

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Antioksidan

Kulit manusia sebagai organ pembatas antara lingkungan dan organ manusia itu sendiri, secara terus menerus kontak dengan radiasi matahari dan substansi di lingkungan sekitar, dimana merangsang produksi radikal bebas di kulit. Radikal bebas memiliki aktivitas oksidatif yang kuat, dimana mereka dapat berinteraksi dan mengoksidasi DNA, lipid, dan protein dalam sel. Sebagai hasil dari interaksi tersebut, terjadi kerusakan membran sel yang menyebabkan kematian sel (Walters, 2008).

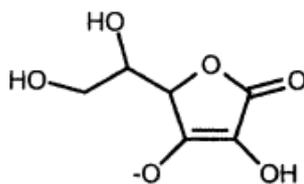
Secara umum ada 2 sumber radikal bebas dalam tubuh, yaitu sumber endogen dan eksogen. Sumber endogen berasal dari dalam tubuh manusia sendiri, seperti hasil dari respirasi mitokondria yang menghasilkan *superoxide* dan *hydrogen peroxide*, sembari enzim seperti *lipoxygenase*, *xantine oxidase* dan *NADPH oxidase* membentuk *hydroxyperoxide* dan superoksida (Barel *et al.*, 2006). Beberapa dari radikal tersebut berfungsi untuk kehidupan organisme, yang berfungsi untuk melawan virus dan bakteri. Sedangkan sisanya berbahaya untuk sel dan harus dinetralkan sebelum terjadi interaksi yang berbahaya (Walters *et al.*, 2008). Sedangkan sumber eksogen bisa berasal dari polutan di lingkungan sekitar seperti asap rokok, asap, radiasi UV, dan makanan (Barel *et al.*, 2006).

Sebagai respon adanya oksidan tersebut, antioksidan sistemik tersedia untuk melakukan proteksi terhadap efek negative dari substansi tersebut. Antioksidan sistemik tersebut meliputi antioksidan yang dimetabolisme oleh

tubuh sendiri berupa enzim seperti carotenoid (*beta-carotene*, *lycopene*, dan *lutein*) dan enzim (*superoxide dismutase*, *catalase* dan *glutathione peroxidase*) (Walters *et al.*, 2008). Sedangkan antioksidan dapat diperoleh juga dari makanan atau suplemen seperti vitamin C dan E dan lainnya (*flavonoid*, *lipoic acid*, *selenium*, *coenzyme Q10*, dll). Substansi tersebut melakukan proteksi pada intra dan interkompartemen. Biasanya akan terjadi keseimbangan antara produksi oksidan dan *oxidant scavenging*, namun pada kondisi tertentu terjadi ketidakseimbangan yang menyebabkan oksidan lebih banyak yang menyebabkan *oxidative stress*. *Oxidative stress* terjadi karena adanya peningkatan oksidan, seperti pada kondisi banyaknya paparan asap rokok atau terlalu sering terkena radiasi UV, atau karena defisiensi antioksidan. Adanya stress oksidatif pada kulit dapat menyebabkan kondisi seperti kanker kulit dan *photoaging* (Barel *et al.*, 2006). Karena itu penggunaan kosmetik yang mengandung antioksidan akan memiliki dampak yang sangat besar dalam penghambatan aktivitas radikal bebas pada kulit (Walters *et al.*, 2008).

2.1.1 Asam Askorbat

Asam askorbat (vitamin C) merupakan *six-carbone lactone* dimana disintesis dari glukosa dalam liver pada sebagian besar mamalia, kecuali manusia, primata, dan *guinea pigs*. Spesies tersebut tidak memiliki enzim *glulonolactone oxidase*, yang penting untuk sintesis asam askorbat. DNA yang mengkode *glulonolactone oxidase* mengalami mutasi sehingga menyebabkan tidak adanya enzim tersebut (Padayatty *et al.*, 2003). Akibat dari tidak mampunya manusia untuk mensintesis asam askorbat, menyebabkan kebutuhan asam askorbat harus disediakan oleh makanan atau suplemen (Barel *et al.*, 2006).

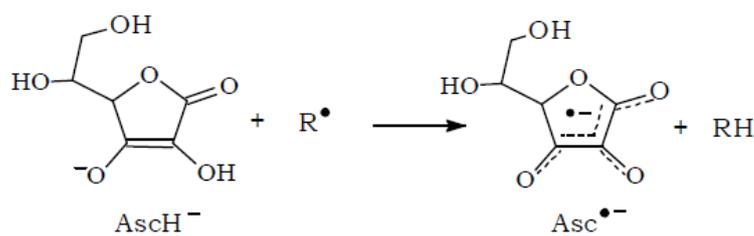


Gambar 2.1 Struktur Kimia Asam Askorbat (Barel et al., 2006)

Asam askorbat atau vitamin C memiliki berbagai aktivitas biologis. Asam askorbat diperlukan untuk keseimbangan kulit sehat, gusi, dan pembuluh darah. Selain itu berfungsi untuk pembentukan kolagen, absorpsi besi anorganik, menurunkan level kolesterol plasma, menghambat pembentukan *nitrosoamone*, perbaikan sistem imun, dan bereaksi dengan radikal bebas (Rekha et al., 2012).

Asam askorbat adalah bahan yang larut air dan sering diformulasikan untuk produk perawatan kulit. Vitamin ini dikenal sebagai agen pereduksi dalam sistem biologis dan dapat menyebabkan reduksi radikal bebas berbasis oksigen dan nitrogen.

Asam askorbat bekerja secara fisiologis sebagai antioksidan larut air dengan kemampuan mereduksi yang dimilikinya. Vitamin ini merupakan donor elektron dan agen pereduksi. Seluruh aksi fisiologis dan biokimia dari asam askorbat yang diketahui adalah karena fungsinya sebagai donor elektron. Asam askorbat menyumbangkan dua elektron dari *double bond* antara karbon kedua dan ketiga dari molekul *six-carbone*. Vitamin C disebut sebagai antioksidan karena dengan menyumbangkan kedua elektron tersebut, dapat mencegah komponen lain untuk teroksidasi. Namun di sisi lain, dengan adanya reaksi alami, vitamin C sendiri dapat teroksidasi dalam proses tersebut (Padayatty et al., 2003).



