....	21
4.3.7 Uji Iritasi	21
4.3.8 Pembuatan Formula Serum Berbasis VCO	23
4.3.9 Uji Homogenitas	23
4.3.10 Uji Antioksidan dengan Metode DPPH.....	23
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
5.1 Ekstraksi Minyak Lada Hitam dengan Destilasi Air	26
5.2 Uji GC-MS pada Minyak Atsiri Lada Hitam dan Minyak Nilam	26
5.3 Karakteristik Minyak Atsiri Lada Hitam	34
5.4 Pemilihan Serum Lada Hitam Berdasarkan Uji Hedonik (Uji Kesukaan)	35
5.5 Uji Iritasi pada Kelinci.....	35
5.6 Uji Homogenitas	38
5.7 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Serum Minyak Lada Hitam dan Serum Komersial.....	39
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	46
6.1 Kesimpulan	46
6.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	52

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Formula Serum Antioksidan	21
Tabel 2. Senyawa dalam Minyak Lada Hitam	29
Tabel 3. Senyawa dalam Minyak Nilam	34
Tabel 4. Karakteristik Minyak Atsiri Lada Hitam Hasil Penelitian dengan Literatur.....	35
Tabel 5. Uji Hedonik Serum Anti-Aging Minyak Atsiri Lada Hitam	36
Tabel 6. Hasil Uji Iritasi pada Pengamatan Setelah 24, 48, dan 72 Jam.....	38
Tabel 7. Hasil Uji Iritasi Serum Lada Hitam	39
Tabel 8. Hasil Pengamatan Uji Homogenitas	39
Tabel 9. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Serum Lada Hitam N1L1	41
Tabel 10. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Serum Lada Hitam O.N3L3	41
Tabel 11. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Serum Lada Hitam C.N1L1	42
Tabel 12. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Serum Lada Hitam C.N3L3	42
Tabel 13. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Serum Komersial.....	42
Tabel 14. Tingkat Kekuatan Aktivitas Antioksidan Serum Formula Dan Serum Komersial	46



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Reaksi DPPH radikal bebas dengan antioksidan.....	13
Gambar 2. Bagan Alir	18
Gambar 3. Kromatogram minyak atsiri lada hitam.....	28
Gambar 4. Spektra massa β -ocimene	28
Gambar 5. Spektra massa limonene	29
Gambar 6. Spektra massa trans-caryophyllene	29
Gambar 7. Pola fragmentasi β -ocimene	30
Gambar 8. Pola fragmentasi limonene	31
Gambar 9. Pola fragmentasi trans-caryophyllene	32
Gambar 10. Kromatogram minyak nilam	33
Gambar 11. Grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh serum O.N1L1	43
Gambar 12. Grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh serum O.N3L3	43
Gambar 13. Grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh serum C.N1L1	44
Gambar 14. Grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh serum C.N3L3	44
Gambar 15. Grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh serum komersial	45

FORMULASI SERUM ANTI-AGING MINYAK ATSIRI LADA HITAM (*Piper Nigrum L.*) DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN METODE DPPH

INTISARI

Astri Astuti
NIM. 16612049

Radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab masalah kulit. Paparan radikal bebas yang berlebihan dapat memicu penuaan. Reaksi radikal bebas dapat dicegah dengan penggunaan antioksidan. Antioksidan alami dapat ditemukan pada tumbuhan, salah satunya minyak lada. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas formulasi serum minyak atsiri lada hitam yang berperan sebagai antioksidan. Langkah-langkah penelitian yang dilakukan adalah: ekstraksi minyak lada dengan destilasi air; karakterisasi fisika dan kimia minyak lada; formulasi 16 serum antioksidan (minyak lada, nilam, dan zaitun); pengujian serum antioksidan meliputi uji hedonik (kesukaan), uji iritasi 2 formula terpilih dan dibandingkan medianya yang berbasis minyak zaitun dan minyak kelapa murni (VCO) untuk uji aktivitas antioksidan dengan DPPH. Hasil ekstraksi minyak lada diperoleh rendemen 1,69%. Karakterisasi sifat fisika minyak lada adalah tidak berwarna; massa jenis 0,867 g/cm³; dan indeks bias 1,483. Sifat kimia dari minyak lada menunjukkan bilangan asam 2,980 mg KOH/g dan mengandung 15 senyawa dengan 3 komponen utama *trans-caryophyllene* (52,31%), *β-ocimene* (17,82%), dan *limonene* (15,87%). Hasil uji hedonik tertinggi adalah serum N1L1 dan N3L3. Hasil uji iritasi menunjukkan serum bersifat non iritan sehingga aman digunakan. Hasil uji antioksidan O.N1L1, O.N3L3, C.N1L1, dan C.N3L3 memiliki aktivitas yang lemah karena memiliki nilai IC₅₀ diatas 150 ppm. Serum C.N3L3 memiliki aktivitas antioksidan lebih baik dibanding ketiga serum lainnya.

Kata Kunci: Serum antioksidan, minyak lada hitam, uji hedonik, uji iritasi, DPPH

FORMULATION ANTI-AGING SERUM CONTAINING ESSENTIAL OIL OF BLACK PEPPER (*Piper Nigrum L.*) AND ANTIOXIDANT ACTIVITY BY DPPH ASSAY

ABSTRACT

Astri Astuti
NIM. 16612049

Free radicals are one of the factors that cause skin problems. Excessive exposure of free radical leads to skin aging. Free radical reaction can be prevented using antioxidants. Natural antioxidants can be found in plants, one of them is pepper oil. This study aims to determine the effectiveness of pepper essential oil based serum formulation as antioxidant. The research steps were: extraction of pepper oil by distillation of water; physical and chemical characterization of pepper oil; 16 serum antioxidant formulations (pepper, patchouli, and olive oil); Antioxidant serum testing includes testing for hedonic (preference), irritation test for 2 selected formulas and compared to olive oil and virgin coconut oil (VCO) based serum for antioxidant test using DPPH. The extraction yield of pepper oil was 1,69%. The result of characterization of pepper oil has colorless; density 0,867 g/cm³; and refractive index 1,483. The chemical properties of pepper oil show an acid value of 2,980 mgKOH/g and contained 15 compounds with 3 major compounds, which are *trans-caryophyllene* (52.31%), *β-ocimene* (17.82%), and *limonene* (15.87%). The results of the hedonic test with the highest values were serums N1L1 and N3L3. The results of the irritation test show that the serum is non-irritant so it is safe to use. The results of antioxidant test of O.N1L1, O.N3L3, C.N1L1, and C.N3L3 showed that serum had weak activity because the IC₅₀ values are more than 150 ppm. C.N3L3 has the best activity among all formulas.

Keyword: antioxidant serum, black pepper oil, hedonic test, irritation test, DPPH

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dewasa ini, produk kosmetik sebagai perawatan kulit (*skincare*) menjadi yang paling dibutuhkan baik oleh remaja maupun orang dewasa. Produk perawatan kulit (*skincare*) yang paling diminati adalah *skincare* untuk wajah. Hal ini dikarenakan kulit wajah menjadi hal pertama yang terlihat apabila mengalami permasalahan kulit. Ada banyak penyebab masalah kulit wajah, diantaranya pengaruh radiasi matahari, polusi udara, ataupun penuaan kulit. Proses penuaan kulit wajah dapat terjadi akibat faktor intrinsik (faktor usia) yang ditandai dengan epidermis yang mulai menipis dan munculnya garis-garis halus serta kerutan. Munculnya kerutan dan garis halus disebabkan karena kulit tidak dapat menghasilkan kolagen dan elastin yang berfungsi mengencangkan dan mengenyalkan kulit secara maksimal. Kulit yang menua secara ekstrinsik akan menunjukkan ciri-ciri seperti timbulnya kerutan kasar dan dispigmentasi berbintik. Terdapat beberapa faktor eksternal yang mempengaruhi penuaan kulit secara ekstrinsik diantaranya merokok, paparan polusi, stress dan terutama paparan radiasi sinar UV (Campa, dkk, 2018). Sinar UV merupakan salah satu faktor dari radikal bebas. Radikal bebas yang berlebihan dapat memicu terjadinya penyakit dan kondisi *degeneratif* seperti penuaan dini, kerutan, kanker kulit, dan lain-lain (Allemann and Baumann, 2009). Efek negatif dari radikal bebas dapat dicegah dengan penggunaan antioksidan dan anti-aging (anti penuaan).

Antioksidan dikenal sebagai bahan dasar dalam produk sediaan topikal, dimana produk memiliki potensi dalam mencegah penuaan dan menjaga kulit. Banyak zat, dengan struktur kimia yang kompleks ditemukan memiliki aktivitas antiradikal dan telah diperkenalkan ke pasar sebagai produk anti penuaan (RatzLyko, dkk, 2012). Akan tetapi, antioksidan sintetik mulai dibatasi karena dapat menimbulkan efek samping apabila penggunaannya melebihi batas, diantaranya dapat menyebabkan racun dalam tubuh dan dapat bersifat karsinogenik (menyebabkan pertumbuhan sel kanker). Pengembangan alternatif dilakukan untuk mendapatkan antioksidan yang

memiliki sifat efektif dan aman digunakan dalam menghambat proses penuaan. Antioksidan alami dapat ditemukan pada tumbuhan salah satunya ialah minyak lada hitam yang memiliki kandungan dengan potensi antioksidan alami.

Minyak lada hitam merupakan minyak atsiri yang berasal dari hasil ekstraksi lada hitam. Buah lada hitam mengandung komponen piperin sebagai komponen utama alkaloid yang terkandung dalam lada memiliki potensi sebagai antioksidan (Risfaheri, 2012). Pada minyak lada hitam umumnya ditemukan senyawa *caryophyllene* dan *limonene*. Selain itu juga dapat ditemukan senyawa *3-carene*, *β -pinene*, *α -phellandrene*, *α -pinene*, *cis- β -ocimene*, *sabinene*, dan juga *caryophyllene oxide* yang bertanggung jawab atas fungsi rasa dan aroma yang berbeda (Tran, dkk, 2019; Jirovetz, dkk, 2000; Morshed dkk, 2017).

Saat ini penelitian tanaman yang memiliki potensi farmakologis mulai dilakukan guna pengembangan sediaan kosmetik serum yang mengandung zat antioksidan yang dapat diperoleh dari bahan alam. Serum diformulasikan sebagai produk dengan konsentrasi berbasis air atau minyak yang memiliki sifat penyerapan dan kemampuan untuk menembus lapisan kulit yang lebih dalam secara efektif dan praktis. Serum adalah konsentrat yang mengandung sekitar sepuluh kali lebih banyak zat aktif biologis daripada krim sehingga lebih cepat dan efektif dalam mengatasi masalah kulit dan bekerja secara lokal pada bagian tubuh berbeda seperti wajah, leher dan kelopak mata serta dapat digunakan oleh setiap usia (Sasidharan, 2014), sehingga diharapkan dapat melindungi kulit dari kerusakan sel akibat radikal bebas dengan pertimbangan bahan alam yang digunakan merupakan sediaan yang relatif aman, murah dan dapat diperoleh dari sumber yang diperbaharui. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan membuat formulasi serum dari minyak atsiri lada hitam (*piper nigrum* L.) serta untuk mengetahui efektivitas antioksidannya sebagai anti-aging (anti-penuaan).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah maka dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimana efektivitas antioksidan minyak atsiri lada hitam sebagai serum *anti-aging*?
2. Bagaimana formula serum minyak atsiri lada hitam sebagai *anti-aging* yang mengandung antioksidan optimal dan yang paling diminati?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka dapat ditetapkan tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui efektivitas antioksidan minyak atsiri lada hitam sebagai serum anti-aging.
2. Mengetahui formula serum minyak atsiri lada hitam sebagai anti-aging yang mengandung antioksidan optimal dengan pengujian menggunakan metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*).

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah dapat mengetahui formula dari serum yang berbasis minyak atsiri lada hitam yang memiliki kandungan antioksidan serta memiliki daya hambat dalam penuaan pada kulit wajah.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Kulit merupakan bagian tubuh terluar yang secara langsung akan terpapar radiasi matahari, polusi udara, maupun kontak kimia lainnya yang dapat mendorong pembentukan radikal bebas yang dikenal *reactive oxygen species* (ROS). ROS merupakan radikal bebas adalah suatu molekul yang mampu hidup bebas dan memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan sehingga memiliki sifat reaktif (Kurutas, 2015). Jumlah radikal bebas yang terus meningkat akibat faktor tersebut dapat menyebabkan sistem pertahanan tubuh yang menurun, sehingga diperlukannya tambahan antioksidan dari luar yang dapat melindungi dari serangan radikal bebas (Wahdaningsih, dkk, 2011)

Antioksidan adalah zat yang pada konsentrasi rendah dapat menghambat atau mencegah senyawa radikal dan aktivitas radikalnya. Berdasarkan sumbernya, antioksidan terbagi menjadi antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Pada berbagai produk kosmetik, penambahan antioksidan sintetis yang digunakan diantaranya Butylated hydroxyl anisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), dan Tocopheryl acetate (α -TA). Namun, pada beberapa studi yang dipublikasikan menunjukkan hubungan antara penggunaan jangka panjang antioksidan sintetis dapat menyebabkan masalah kesehatan, seperti alergi kulit, masalah saluran pencernaan, dan dalam beberapa kasus meningkatkan resiko kanker (Lourenco, dkk, 2019). Penggunaan antioksidan alami mengalami peningkatan karena dianggap lebih efektif dan lebih aman dari antioksidan sintetis. Senyawa antioksidan alami dapat ditemukan dalam tumbuhan yang berasal dari golongan polifenol (asam fenolik, flavonoid, antosianin, dan lignin), karotenoid (xantofil dan karoten), vitamin (vitamin C dan E), dan β -karoten (Xu, dkk, 2017). Sejumlah publikasi juga menyimpulkan minyak atsiri dari spesies tumbuhan seperti oregano, thyme, sage, lemon balm, basil sangat penting sebagai sumber zat antioksidan alami (Duxic, dkk, 2016).

Salah satu khasiat minyak atsiri adalah sebagai zat antioksidan. Potensial antioksidan minyak atsiri spesies Himalayan Lamiaceae (minyak *N. ciliaris*, *N. leucophylla*, *E. annuus* dan *E. mucrotus*) menunjukkan kemampuan penangkalan radikal, penghambatan peroksida lipid dan memungkinkan sebagai suplemen makanan alami (Kumar, dkk, 2019). Lada hitam juga teridentifikasi memiliki potensi sebagai antipiretik, antiinflamasi, antikanker, dan antioksidan (Akbar, dkk, 2012). Analisis aktivitas penangkalan radikal yang dilakukan terhadap lada yang menunjukkan peran yang kuat sebagai antioksidan alami, suplemen makanan dan aplikasi dalam bidang farmasi. Selain itu, minyak atsiri lada hitam juga memiliki aktivitas antibakteri yang kuat (Li, dkk, 2019). Minyak esensial memiliki kapasitas penangkalan radikal yang kuat yang bermanfaat pada produk makanan dan kosmetik.

Salah satu produk kosmetik perawatan kulit yang memiliki kemampuan meresap lebih dalam untuk mengantarkan bahan aktif ke dalam kulit adalah serum. Serum kulit yang baik dapat membuat kulit lebih kencang, halus, pori-pori tampak kecil, dan meningkatkan kelembaban, maupun anti-penuaan (Ojha, dkk, 2018). Komposisi dalam serum umumnya mencakup zat pelembab, antioksidan, zat pengental, dan/atau pengemulsi dan dapat mencakup senyawa ekstrak berupa ekstrak air, ekstrak alkohol, ekstrak glikolat, atau ekstrak minyak atsiri yang diperoleh dari setiap bagian tanamannya (misalnya akar, batang, daun, bunga, biji) (Florence, dkk, 2019).

Minyak atsiri yang banyak digunakan dalam produk kosmetik yaitu, minyak chamomile yang memiliki kandungan seskuiterpen yang tinggi. Minyak ini sering digunakan untuk krim kulit, sabun mandi, produk obat kumur, kosmetik dan sampo. Minyak peppermint yang digunakan sebagai wewangian pada sabun dan kosmetik karna memiliki efek segar, mint, dan mendinginkan karena kandungan mentol, dan minyak mawar yang banyak digunakan sebagai wewangian diberbagai jenis produk kosmetik (sabun, losion tubuh, krim wajah, dan lain-lain.). Evaluasi potensi terhadap minyak cengkeh dan serai wangi juga telah dilakukan dengan hasil yang menunjukkan minyak cengkeh memiliki efek penangkalan terhadap radikal bebas yang lebih kuat dibanding minyak serai, dan kemungkinan keduanya sebagai

sumber baru bahan perawatan kulit di industri kosmetik. (Sarkic and Irish, 2018; Sugiura, dkk, 2012; De Groot and Schmidt, 2016; Huang, dkk, 2013).

Pada penelitian ini dilakukan formulasi serum wajah antioksidan berbasis minyak atsiri lada hitam. Minyak lada hitam dapat digunakan sebagai zat aktif serum wajah karena mengandung senyawa *caryophyllene*, yang memiliki aktivitas penangkalan radikal bebas dalam melawan radikal hidroksil, anion superoksida dan peroksida lipid (Calleja, dkk, 2013). Formula serum wajah umumnya terdiri dari zat aktif, minyak pembawa (*carrier oil*), dan minyak pengikat. Minyak pembawa yang dapat digunakan adalah minyak zaitun atau VCO, sedangkan minyak pengikat zat aktif dapat digunakan minyak atsiri nilam (Fitri, dkk, 2017). Serum wajah komersial ada yang mengandung zat aktif seperti vitamin C, vitamin E, dan niacinamide (vitamin B) (Ganceviciene, dkk, 2012).

Identifikasi aktivitas antioksidan serum dilakukan dengan uji DPPH. Pengujian dengan DPPH merupakan salah satu metode yang sering digunakan. Metode ini melibatkan penurunan serapan DPPH pada panjang gelombang maksimal yang berbanding dengan konsentrasi penghambat radikal bebas yang ditambahkan ke larutan reagen DPPH. Aktivitas tersebut dinyatakan sebagai nilai IC_{50} atau *inhibitory concentration* (Amelia, 2011). Identifikasi terhadap antioksidan lada hitam telah dilakukan melalui pengujian DPPH dan ABTS menunjukkan hasil bahwa minyak esensial lada hitam memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami, minyak lada hitam menunjukkan potensi aktivitas antioksidan sebesar $11,24 \pm 1,36$ hingga $64,46 \pm 1,05\%$ (Zhang and Xu, 2015; Purkait, dkk, 2018).