Gambar 2.2 Asam Askorbat sebagai donor elektron sebagai antioksidan (Buettner, 1997)

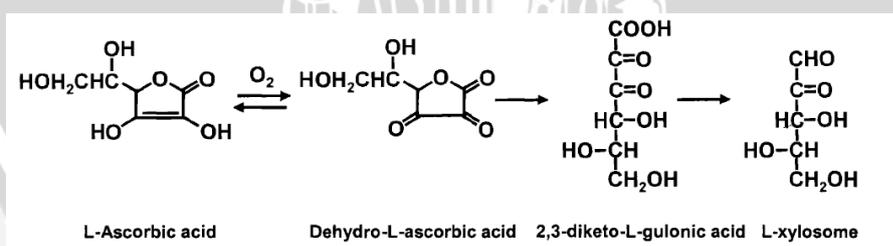
Perlu diperhatikan saat asam askorbat mendonorkan elektronnya, mereka kehilangan bagian dari rangkaiannya. Substansi yang terbentuk saat mereka kehilangan satu elektron merupakan radikal bebas, *semidehydroascorbic acid* atau *ascorbyl radical*. Dibandingkan dengan radikal bebas yang lain, *ascorbyl radical* relatif lebih stabil dan tidak reaktif. Radikal bebas yang reaktif dan berbahaya dapat berinteraksi dengan asam askorbat. Radikal bebas reaktif tereduksi, dan asam askorbat berubah menjadi sedikit reaktif. Proses reduksi radikal bebas reaktif disertai dengan pembentukan komponen yang sedikit reaktif disebut dengan *radical scavenging* atau *quenching*. Asam askorbat merupakan *radical scavenging* yang baik dilihat dari struktur kimianya (Padayatty *et al.*, 2003).

Ascorbyl radical, dengan elektron tidak berpasangannya, merupakan komponen yang tidak bertahan lama. Saat kehilangan elektron keduanya, komponen ini berubah membentuk *dehydroascorbic acid*. Stabilitas *dehydroascorbic acid* dipengaruhi oleh temperatur dan pH, namun hanya beberapa saat saja. Pembentukan *ascorbyl radical* dan *dehydroascorbic acid* dimediasi oleh berbagai oksidan di dalam tubuh, termasuk oksigen molekular,

superoksida, *hydroxyl radical*, *hypochlorous acid*, nitrogen reaktif dan logam seperti besi dan tembaga (Padayatty *et al.*, 2003).

Asam askorbat yang tersedia adalah dalam bentuk serbuk yang merupakan bentuk yang stabil. Namun kestabilan asam askorbat menurun saat dilarutkan dalam air. Faktor dari lingkungan seperti temperatur, pH, oksigen, ion logam, sinar UV, dan efek x-ray mempengaruhi stabilitasnya. Pada makanan dan kosmetik, ketidakstabilan asam askorbat selain mempengaruhi efeknya juga mempengaruhi bentuk sediaan itu sendiri. Asam askorbat akan berubah warna saat teroksidasi (Wilson, 2007).

Degradasi asam askorbat terjadi melalui proses oksidasi dan reduksi yang kompleks. Gambar 2.5 akan menunjukkan bagaimana asam askorbat teroksidasi dalam air. Saat dilarutkan dalam air, asam askorbat akan teroksidasi menjadi *dehydroascorbic acid* yang sangat tidak stabil dalam air. Kemudian *dehydroascorbic acid* dapat membentuk substansi lain seperti *2,3-diketo-1-gulonic acid*. Proses degradasi dari asam askorbat dimulai saat terjadi ionisasi pada gugus hidroksi dari asam askorbat (Lee *et al.*, 2004).



Gambar 2.3 Degradasi Asam Askorbat dalam Air (Lee *et al.*, 2004)

Asam askorbat memiliki banyak manfaat pada kulit. Asam askorbat topikal melindungi kerusakan kulit akibat sinar matahari dengan bertindak sebagai antioksidan yang menonaktifkan *UV-induced free radicals*, yang berbentuk anion

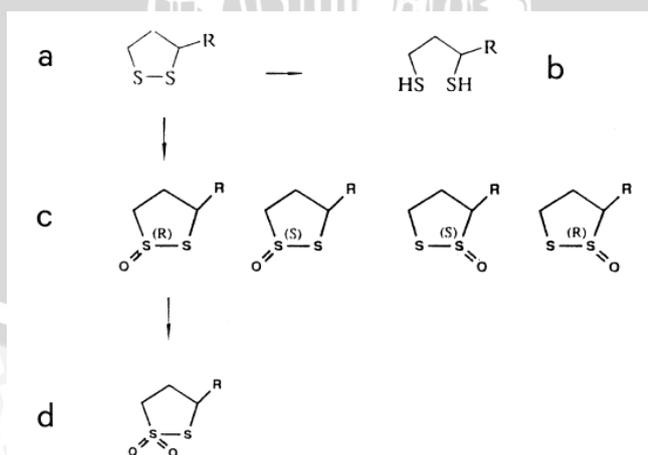
superoksida, *singlet oxygen*, dan radikal hidroksil. Asam askorbat efektif dalam melindungi kulit dari UVB (290-320 nm) dan UVA (320-400 nm). Aplikasi asam askorbat dapat mengurangi eritema akut dan efek *sunburn* ketika diaplikasikan setelah terkena paparan sinar matahari (Draelos dan Thaman, 2006). Selain itu asam askorbat juga berperan sebagai antiinflamasi. Fungsi utama dari asam askorbat adalah menstimulasi secara langsung sintesis kolagen. Asam askorbat merupakan *co-faktor* dari 2 enzim yang berperan dalam sintesis kolagen, yaitu *prolyl hydroxylase* dan *lysyl hydroxylase*. Asam askorbat bekerja pada DNA untuk meningkatkan kecepatan transkripsi untuk menstabilkan RNA *pro-collagen messenger*, dimana akan meregulasi dan menyeimbangkan interseluler dari kolagen. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa asam askorbat memiliki efek *antiaging*. Asam askorbat tidak hanya meningkatkan proliferasi fibroblas, namun juga meningkatkan sintesis kolagen, seperti dijelaskan sebelumnya. Selain itu asam askorbat juga meningkatkan sintesis lipid spesifik di kulit, yang dapat meningkatkan kelembaban alami kulit dan meningkatkan fungsi barrier pada kulit (Draelos dan Thaman, 2006).

Penggunaan asam askorbat sendiri untuk sediaan topikal, khususnya kosmetik masih jarang, karena ketidakstabilannya. Asam askorbat dengan mudah akan tereduksi menjadi *dehydroascorbic acid* pada air, yang merupakan bentuk tidak aktifnya, sehingga akan mengurangi efektifitasnya sebagai antioksidan. Pada kosmetik, sebagian besar yang digunakan adalah derivat vitamin C, seperti *ascorbyl palmitate* karena lebih stabil jika digunakan untuk kosmetik. *Ascorbyl palmitate* larut dengan baik dalam lemak atau minyak. Namun ternyata derivat asam askorbat ini tidak dapat diabsorpsi dengan baik ke dalam stratum corneum dibandingkan dengan asam askorbat. *Ascorbyl*

palmitate memperlihatkan hasil yang tidak baik dalam melindungi kulit terhadap *photoaging* dibandingkan dengan asam askorbat. Meskipun *ascorbyl palmitate* mampu diabsorpsi ke dalam kulit, namun konversinya menjadi asam askorbat tidak efisien, karena penelitian menunjukkan bahwa *ascorbyl palmitate* masih terlihat di ekstrasel dan tidak dikonversi menjadi asam askorbat (Pinnell *et al.*, 2001). Karena itu penggunaan asam askorbat sebenarnya masih menjadi pilihan untuk digunakan dalam kosmetik namun kestabilannya masih menjadi hal yang harus diperbaiki dalam proses pembuatan sediaan topikal.