BAB III

DASAR TEORI

3.1 Minyak Atsiri

Minyak atsiri atau disebut juga dengan minyak menguap (volatile oil), minyak eteris (ethereal oil), atau minyak esensial (essential oil) merupakan minyak yang memiliki bau khas dari tanaman asalnya dan mudah menguap pada suhu kamar di udara terbuka. Pada tumbuhan, minyak atsiri berfungsi sebagai pengusir serangga dan memiliki peran sebaliknya yang berfungsi sebagai penarik serangga untuk membantu proses penyerbukan dan sebagai cadangan makanan (Gunawan, 2004).

Minyak atsiri terbagi menjadi dua kelompok, yang pertama yaitu minyak atsiri yang dapat dipisahkan dengan mudah menjadi komponen-komponen atau penyusun murni yang dapat dijadikan sebagai bahan dasar untuk diproses menjadi produk-produk lain, sedangkan yang kedua ialah minyak atsiri yang sulit dipisahkan menjadi komponen murninya dan umumnya minyak atsiri tersebut dapat langsung digunakan tanpa diisolasi (Agusta, 2000)

Minyak atsiri memiliki banyak manfaat diantaranya, digunakan sebagai bahan pewangi dan penyedap, antiseptik, dan bahan analgesik. Disamping itu beberapa jenis minyak atsiri dapat digunakan sebagai obat, maupun kosmetik (Guenther, 1987)

3.2 Lada Hitam

Lada atau yang lebih dikenal sebagai merica memiliki nama latin *Piper nigrum L.* dan berasal dari famili Piperaceae (Vasavirama dan Upender, 2014). Terdapat dua macam lada, yaitu lada hitam dan lada putih. Perbedaan dari kedua lada tersebut dapat dilihat dari warnanya dan proses pengolahannya. Pada lada hitam diperoleh dari buah yang masih hijau (setengah matang) yang kemudian dijemur sampai kering hingga diperoleh buah lada yang berwarna kehitaman, sedangkan lada putih diperoleh dari buah yang hampir matang yang direndam dan

dikupas kulitnya, kemudian dijemur dan didapat buah lada berwarna putih (Rismunandar, 2007).

Lada merupakan salah satu rempah yang telah lama ditanam di Indonesia. Tanaman ini berasal dari India dan terdapat sekitar 600 jenis varietas, sementara di Indonesia terdapat kurang lebih 40 varietas. Pusat perkembangan lada dimulai di Jambi dan Lampung yang kini meluas ke berbagai pelosok daerah.

Lada dikenal dengan rasanya yang pedas dan aroma yang khas. Rasa pedas pada lada berasal dari kandungan alkaloidnya yaitu piperin (Lee dkk, 1984). Aromanya berasal dari minyak atsiri yang terdiri dari terpena. Selain itu, pada buah lada hitam juga terkandung zat aktif lain seperti amida fenolat, asam fenolat, dan flavonoid yang memiliki sifat antioksidan (anti-radikal) yang sangat kuat (Meghwal dan Goswami, 2012).

Tumbuhan lada memiliki sistematika sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Sub division	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledoneae
Sub Kelas	: Monochlamidae (Apetalae)
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae
Genus	: Piper
Spesies	: Piper nigrum L. (Tjitrosoepomo, 2004)

3.3 Minyak Lada Hitam

Minyak lada hitam merupakan minyak atsiri yang dihasilkan dengan mengesktrak lada hitam, umumnya melalui proses penyulingan atau distilasi. Minyak lada hitam memiliki bau khas lada dengan warna kekuningan hingga kehijauan. Zat aktif minyak atsiri dalam lada memiliki banyak khasiat diantaranya dapat mengobati asma, obesitas, antipiretik, antikanker, dan memiliki potensi sebagai antioksidan.

Pada penelitiannya, Tran dkk (2019), telah mengidentifikasi 26 senyawa yang mewakili 99,86% dari total senyawa dalam minyak atsiri lada hitam. Komponen senyawa kimia yang terdapat dalam minyak atsiri lada hitam diantaranya *α-pinene*, *β-pinene*, *β-myrcene*, *3-carene*, *o-cymene*, *D-limonene*, *α-phellandrene*, *terpinene*, *terpinolene*, *α-terpinene*, *linalool*, *α-phellandren-8-ol*, *α-terpineol*, *α-elemene*, *α-cubebene*, *copaene*, *aromadendrene*, *β-caryophyllene*, *humulene*, *germacrene-D*, *eudesma-4(14)-11-diene*, *α-selinene*, *β-bisabolene*, *β-cadinene*, *caryophyllene oxide*, *isopathuleol*, *sabinene*. Dengan 3 senyawa utamanya yaitu *3-carene*, *limonene* dan *trans-caryophyllene*.

3.4 Metode Isolasi Minyak Atsiri

Isolasi minyak atsiri umumnya dilakukan dengan cara ekstraksi. Ekstraksi merupakan pemisahan suatu zat dalam sampel menggunakan pelarut yang sesuai hingga mencapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi pada sel tanaman. Ada berbagai macam metode ekstraksi untuk mendapatkan minyak atsiri contohnya yaitu ekstraksi dengan pelarut menguap (solvent extraction), pengepresan, ekstraksi dengan lemak, namun yang paling umum dilakukan adalah isolasi minyak atsiri melalui metode penyulingan (destilasi).

Prinsip kerja destilasi secara umum yaitu uap menembus jaringan tanaman dan menguapkan zat aktif dalam tanaman yang mudah menguap. Sastrohamidjojo (2004), menyebutkan terdapat tiga jenis hidrodestilasi, yaitu:

1. Penyulingan Air

Penyulingan air dilakukan dengan cara bahan yang akan disuling berhubungan langsung dengan pelarut yang dididihkan dengan api secara langsung. Umumnya bahan yang menggunakan metode ini adalah bahan yang mudah terdegradasi pada suhu tinggi, atau tidak tahan panas seperti bunga-bunga.

2. Penyulingan Uap dan Air

Untuk penyulingan jenis ini, bahan tanaman yang akan disuling ditempatkan pada satu wadah yang dipisahkan sebuah angas (saringan) yang

terletak didasar alat penyulingan. Bagian bawah alat penyulingan berisi air sehingga bahan tanaman yang disuling hanya terkena uapnya saja.

3. Penyulingan uap

Penyulingan uap atau dikenal juga penyulingan uap langsung dilakukan menggunakan dua wadah. Dimana satu wadah berisi air yang dididihkan sehingga menghasilkan uap yang kemudian akan berhubungan langsung dengan bahan yang akan disuling.

3.5 Radikal Bebas dan Antioksidan

Radikal bebas merupakan suatu bahan kimia yang terdiri dari atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan yang sangat reaktif dan memiliki energy tinggi sehingga cenderung menarik elektron dari molekul lain dan membentuk reaksi berantai. Radikal bebas memiliki peran penting dalam membunuh virus dan bakteri intraseluler. Akan tetapi, kelebihan radikal bebas dapat mengganggu sel karena adanya pengambilan elektron dari atom komponen-komponen sel baik struktural (sel) maupun fungsional (enzim dan DNA) (Arivazhagan dkk, 2000).

Radikal bebas terjadi akibat adanya proses auto-oksidasi dari molekul-molekul intraseluler karena paparan polusi udara luar (eksogen), seperti asap kendaraan, asap rokok, radiasi matahari ataupun radiasi sinar uv, serta konsumsi makanan yang berlemak (Halliwell & Gutteridge, 1999). Normalnya, radikal bebas yang diproduksi dalam tubuh akan dinetralisir oleh antioksidan dalam tubuh. Akan tetapi, kadar radikal yang terlalu tinggi akan mengurangi kemampuan antioksidan tersebut sehingga terjadi ketidakseimbangan pada antioksidan terhadap radikal bebas (Clarkson & Thompson, 2000).

Antioksidan berperan penting dalam melindungi sel melawan radikal bebas dengan mendonor elektron pada radikal bebas sehingga menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan stres oksidatif. Terdapat lima fungsi sistem antioksidan tubuh, diantaranya:

1. Antioksidan primer, merupakan antioksidan yang berupa senyawa fenol yang mampu memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas asam lemak dengan

memberikan atom hidrogen yang berasal dari gugus hidroksi senyawa fenol dan membentuk senyawa yang stabil. Antioksidan jenis ini adalah BHA, BHT, PG, tokoferol, dan TBHQ.

2. *Oxygen scavengers*, merupakan beberapa senyawa yang memiliki peran sebagai pengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi yang kemudian akan bereaksi dengan oksigen yang berada dalam sistem sehingga jumlah oksigen akan berkurang. Senyawa-senyawa kelompok ini diantaranya vitamin C (asam askorbat), askorbilpalminat, asam eritorbat, dan sulfat.
3. Antioksidan sekunder, merupakan kelompok senyawa yang mampu untuk berdekomposisi hidroperoksida menjadi produk akhir yang stabil dan umumnya digunakan untuk menstabilkan poliolefin resin. Contohnya, asam tiodipropionat dan dilauriltiopropionat.
4. *Antioxidative enzyme*, merupakan enzim yang memiliki peran dalam mencegah terbentuknya radikal bebas, diantaranya glukose oksidase, superoksidase dismutase (SOD), glutathion peroksidase, dan katalase.
5. *Chelators sequestrant*, merupakan beberapa senyawa yang memiliki kemampuan mengikat logam seperti besi dan tembaga yang mampu mengkatalis reaksi oksidasi lemak. Senyawa yang termasuk dalam kelompok ini adalah asam sitrat, asam amino, ethylenediaminetetra acetid acid (EDTA), dan fosfolipid (Prakash dkk, 2001).

3.5.1 Sumber Antioksidan dan Mekanisme Kerja

Sumber antioksidan terbagi kedalam dua jenis, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami diperoleh dari bahan alam yang banyak dikembangkan karena memiliki keamanan yang lebih baik. Senyawa antioksidan umumnya terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan dan hasil isolasi sumber alami (Pratt, 1992) Senyawa antioksidan alami pada tumbuhan berasal dari senyawa fenolik berupa golongan flavonoid maupun turunan asam sinamat, sedangkan untuk antioksidan sintetik merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia yang telah diijinkan penggunaannya atau telah sering

digunakan. Terdapat tiga jenis antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu antioksidan primer, antioksidan sekunder, dan antioksidan tersier.

- a. Antioksidan primer atau dikenal juga sebagai antioksidan enzimatis, bekerja dengan cara mencegah terjadinya pembentukan senyawa radikal baru ataupun mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif dengan cara pemutusan reaksi berantai (polimerisasi) yang kemudian mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Contoh antioksidan primer yaitu enzim superoksida dismutase (SOD), dan katalase dan glutathion peroksidase (GSH) (Winarsi, 2007)
- b. Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau non-enzimatis, bekerja dengan cara memotong atau merusak pembentukan reaksi oksidasi dari radikal bebas sehingga tidak dapat bereaksi dengan komponen seluler (Lampe, 1999). Antioksidan sekunder dapat diperoleh dari sayuran, buah-buahan, dan daging yang meliputi vitamin E, vitamin C, karoten, flavonoid, albumin, asam lemak, dan karotenoid (Winarsi, 2007)
- c. Antioksidan tersier bekerja dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas yang meliputi sistem enzim *DNA-repair* dan metionin sulfoksida reduktase. Kerusakan DNA yang disebabkan senyawa radikal bebas memiliki ciri yaitu adanya kerusakan pada *single* dan *double strand*, baik pada gugus non-basa maupun gugus basa (Winarsi, 2007).

3.6 Anti -Aging

Penuaan kulit terbagi kedalam dua jenis yaitu penuaan intrinsik atau penuaan kulit yang terjadi secara alami akibat semakin bertambahnya usia dan penuaan ekstrinsik yang terjadi akibat faktor luar seperti paparan sinar matahari ataupun karena radikal bebas. Proses penuaan akibat radikal bebas terjadi ketika suatu senyawa kehilangan elektron akibat radikal bebas sehingga menjadi tidak stabil dan membentuk radikal bebas yang baru. Radikal bebas yang terus-terusan terbentuk akan membentuk reaksi oksidasi berantai. Jumlah radikal bebas yang terus bertambah dibanding jumlah antioksidan akan menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel yang apabila tidak diimbangi dengan regenerasi sel akan

Aktivitas antioksidan pada metode DPPH dinyatakan dengan nilai IC_{50} yang menunjukkan konsentrasi ekstrak dalam meredam aktivitas radikal bebas DPPH sebesar 50%. Semakin rendah nilai IC_{50} yang dihasilkan menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi. Secara teoritis, suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat apabila nilai IC_{50} nya kurang dari 50 ppm, kuat untuk nilai diantara 50-100 ppm, sedang untuk nilai diantara 101-150 ppm, dan lemah jika nilai lebih dari 150 ppm (Blois, 1985)

3.9 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer merupakan alat yang terdiri dari spectrometer dan fotometer, dimana spectrometer menghasilkan sinar dari spektrum pada panjang gelombang tertentu dan fotometer sebagai alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorbansi. Dapat dikatakan spektrofotometri UV-Vis ialah alat yang digunakan untuk mengukur transmitansi atau absorbansi dari suatu cuplikan pada panjang gelombang tertentu (Gandjar, 2007), yang berinteraksi dengan suatu cahaya UV dan menyerap suatu energi dan mengakibatkan elektron tereksitasi dari ground state ke keadaan tereksitasi yang memiliki energi lebih tinggi. Serapan terjadi pada struktur kimia yang memiliki ikatan terkonjugasi, ikatan p dan non-bonding elektron (Harjadi, 1990).

Prinsip kerja spektrofotometri yaitu cahaya yang masuk melalui suatu media, sebagian cahaya akan diserap dan diukur sebagai absorbansi (A), dan sebagian lagi akan dihamburkan dan diukur sebagai transmitansi (T), sebagaimana persamaan hukum lambert-beer:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Keterangan:

A = Absorbansi sampel yang diukur

ϵ = Ekstensi molar/serapan molar

b = Tebal laju larutan

c = Konsentrasi sampel

Ketika suatu cahaya yang melalui suatu zat dengan konsentrasi tertentu, maka akan terbentuk spektrum cahaya. Akan tetapi hanya cahaya dengan panjang gelombang tertentu yang akan diserap. Jika zat menyerap cahaya tampak dan UV maka akan terjadi perpindahan elektron atau yang biasa disebut transisi elektronik. Jarak antara dua lembah yang berdampingan dari gelombang tersebut dikenal sebagai panjang gelombang (λ). Persamaan hubungan antara energi dan panjang gelombang (λ) dapat ditulis sebagai berikut:

$$E = h \cdot c/\lambda$$

Dimana,

E = Energi cahaya (erg)

h = Konstanta Planck ($6,62 \times 10^{-27}$ erg det)

λ = Panjang gelombang (cm)

3.10 GC-MS

Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) merupakan salah satu metode pemisahan senyawa organik yang menggunakan dua metode analisis senyawa yaitu kromatografi gas (GC) untuk menganalisis jumlah suatu senyawa secara kuantitatif dan spektrometri massa (MS) yang digunakan untuk menganalisis struktur molekul dari senyawa analit (Pavia, 2006)

Prinsip kerja dari kromatografi gas terkait dengan titik didih senyawa yang dianalisis serta perbedaan interaksi analit dengan fase diam dan fase gerak. Senyawa dengan titik didih yang tinggi memiliki waktu retensi yang lama begitu pula dengan senyawa yang lebih terikat dalam fase cair pada permukaan fase diam akan memiliki waktu retensi yang lebih lama (Agusta, 2000).

Prinsip kerja spektrometri massa adalah menembak bahan yang sedang dianalisis dengan berkas elektron dan secara kuantitatif mencatat hasilnya sebagai suatu spektrum fragmen ion positif. Fragmen-fragmen tersebut berkelompok sesuai dengan massanya (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Berdasarkan analisis GC-MS diperoleh dua informasi dasar, yaitu hasil analisis kromatografi gas yang ditampilkan dalam bentuk kromatogram yang memberikan informasi mengenai jumlah komponen kimia yang terdapat dalam campuran yang

dianalisis (jika sampel bentuk campuran) yang ditunjukkan oleh jumlah puncak yang terbentuk pada kromatogram berikut kuantitas masing-masing, sedangkan hasil analisis spektrometri massa yang ditampilkan dalam bentuk spektrum massa menunjukkan gambaran mengenai jenis dan jumlah fragmen molekul yang terbentuk dari suatu komponen kimia (masing-masing puncak pada kromatogram). Setiap fragmen yang terbentuk dari pemecahan suatu komponen kimia memiliki berat molekul yang berbeda dan ditampilkan dalam bentuk diagram dua dimensi, m/z (m/e , massa/muatan) pada sumbu X dan intensitas pada sumbu Y yang disebut spektrum massa (Agusta, 2000)

3.11 Uji Iritasi

Pada sediaan topikal, salah satu parameter yang penting untuk diperhatikan adalah adanya kemungkinan produk yang diaplikasikan menimbulkan iritasi terhadap kulit. Iritasi merupakan salah satu reaksi buruk yang terjadi pada kulit, yang dapat disebabkan oleh beragam faktor diantaranya lama pemberian, luas area pemberian, tingkat penetrasi dan ketoksikan dari bahan yang diaplikasikan (More, 2013).

Munculnya iritasi dapat terjadi setelah beberapa waktu dari pengaplikasian sediaan, ditandai dengan beberapa gejala seperti kulit akan mengering terasa nyeri, mengalami perdarahan, dan pecah-pecah. Iritasi yang terjadi pada kulit ditandai dengan adanya eritema dan edema, dimana eritema atau kemerahan terjadi karena dilatasi pembuluh darah pada daerah yang teriritasi, sedangkan pada udema terjadi perbesaran plasma yang membeku pada daerah yang terluka (Irsan dkk., 2013).

Evaluasi keamanan kosmetik, salah satunya adalah uji iritasi, harus dilakukan sebelum pemakaian pada manusia sehingga mencegah reaksi hipersensitifitas. Iritasi primer biasanya diukur dengan patch test pada kulit kelinci berdasarkan prosedur Draize. Adanya tanda-tanda iritasi pada kulit hewan coba, maka memungkinkan adanya potensi iritasi pada kulit manusia.