2.1.2 Alpha Lipoic Acid (ALA)

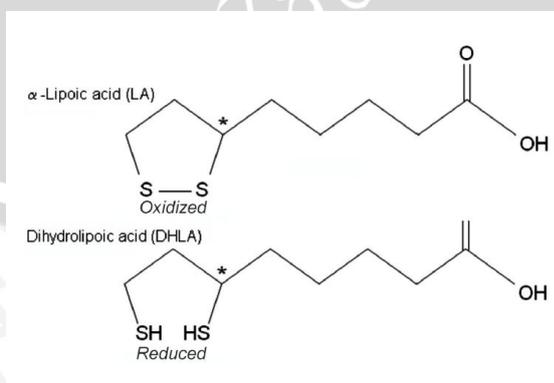
Alpha lipoic acid (ALA) atau yang biasa disebut *lipoic acid* (LA) (1,2-dithiolane-3-pentanoic acid) memiliki nama lain *thioctic acid*, *6,6-thioctic acid* dan *1,2-dithiol-3valeric acid*. LA merupakan 8-karbon disulfida yang memiliki sebuah *chiral* pusat, dan sebuah karbon asimetris yang menghasilkan dua isomer optik yaitu R-LA dan S-LA (Goraca *et al.*, 2011).



Gambar 2.4 Struktur Kimia ALA dan isomernya. a, ALA, b, DHLA, c R-isomer dan S-isomer, d, versi thiosulfonate. R menyimbolkan asam pentanoat (Perricone *et al.*, 1999)

R-isomer disintesis secara endogen dan berikatan dengan protein. Untuk tujuan terapeutik, R-isomer biasanya dikombinasikan bersama dengan S-isomer (Goraca *et al.*, 2011). LA terdapat di semua sel eukariot dan prokariot. Pada tubuh manusia, ini merupakan bagian dari *2-oxo acid dehydrogenase* yang memiliki peran dalam pembentukan energi (Biewenga *et al.*, 1997).

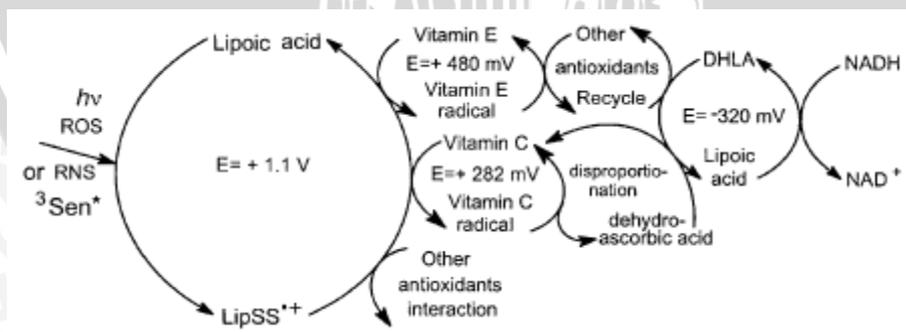
Lipoic acid merupakan molekul kecil yang terdiri dari dua, gugus tiol teroksidasi dan tereduksi. Bentuk teroksidasinya disebut *alpha lipoic acid*, atau *lipoic acid*, dan bentuk tereduksinya dikenal sebagai *dihydrolipoic acid* (DHLA) (Goraca *et al.*, 2011). *Lipoic acid* berikatan dengan gugus asil, dan tereduksi menjadi *dihydrolipoic acid* (DHLA). Secara umum, ALA dan DHLA berperan sebagai pasangan redoks, yang membawa elektron yang merupakan substrat dari *dehydrogenase* ke NAD^+ (Biewenga *et al.*, 1997). DHLA merupakan bentuk predominan yang berinteraksi dengan *reactive oxygen species* (ROS), namun bentuk teroksidasinya, yaitu LA juga memiliki aktivitas untuk menonaktifkan radikal bebas (Goraca *et al.*, 2011). Pada beberapa kondisi tertentu justru ALA memiliki efek yang lebih kuat sebagai antioksidan dibanding dengan bentuk tereduksinya, DHLA (Li dan Liu, 2002).



Gambar 2.5 *AlphaLipoic Acid* dan *Dihidrolipoic Acid* (Goraca *et al.*, 2011)

Secara alami ALA ditemukan di mitokondria dimana berikatan subunit E2, yang memiliki peran sebagai koenzim untuk *pyruvate dehydrogenase* dan *alpha-ketoglutarate dehydrogenase* (Goraca *et al.*, 2011). ALA berikatan dengan protein dan konsekuensinya, ALA bebas tidak terdeteksi di tubuh manusia. Namun setelah diaplikasikan, *alpha lipoic acid* bebas bisa ditemukan dalam sirkulasi. Efek terapeutik dihasilkan dari ALA bebas, ALA yang tidak berikatan. Sedangkan ALA yang berikatan tidak memberikan efek farmakologis (Biewenga *et al.*, 1997).

ALA memiliki reaksi yang kuat dengan peroksinitrit, O₂, HOCl, OH⁻, CCl₃OO, dan *triplet duroquinolone*. Interaksi dengan agen-agen tersebut menyebabkan pembentukan dari LipSS⁺, atau bentuk kation dari ALA. Bentuk ini bersifat radikal dan mampu berinteraksi dengan *fotosensitizer* endogen. Bila telah terbentuk kation ini dan tidak segera dirubah menjadi bentuk ALA kembali, maka kation ini dapat menjadi ROS dan menyebabkan *oxidation damage* pada sel. Namun penelitian menunjukkan bahwa vitamin C mampu merubah kembali LipSS⁺ menjadi ALA (Li dan Liu, 2002).



Gambar 2.6 Interaksi Sinergis dari ALA Teroksidasi dan Tereduksi dengan Antioksidan Lain (Li dan Liu, 2002)

ALA relatif stabil dalam bentuk solid, namun akan membentuk polimer saat dipanaskan melebihi titik didihnya (47,5° C) atau terpengaruh cahaya saat dilarutkan dalam larutan netral (Goraca *et al.*, 2011).