3.12 Uji Hedonik

Uji hedonik merupakan salah satu pengujian sensorik melalui alat indra yang memiliki peran dalam pengembangan suatu produk baru, selain itu uji ini juga berguna untuk memberi nilai terhadap sifat tertentu dari suatu produk dari tingkat kesukaan konsumen terhadap produk tersebut (Stone dan Joel, 2004).

Senyawa aroma memiliki sifat volatil, sehingga mudah mencapai sistem penciuman di bagian atas hidung, perlu konsentrasi yang cukup untuk berinteraksi dengan satu atau lebih reseptor penciuman. Senyawa aroma dapat ditemukan dalam makanan, rempah-rempah, parfum, dan minyak esensial. Disamping itu senyawa aroma berperan penting dalam produksi penyedap, yang umumnya digunakan untuk meningkatkan daya tarik produk tersebut (Antara dan Wartini, 2014).

Menurut Winarno (1997), bahwa pengujian suatu tidak hanya dilihat dari aspek kimianya saja, akan tetapi juga dilihat dari aroma. Oleh karena itu uji organoleptik perlu dilakukan untuk mengetahui seberapa jauh produk serum dari minyak lada dapat disukai oleh konsumen.

3.13 Uji Homogenitas

Stabilitas pada suatu sediaan merupakan salah satu pengujian yang penting, salah satunya adalah dengan mengetahui pengaruh suhu terhadap stabilitas. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa suhu merupakan faktor yang dapat mempengaruhi stabilitas pada sediaan, khususnya sediaan suspensi (Zaini, dkk., 2016). Uji homogenitas merupakan salah satu pengujian dalam menentukan stabilitas melalui pengamatan secara langsung. Pengamatan yang dilakukan meliputi ada atau tidaknya gumpalan atau endapan yang terbentuk pada larutan (Dewi, dkk., 2017)

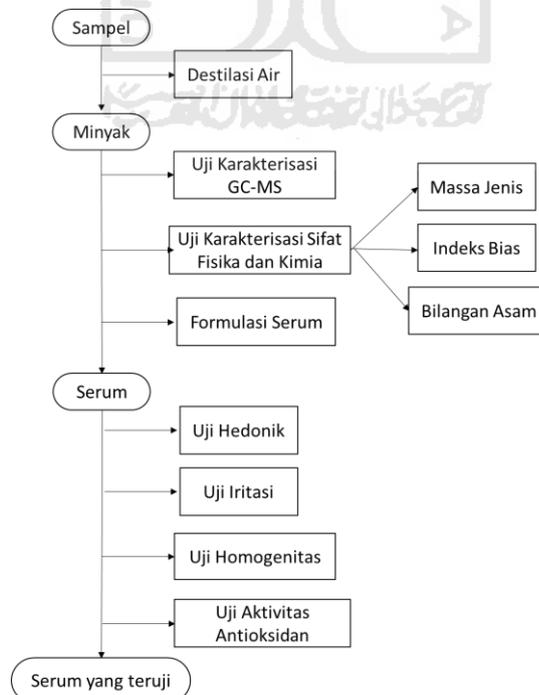
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini meliputi, biji lada hitam; air suling; akuades; Na₂SO₄; KOH; H₂C₂O₄; fenoltalein; etanol teknis 96%; minyak atsiri nilam; *olive oil*; *virgin coconut oil*; *aluminium foil*; *plastic wrap*; kontrol positif (serum komersial); DPPH (*2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazylhydrate*); etanol p.a; dan kelinci jantan umur ± 2 bulan.

4.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: rangkaian alat destilasi (ketel, kondensor); blender bumbu; piknometer 1 mL; botol serum; botol vial; labu ukur 10 mL; labu ukur 5 mL; gelas beker 100 mL; labu ukur 100 mL; labu ukur 250 mL; buret 250 mL; corong; pipet tetes; pipet micro; *shaker*; pipet ukur 5 mL; pipet ukur 10 mL; pipet ukur 25 mL; hot plate; kasa *steril*; plaster; gunting; Refraktometer; GC-MS dan Spektrophotometer Uv-vis.



Gambar 2. Bagan Alir

4.3 Cara Kerja

4.3.1 Destilasi Minyak Atsiri Lada Hitam

Lada hitam yang digunakan berasal dari pasar Beringharjo. Minyak atsiri lada hitam diperoleh melalui metode destilasi air. Lada hitam kering ditimbang sebanyak 2 kg kemudian dihaluskan dan dimasukkan kedalam ketel dan ditambahkan air suling pada ketel hingga sampel terendam, selanjutnya dilakukan distilasi. Distilasi dihentikan bila tidak ada lagi distilat berupa minyak yang menetes bersama hidrosol, atau volume minyak tidak bertambah. Minyak atsiri yang dihasilkan kemudian dipisahkan dari hidrosol dan ditambahkan Na_2SO_4 untuk mengikat hidrosol yang masih terdapat dalam minyak. Setelah itu, hasil minyak disimpan dalam botol gelap yang tertutup rapat.

4.3.2 Uji Kualitatif Minyak Atsiri

Minyak atsiri dianalisis menggunakan GC-MS untuk menganalisis kandungan dari komponen minyak atsiri. Analisis dilakukan di Laboratorium Terpadu UII. Minyak atsiri diinjeksikan ke GC-MS menggunakan model injeksi berupa split dengan temperatur injeksi $200\text{ }^\circ\text{C}$ dan rasio split 130,0. Kolom yang digunakan yaitu Rtx-5MS dengan tekanan 36,2 kPa; kolom aliran 0,75 mL/menit; dan suhu kolom $60\text{ }^\circ\text{C}$.

4.3.3 Uji Karakterisasi

4.3.3.1 Penentuan Massa Jenis

Penentuan massa jenis dilakukan untuk mengukur massa suatu sampel setiap satuan volume benda menggunakan piknometer. Piknometer dibersihkan dan dikeringkan kemudian ditimbang (m). Piknometer diisi dengan air suling, ditutup dan dibersihkan dari sisa air kemudian ditimbang dengan isinya (m_1). Piknometer kemudian dikosongkan lalu dibersihkan dan dikeringkan kemudian diisi dengan minyak atsiri lada hitam dan ditutup hingga rapat sekaligus dibersihkan dari sisa minyak. Piknometer berisi minyak tadi ditimbang (m_2) hingga diperoleh massa konstan. Adapun persamaan untuk penentuan nilai massa jenis, sebagai berikut:

$$\text{Massa Jenis} = \frac{(m_2) - m}{(m_1) - m} \times \text{massa jenis air}$$

4.3.3.2 Pengukuran Indeks Bias

Sebelum dilakukan pengukuran indeks bias, refraktometer harus distandarkan dengan akuades. Satu tetes minyak diletakkan pada kaca prisma refraktometer, kemudian kaca prisma ditutup. Lampu refraktometer dinyalakan dan diatur hingga tampilannya menjadi terang (atas) dan gelap (bawah) tanpa garis merah diantaranya, lalu dilakukan pembacaan.

4.3.3.3 Penentuan Bilangan Asam

Bilangan asam dinyatakan sebagai jumlah milligram basa (KOH 0,1 N) yang digunakan untuk menetralkan asam lemak bebas yang terdapat dalam satu gram minyak (Ketaren, 2008). Penentuan bilangan asam dilakukan berdasarkan SNI 01-3555-1998. Sebanyak 1 g minyak dimasukkan ke gelas beker 100 mL, kemudian ditambahkan etanol p.a sebanyak 50 mL. Campuran tersebut dipanaskan pada suhu 65 °C sambil diaduk hingga membentuk larutan. Larutan tersebut selanjutnya ditambahkan indikator fenolftalein 1% dan dititrasi dengan KOH 0,1 N yang telah distandardisasi dengan C₂H₂O₄ 0,1 N sampai terlihat warna merah muda. Setelah itu, dilakukan perhitungan jumlah mg KOH yang digunakan untuk menetralkan asam lemak bebas dalam 1 g sampel minyak.

$$\text{Bilangan asam} = \frac{V_s \times N \times 56,1}{G}$$

Keterangan:

V_s = Jumlah KOH yang dibutuhkan untuk menitrasi sampel (mL)

N = Normalitas larutan KOH

G = Berat sampel (g)

56,1 = Berat ekivalen KOH

4.3.4 Pembuatan serum

Pembuatan formula serum antioksidan dan anti-aging dibagi menjadi dua komposisi yaitu 40% dari bahan utama berupa minyak lada hitam dan minyak

nilam, kemudian 60% dari bahan pelarut yaitu olive oil. Minyak lada hitam dan minyak nilam dicampur terlebih dahulu dengan volume sesuai tabel I agar pencampuran merata, kemudian di *shaker* selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm, Setelah minyak atsiri dan minyak nilam dicampurkan, selanjutnya ditambahkan olive oil sesuai tabel I dan di *shaker* dengan kecepatan 250 rpm selama 1 hari. Serum antioksidan dan anti-aging berbasis minyak lada hitam dan minyak nilam selanjutnya dilakukan beberapa tahapan uji untuk menentukan serum antioksidan dan anti-aging yang paling optimal.

Tabel 1. Formula serum antioksidan

<i>Formula Serum</i>	Minyak Lada Hitam (mL)	Minyak Nilam (mL)	Olive Oil (mL)
<i>L1N1</i>	1,1	0,1	1,8
<i>L2N1</i>	1,2	0,1	1,95
<i>L3N1</i>	1,3	0,1	2,1
<i>L4N1</i>	1,4	0,1	2,25
<i>L1N2</i>	1,1	0,15	1,875
<i>L2N2</i>	1,2	0,15	2,025
<i>L3N2</i>	1,3	0,15	2,175
<i>L4N2</i>	1,4	0,15	2,325
<i>L1N3</i>	1,1	0,2	1,95
<i>L2N3</i>	1,2	0,2	2,1
<i>L3N3</i>	1,3	0,2	2,25
<i>L4N3</i>	1,4	0,2	2,4
<i>L1N4</i>	1,1	0,25	2,025
<i>L2N4</i>	1,2	0,25	2,175
<i>L3N4</i>	1,3	0,25	2,325
<i>L4N4</i>	1,4	0,25	2,475

Formulasi serum antioksidan dan anti-aging dilakukan uji hedonik, dimana diantara 16 serum tersebut dipilih 2 serum antioksidan dan anti-aging yang memiliki hasil terbaik berdasarkan uji hedonik. Cara kerja untuk uji hedonik dapat dilihat pada anak sub bab 4.3.6.

4.3.5 Ethical clearance

Ethical clearance atau kelayakan etik merupakan keterangan tertulis yang diberikan oleh komisi etik penelitian yang ditujukan untuk riset atau penelitian yang melibatkan makhluk hidup sebagai subjeknya. Tujuan diperlukannya *ethical clearance* untuk memastikan bahwa manusia ataupun hewan uji mendapat perlakuan sesuai dengan prosedur yang benar dan tidak melanggar etika serta data yang diperoleh memiliki validitas yang tinggi. *Ethical clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

4.3.6 Uji Hedonik (Uji Kesukaan)

Uji kesukaan serum lada hitam dilakukan kepada 40 responden dimana 20 orang yang berumur 18-25 tahun dan 20 orang yang berumur 26-45 tahun. Masing – masing responden akan diberi 16 serum, setiap responden akan memilih yang disukai dari parameter aroma, warna, kekuatan wangi dan kekentalan dengan cara mengisi kuesioner seperti pada lampiran 5. Panelis memberikan penilaian terhadap 16 formulasi serum antioksidan berdasarkan parameter yang ditentukan dengan kriteria (1) tidak suka, (2) kurang suka, (3) cukup suka, (4) suka, dan (5) sangat suka. Sampel teratas dengan skor paling tinggi dan yang disukai aromanya akan diujikan ke tahap selanjutnya.

4.3.7 Uji Iritasi

a. Pemilihan hewan uji

Pada penelitian ini, uji iritasi dilakukan secara *in vivo* pada kelinci percobaan. Penggunaan kelinci sebagai hewan uji dikarenakan kelinci memiliki luas punggung yang besar dan lebar sehingga dapat memudahkan pengamatan hasil

uji. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci lokal jantan usia ± 3 bulan dengan berat badan ± 2 kg yang memiliki kondisi sehat dan dipelihara dalam kondisi baik. Alasan pemilihan kelinci jantan yaitu agar selama penelitian berlangsung kelinci tidak terpengaruh secara hormonal dan kehamilan, kelinci yang berusia sekitar tiga bulan tergolong dalam usia dewasa muda dan memiliki respon imunologis yang cepat terlihat. Selain itu, kelinci dipilih yang tidak terdapat infeksi pada kulit ataupun belum pernah digunakan dalam percobaan sebelumnya guna menghindari gangguan selama penelitian.

b. Pemeliharaan hewan uji

Hewan uji diadaptasikan terlebih dahulu selama ± 1 minggu sebelum dilakukan proses pengujian. Pemeliharaan hewan uji dilakukan pada kandang yang berbentuk persegi dengan ukuran $0,5 \times 0,5$ meter. Kelinci diberi makan 3 kali sehari dengan sayur-sayuran/rumput. Untuk menghindari stress pada kelinci selama penelitian, sebaiknya pemberian makan kelinci dilakukan tepat waktu, kelinci diletakkan pada kandang yang nyaman dan aman, sesekali dilepaskan pada halaman luas, dan memastikan kelinci bebas dari rasa takut ataupun gangguan dari predator.

c. Pengujian hewan uji

Sebelum dilakukan pengujian, hewan uji dicukur terlebih dahulu pada daerah punggung dengan ukuran 1×1 inci dan dilakukan secara bertahap. Tahap pertama yaitu menggunting rambut kelinci sekitar $0,5$ cm dengan gunting rambut. Selanjutnya, pada tahap kedua yaitu pencukuran bulu kelinci menggunakan alat cukur dengan perlahan agar tidak melukai kulit kelinci dan didapatkan kulit kelinci yang bebas bulu.

Setelahnya, dilakukan pemberian serum uji dan pengamatan gejala toksik berupa eritema dan edema. Serum uji diambil sebanyak satu tetes kemudian dioleskan di atas punggung kelinci secara hati-hati dan merata. Setelah itu, punggung kelinci tersebut ditutup dengan kasa steril dan diberi plester. Hewan uji dikembalikan lagi ke kandang. Pengamatan gejala toksik diamati setelah 24, 47, dan 72 jam. Apabila selama pengujian hewan menunjukkan tanda-tanda sakit seperti diare, anoreksia, penurunan berat badan, gemetar dan perubahan tingkah

laku maka penelitian dihentikan saat itu juga dan dilaporkan ke dokter hewan untuk pemeriksaan lebih lanjut.

4.3.8 Pembuatan Formula Serum Berbasis VCO

Sebelum dilakukan pengujian antioksidan menggunakan DPPH, formula serum terpilih berbasis *olive oil* yaitu N1L1 dan N3L3 dibuat formulanya berbasis dengan VCO. Hal ini untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh pada perbedaan pelarut yang digunakan pada formula serum lada hitam serta mengetahui formula serum yang lebih optimal dalam menangkal radikal bebas.

4.3.9 Uji Homogenitas

Uji homogenitas merupakan uji pengamatan terhadap suatu larutan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan fase dan suatu gumpalan atau endapan pada larutan yang dilakukan diberbagai suhu. Sampel dimasukkan kedalam kulkas, diukur pada setiap penurunan suhu setiap 5, 10, 15 dan 30 menit. Diamati apakah terjadi perubahan, atau terbentuk gumpalan dan endapan.

4.3.10 Uji Antioksidan dengan Metode DPPH (Kuantitatif)

a. Pembuatan larutan DPPH 0,08 mM dalam etanol p.a

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 3,15 mg dan dilarutkan dengan 100 ml etanol p.a kedalam labu ukur. Larutan disimpan dalam labu takar yang kemudian dibungkus dengan *aluminium foil* untuk menghindari kerusakan akibat cahaya.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH 0,08 mM sebanyak 2,5 ml dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL, ditambah etanol p.a hingga tanda batas dan diinkubasi pada suhu ruangan selama kurang lebih 30 menit. Selanjutnya, diamati absorbansinya pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Etanol p.a digunakan sebagai blanko. Panjang gelombang maksimum diperoleh dari nilai absorbansi tertinggi.

c. Pengukuran aktivitas peredaman radikal bebas pembanding (serum komersial)

Larutan serum komersial dengan kadar 1000 ppm dibuat dengan melarutkan sebanyak 10 mg serum komersial dengan 10 mL etanol p.a pada labu ukur kemudian dihomogenkan hingga larut sempurna. Hasil larutan 1000 ppm kemudian dibuat larutan stok serum komersial dengan kadar 100 ppm. Dari larutan stok serum komersial kadar 100 ppm selanjutnya dibuat larutan dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Uji antioksidan dilakukan dengan cara memipet 2,5 mL dari masing-masing konsentrasi yang berbeda ditambah dengan 2,5 mL larutan induk DPPH 0,08 mM. Campuran larutan dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang dalam ruang gelap selama kurang lebih 30 menit lalu absorbansi dibaca secara triplo dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm.

d. Pengukuran aktivitas peredaman radikal bebas serum formula

Larutan sampel dari masing-masing serum formula dibuat dalam seri kadar 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm sebanyak 10 mL. Sebanyak 2,5 mL larutan pada masing-masing konsentrasi serum formula ditambahkan dengan 2,5 mL larutan induk DPPH 0,08 mM. Campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang dalam ruang gelap selama kurang lebih 30 menit. Serapan dibaca pada panjang gelombang 516 nm. Pengukuran dilakukan secara triplo. Digunakan 5 mL larutan DPPH 0,04 mM sebagai kontrol.

Aktivitas antioksidan dihitung sebagai presentase inhibisi terhadap DPPH (persentase “scavenging effect”), melalui persamaan:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Keterangan:

A_{kontrol} = Nilai absorbansi tanpa sampel

A_{sampel} = Nilai absorbansi sampel

Aktivitas antioksidan diukur dengan nilai IC₅₀ yang merupakan konsentrasi sampel yang diperlukan untuk memberikan %inhibisi mencapai 50%. Nilai IC₅₀

diperoleh berdasarkan persamaan yang diperoleh dari hasil grafik antara aktivitas peredaman dengan konsentrasi sampel menggunakan Microsoft Excel®.