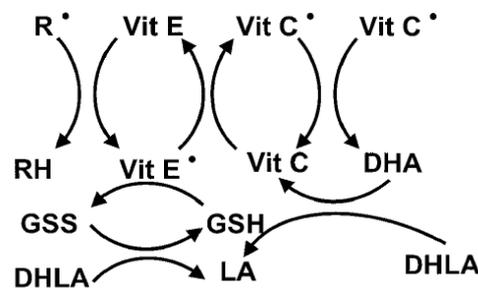
ALA dan DHLA sebagai antioksidan memiliki beberapa fungsi, seperti:

1. ALA sebagai antioksidan biologis

ALA menjadi antioksidan yang sangat poten karena memiliki kemampuan untuk larut di air dan lemak, selain itu mudah dikonversi oleh jaringan menjadi bentuk yang mudah digunakan. LA sebagai antioksidan dapat berperan secara langsung dalam melawan ROS. Fungsi LA sebagai antioksidan sudah terbukti dapat mereduksi *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase*, mengembalikan GSH/GSSG dan meningkatkan ekspresi mitokondria untuk enzim antioksidan, termasuk *glutathione reductase* (Goraca *et al.*, 2011).

2. Meregenerasi antioksidan lain

Antioksidan merupakan komponen yang dapat mencari radikal bebas dan berikatan dengan mereka. DHLA merupakan agen pereduksi yang poten dan memiliki aktivitas antioksidan lebih baik daripada ALA dalam mereduksi antioksidan lain, seperti vitamin C dan vitamin E. DHLA lebih poten dalam meregenerasi vitamin C. DHLA mungkin dapat mereduksi *alpha-tocoperol radical* langsung atau tidak langsung dengan mereduksi bentuk teroksidasi dari vitamin C, dimana mampu untuk mereduksi radikal tersebut. Selain itu, DHLA mampu untuk mereduksi bentuk teroksidasi dari *coenzyme Q10*. ALA dapat secara langsung meregenerasi dan memperpanjang waktu hidup dari vitamin C, glutation, dan *coenzyme Q10*, dan secara tidak langsung memperbarui vitamin E (Goraca *et al.*, 2011).



Gambar 2.7 ALA dan DHLA meregenerasi antioksidan lain seperti vitamin C dan E (Evans dan Goldfine, 2000)

3. ALA sebagai pengkelat logam

ALA dan DHLA sebagai ROS *scavenger*, dapat mengkelat redoks aktif logam, seperti besi, tembaga, mangan, dan zinc bebas baik *in vitro* maupun *in vivo*. Logam-logam tersebut dapat menginduksi *oxidative damage* dengan mengkatalis reaksi yang menyebabkan radikal bebas yang sangat reaktif. Komponen yang dikelat oleh ALA dapat mencegah terjadinya penyakit kronis yang disebabkan karena kerusakan organ akibat radikal bebas seperti logam bebas. ALA dapat mengkelat Cu^{2+} , Zn^{2+} , dan Pb^{2+} , namun tidak Fe^{3+} . Sedangkan DHLA mampu membentuk kompleks dengan Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , dan Fe^{3+} (Goraca *et al.*, 2011).

ALA dapat diaplikasikan di kulit melalui sediaan topikal. ALA memiliki beberapa manfaat di kulit seperti *whitening agent* dan *skin rejuvenating agent* (untuk memudahkan kulit).

ALA dapat berperan sebagai *whitening agent* melalui 2 mekanisme, yaitu memberikan efek pada pembentukan melanin dan mengurangi pigmentasi. Secara *in vitro* ALA terbukti mampu menekan pembentukan melanin pada sel melanoma, sehingga sangat potensial sebagai *whitening agent* pada kulit. Sedangkan secara *in vivo*, pemberian ALA secara topikal mampu

mengurangi pigmentasi yang disebabkan oleh sinar UV pada *guinea pigs* (Oryza, 2004).

ALA juga memiliki efek sebagai *skin rejuvenating agent*. Secara *in vitro*, ALA terbukti mampu menstimulasi pertumbuhan dari fibroblast manusia, dimana akan membuat kulit lebih lembut dan membuat kulit tua tampak lebih muda. Selain itu secara *in vitro* pada *skin cell* model, ALA terlihat mampu meningkatkan pergantian kulit dan membuat kulit lebih lembut (Oryza, 2004).

2.2 Kulit

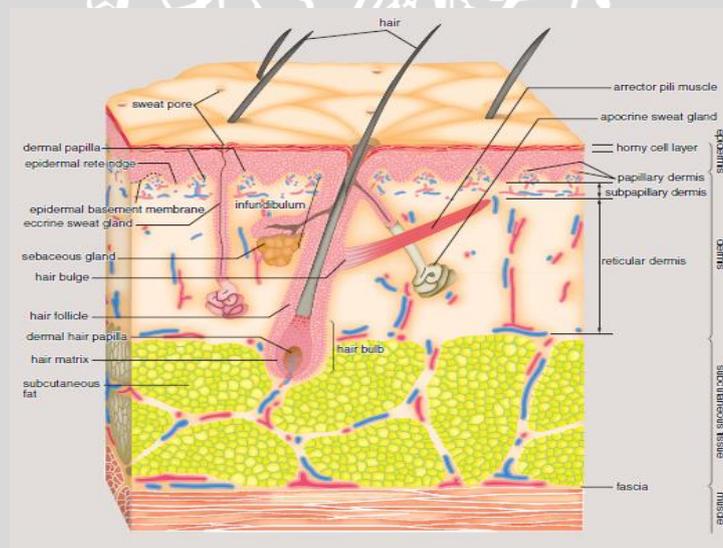
Kulit merupakan organ terbesar pada tubuh. Kulit memberikan penghalang fisik maupun kimia dan memberikan perlindungan terhadap pengaruh lingkungan. Kulit memiliki banyak *transducer* yang menyalurkan sinyal menuju ke otak untuk diproses. Kulit juga bertanggung jawab terhadap penampilan luar, yang kemudian menciptakan citra unik sehingga dapat dikenali dan diidentifikasi oleh organisme lain (Schueller *et al.*, 1999).

Kulit dibentuk dalam waktu 30-40 hari dan terdiri dari dua lapisan utama, yaitu lapisan epidermis dan dermis. Lapisan epidermis merupakan lapisan terluar dan menyusun sebagian besar keratinosit, yang memiliki komponen protein utama keratin. Epidermis juga mengandung melanosit, dimana memproduksi pigmen yang disebut melanin dan memproduksi sel imun special yaitu sel Langerhans. Lapisan ini dibagi menjadi beberapa lapisan fungsional yaitu stratum spinosum, stratum granulosum, dan stratum corneum. Stratum corneum merupakan lapisan terluar epidermis, terdiri dari 15-20 lapisan yang berfungsi

untuk melindungi lapisan di bawahnya dan melindungi dari kerusakan saraf (Schueller *et al.*, 1999).