BAB V

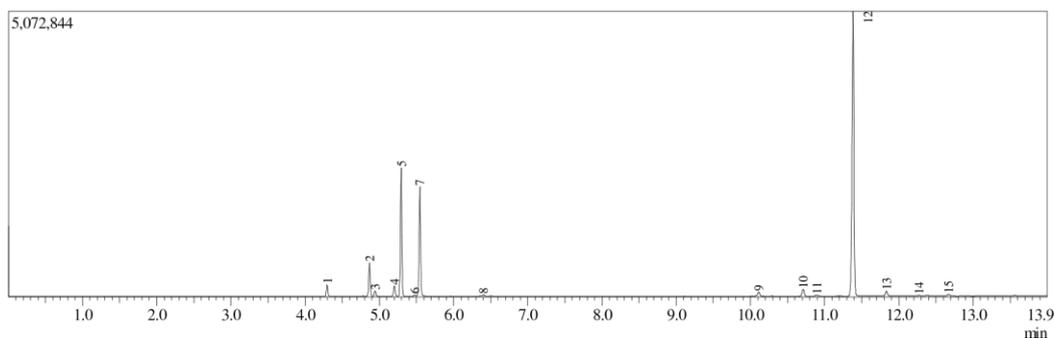
HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekstraksi Minyak Lada Hitam dengan Destilasi Air

Ekstraksi minyak lada hitam dilakukan menggunakan metode destilasi air. Lada hitam dihaluskan terlebih dahulu untuk memperluas area permukaannya. Dimasukkan kedalam ketel sebanyak 2 kg dengan penambahan air \pm 1 liter. Pada satu jam pertama pemanasan muncul uap air yang masuk ke kondensor dan berubah fasenya dari gas menjadi cairan. Cairan tersebut merupakan minyak atsiri dan hidrosol yang selanjutnya dipisahkan dengan penambahan Na_2SO_4 untuk mengikat hidrosol pada minyak. Hasil minyak sebanyak 39 mL dengan rendemen sebesar 1,69% yang didapat selama destilasi 5 jam. Pada beberapa literatur rendemen minyak atsiri lada hitam berkisar 1,24% (Rmili dkk, 2014) hingga 3,1% (Wang dkk, 2008).

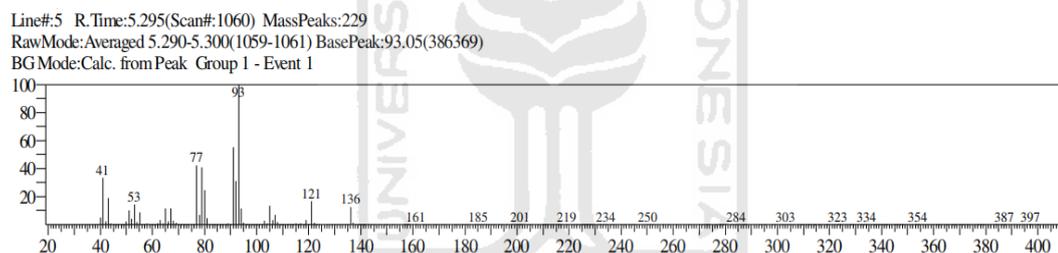
5.2 Uji GC-MS pada Minyak Atsiri Lada Hitam dan Minyak Nilam

Analisis terhadap minyak atsiri lada hitam dilakukan menggunakan metode Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). GC-MS merupakan suatu metode pemisahan senyawa organik dengan dua metode analisis berupa kromatografi gas (GC) untuk menganalisis jumlah senyawa secara kuantitatif dan spektrometri massa (MS) yang digunakan untuk mengetahui jenis dan jumlah fragmen (pola fragmentasi) dari suatu komponen. Hasil data untuk kromatogram minyak atsiri lada hitam ditunjukkan pada Gambar 3. Terdapat 15 (lima belas) puncak senyawa yang artinya pada minyak atsiri lada hitam tersebut terdapat 15 senyawa penyusun dengan waktu retensi berbeda. Kelimpahan terbesar ditunjukkan pada puncak 12 berupa senyawa trans-Caryophyllene (52,31%). Hasil analisis senyawa minyak lada hitam ditunjukkan pada Tabel 2.

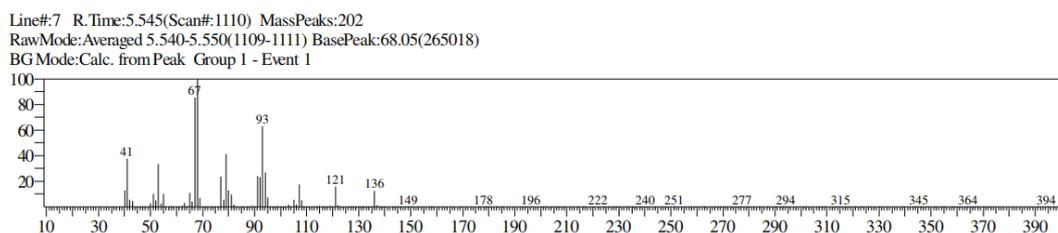


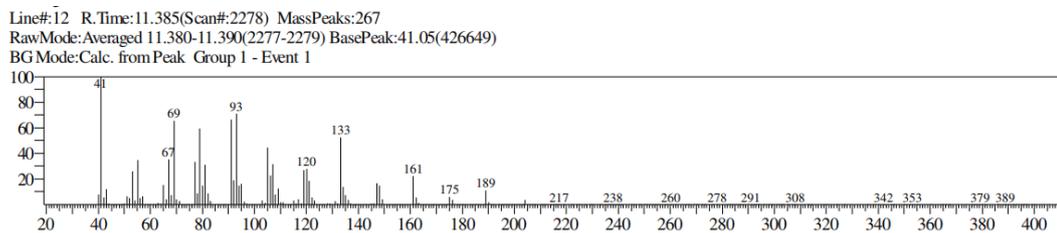
Gambar 3. Kromatogram minyak atsiri lada hitam

Data hasil komponen senyawa yang terkandung dalam minyak atsiri lada hitam yang diperoleh tidak berbeda jauh dengan hasil GC-MS pada penelitian sebelumnya. Dilihat dari %area, terdapat 3 senyawa dengan kelimpahan terbesar yaitu: *β-ocimene* (15,87%), *limonene* (17,82%), dan *trans-caryophyllene* (52,31%).



Gambar 4. Spektra massa *β-ocimene*

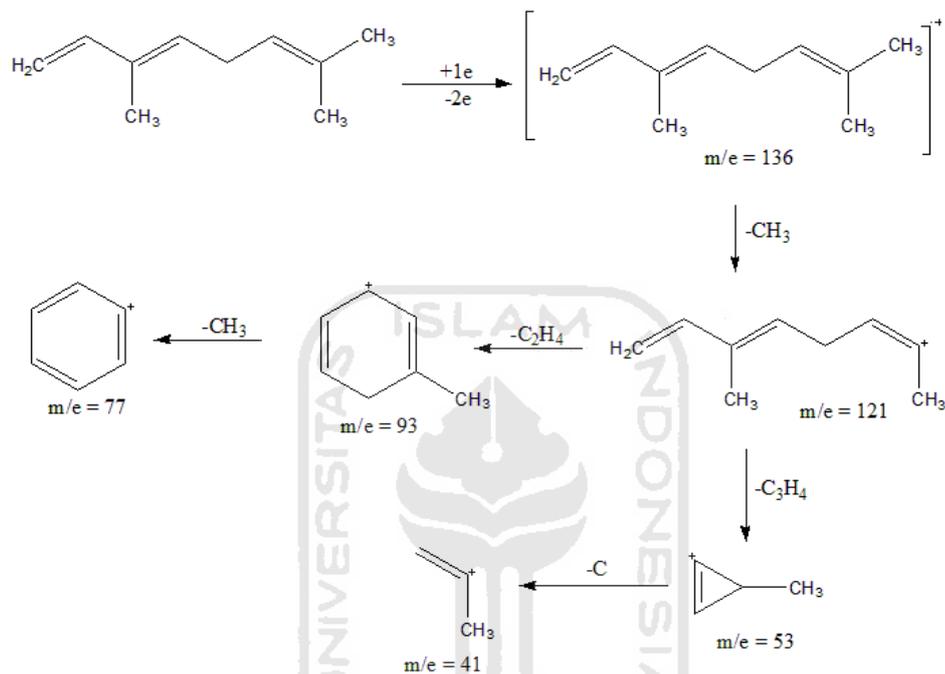


Gambar 5. Spektra massa *limonene*Gambar 6. Spektra massa *trans-caryophyllene*

Tabel 2. Senyawa dalam minyak lada hitam

Komponen	Hasil penelitian		Anggraini, dkk., (2018)		Tran, dkk., (2019)	
	R	%				
	Time	Area	R Time	Area	R Time	Area
<i>2-beta-pinene</i>	4.866	5.01	4.281	9.54	6.71	9.77
<i>beta-myrcene</i>	4.943	0.9	4.397	2.62	7.13	2.91
<i>1-phellandrene</i>	5.201	1.72	4.644	2.83	10.77	0.09
<i>p-cymene</i>	5.473	0.24	4.954	1.04		
<i>dl-Limonene</i>	5.544	15.87	5.037	18.2	9.23	20.94
<i>cis-Ocimene</i>	4.296	1.7	-	-	-	-
<i>Beta Ocimene</i>	5.295	17.82	5.256	0.12	-	-
<i>alpha-terpinolene</i>	6.402	0.34	5.899	0.26	12.99	0.04
	10.111	0.84	-	-	-	-
<i>alpha-copaene</i>	10.71	1.39	10.799	3.65	-	-
<i>trans-caryophyllene</i>	11.385	52.31	11.599	23.77	24.08	15.05
<i>alpha-humulene</i>	10.893	0.24	12.075	1.57	24.6	2.1
	11.833	1.04	-	-	-	-
<i>cyclohexane</i>	12.272	0.15	-	-	-	-
<i>Delta-cadinene</i>	12.67	0.42	13.102	0.78	-	-

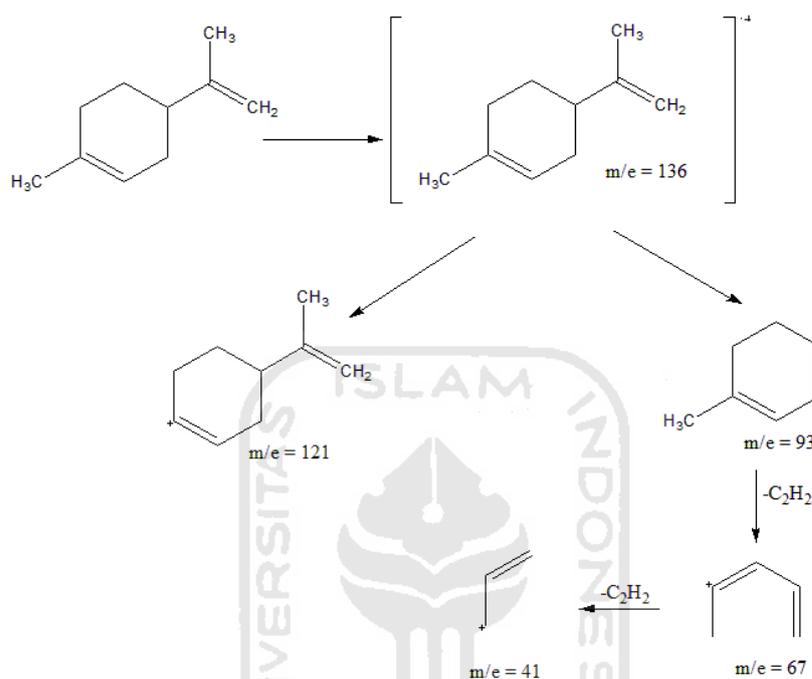
Hasil Spektre massa β -ocimene yang ditunjukkan pada gambar 4. merupakan senyawa pada puncak 5. Memiliki ion molekul massa m/e 136. Senyawa ini golongan asiklik monoterpene, dengan fragmentasi (m/e) 136, 121, 93, 77, 53, dan 41 yang ditunjukkan pada gambar 7.



Gambar 7. Pola fragmentasi β -ocimene

β -Ocimene adalah tumbuhan yang sangat umum mudah menguap yang dilepaskan dalam jumlah penting dari daun dan bunga banyak spesies tumbuhan. Monoterpene asiklik ini dapat memainkan beberapa fungsi biologis pada tumbuhan, dengan berpotensi mempengaruhi respons pertahanan terhadap herbivora (Armengol, dkk. 2017). Ocimene adalah salah satu monoterpene paling umum yang ditemukan di alam. Di bidang kedokteran botani, terdapat hubungan β -ocimene dalam EO dengan aktivitas antijamur, aktivitas antitumor, dan ketahanan hama (Russo, dkk., 2017).

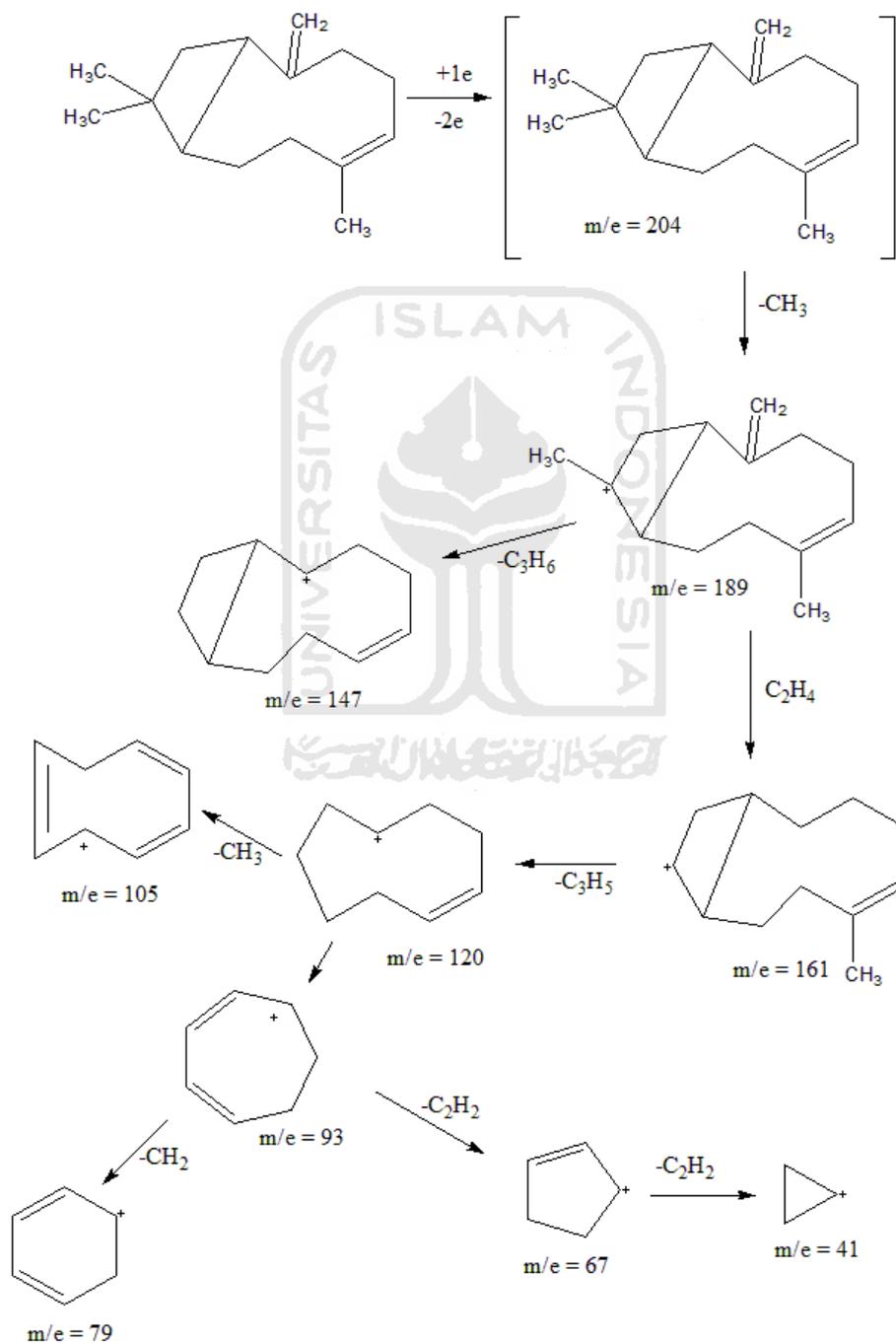
Hasil Spektra massa *limonene* yang ditunjukkan pada gambar 5. merupakan senyawa pada puncak 7. Memiliki ion molekul massa m/e . Senyawa ini golongan monoterpene, dengan fragmentasi (m/e) 136, 121, 93, 67, dan 41.



Gambar 8. Pola fragmentasi *limonene*

Limonene merupakan terpene yang banyak ditemukan antara lain pada minyak atsiri lemon, jeruk, bergamot, dan tangerin. Limonene adalah monoterpene yang terbentuk dari dua unit isoprene. Limonene memiliki seperti aroma lemon, sehingga banyak digunakan sebagai bahan tambahan perasa dan pewangi pada makanan. Limonene adalah salah satu wewangian yang paling umum digunakan dalam formulasi kosmetik, dan dapat ditemukan di berbagai jenis produk kecantikan seperti sabun, parfum, sampo, kondisioner rambut, dan shower gel. Molekul ini memiliki peran penting dalam komposisi minyak esensial dan membantu mengurangi aksi iritasi (Soulimani, dkk., 2019).

Hasil Spektra massa *trans-caryophyllene* yang ditunjukkan pada gambar 6. merupakan senyawa pada puncak 12. Memiliki ion molekul massa m/e 204. Senyawa ini golongan seskuiterpene, dengan fragmentasi (m/e) 204, 189, 161, 147, 120, 105, 93, 79, 67, dan 41.

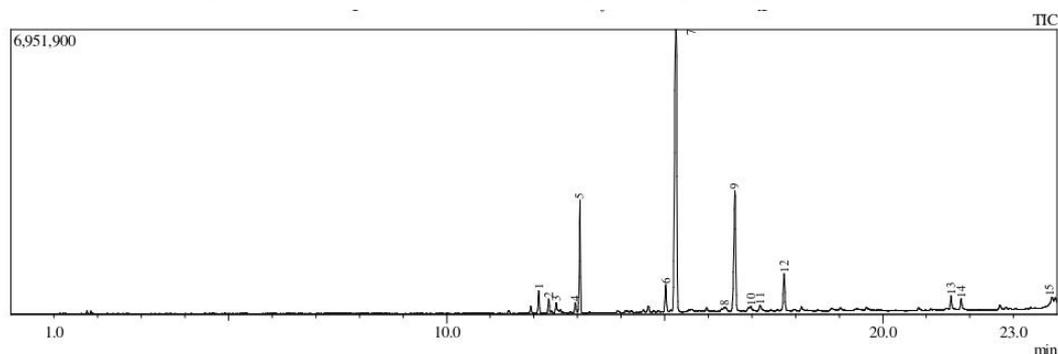


Gambar 9. Pola fragmentasi *trans-caryophyllene*

Trans-caryophyllene (E-BPC) merupakan senyawa tumbuhan anggota seskuiterpene bisiklik yang secara ilmiah lebih dikenal sebagai β -caryophyllene (BCP). BCP memiliki bau yang kuat dan biasa digunakan sebagai kosmetik dan bahan tambahan pada makanan. BCP merupakan salah satu komponen aktif utama minyak atsiri yang berasal dari tanaman rempah dan pangan dalam jumlah besar, umumnya ditemukan pada kemangi (*Ocimum spp.*), Kayu manis (*Cinnamomum spp.*), Lada hitam (*Piper nigrum L.*), dan cannabis (*Cannabis sativa L.*). Efek biologisnya meliputi anti-inflamasi, antikarsinogenik, antimikroba, antioksidan, dan aktivitas analgesik (Fidy, dkk., 2016). BCP merupakan penghambat efektif peroksidasi lipid karena memiliki aktivitas penangkalan radikal bebas dalam melawan radikal hidroksil, anion superoksida dan peroksida lipid (Calleja, dkk., 2013).

Senyawa organik seperti monoterpene, seskuiterpene, deskuiaterpene dan diterpene secara eksperimental diidentifikasi dan diukur sifat-sifat antioksidannya berdasarkan penangkalan radikal bebas. Mekanisme penangkalan terjadi melalui interaksi radikal bebas seperti radikal hidroperoksi (HOO^{\cdot}) dengan antioksidan yang menyumbangkan satu atom hidrogen (H) sehingga dapat terbentuk suatu senyawa yang sifatnya lebih stabil (Ngo, dkk., 2017).

Minyak atsiri nilam yang digunakan diperoleh dari tanaman nilam yang berasal dari Bone, Sulawesi Selatan. Minyak nilam berwarna coklat kemerahan dan memiliki aroma khas nilam. Hasil data kromatogram minyak nilam diperoleh 15 puncak senyawa dengan kelimpahan paling besar pada puncak 7 yang merupakan senyawa utama yaitu *Patchouli Alcohol* ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 10. Kromatogram minyak nilam

Tabel 3. Senyawa dalam Minyak Nilam

Peak	R. Time	%Area	Senyawa
1	12.111	2.25	alpha-Humulene
2	12.342	1.52	Patchoulane
3	12.513	1.2	Apha Sinensal
4	12.952	1.17	1,5,9,11-Tridecatetraene
5	13.058	10.52	delta-Guaiene
6	15.023	3.2	delta-Guaiene
7	15.262	51.54	Patchouli alcohol
8	16.369	0.88	Ledol
9	16.611	17.2	Ledol
10	16.975	1.33	Ledol
11	17.188	0.93	Citonellyl formate
12	17.739	4.51	Ledol
13	21.566	1.53	Tidak ditemukan
14	21.796	1.4	Tidak ditemukan
15	23.879	0.83	Tidak ditemukan

Minyak nilam atau dikenal juga sebagai *patchouli oil* merupakan minyak atsiri yang memiliki kandungan patchouli alkohol lebih dari 50% yang merupakan bahan alami penting dalam industri parfum sebagai bahan pewangi dan penahan aroma (fixative) sehingga bau wangi lebih tahan lama (Kim, 2008). Selain itu, patchouli alcohol juga memiliki potensi sebagai antioksidan dibuktikan dengan kemampuannya dalam menyumbangkan satu atom hidrogen (H) kepada senyawa radikal bebas dan membentuk senyawa yang memiliki sifat lebih stabil. Pada spektrum massa yang diperoleh dari spektrometer massa pada tabel 3. didapatkan beberapa senyawa yang tidak terdeteksi atau tidak ditemukan. Puncak yang tidak terdeteksi memungkinkan bahwa puncak-puncak tersebut hanyalah pengotor yang ada dalam minyak atsiri.

5.3 Karakteristik Minyak Atsiri Lada Hitam

Minyak atsiri lada hitam yang dihasilkan tidak berwarna dengan aroma yang menyengat khas lada. Pengukuran massa jenis minyak atsiri lada hitam dilakukan untuk mengetahui ukuran kerapatan massa pada setiap volume benda. Pengukuran massa jenis dilakukan dengan menggunakan piknometer dan diperoleh hasilnya sebesar 0,867. Hasil ini menunjukkan bahwa nilai massa jenis yang diperoleh sesuai dengan nilai dari standar yang ditetapkan ISO 3061:2008 yaitu 0,861 sampai 0,885.

Pengukuran indeks bias dilakukan menggunakan refraktometer, hasilnya menunjukkan bahwa minyak atsiri lada hitam hasil penelitian memiliki nilai indeks bias sebesar 1,483. Hasil ini menunjukkan bahwa nilai indeks bias memenuhi standar yang ditetapkan ISO 3061:2008 yaitu 1,480 sampai 1,493.

Penentuan bilangan asam minyak lada hitam dilakukan untuk mengetahui banyaknya milligram basa (KOH) dalam menetralkan satu gram zat kimia (asam lemak). Bilangan asam diperoleh menggunakan metode titrasi basa, hasilnya diperoleh sebesar 2,980 mg KOH/g. Hasil ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan Morshed (2017) yang memperoleh bilangan asam $0,37 \pm 0,55$. Besarnya bilangan asam dapat dipengaruhi dari hidrolisa minyak yang terjadi karena terdapat sejumlah air dalam minyak tersebut.

Mutu minyak atsiri lada hitam hasil penelitian melalui distilasi air dianalisis karakteristiknya dan dibandingkan dengan standar mutu minyak atsiri lada hitam berdasarkan standar yang ada yaitu Standar Internasional ISO 3061:2008 dan hasil penelitian Anggraini (2018) yang ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik minyak atsiri lada hitam hasil penelitian dengan literatur

No.	Parameter	Hasil		
		ISO 3061:2008	Anggraini, dkk. (2018)	Hasil Penelitian
1	Warna	tidak berwarna atau berwarna (kuning, hijau, biru)	agak kehijauan	tidak berwarna
2	Massa Jenis	0.861 - 0.885	0,887	0.867
3	Indeks Bias	1.480 - 1.493	1,485	1.483

5.4 Pemilihan Serum Lada Hitam Berdasarkan Uji Hedonik (Uji Kesukaan)

Uji kesukaan dilakukan terhadap 40 panelis, terdiri dari 20 orang berusia sekitar 18 – 24 tahun dan 20 orang lainnya yang berusia 25 – 50 tahun. Setiap orang diberikan 16 formula serum anti-aging lada hitam dan melakukan penilaian terhadap aroma, kekuatan wangi, warna, dan kekentalan dari formula serum dengan mengisi kuisioner yang disediakan. Skala yang digunakan yaitu mulai dari 1 (tidak suka), 2 (kurang suka), 3 (cukup suka), 4 (suka), 5 (sangat suka). Nilai dari masing-masing parameter kemudian diakumulasi untuk menentukan formula serum yang paling disukai. Data nilai uji kesukaan (*hedonic test*) dapat dilihat pada tabel 5.

Hasil data kuisioner dari responden menunjukkan nilai pada setiap parameter penelitian pada rentang usia 18-24 tahun dan 25-50 tahun yang menunjukkan 2 formula serum lada hitam dengan nilai tertinggi yaitu N1L1 dan N3L3 dengan nilai total 433 dan 434 yang memiliki aroma khas lada dan kekuatan wangi yang kuat dan disukai dibanding formula serum yang lain.

Tabel 5. Uji hedonik serum anti-aging minyak atsiri lada hitam

Kode Serum	Aroma		Kekuatan wangi		Warna		Kekentalan		Nilai Total
	18-24 tahun	25-50 tahun	18-24 tahun	25-50 tahun	18-24 tahun	25-50 tahun	18-24 tahun	25-50 tahun	
N1L1	50	45	50	43	64	61	63	57	433
N3L3	50	46	51	46	62	64	61	54	434

Keterangan: N1L1: lada 1,1 mL; nilam 0,1 mL; dan olive oil 1,8 mL

N3L3: lada 1,3 mL; nilam 0,2 mL; dan olive oil 2,25 mL

5.5 Uji Iritasi pada Kelinci

Berdasarkan peraturan badan pengawas obat dan makanan nomor HK.03.1.23.12.11.10052 tahun 2011 tentang pengawasan produksi dan peredaran kosmetik menjelaskan bahwa setiap kosmetik yang beredar wajib memenuhi standard an/atau persyaratan keamanan. Salah satu uji keamanan yang sering digunakan adalah uji iritasi yang umumnya dilakukan secara in vivo pada kelinci. Kelinci dipilih karena memiliki luas punggung yang lebar sehingga dapat memudahkan pengamatan hasil uji. Kelinci yang digunakan adalah kelinci lokal jantan berusia \pm 3 bulan dengan bobot \pm 2 kg, dalam kondisi sehat tanpa cacat fisik dan belum pernah digunakan sebagai penelitian sebelumnya.

Pencukuran hewan uji dilakukan didaerah punggung kelinci untuk menghindari jangkauan dari kelinci sehingga serum yang akan dioleskan tidak termakan oleh hewan uji dan efek toksik yang mungkin ada pada serum akan muncul akibat pemakaian produk secara dermal. Pencukuran juga dilakukan untuk mengoptimalkan kinerja serum agar langsung terserap pada kulit.

Terdapat dua sampel serum yang diujikan yaitu N1L1 dan N3L3. Masing-masing sampel diaplikasikan pada kulit kelinci sebanyak satu tetes. Area punggung kiri kelinci merupakan area serum N1L1 dan area punggung kanan kelinci untuk serum N3L3. Setelah pengolesan selesai, area punggung kelinci yang telah diberi perlakuan kemudian ditutup dengan kasa steril dan diberi plester. Hal ini bertujuan agar area yang diberi serum tidak terkontaminasi dengan udara luar. Selanjutnya dilakukan pengamatan setiap 24, 48, dan 72 jam. Hasil pengamatan ditunjukkan pada tabel 6.

Iritasi umumnya ditandai dengan munculnya alergi yang merupakan keadaan hipersensitivitas kulit atau respons imun yang berlebihan terhadap antigen, berupa eritema dan edema (James, 2014). Eritema adalah kemerahan pada kulit yang disebabkan oleh hiperemia (pelebaran pembuluh darah secara berlebih) yang diakibatkan karena peradangan paparan sinar matahari, infeksi, ataupun alergi terhadap suatu zat tertentu. Edema adalah pembengkakan yang terjadi akibat penumpukan cairan serous berlebih di antara sel-sel jaringan, menyebabkan timbulnya benjolan pada permukaan kulit. Kulit hewan uji yang tidak menimbulkan reaksi eritema dan edema menunjukkan minyak atsiri lada memiliki pH yang berada pada kisaran pH kulit normal yaitu 5,4 – 5,9. Penggunaan sediaan dengan pH tinggi menyebabkan peningkatan pH kulit yang dapat menimbulkan peningkatan efek dehidrasi dan iritasi (Tarun, dkk., 2014).

Tabel 6. Hasil uji iritasi pada pengamatan setelah 24, 48, dan 72 jam

Sampel	N1L1	N3L3
Sebelum diberikan sampel		
Setelah 24 jam		
Setelah 48 jam		
Setelah 72 jam		

Tabel 7. Hasil uji iritasi serum lada hitam

Sampel	Eritema	Edema	Kesimpulan
N1L1	0	0	Non Iritan
N3L3	0	0	Non Iritan

Berdasarkan data pada tabel 7. hasil pengamatan dinyatakan dalam skor eritema dan edema sesuai dengan tingkat keparahannya. Menunjukkan bahwa serum minyak atsiri lada hitam memiliki skor eritema dan edema nol atau dapat disimpulkan sampel serum lada hitam non iritan dan aman bila digunakan pada kulit.

5.6 Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui stabilitas dari sediaan serum minyak lada hitam pada penurunan suhu. Suatu sediaan dikatakan homogeny apabila selama pengamatan tidak terbentuknya perbedaan fase ataupun terbentuknya gumpalan maupun endapan pada larutan. Hasil pengamatan uji homogenitas dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil pengamatan uji homogenitas

Menit ke-	Suhu	Hasil Pengamatan	
		Perbedaan Fase	Terbentuk Gumpalan
5	23 °C	Tidak ada	Tidak ada
10	21 °C	Tidak ada	Tidak ada
15	19 °C	Tidak ada	Tidak ada
30	15 °C	Tidak ada	Tidak ada

Hasil data tabel menunjukkan bahwa pada serum O.N1L1, O.N3L3, C.N1L1 dan C.N3L3 tidak menunjukkan perubahan pada setiap penurunan suhu. Hal tersebut dibuktikan dengan tidak terbentuknya perbedaan fase pada larutan dan tidak ditemukannya gumpalan atau endapan pada serum minyak lada hitam.

5.7 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Serum Minyak Lada Hitam dan Serum Komersial

Aktivitas antioksidan dapat ditentukan melalui beberapa metode salah satunya metode DPPH. Metode DPPH merupakan uji antioksidan berdasarkan transfer elektron yang memiliki daya serap pada rentang 515-519 nm. Metode ini merupakan metode yang paling sering dilakukan dalam pengujian aktivitas antioksidan karena merupakan metode yang sederhana, hanya memerlukan sampel yang sedikit, dan lebih sensitif serta stabil dibanding metode lain. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) merupakan senyawa radikal stabil berwarna ungu karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dan akan berubah menjadi kuning ketika elektronnya berpasangan. Perubahan warna terjadi karena adanya reaksi peredaman radikal bebas oleh antioksidan terhadap DPPH melalui atom hidrogen yang dilepaskan untuk melengkapi kekurangan elektron oleh senyawa sampel sehingga membentuk senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin dan radikal antioksidan yang lebih stabil. Hasil perubahan warna yang terjadi akan mengakibatkan perubahan absorbansi pada panjang gelombang maksimum DPPH. Semakin rendah nilai absorbansi yang didapat maka semakin tinggi antioksidannya.

Hasil penentuan panjang gelombang maksimum untuk DPPH didapatkan serapan tertinggi pada panjang gelombang 516 nm. Larutan DPPH yang dibuat dalam etanol p.a pada labu ukur dilapisi dengan *aluminium foil* dan disimpan di tempat gelap untuk menghindari kerusakan akibat terkena cahaya. Larutan DPPH yang digunakan memiliki konsentrasi 0,08 mM. Pengukuran serapan dilakukan setelah dilakukan inkubasi selama 30 menit, hal ini diharapkan agar antioksidan yang ada dalam sampel akan menyumbangkan hidrogen kepada DPPH. Semakin cepat sampel mendekolorisasi DPPH menjadi kuning maka menjadi indikasi bahwa sampel tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Selanjutnya, besarnya aktivitas antioksidan dari formula serum lada hitam dan kontrol positif yang digunakan diukur pada panjang gelombang maksimum. Kontrol positif yang digunakan sebagai pembanding adalah serum komersial yang mengandung zat antioksidan.