Area di antara epidermis dan dermis dikenal dengan sebutan *epidermal-dermal junction*. Di bawah lapisan ini terdapat lapisan dermis, yang merupakan jaringan ikat tebal yang terdiri dari serat kolagen, serat elastis dan gel interfibrillar dari *glycosaminoglycan*. Kolagen disintesis oleh fibroblast dan bertanggungjawab pada kekuatan dan lemak bebas kulit (Schueller *et al.*, 1999).

Dermis terdiri atas dua bagian, yaitu *papillary dermis* dan *reticular dermis*. *Papillary dermis* mengandung kolagen dan serat elastis serta fibronektin. *Glycosaminoglikan* berfungsi untuk menyeimbangkan homeostasis air pada kulit. *Reticular dermis* terdiri dari kolagen dan jaringan ikat yang tidak mengandung banyak pembuluh darah dan *glycosaminoglikan* (Schueller *et al.*, 1999).



Gambar 2.8 Struktur Kulit (Shimizu, 2007)

Kulit secara kontinu mengalami regenerasi dan mengganti sel-sel tua, kemudian mengelupas dari stratum korneum. Adanya luka di epidermis bisa

diperbaiki tanpa meninggalkan bekas apapun, namun luka di dermis bisa meninggalkan bekas di kulit. Kulit mengalami pergantian setiap 2 bulan. Jadi produk kosmetik akan terlihat efeknya di kulit setidaknya selama 2 bulan (Schueller *et al.*, 1999).

2.3 Emulsi

Emulsi merupakan campuran antara dua material yang tidak dapat terlarut dimana distabilkan untuk melawan pemisahan antar keduanya (Barel *et al.*, 2006). Berdasarkan Farmakope Indonesia IV, emulsi adalah sistem dua fasa yang salah satu cairannya terdispersi dalam cairan lain dalam bentuk tetesan kecil, secara umum emulsi digunakan untuk produk farmasi dan kosmetik (Depkes RI, 1995). Emulsi terdiri dari dua fase yang tidak saling bercampur, satu fase sebagai fase luar dan fase dalam yang terdispersi secara homogen sebagai droplet. Kedua fase tidak stabil dapat distabilkan dengan adanya pengemulsi (Lund, 1994). Ada dua tipe emulsi secara umum, yaitu emulsi minyak dalam air (m/a) dan emulsi air dalam minyak (a/m). Emulsi m/a merupakan jenis emulsi yang paling banyak diformulasikan karena tidak berminyak di kulit dan membutuhkan biaya formulasi yang rendah karena mengandung lebih banyak air (Barel *et al.*, 2006).

Emulsi m/a mengandung 10-35% fase minyak, sedangkan emulsi dengan viskositas rendah mengandung fase minyak sebanyak 5-15%. Air sebagai fase luar dari emulsi membantu hidrasi stratum corneum pada kulit. Hal ini dibutuhkan jika ingin menggabungkan zat aktif yang larut dengan pembawanya. Tetesan minyak memiliki densitas yang lebih rendah daripada fase dimana mereka disuspensikan sehingga untuk memperoleh emulsi yang stabil dibutuhkan

penyesuaian berat jenis minyak dan air secara maksimal. Viskositas fase air sebagai fase luar bisa ditingkatkan untuk menghambat fase minyak naik. Penambahan wax ke dalam fase minyak bisa meningkatkan berat jenis, namun akan mempengaruhi penampilan, tekstur dan rasa saat diaplikasikan ke kulit. Peningkatan berat jenis fase air merupakan pendekatan yang paling umum dilakukan (Barel *et al.*, 2006).

2.3.1 Krim

Krim didefinisikan sebagai cairan kental atau emulsi setengah padat bertipe air dalam minyak atau minyak dalam air. Krim banyak digunakan sebagai emolien atau pemakaian obat pada kulit. Istilah krim secara luas digunakan dalam farmasi dan industri kosmetik. Krim umumnya lebih mudah menyebar daripada penggunaan salep, dan jenis krim minyak dalam air lebih mudah dibersihkan daripada krim air dalam minyak atau salep (Ansel, 1989).

Krim banyak digunakan sebagai sediaan pembawa zat aktif dalam kosmetik. Krim m/a banyak dijadikan pilihan dalam kosmetik karena penggunaannya yang lebih nyaman daripada krim a/m. Krim m/a tidak akan meninggalkan kesan lengket seperti krim a/m karena pembawanya adalah air. Namun krim jenis ini memiliki kekurangan seperti mudah menguap, sehingga penggunaannya harus dilakukan berulang.

Ada beberapa kualitas krim yang harus dipenuhi untuk kosmetik yaitu (Ditjen POM, 1985):

1. Mudah dioleskan pada kulit
2. Mudah dicuci bersih dari daerah lekatan
3. Tidak menodai pakaian

4. Tidak berbau tengik
5. Bebas partikulat keras dan tajam
6. Tidak mengiritasi kulit

2.3.2 Pemilihan pH Sediaan

Kulit merupakan organ yang melindungi tubuh dari paparan lingkungan. Kulit melindungi seluruh organ tubuh dan menutupi seluruh permukaan tubuh. Kulit mengandung kelenjar keringat dan kelenjar sebum (kelenjar minyak) yang dapat mempengaruhi pH (tingkat keasaman) dari kulit. pH kulit normal berkisar antara 4,5-6,5 (Walters *et al.*, 2008). Sedangkan kulit wajah memiliki pH antara 4,0-4,9 dan daerah dahi memiliki pH 4,5-5,6. Kulit memiliki pH asam karena adanya produksi dari asam amino, asam laktat, sekresi sebum yang mengandung protein dan sekresi keringat pada kulit yang mengandung ammonia dan hydrogen (Korting *et al.*, 1996).

Sediaan yang digunakan mengandung asam askorbat (vitamin C) sehingga pH sediaan menjadi asam (sekitar 3,5- 4). Pemilihan pH sediaan pada rentang pH tersebut karena asam askorbat diabsorbsi secara baik pada pH 3,5 atau kurang (Pinnel *et al.*, 2001). Asam askorbat dapat diabsorbsi dengan baik pada pH tersebut karena pH merupakan substansi asam yang akan lebih mudah larut pada suasana asam. Namun tidak dipilih sediaan dengan pH kurang dari 3,5 karena ditakutkan akan mengiritasi kulit.

2.3.3 Pemerian

1. Asam Stearat

Asam stearat merupakan zat yang secara luas digunakan pada formulasi kosmetik. Zat ini berfungsi sebagai *emulsifier* dan *solubilizing agent*. Jika dinetralisasi parsial menggunakan *neutralizer*, maka asam stearat dapat membentuk basis krim ketika dicampur selama 5-15 menit pada cairan berair. Untuk penggunaan pada krim, digunakan sebanyak 1-20%. Asam stearat merupakan material yang stabil dan inkompatibel dengan agen pengoksidasi. Asam stearat memiliki titik didih $>54^{\circ}\text{C}$ (Rowe *et al.*, 2009).