Nilai absorbansi yang didapat kemudian dihitung %inhibisinya untuk memperoleh kurva regresi linear dan persamaannya dengan konsentrasi sebagai sumbu x dan %inhibisi sebagai sumbu y. Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan regresi linear yang didapat dengan mengganti y dengan 50 pada persamaan tersebut. Aktivitas Antioksidan dari serum minyak lada hitam dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 9. Hasil uji aktivitas antioksidan serum lada hitam O. N1L1

Serum	Kadar serum (ppm)	Rata-rata Absorbansi	%Inhibisi (%)	Persamaan garis linear	IC_{50}
O.N1L1	50	0,403	37,808	$y = 0,007x + 37,676$ $R^2 = 0,9030$	1.760,571 ppm
	100	0,398	38,580		
	150	0,396	38,888		
	200	0,395	38,977		
	250	0,393	39,352		
Absorbansi kontrol (DPPH + etanol p.a) = 0,648					

Tabel 10. Hasil uji aktivitas antioksidan serum lada hitam O.N3L3

Serum	Kadar serum (ppm)	Rata-rata Absorbansi	%Inhibisi (%)	Persamaan garis linear	IC_{50}
O.N3L3	50	0,404	37,654	$y = 0,0069x + 37,412$ $R^2 = 0,9772$	1.824,347 ppm
	100	0,400	38,225		
	150	0,398	38,487		
	200	0,396	38,796		
	250	0,394	39,105		
Absorbansi kontrol (DPPH + etanol p.a) = 0,648					

Tabel 11. Hasil uji aktivitas antioksidan serum lada hitam C.N1L1

Serum	Kadar serum (ppm)	Rata-rata Absorbansi	%Inhibisi (%)	Persamaan garis linear	IC ₅₀
C.N1L1	50	0,401	38,025	$y = 0,007x + 37,985$ $R^2 = 0,8318$	1.716,428 ppm
	100	0,395	38,951		
	150	0,393	39,259		
	200	0,393	39,352		
	250	0,391	39,568		
Absorbansi kontrol (DPPH + etanol p.a) = 0,648					

Tabel 12. Hasil uji aktivitas antioksidan serum lada hitam C.N3L3

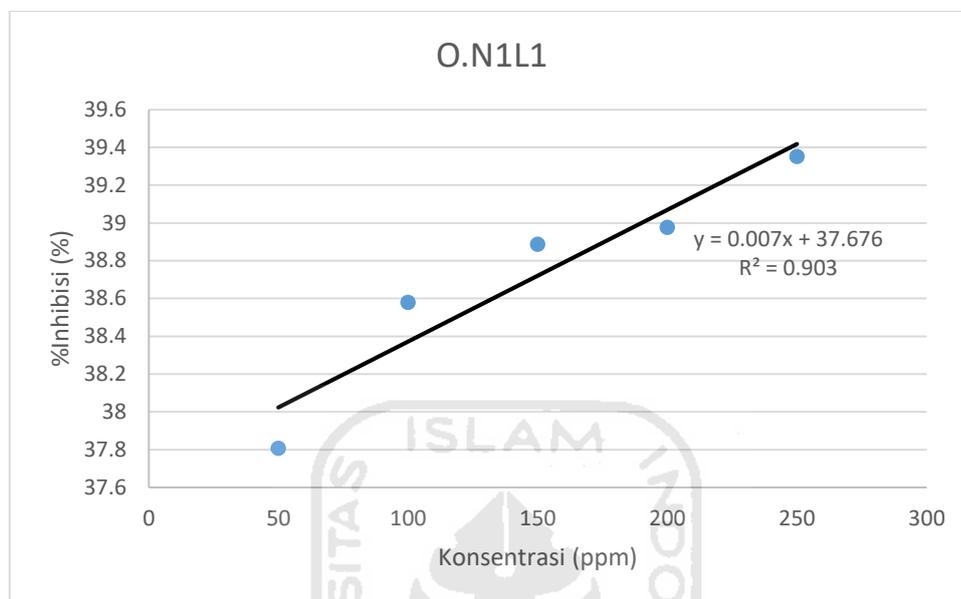
Serum	Kadar serum (ppm)	Rata-rata Absorbansi	%Inhibisi (%)	Persamaan garis linear	IC ₅₀
C.N3L3	50	0,404	37,654	$y = 0,0113x + 36,972$ $R^2 = 0,9517$	1.152,920 ppm
	100	0,400	38,179		
	150	0,399	38,333		
	200	0,397	39,197		
	250	0,389	39,969		
Absorbansi kontrol (DPPH + etanol p.a) = 0,648					

Tabel 13. Hasil uji aktivitas antioksidan serum komersial

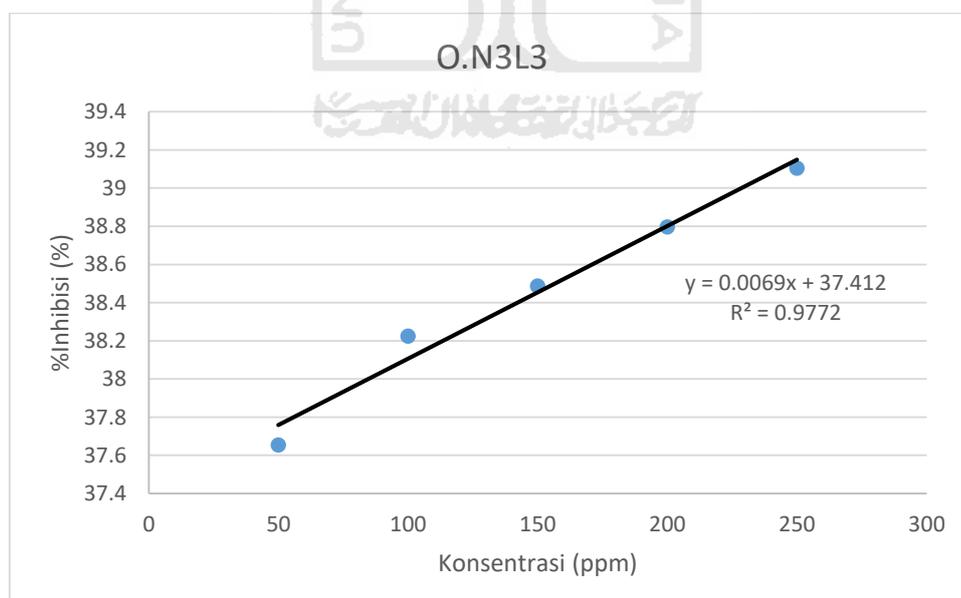
Serum	Kadar serum (ppm)	Rata-rata Absorbansi	%Inhibisi (%)	Persamaan garis linear	IC ₅₀
Komersial	10	0,277	32,621	$y = 0,5869x + 26,655$ $R^2 = 0,9997$	39,776 ppm
	20	0,254	38,203		
	30	0,229	44,417		
	40	0,206	50,000		
	50	0,181	56,068		
Absorbansi kontrol (DPPH + etanol p.a) = 0,648					

Berdasarkan tabel 9. Hingga tabel 13. dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka akan semakin banyak pula elektron yang diberikan ke DPPH dan mereduksinya dari radikal menjadi nonradikal. Hal ini ditandai dengan penurunan nilai absorbansi yang berarti meningkatnya %inhibisi.

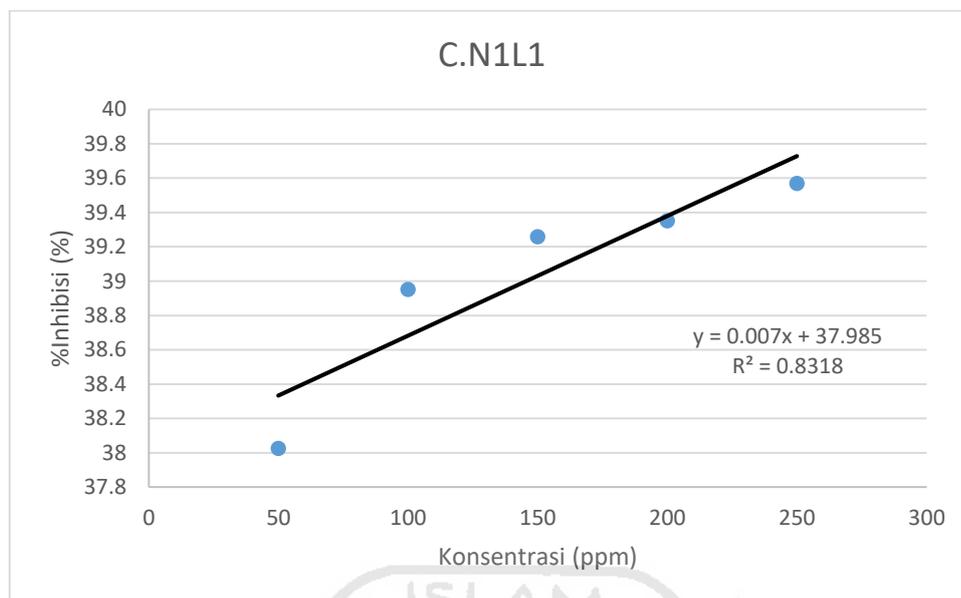
Grafik hubungan antara konsentrasi dan persen inhibisi radikal bebas dapat dilihat pada gambar 5 sampai 9.



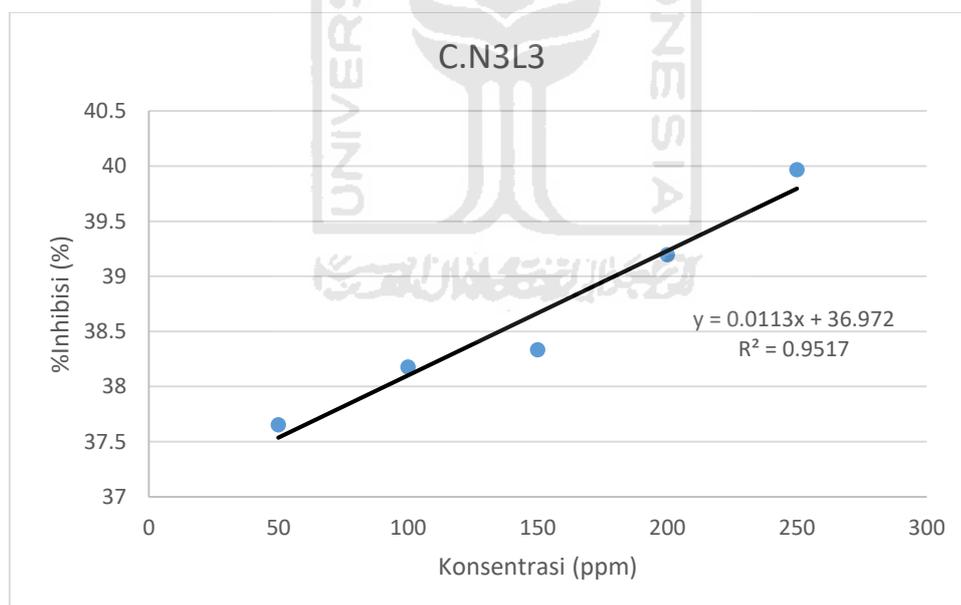
Gambar 11. Grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh serum O.N1L1



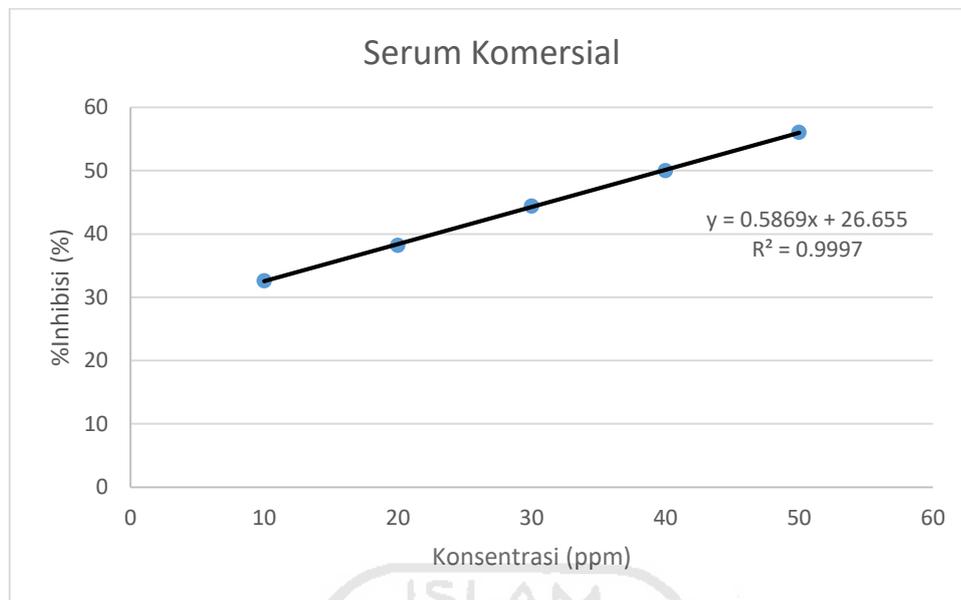
Gambar 12. Grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh serum O.N3L3



Gambar 13. Grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh serum C.N1L1



Gambar 14. Grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh serum C.N3L3



Gambar 15. Grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh serum komersial

Dari setiap grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh tiap serum formula dan serum komersial diperoleh persamaan regresinya. Untuk serum O.N1L1 yaitu $y = 0,007x + 37,676$ dengan $r^2 = 0,903$ dan nilai IC_{50} 1.760,571 ppm dan untuk serum O.N3L3 memiliki persamaan $y = 0,0069x + 37,412$ dengan r^2 0,9772 dan nilai IC_{50} sebesar 1.824,347 ppm. Dari hasil IC_{50} serum formula berbasis minyak *olive oil* memiliki aktivitas antioksidan yang rendah. Hasil ini tidak begitu jauh dengan hasil serum lada hitam berbasis minyak VCO, didapatkan untuk serum C.N1L1 memiliki persamaan $y = 0,007x + 37,985$ dengan r^2 0,8318 dan nilai IC_{50} 1.716,428 ppm dan serum C.N3L3 dengan persamaan $y = 0,0113x + 36,972$ dengan r^2 0,9517 dan hasil IC_{50} 1.152,920. Namun, dari keempat serum formula lada hitam aktivitas antioksidan yang berbasis minyak VCO lebih rendah dari *olive oil* atau memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi.

Untuk hasil serum komersial sebagai kontrol positif (pembanding) didapatkan persamaan regresinya $y = 0,5869x + 26,655$ dengan r^2 0,9997 dan hasil IC_{50} 37,776 menunjukkan bahwa serum komersial memiliki daya antioksidan yang kuat. Serum komersial yang digunakan memiliki kandungan *ascorbic acid* (vitamin

C) 10% yang sudah terbukti berperan sebagai antioksidan dalam menangkal radikal bebas dan telah dipasarkan.

Dapat diambil kesimpulan bahwa semakin tinggi nilai IC_{50} menunjukkan semakin rendah aktivitas antioksidannya, begitu juga sebaliknya jika kadar IC_{50} suatu sampel rendah maka aktivitas antioksidan yang dimiliki semakin kuat atau tinggi sehingga konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk meredam 50% radikal bebas semakin sedikit.

Tabel 14. Tingkat kekuatan aktivitas antioksidan serum formula dan serum komersial

Sampel	IC_{50} (ppm)	Sangat kuat (<50 ppm)	Kuat (50-100 ppm)	Sedang (101-150 ppm)	Lemah (>150 ppm)
O.N1L1	1760.57				√
O.N3L3	1824.35				√
C.N1L1	1716.43				√
C.N3L3	1152.92				√
Serum Komersial	39.77	√			

Berdasarkan tabel 14. dapat diambil kesimpulan bahwa serum minyak lada lada hitam dengan formula O.N1L1, O.N3L3, C.N1L1, dan C.N3L3 memiliki aktivitas antioksidan yang lemah karena memiliki nilai IC_{50} lebih dari 150 ppm, sedangkan serum komersial sebagai pembanding memiliki antioksidan sangat kuat dengan nilai IC_{50} yang kurang dari 50 ppm.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Formulasi serum minyak lada hitam yang paling disukai adalah N1L1 dan N3L3. Hasil uji iritasi menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut bersifat non iritan karena tidak menimbulkan eritema dan edema pada kulit kelinci sehingga aman untuk digunakan.
2. Serum minyak atsiri lada hitam berbasis *olive oil* dan VCO yaitu O.N1L1, O.N3L3, C.N1L1, dan C.N3L3 memiliki aktivitas antioksidan lemah. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai IC_{50} serum O.N1L1 sebesar 1.760,571 ppm; serum O.N3L3 sebesar 1.824,347 ppm; serum C.N1L1 sebesar 1.716,428 ppm dan serum C.N3L3 sebesar 1.152, 920 ppm. Hasil serum C.N3L3 memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dibanding ketiga serum lainnya.

6.2 Saran

Perlu dilakukan determinasi tumbuhan untuk memastikan jenis sampel tumbuhan yang digunakan, dikaji lebih dalam mengenai komposisi formula serum agar mendapatkan aktivitas antioksidan yang lebih optimal, seperti pemilihan pelarut yang tepat agar tidak kontradiktif dengan zat aktif pada sampel. Penentuan aktivitas antioksidan juga perlu dilakukan dengan menggunakan metode lain seperti metode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) atau FIC (Ferrous Ion Chelating) Selain itu juga perlu dilakukan uji stabilitas dan uji fisik terhadap serum antioksidan seperti uji organoleptik, uji pemanasan dan pendinginan, uji pH, viskositas, dan daya sebar.

DAFTAR PUSTAKA

- Agusta, Andria, 2000, *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia*, ITB Press, Bandung.
- Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B. H., Farooq, S., Ali, M., and Khan, M. A., 2012, Biological Role of Piper Nigrum L. (Black Pepper): A Review, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3): S1945-S1953
- Allemann, I. B., and Baumann, L., 2008, Antioxidants Used in Skin Care Formulations, 1–8.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M., 1993, Oxidants, Antioxidants, and The Degenerative Diseases of Aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17): 7915-7922.
- Amiri, H., 2012, Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three Thymus Species, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,
- Antara, N. dan Wartini, M., 2014, *Aroma and Flavor Compounds*, Tropical Plant Curriculum Project, Udayana University, Bali.
- Arivazhagan, P., Thilakavathy, T., and Panneerselvam, C., 2000, Antioxidant Lipoate and Tissue Antioxidants in Aged Rats. *J. Nutr. Biochem*, 11:122-127.
- Armengol, G. F., Fiella, I., Llusia, J., Penuelas, J., 2017, β -Ocimene, a Key Floral and Foliar Volatile Involved in Multiple Interactions between Plants and Other Organisms, *Molecules*, 22(7): 1148.
- Barel, A. O., Paye, M., dan Maibach, H. I., 2009, *Handbook of Cosmetic Science and Technology*, Third Edition, Informa Healthcare USA Inc., New York.
- Blois, M. S., 1958, Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*, 181:1199-1200.
- Campa, M., and Baron, E., 2018, Anti-aging Effects of Select Botanicals: Scientific Evidence and Current Trends, *Cosmetics*, 5(54): 1-15.
- Calleja, M. A., Vietes, J. M., Meterdez, T. M., Torres, M. I., Faus, M. J., Gil., A., and Suarez A., 2013, The Antioxidant Effect of β -caryophyllene Protects Rat Liver from Carbon Tetrachloride-Induced Fibrosis by Inhibiting Hepatic Stellate Cell Activation, *British Journal of Nutrition*, 109: 394-401.
- Clarkson, P. M., Thompson, H. S., 2000, Antioxidants: What Role Do They Play in Physical Activity and Health, *J. Clin Nutr. Biochem*, 72: 637S-46S.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1980, *Materia Medika Indonesia Jilid IV*, Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Dewi, Indri K., Rusita, Y. D., 2017, Uji Stabilitas Fisik dan Hedonik Sirup Herbal Kunyit Asam, *Jurnal Kebidanan dan Kesehatan Tradisional*, 2(2): 60-115.
- Fessenden, R. J. dan Fessenden, J. S., 1982, *Kimia Organik Jilid 2*, Erlangga, Jakarta.
- Fidy, K., Fiedoeowicz, A., Strzadala, L., Szumny, A., 2016, β -Caryophyllene and β -Caryophyllene Oxide—Natural Compounds of Anticancer and Analgesic Properties, *Cancer Medicine*, 5(10):3007-3017

- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Guenther, E., 1987, *Minyak Atsiri jilid I*, UI Press, Jakarta.
- Gunawan, D dan Mulyani S., 2004, *Ilmu Obat Alam*, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Hafsari, A. R., Cahyanto, T., Sujarwo, T., dan Lestari R. I., 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Beluntas terhadap *Propionibacterium Acnes* Penyebab Jerawat, *Jurnal Istek*, 9(1): 141-161.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C., 2007, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford.
- Harjadi, W., h0, *Ilmu Kimia Analitik Dasar*, Gramedia, Jakarta.
- Huang, X., Feng, Y., Huang, Y., and Li, H., 2013, Chemical Composition, Antioxidant and the Possible Use as Skin-care Ingredient of Clove Oil (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) and citronella oil (*Cymbopogon goeringii*) from China, *The Journal of Essential Oil Research*, 25(4): 315-323.
- Irsan, Manggau, M. A., Pakki, E., dan Usmar, 2013, Uji Iritasi Krim Antioksidan Ekstrak Biji Lengkeng (*Euphoria longana* Stend) pada Kulit Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 17(2): 55–60.
- Jain, P. K., and Agrawal, R. K., 2008, Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Developed Mono- and Polyherbal Formulations, *Asian J. Exp. Sci.*, 22(3): 213-220.
- James, O., Sunday, A. B., 2014, Evaluation of Acute Dermal Irritation and Wound Contraction *Gymnema Sylvestre* and *Datura Metel* Extracts in Rats, *American Journal of Biomedical and Life Science*, 2(4): 83-88.
- Jia, N., Li, T., Diao, X., Kong, B., 2014, Protective effects of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract on hydrogen peroxide-induced damage in lung fibroblast MRC-5 cells in relation to the antioxidant activity, *J. Funct. Foods*, 11: 142–151.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Ngassoum, M. B., Geissler, M., 2002, Aroma Compounds Analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* Essential Oils from Cameroon Using Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography, Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Olfactometry, *Journal of Chromatography A*, 976: 265-275.
- Karsha, V. P., and Lakshmi, O. B., 2009, Antibacterial Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* Linn.) with Special Reference to Its Mode of Action on Bacteria, *J. Indian of Nat. Prod. and Res*, 1(2): 213- 215.
- Ketaren, S., 2008, *Minyak dan Lemak Pangan*, Cetakan Pertama, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Kim, Hyung W., Cho, Su J., Kim, Bu-Yeo, Cho, Su I., and Kim, Young K., 2008, *Pogostemon cablin* as ROS Scavenger in Oxidant Induced Cell Death of Human Neuroglioma Cells, *Evid Based Complement Alternat Med*, 7 (2): 239-247.
- Kumar, V., Mathela, C. S., Kumar, M., and Tewari, G., 2019, Antioxidant Potential of Essential Oils from Some Himalayan Asteraceae and Lamiaceae Species, *Medicine in Drug Discovery*, 1.