2. Setil alkohol

Setil alkohol digunakan secara luas pada formulasi kosmetik sebagai *emollient* dan *stiffening agent*. Agen ini dapat meningkatkan stabilitas, memperbaiki tekstur, dan meningkatkan konsistensi. Sedangkan fungsi emollient dari setil alkohol karena arbsosi dan retensi dari agen ini pada epidermis yang dapat melubrikasi dan menghaluskan kulit. Untuk *stiffening agent* digunakan konsentrasi 2-10%. Setil alkohol leleh pada suhu $45-52^{\circ}\text{C}$, stabil pada asam, alkali, cahaya dan udara (Rowe *et al.*, 2009).

3. Propilenglikol

Propilenglikol digunakan secara luas sebagai pelarut pada formulasi parenteral maupun nonparenteral. Merupakan pelarut yang lebih baik daripada gliserin dan melarutkan berbagai material seperti vitamin, alkaloid, dan anaestesi lokal. Propilenglikol digunakan dalam kosmetik sebagai pembawa dari *emulsifier*. Propilenglikol tidak mudah menguap.

Untuk pelarut pada sediaan topikal, digunakan konsentrasi 5-80% pada sediaan (Rowe *et al.*, 2009).

4. Aquades

Aquades merupakan zat yang secara luas digunakan pada formulasi kosmetik yang berfungsi sebagai pelarut. Untuk penggunaan pada krim, aquades digunakan tidak terbatas/sesuai kebutuhan. Aquades merupakan material yang stabil dan bereaksi dengan bahan-bahan yang mudah terhidrolisis, alkali metal dan oksidanya. Aquades memiliki titik didih 100° C (Rowe *et al.*, 2009).

5. Metilparaben

Metilparaben merupakan zat yang secara luas digunakan pada formulasi kosmetik yang berfungsi sebagai antimikroba atau pengawet. Metilparaben memiliki nama lain nipagin. Metilparaben dapat bekerja optimum apabila dikombinasikan dengan propilparaben. Untuk penggunaan pada krim, digunakan sebanyak 0.02-0.3%. Metilparaben merupakan material yang stabil pada pH 3-6 dan inkompatibel dengan zat tambahan seperti bentonit, talk, tragakan, minyak esensial, sorbitol, dan atropin. Metilparaben memiliki titik leleh 125-128° C (Rowe *et al.*, 2009).

6. Propilparaben

Propilparaben merupakan zat yang secara luas digunakan pada formulasi kosmetik yang berfungsi sebagai antimikroba atau pengawet. Propilparaben memiliki nama lain nipasol. Propilparaben dapat bekerja optimum apabila dikombinasikan dengan metil paraben. Untuk penggunaan pada krim, digunakan sebanyak 0.01-0.6%. Propilparaben

merupakan material yang stabil pada pH 3-6 dan aktivitas pengawet berkurang dengan adanya surfaktan non ionik akibat miselasi. Efikasi propilparaben dapat menurun akibat magnesium trisilicate, aluminium sitrat, magnesium aluminium silikat, *yellow non oxide*, dan *ultramarine* biru. Propilparaben memiliki titik didih 295° C (Rowe *et al.*, 2009).

2.3.4 Rasionalisasi Formula

1. Fase Minyak

a. *Emulsifier*

Pada formula ini digunakan asam stearat sebagai *emulsifier* karena asam stearat umumnya digunakan sebagai emulgator (Rowe *et al.*, 2009), Asam stearat digunakan untuk penggunaan pada krim sebanyak 1-20% (Rowe *et al.* 2009), dan dipilih konsentrasi 12%.

b. *Thickener*

Pada formula ini setil alkohol digunakan sebagai *thickener* untuk meningkatkan stabilitas, memperbaiki tekstur, dan meningkatkan konsistensi. Selain itu, setil alkohol juga dapat berfungsi sebagai *emollient* karena arbsosi dan retensi dari agen ini pada epidermis dapat melubrikasi dan menghaluskan kulit. Untuk *stiffening agent* digunakan konsentrasi 2-10%. Dipilih konsentrasi 3% berdasarkan formula krim vitamin C (Ahmad, *et al.*, tahun 2011).

c. *Basis Minyak*

Parrafin *liquid* (mineral oil) digunakan sebagai alternatif basis minyak untuk krim. Dipilih konsentrasi 5% karena rentang penggunaan

paraffin liquid untuk penggunaan pada emulsi topikal yaitu 1.0–32.0% (Rowe *et al.*, 2009).

2. Fase Air

a. Pelarut

Pelarut pada formula ini digunakan untuk melarutkan bahan-bahan yang tidak larut dalam air, atau terdegradasi jika dilarutkan dalam air. Pelarut yang digunakan adalah propilenglikol. Alasan penggunaan pelarut ini karena memiliki kemampuan melarutkan bahan yang lebih baik daripada gliserin. Selain itu berdasarkan penelitian, propilenglikol memiliki kemampuan yang baik dalam melarutkan vitamin C dan menjaga stabilitas vitamin C dalam larutan.

b. Aquades

Merupakan air yang telah dihilangkan ion di dalamnya melalui proses distilasi. Alasan penggunaan air jenis ini untuk memperkecil kemungkinan tumbuhnya bakteri dan adanya interaksi zat aktif maupun tambahan dengan ion yang ada di air seperti ion logam atau ion lain.

c. Pengawet

Pada formula ini digunakan kombinasi pengawet metilparaben dan propilparaben. Digunakan kombinasi untuk memaksimalkan efek dari antimikroba karena sediaan merupakan krim m/a yang mengandung air lebih banyak sehingga lebih rentan menjadi tempat tumbuh bakteri. Propilparaben digunakan sebagai pengawet, dipilih konsentrasi 0,02 karena rentang penggunaan propilparaben adalah 0,01–0,6% (Rowe *et al.*, 2009). Metilparaben digunakan sebagai

pengawet, dipilih konsentrasi 0,18 karena rentang penggunaan metilparaben adalah 0,02–0,3. Sehingga total penggunaan paraben dalam sediaan ini adalah sebesar 0,2% , tidak melebihi ketentuan maksimal yaitu 0,8% (Rowe *et al.*, 2009).

3. Formula Alternatif

Formula alternatif digunakan untuk dibandingkan dengan formula utama. Pada penelitian ini formula alternatif ditandai dengan formula 2. Sedangkan formula utama ditandai dengan formula 1. Pada formula alternatif, digunakan kombinasi *emulsifier*, yaitu menggunakan asam stearat dan sorbitan stearat. Selain itu jumlah KOH yang digunakan lebih sedikit daripada formula 1 karena ditambahkan fase minyak lain sebagai basis. Digunakan *mineral oil*, *paraffin liquid*, yang ditambahkan dalam fase minyak. Pemilihan basis ini karena *paraffin liquid* digunakan secara luas sebagai basis krim kosmetik. Konsentrasi yang digunakan yaitu 5%, karena rentang penggunaan *paraffin* sebanyak 1-32% (Rowe *et al.*, 2009).

2.4 Stabilitas Sediaan Farmasi

Stabilitas sediaan farmasi merupakan kemampuan dari suatu sediaan untuk mempertahankan spesifikasi yang tentukan untuk menjamin kualitasnya. Spesifikasi dipertahankan sampai batas yang ditentukan selama periode penyimpanan dan penggunaan, sifat dan karakteristinya sama dengan saat sediaan dibuat. Sediaan dikatakan tidak stabil bila terjadi perubahan fisik dan perubahan kemampuan atau fungsi dari spesifikasi yang ditentukan. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi stabilitas, yaitu (Vadas, 2000):

1. Faktor lingkungan, seperti suhu, udara, cahaya dan kelembaban
2. Zat aktif atau ekspien. Ukuran zat aktif mempengaruhi kestabilan dan adanya ekspien yang kemungkinan bereaksi dengan zat aktif
3. Kontaminasi mikroba
4. Kontaminasi logam
5. Adanya reaksi dengan wadah

Stabilitas dibagi menjadi 3 tipe, yaitu stabilitas fisik, stabilitas kimia, dan stabilitas mikrobiologi.

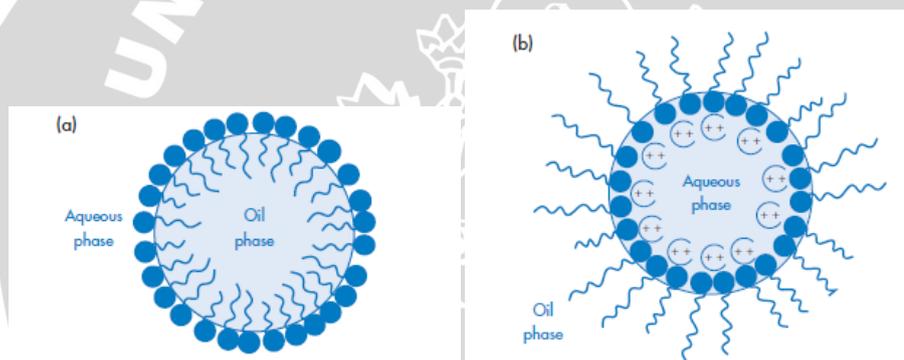
2.4.1 Stabilitas Fisik

Stabilitas fisik mengharuskan suatu sediaan secara keseluruhan tidak mengalami perubahan fisik selama masa penyimpanan, baik pada penampilannya, organoleptik, kekerasan, dan ukuran partikel karena akan mempengaruhi homogenitas zat aktif dan pelepasan zat aktif (Vadas, 2000). Kestabilan emulsi dipengaruhi oleh kestabilan air dan minyak dalam emulsi (Attwood dan Florence, 2008).

Adsorpsi dari surfaktan pada permukaan air atau minyak, dimana berfungsi untuk menurunkan tegangan permukaan, membantu proses dispersi dari air menjadi bentuk droplet yang berukuran kecil dan membantu untuk menyeimbangkan partikel pada fase terdispersi. Saat tegangan permukaan bernilai nol, secara alami droplet minyak akan bergabung untuk mengurangi area kontak minyak-air. Namun adanya surfaktan pada permukaan droplet akan mencegah terjadinya proses penggabungan ini dan terjadi *coalescence*. Surfaktan akan meningkatkan atau menurunkan zeta potensial yang kemudian

membentuk lapisan terhidrasi pada partikel hidrofobik pada emulsi m/a (Attwood dan Florence, 2008).

Emulsi merupakan bentuk yang lebih kompleks daripada suspensi karena adanya kemungkinan surfaktan berbindah dari fase luar ke fase dalam, terbentuknya misel pada kedua fase, dan terbentuknya fase kristal liquid antara droplet yang terdispersi. Penggunaan kombinasi surfaktan diketahui mampu membentuk emulsi yang lebih stabil daripada penggunaan surfaktan tunggal. Ini disebabkan karena pada penggunaan kombinasi surfaktan akan membentuk lapisan penstabil yang lebih kaku (Attwood dan Florence, 2008).

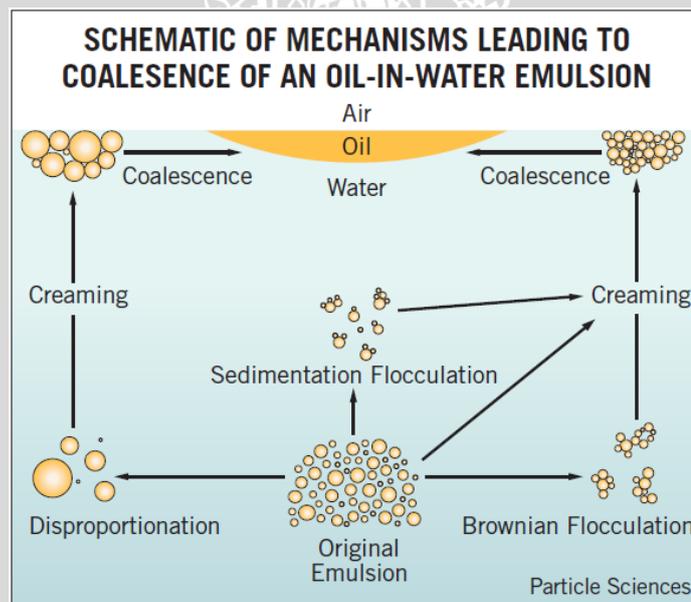


Gambar 2.9 Lapisan Surfaktan pada Permukaan Air/Minyak pada Emulsi m/a dan a/m (Attwood dan Florence, 2008)

Emulsi dianggap tidak stabil secara fisik saat suatu emulsi benar-benar *break*, yaitu, sistem terpisah menjadi fase air dan minyak. Kejadian ini dianggap menjadi tanggung jawab dari empat mekanisme berbeda, yaitu flokulasi, *creaming*, *coalescence*, dan *breaking* (Particle Science Inc., 2011).