- Kurutas, E. B., 2015, The Importance of Antioxidants which Play the Role in Cellular Response Against Oxidative/Nitrosative Stress: Current State, *Nutrition Journal*, 71.
- Lampe, J. W., 1999, Health Effect of Vegetables and Fruit Assessing Mechanism of Action in Human Experimental Studies, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70: 475S- 490S.
- Li, Yong-xin, Zhang, C., Pan, S., Chen, L., Liu, M., Yang, K., Zeng, X., Tian, J., 2019, Analysis of Chemical Components and Biological Activities of Essential Oils from Black and White Pepper (*Piper nigrum* L.) in Five Provinces of Southern China, *LWT-Food Science and Technology*, 117.
- Lourenco, S. C., Martins, M. M., and Alves, V. D., 2019, Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications, *Molecules*, 24 (22): 4132.
- Meghwal, M. dan Goswami, T. K., 2012, Nutritional Constituent of Black Pepper as Medicinal Molecules: A Review, *Open Access Scientific Reports*, 1: 1-7.
- Middha, S. K., Usha, T., and Pande, V., 2013, HPLC Evaluation of Phenolic Profile, Nutritive Content, and Antioxidant Capacity of Extracts Obtained from *Punica granatum* Fruit Peel, *Adv Pharmacol Sci*, 1-6.
- More, B. H., Sakharwade, S. N., Tembhurne, S. V. and Sakarkar, D. M., 2013, Evaluation of Sunscreen activity of Cream containing Leaves Extract of *Butea monosperma* for Topical application, *International Journal of Research in Cosmetic Science*, 3(1): 1-6.
- Morshed, S., Hossain, M. D., Ahmad, M., and Junayed, M., 2017, Physicochemical Characteristics of Essential Oil of Black Pepper (*Piper nigrum*) Cultivated in Chittagong, Bangladesh, *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 4: 66-69.
- Muliyawan, D., dan Suriana, N., 2013, A-Z Tentang Kosmetik, PT Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Ngo, T. C., Dao, D. Q., Nguyen, M. T., and Nam, P. C., 2017, A DFT Analysis on The Radical Scavenging Activity of Oxygenated Terpenoids Present in The Extract of The Buds of *Cleistocalyx operculatus*, *RSC Advances*, 7:39686-39698.
- Ojha, S., Sinha, S., Chaudhuri, S. D., Chadha, H., Aggarwal, B., Jain, S., M., Ajeet and Meenu, 2018, Formulation and Evaluation of Face Serum Containing Bee Venom and Aloe Vera Gel, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 8(2): 1100-1105.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M and Kriz, G.S., 2006, *Introduction for Spectroscopy*, Third edition, Brooks/Cole, Washington.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P., 2011, Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review, *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 1(1):1-10
- Poljsak, B. and Dahmane, R., 2012, Free Radicals and Extrinsic Skin Aging, *Dermatology Research and Practice*, 1-4.
- Prakash, A., Rigelhof, F., Miller, E., 2001, Antioxidant Activity, *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 19(2).

- Pratt, D. E., and Hudson, B. J. F., 1990, *Natural Antioxidant Not Exploited Commercially in Food Antioxidant*, Hudson, B. J. F. ed., Elsevier Applied science, London.
- Ratz-Lyko A., Arct J., Pytkowska K., 2012. Method for Evaluation of Cosmetic Antioxidant Activity, *Skin Res Technol*, 18(4): 421–430.
- Reynertson, K. A., 2007, Phytochemical Analysis of Bioactive Constituents from Edible Myrtaceae Fruit, Dissertation, The City University of New York, New York.
- Risfaheri, 2012, Diversifikasi Produk Lada (*Piper nigrum* L.) untuk Peningkatan Nilai Tambah, *Buletin Teknologi Pasca Panen Pertanian*, 8(1): 12.
- Rismunandar, 2007, *Lada Budidaya dan Tata Niaga*, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Rmili, R., Ramdani, M., Ghazi, Z., Saidi, N., and El Mahi, B., 2014, Composition Comparison of Essential Oil Extracted by Hidrodistillation and Microwave-Assisted Hydrodistillation from *Piper Nigrum* L., *J. Mater. Environ. Sci.*, 5(5): 1560-1567.
- Russo, E. B., and Marcu, J., 2017, Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads, *Advances in Pharmacology*, 67-134.
- Saeed, N. dkk., 2012, Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L., *BMC Complement Altern Med.*, 12: 221-32.
- Sasidharan, S., Pyarry Joseph, P., Junise, 2014, Formulation and Evaluation of Fairness Serum Using Polyherbal Extracts, *Internationa Journal of Pharmacy*, 4(3): 105-112.
- Sastrohamidjojo, H., 2004, *Kimia Minyak Atsiri*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Souliman R., Boauayed, J., Joshi, R. J., 2019, Limonene: Natural Monoterpene Volatile Compounds of Potential Therapeutic Interes, *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 7(4): 01-10.
- Stone, H dan Joel, L., 2004, *Sensory Evaluation Practices*, Edisi Ketiga, Elsevier Academic Press, California.
- Tjitrosoepomo, G., 2004, *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Tran, T. H, Ha, L. K., Nguyen, D. C., Dao, T. P., Nhan, L. T. H., Nguyen, D. H., 4, Nguyen, T. D., N., Dai-Viet, Tran, Q. T., and Bach, L. G., 2019, The Study on Extraction Process and Analysis of Components in Essential Oils of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Seeds Harvested in Gia Lai Province, Vietnam, *Processes*, 7(2): 56
- Vasavirama, K., and Upender, M., 2014, Piperine: A Valuable Alkaloid from Piper Species, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(4): 34-38.
- Wahdaningsih, S., Setyowati, E. P., Wahyuono, S., 2011, Aktivitas Penangkap Radikal Bebas dari Batang Pakis (*Alsophila glauca* J. Sm), *Majalah Obat Tradisional*, 16(3): 156-160.
- Wang, Y., Jiang, Z., Li, R., 2008, Composition Comparison of Essential Oils Extracted by Hydrdistillation and Microwave-assisted Hydrodistillation

- from Black Pepper (*Piper nigrum L.*) Grown in China, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*.
- Winarno, F. G., 1997, *Kimia Pangan dan Gizi*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Winarsi, H., 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan, Kanisius, Yogyakarta.
- Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., Li, H. B., 2017, Natural Antioxidants in Foods And Medicinal Plants: Extraction, Assesment and Resources, *International Journal of Molculus Sciences*, 18 (1): 96.
- Zaini, Alifa N., Gozali, D., 2016, Pengaruh Suhu terhadap Stabillitas Obat Sediaan Suspensi, *Farmaka Suplemen*, 14(2).
- Zhang, L. L., and Xu, J. G., 2015, Comparative Study on Antioxidant Activity of Essential Oil from White and Black Pepper, *European Journal of Food Science and Technology*, 3(3): 10-16.



LAMPIRAN-LAMPIRAN



Lampiran 1. Dokumentasi alat penelitian

Peralatan gelas



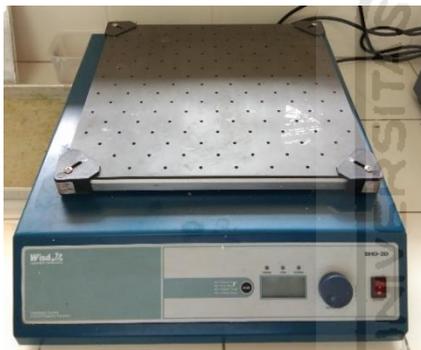
Timbangan analitik



Refraktometer



Shaker



Spektrofotometer UV-Vis Hitachi UH 5300



Kelinci jantan ± 2 bulan



Lampiran 2. Dokumentasi ekstraksi minyak lada hitam

Distilasi minyak lada hitam



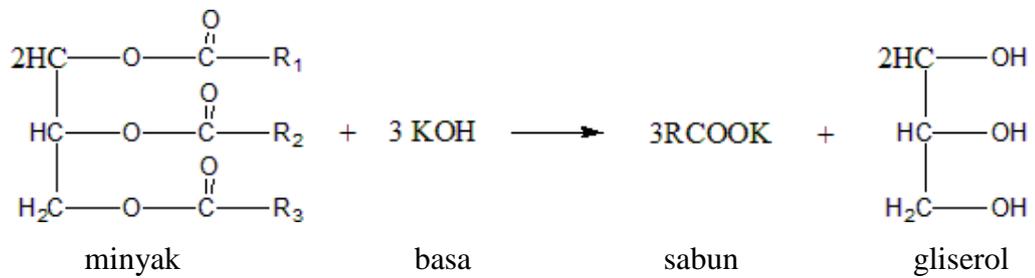
Hasil suling minyak lada hitam



Lampiran 3. Dokumentasi uji karakteristik

Bilangan asam

1. Reaksi bilangan asam



2. Hasil uji bilangan asam



Lampiran 4. Dokumentasi formula minyak lada hitam



Lampiran 6. Hasil penentuan uji hedonik

No.	Formula serum	Nilai Responden	Nilai Responden	Nilai Total
		(18-25 Tahun)	(26-40 tahun)	
1	N1L1	227	206	433
2	N1L2	211	195	406
3	N1L3	217	215	432
4	N1L4	209	210	419
5	N2L1	216	207	423
6	N2L2	200	207	407
7	N2L3	217	199	416
8	N2L4	200	193	393
9	N3L1	216	211	427
10	N3L2	213	209	422
11	N3L3	224	210	434
12	N3L4	210	212	422
13	N4L1	220	210	430
14	N4L2	209	208	417
15	N4L3	221	201	422
16	N4L4	216	205	421

Serum dengan jumlah penilaian terbanyak yaitu:

N1L1 = 433

N3L3 = 434

Lampiran 7. Hasil approve dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran UII



UNIVERSITAS
ISLAM
INDONESIA

**FAKULTAS
KEDOKTERAN**

Gedung Dr. Soekiman Wirjosandjojo
Kampus Terpadu Universitas Islam Indonesia
Jl. Kaliurang km 14,5 Yogyakarta 55584
T. (0274) 898444 ext.2096, 2097
F. (0274) 898459 ext 2007
E. fk@uii.ac.id
W. fk.uui.ac.id

Nomor : 70/Ka.Kom.Et/70/KE/I/2020

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL APPROVAL**

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

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

"Formulasi Serum Anti Aging Minyak Atsiri Lada Hitam (*Piper Nigrum L.*) dan Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH dan FRAP"

Peneliti Utama : Astri Astuti
Principal Investigator

Nama Institusi : Program Studi Kimia FMIPA UII
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
and approved the above-mentioned protocol.

Yogyakarta, 31 Januari 2020
Ketua
Chairman

Rahma Xuantari, M.Sc, Sp.PK

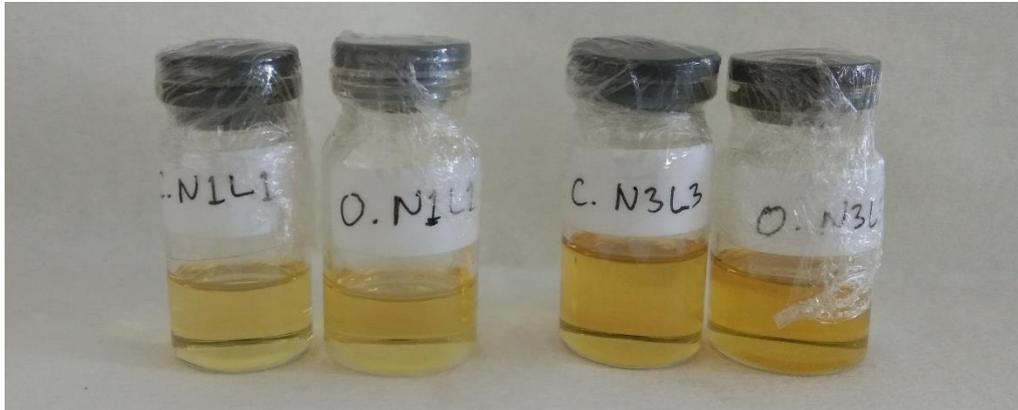


***Ethical Approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan**
****Peneliti berkewajiban**

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila :
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tangan jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*

Lampiran 8. Dokumentasi serum

Serum lada hitam berbasis minyak zaitun (*olive oil*) dan minyak kelapa (VCO)



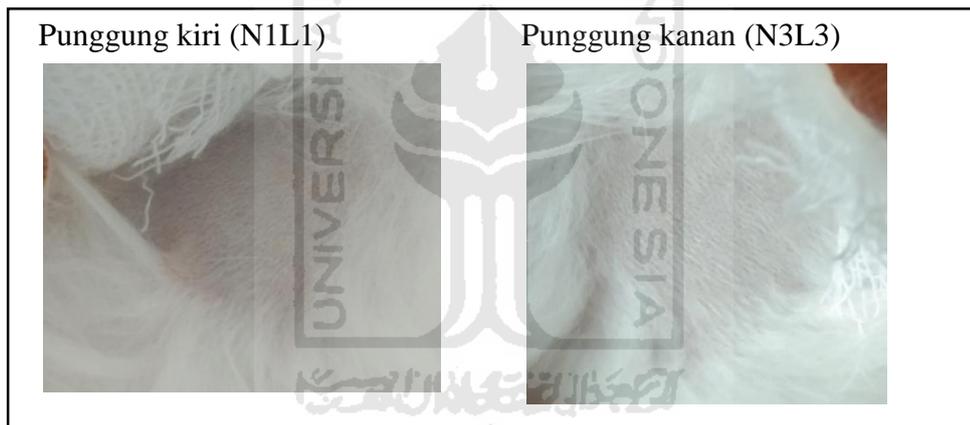
Serum komersial (Wardah)



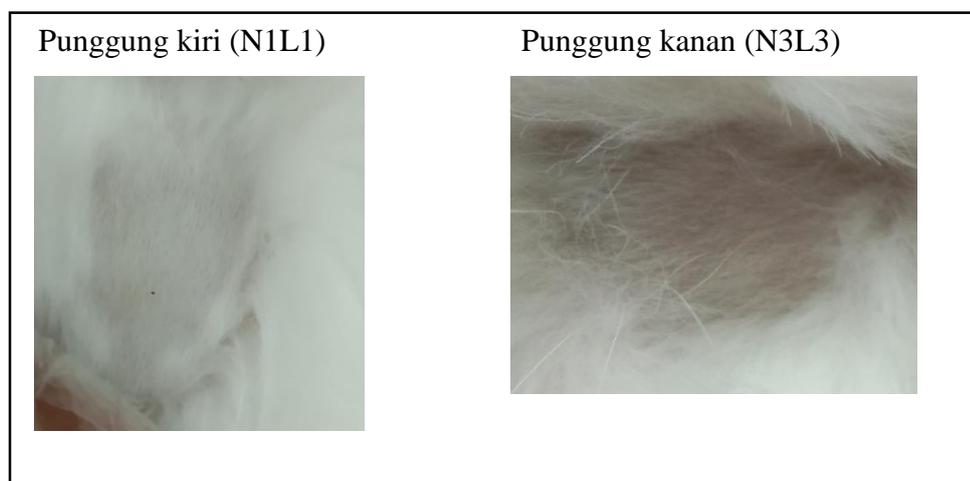
Lampiran 9. Dokumentasi uji iritasi pada kelinci (24, 48, 72 jam)



Pengamatan setelah 24 jam



Pengamatan setelah 72 jam



Lampiran 10. Dokumentasi uji aktivitas antioksidan DPPH



Serum O.N1L1, O.N3L3, C.N1L1, dan C.N3L3



Serum komersial (Wardah)

Lampiran 11. Hasil uji homogenitas

Menit ke-	Suhu	Hasil Pengamatan
5	23 °C	
10	21 °C	
15	19 °C	
30	15 °C	

Lampiran 12. Perhitungan dalam pengujian karakteristik minyak lada hitam

a. Penentuan berat jenis

Diketahui:

$$m \text{ pikno kosong} = 7,426 \text{ g}$$

$$m \text{ pikno} + \text{air} = 8,977 \text{ g}$$

$$m \text{ pikno} + \text{minyak lada} = 8,767 \text{ g}$$

$$\begin{aligned} \text{Berat jenis minyak lada hitam} &= \frac{(m \text{ pikno} + \text{minyak}) - m \text{ pikno kosong}}{(m \text{ pikno} + \text{air}) - m \text{ pikno kosong}} \times \rho \text{ air} \\ &= \frac{8,767 \text{ g} - 7,426 \text{ g}}{8,977 \text{ g} - 7,426 \text{ g}} \times 0,997 \text{ g/mL} \\ &= 0,8672 \text{ g/mL} \end{aligned}$$

b. Penentuan bilangan asam

- Pembuatan larutan KOH 0,1 N dalam 250 mL

Diketahui:

$$N_{\text{KOH}} = 0,1 \text{ N} = 0,1 \text{ mol/L}$$

$$V_{\text{KOH}} = 250 \text{ mL} = 0,25 \text{ L}$$

$$M_r \text{ KOH} = 56,1 \text{ g/mol}$$

$$M = \frac{g/M_r}{V}$$

$$g = M \times V \times M_r$$

$$g = 0,1 \text{ mol/L} \times 0,25 \text{ L} \times 56,1 \text{ g/mol}$$

$$g = 1,4025 \text{ g}$$

Maka untuk membuat larutan KOH 0,1 N dalam 250 mL dibutuhkan KOH sebanyak 1,4205 g.

- Pembuatan larutan asam oksalat ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) 0,1 N dalam 50 mL

Diketahui:

$$N_{\text{asam oksalat}} = 0,1 \text{ N} = 0,1 \text{ mol/L}$$

$$V_{\text{asam oksalat}} = 50 \text{ mL} = 0,05 \text{ L}$$

$$M_r \text{ as. Oksalat} = \text{BM/valensi} = \frac{126 \text{ g/mol}}{2} = 63 \text{ g/mol}$$

$$g = M \times V \times M_r$$

$$g = 0,1 \text{ mol/L} \times 0,05 \text{ L} \times 63 \text{ g/mol}$$

$$g = 0,315 \text{ g}$$

Maka untuk membuat larutan asam oksalat 0,1 N dalam 50 mL dibutuhkan asam oksalat sebanyak 0,315 g.

- Standarisasi KOH 0,1 N dengan asam oksalat 0,1 N

Diketahui:

$$V_1 = 12,3 \text{ mL}$$

$$V_2 = 12,1 \text{ mL}$$

$$V_3 = 12,2 \text{ mL}$$

$$\begin{aligned} \text{Vrata-rata} &= \frac{V_1 + V_2 + V_3}{n} \\ &= \frac{(12,3 + 12,1 + 12,2) \text{ mL}}{3} \\ &= 12,2 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$N_{\text{KOH}} \times V_{\text{KOH}} = N_{\text{as}} \times V_{\text{as}}$$

$$N_{\text{KOH}} \times 12,2 \text{ mL} = 0,1 \text{ N} \times 10 \text{ mL}$$

$$N_{\text{KOH}} = 0,0819 \text{ N}$$

Maka KOH yang digunakan dalam penelitian untuk penentuan bilangan asam adalah 0,0819 N.

- Pembuatan indikator pp 1% dalam 10 mL
 $m_{\text{pp}} = 1/100 \times 10 \text{ mL} = 0,1 \text{ g}$
 Maka serbuk pp yang ditimbang untuk membuat larutan indikator pp 1% dalam 10 mL adalah 0,1 gram.
- Penentuan Bilangan Asam
 $\text{Vrata-rata KOH} = 0,65 \text{ mL}$
 $N_{\text{KOH}} = 0,0819 \text{ mmol/mL}$
 $\text{BM KOH} = 56,1 \text{ mg/mmol}$
 $\text{Massa sampel} = 1,002 \text{ g}$

$$\begin{aligned} \text{Bilangan asam} &= \frac{V_{\text{KOH}} \times N_{\text{KOH}} \times \text{BM}_{\text{KOH}}}{m_{\text{sampel}}} \\ &= \frac{0,65 \text{ mL} \times 0,0819 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \times 56,1 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}}{1,002 \text{ g}} \\ &= 2,98 \text{ mg KOH/g lemak} \end{aligned}$$

Lampiran 13. Perhitungan dalam pengujian aktivitas Antioksidan dengan DPPH

- Pembuatan larutan DPPH 0,08 mM dalam 25 mL (untuk serum komersial)

Mr DPPH = 394,3 g/mol atau mg/mmol

$$M = \frac{\text{mol}}{\text{liter}} \rightarrow \text{mM} = \frac{\text{mmol}}{\text{liter}}$$

$$\text{mol} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr}} \rightarrow \text{mmol} = \frac{\text{mg}}{\text{Mr}}$$

$$1 \text{ mM} = \frac{\text{mg/Mr}}{\text{liter}}$$

Maka,

$$0,08 \text{ mM} = \frac{\text{mg}/394,3 \text{ mg/mmol}}{0,025 \text{ L}}$$

$$0,08 \text{ mmol/L} = \frac{\text{mg}/394,3 \text{ mg/mmol}}{0,025 \text{ L}}$$

$$\text{mg} = 0,08 \text{ mmol/L} \times 394,3 \text{ mg/mmol} \times 0,025 \text{ L}$$

$$\text{mg} = 0,78 \text{ mg}$$

Maka untuk membuat larutan DPPH 0,08 mM dalam etanol p.a sebesar 25 mL dibutuhkan DPPH sebanyak 0,78 mg.

- Pembuatan larutan DPPH 0,08 mM dalam 100 mL (untuk serum lada hitam)

$$0,08 \text{ mM} = \frac{\text{mg}/394,3 \text{ mg/mmol}}{0,025 \text{ L}}$$

$$\text{mg} = 0,08 \text{ mmol/L} \times 394,3 \text{ mg/mmol} \times 0,1 \text{ L}$$

$$\text{mg} = 3,15 \text{ mg}$$

Maka untuk membuat larutan DPPH 0,08 mM dalam etanol p.a sebesar 100 mL dibutuhkan DPPH sebanyak 3,15 mg.

- Pembuatan larutan DPPH 0,04 mM sebagai kontrol dalam 5 mL

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$0,08 \text{ mM} \times V_1 = 0,04 \text{ mM} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{0,04 \text{ mM} \times 5 \text{ mL}}{0,08 \text{ mM}}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL}$$

Maka untuk membuat larutan DPPH 0,04 mM sebanyak 5 mL dibutuhkan larutan DPPH 0,08 mM sebanyak 2,5 mL.

- Pembuatan larutan serum lada hitam (N1L1 dan N3L3) 1000 ppm

$$\begin{aligned}
 1000 \text{ ppm} &= 1000 \mu\text{g/mL dalam } 10 \text{ mL} = 1000 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \\
 &= 10.000 \mu \\
 &= 10 \text{ mg dalam } 10 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Maka untuk membuat larutan serum N1L1 dan N3L3 1000 ppm sebanyak 10 mL dibutuhkan masing-masing 10 mg serum N1L1 dan N3L3.

- Pembuatan larutan seri kadar untuk masing-masing serum lada hitam dengan variasi konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250 ppm dari larutan kadar 1000 ppm. Larutan kadar masing-masing dibuat dalam 10 mL

- 50 ppm

$$\begin{aligned}
 M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\
 1000 \text{ ppm} \times V_1 &= 50 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\
 V_1 &= 0,5 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

- 100 ppm

$$\begin{aligned}
 M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\
 1000 \text{ ppm} \times V_1 &= 100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\
 V_1 &= 1 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

- 150 ppm

$$\begin{aligned}
 M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\
 1000 \text{ ppm} \times V_1 &= 150 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\
 V_1 &= 1,5 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

- 200 ppm

$$\begin{aligned}
 M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\
 1000 \text{ ppm} \times V_1 &= 200 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\
 V_1 &= 2 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

- 250 ppm

$$\begin{aligned}
 M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\
 1000 \text{ ppm} \times V_1 &= 250 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\
 V_1 &= 2,5 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Pembuatan larutan pembanding serum komersial

- Pembuatan larutan stok serum komersial kadar 100 ppm dari larutan standar 1000 ppm sebanyak 10 mL

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL}$$

Maka untuk membuat larutan kadar 100 ppm dalam etanol p.a 10 mL dibutuhkan 1 mL dari larutan serum komersial 1000 ppm.

- Pembuatan larutan serum komersial dengan variasi konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm dalam 5 ml dari larutan stok serum komersial kadar 100 ppm.
- 10 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 10 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0.5 \text{ mL}$$

- 20 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL}$$

- 30 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 30 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,5 \text{ mL}$$

- 40 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 40 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

- 50 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 50 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL}$$

Lampiran 14. Hasil absorbansi serum komersial, perhitungan %inhibisi dan IC₅₀

Absorbansi kontrol = 0,412

Konsentrasi serum komersial (ppm)	Absorbansi	Rata-rata Absorbansi	% Inhibisi (%)	Persamaan garis dan nilai IC ₅₀
10	0,278	0,2776	32,621	$y = 0,5864x + 26,655$ $R^2 = 0,9997$ $IC_{50} = 39,776 \text{ ppm}$
	0,277			
	0,278			
20	0,255	0,2546	38,203	
	0,255			
	0,254			
30	0,229	0,2290	44,417	
	0,229			
	0,229			
40	0,206	0,2060	50	
	0,206			
	0,206			
50	0,181	0,1810	56,068	
	0,181			
	0,181			

Rumus % Inhibisi = $\left(\frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$

$$\% \text{inhibisi } 10 \text{ ppm} = \left(\frac{0,412 - 0,2776}{0,412} \right) \times 100\% = 32,621\%$$

$$\% \text{inhibisi } 20 \text{ ppm} = \left(\frac{0,412 - 0,2546}{0,412} \right) \times 100\% = 38,203\%$$

$$\% \text{inhibisi } 30 \text{ ppm} = \left(\frac{0,412 - 0,2290}{0,412} \right) \times 100\% = 44,417\%$$

$$\% \text{inhibisi } 40 \text{ ppm} = \left(\frac{0,412 - 0,2060}{0,412} \right) \times 100\% = 50,00\%$$

$$\% \text{inhibisi } 50 \text{ ppm} = \left(\frac{0,412 - 0,1810}{0,412} \right) \times 100\% = 56,068\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung melalui persamaan garis linear yang dibuat dengan memplotkan antara konsentrasi dan %inhibisi. Persamaan yang didapat adalah $y = 0,5869x + 26,655$ dimana x adalah nilai yang dicari ketika $y = 50$.

Maka, $y = 0,5869x + 26,655$

$$50 = 0,5869x + 26,655$$

$$x = \left(\frac{50 - 26,655}{0,5869} \right) = 39,776 \text{ ppm atau } 0,039 \text{ mg/mL}$$

Lampiran 15. Hasil Absorbansi serum O.N1L1, perhitungan %Inhibisi dan IC₅₀

Absorbansi kontrol = 0,694

Konsentrasi serum O.N1L1 (ppm)	Absorbansi	Rata-rata Absorbansi	%Inhibisi (%)	Persamaan garis dan nilai IC ₅₀
50 ppm	0,403	0,4030	37,808	$y = 0,007x + 37,676$ $R^2 = 0,903$ $IC_{50} = 1.760,571 \text{ ppm}$
	0,403			
	0,403			
100 ppm	0,398	0,3980	38,580	
	0,398			
	0,398			
150 ppm	0,396	0,3960	38,888	
	0,396			
	0,396			
200 ppm	0,395	0,3953	38,977	
	0,396			
	0,395			
250 ppm	0,393	0,3930	39,352	
	0,393			
	0,393			

Rumus %Inhibisi = $\left(\frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$

$$\% \text{inhibisi } 50 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,4030}{0,648} \right) \times 100\% = 37,808\%$$

$$\% \text{inhibisi } 100 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3980}{0,648} \right) \times 100\% = 38,580\%$$

$$\% \text{inhibisi } 150 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3960}{0,648} \right) \times 100\% = 38,888\%$$

$$\% \text{inhibisi } 200 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3953}{0,648} \right) \times 100\% = 38,977\%$$

$$\% \text{inhibisi } 250 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3930}{0,648} \right) \times 100\% = 39,352\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung melalui persamaan garis linear yang dibuat dengan memplotkan antara konsentrasi dan %inhibisi. Persamaan yang didapat adalah $y = 0,007x + 37,676$ dimana x adalah nilai yang dicari ketika $y = 50$.

Maka, $y = 0,007x + 37,676$

$$50 = 0,007x + 37,676$$

$$x = \left(\frac{50 - 37,676}{0,007} \right) = 1.760,571 \text{ ppm atau } 1,176 \text{ mg/mL}$$

Lampiran 16. Hasil Absorbansi serum O.N3L3, perhitungan %Inhibisi dan IC₅₀

Absorbansi kontrol = 0,694

Konsentrasi serum O.N3L3 (ppm)	Absorbansi	Rata-rata Absorbansi	%Inhibisi (%)	Persamaan garis dan nilai IC ₅₀
50 ppm	0,404	0,4040	37,654	$y = 0,0069x + 37,412$ $R^2 = 0,9772$ $IC_{50} = 1.824,347 \text{ ppm}$
	0,404			
	0,404			
100 ppm	0,401	0,4003	38,225	
	0,4			
	0,4			
150 ppm	0,399	0,3986	38,487	
	0,399			
	0,398			
200 ppm	0,397	0,3966	38,796	
	0,397			
	0,396			
250 ppm	0,395	0,3946	39,105	
	0,395			
	0,394			

Rumus % Inhibisi = $\left(\frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$

$$\% \text{inhibisi } 50 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,4040}{0,648} \right) \times 100\% = 37,654\%$$

$$\% \text{inhibisi } 100 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,4003}{0,648} \right) \times 100\% = 38,225\%$$

$$\% \text{inhibisi } 150 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3986}{0,648} \right) \times 100\% = 38,487\%$$

$$\% \text{inhibisi } 200 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3966}{0,648} \right) \times 100\% = 38,796\%$$

$$\% \text{inhibisi } 250 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3946}{0,648} \right) \times 100\% = 39,105\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung melalui persamaan garis linear yang dibuat dengan memplotkan antara konsentrasi dan %inhibisi. Persamaan yang didapat adalah $y = 0,0069x + 37,412$ dimana x adalah nilai yang dicari ketika $y = 50$.

Maka, $y = 0,0069x + 37,412$

$$50 = 0,0069x + 37,412$$

$$x = \left(\frac{50 - 37,412}{0,0069} \right) = 1.824,347 \text{ ppm atau } 1,824 \text{ mg/mL}$$

Lampiran 17. Hasil absorbansi serum C.N1L1, perhitungan %inhibisi dan IC₅₀

Absorbansi kontrol = 0,694

Konsentrasi serum komersial (ppm)	Absorbansi	Rata-rata Absorbansi	%Inhibisi (%)	Persamaan garis dan nilai IC ₅₀
50 ppm	0,402	0,4016	38,025	$y = 0,007x + 37,985$ $R^2 = 0,8318$ $IC_{50} = 1.716,428 \text{ ppm}$
	0,402			
	0,401			
100 ppm	0,395	0,3956	38,951	
	0,396			
	0,396			
150 ppm	0,394	0,3936	39,259	
	0,393			
	0,394			
200 ppm	0,393	0,3930	39,352	
	0,393			
	0,393			
250 ppm	0,392	0,3916	39,568	
	0,392			
	0,391			

Rumus %Inhibisi = $\left(\frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$

$$\% \text{inhibisi } 50 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,4016}{0,648} \right) \times 100\% = 38,025\%$$

$$\% \text{inhibisi } 100 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3956}{0,648} \right) \times 100\% = 38,951\%$$

$$\% \text{inhibisi } 150 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3936}{0,648} \right) \times 100\% = 39,259\%$$

$$\% \text{inhibisi } 200 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3930}{0,648} \right) \times 100\% = 39,352\%$$

$$\% \text{inhibisi } 250 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3916}{0,648} \right) \times 100\% = 39,568\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung melalui persamaan garis linear yang dibuat dengan memplotkan antara konsentrasi dan %inhibisi. Persamaan yang didapat adalah $y = 0,007x + 37,985$ dimana x adalah nilai yang dicari ketika $y = 50$.

Maka, $y = 0,007x + 37,985$

$$50 = 0,007x + 37,985$$

$$x = \left(\frac{50 - 37,985}{0,007} \right) = 1.716,428 \text{ ppm atau } 1,7164 \text{ mg/mL}$$

Lampiran 17. Hasil absorbansi serum C.N3L3, perhitungan %inhibisi dan IC₅₀
Absorbansi kontrol = 0,694

Konsentrasi serum komersial (ppm)	Absorbansi	Rata-rata Absorbansi	%Inhibisi (%)	Persamaan garis dan nilai IC ₅₀
50 ppm	0,404	0,404	37,654	$y = 0,0113x + 36,972$ $R^2 = 0,9517$ $IC_{50} = 1.152,920$ ppm
	0,404			
	0,404			
100 ppm	0,401	0,400	38,179	
	0,401			
	0,4			
150 ppm	0,4	0,399	38,333	
	0,4			
	0,399			
200 ppm	0,399	0,397	39,197	
	0,396			
	0,396			
250 ppm	0,389	0,389	39,969	
	0,389			
	0,389			

$$\text{Rumus \%Inhibisi} = \left(\frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$$

$$\% \text{inhibisi } 50 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,4040}{0,648} \right) \times 100\% = 37,654\%$$

$$\% \text{inhibisi } 100 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,4006}{0,648} \right) \times 100\% = 38,179\%$$

$$\% \text{inhibisi } 150 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3996}{0,648} \right) \times 100\% = 38,333\%$$

$$\% \text{inhibisi } 200 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3970}{0,648} \right) \times 100\% = 39,197\%$$

$$\% \text{inhibisi } 250 \text{ ppm} = \left(\frac{0,648 - 0,3890}{0,648} \right) \times 100\% = 39,969\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung melalui persamaan garis linear yang dibuat dengan memplotkan antara konsentrasi dan %inhibisi. Persamaan yang didapat adalah $y = 0,0113x + 36,972$ dimana x adalah nilai yang dicari ketika $y = 50$.

Maka, $y = 0,0113x + 36,972$

$$50 = 0,0113x + 36,972$$

$$x = \left(\frac{50 - 36,972}{0,0113} \right) = 1.152,920 \text{ ppm atau } 1,153 \text{ mg/mL}$$