Flokulasi (*flocculation*) merupakan suatu kejadian bergabungnya butiran (globul) fase dalam karena adanya gaya tarik menarik antar butiran fase dalam sehingga membentuk kelompok butiran fase dalam. Sedangkan *creaming* adalah proses terbentuknya lapisan dimana pada lapisan tersebut terdapat konsentrasi

butiran fase dalam lebih banyak. *Creaming* dapat terjadi karena adanya perbedaan kerapatan jenis antara dua fase pembentuk emulsi. Lapisan hasil *creaming* ini dapat terbentuk di permukaan maupun dasar emulsi. *Creaming* terbentuk di permukaan emulsi jika kerapatan fase dalam lebih kecil daripada kerapatan fase luar, dan sebaliknya. *Coalescence* merupakan proses dimana butiran-butiran fase dalam saling berbenturan atau kontak sehingga akan cepat membentuk butiran yang lebih besar. *Breaking* adalah suatu kejadian dimana fase dalam benar-benar terpisah dari fase luar. Butiran fase dalam berganung dan membentuk lapisan yang memisah dari emulsi (Particle Science Inc., 2011).



Gambar 2.10 Proses Terjadinya Ketidakstabilan Emulsi (Particle Science Inc., 2011)

2.4.2 Stabilitas Kimia

Stabilitas kimia adalah lamanya waktu suatu zat aktif untuk mempertahankan sifat kimia dan potensinya seperti yang tertera dalam etiket dalam batas waktu yang ditentukan selama periode penyimpanan. Stabilitas

kimia mengharuskan zat aktif tidak terdegradasi sampai batas yang telah ditentukan karena berkurangnya zat aktif akan mempengaruhi efek dari sediaan.

Banyak zat aktif yang mengalami dekomposisi kimia saat diformulasikan, baik pada sediaan liquid maupun sediaan solid. Degradasi ini tidak hanya menyebabkan hilangnya potensi dari zat aktif, namun juga dapat mengubah penampilan fisik dari sediaan (Vadas, 2000). Ada beberapa mekanisme zat aktif terdekomposisi secara kimia, yaitu (Florence dan Attwood, 2008):

1. Hidrolisis

Hidrolisis terjadi jika suatu zat aktif mudah bereaksi dengan air. Zat aktif yang memiliki gugus ester, amida, lactam, imida atau karbamat sangat beresiko mengalami hidrolisis. Hidrolisis dapat dikatalisis dengan adanya ion hidrogen atau ion hidroksil. Larutan dapat distabilkan dengan melakukan formulasi pada pH yang memiliki stabilitas maksimum atau menambahkan pada pelarut non air.

2. Oksidasi

Proses oksidasi melibatkan proses lepasnya atom elektropositif atau elektron atau adanya penambahan atom elektronegatif. Zat aktif yang beresiko mengalami oksidasi adalah golongan steroid dan sterol. Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan selama penyimpanan maupun proses pembuatan untuk mengurangi oksidasi, seperti mengganti oksigen dengan nitrogen atau karbon dioksida pada tempat penyimpanan, hindari kontak dengan logam berat seperti besi dan nikel, kemudian letakkan pada suhu rendah dan tambahkan antioksidan pada proses pembuatan.

3. Isomerisasi

Isomerisasi merupakan proses konversi dari zat aktif menjadi bentuk isomer geometric atau optikalnya, yang memiliki aktivitas terapeutik yang lebih rendah. Contoh zat aktif yang bisa berubah menjadi isomernya adalah vitamin A, terjadi isomerisasi cis-trans.

4. Dekomposisi Fotokimia

Proses ini melibatkan cahaya yang menyebabkan zat aktif terdegradasi. Dekomposisi tidak hanya terjadi saat penyimpanan, namun juga saat proses pembuatan. Untuk meminimalisasi terjadinya dekomposisi fotokimia, maka produk dapat diletakkan pada wadah kaca berwarna gelap.

5. Polimerisasi

Polimerisasi terjadi saat dua atau lebih molekul zat aktif bergabung membentuk molekul kompleks. Contoh obat yang dapat membentuk polimer diantaranya amino-penicillin.

Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kestabilan kimia zat aktif, diantaranya yaitu (Florence dan Attwood, 2008):

1. pH

pH secara signifikan dipengaruhi oleh degradasi zat aktif akibat terhidrolisis dalam larutan. Untuk meminimalisasi efek dari pH maka digunakan pH stabil maksimal dengan menggunakan buffer.

2. Suhu

Peningkatan suhu biasanya menyebabkan peningkatan laju hidrolisis zat aktif dalam larutan. Pengaruh dari suhu ini digunakan sebagai dasar untuk melakukan uji stabilitas. Degradasi zat aktif akibat pengaruh suhu dapat dihitung dengan menggunakan persamaan Arrhenius.

$$\log k = \log A - E_a / (2,303RT)$$

3. Pelarut
4. Oksigen
5. Cahaya
6. Eksipien

Oksigen akan berpengaruh pada zat aktif yang rentan bereaksi dengan O_2 . Pada zat aktif rentan terhadap oksigen, maka oksigen pada wadah penyimpanan dapat digantikan dengan nitrogen.

2.4.3 Stabilitas Mikrobiologi

Stabilitas mikrobiologi suatu sediaan adalah keadaan di mana sediaan bebas dari mikroorganisme atau memenuhi batas mikroorganisme sampai batas waktu yang ditentukan (Vadas, 2000).

2.4.4 Metode Pengujian Stabilitas

Stabilitas suatu sediaan diuji untuk mengetahui apakah suatu sediaan mampu mempertahankan spesifikasi yang dimiliki selama batas waktu yang ditentukan. Ada beberapa metode pengujian stabilitas untuk mengetahui stabilitas emulsi baik secara fisik maupun kimia, yaitu:

1. Uji *Freeze-Thaw Cycle*

Sediaan ditempatkan pada suhu $-10^{\circ}C$ selama 20 jam kemudian diletakkan pada suhu $45^{\circ}C$ selama 2 jam. Proses ini merupakan proses 1 siklus. Pengujian dilakukan setidaknya 5 siklus. Pengujian ini meletakkan sediaan pada suhu yang sangat ekstrim dimana produk dapat membeku kemudian mencair. Pada kondisi ini lama kelamaan emulsi akan rusak dan pecah. Jika

sediaan dapat melewati setidaknya 5 siklus maka sediaan dapat dikatakan stabil (Ken, 2011).

2. Uji Sentrifugasi

Emulsi mengandung material yang memiliki berat jenis berbeda-beda. Secara umum, emulsi mengandung fase air yang memiliki berat jenis lebih tinggi daripada fase minyak. Hal ini menyebabkan adanya kemungkinan fase dalam dan fase luar akan terpisah dan fase minyak akan naik ke bagian atas emulsi dan membentuk lapisan globul minyak. Kejadian ini biasa disebut dengan *creaming*. *Creaming* merupakan tanda awal dari ketidakstabilan emulsi dan harus ditindak secara serius. Cara yang dapat dilakukan untuk mengetahui untuk memprediksi adanya *creaming* pada emulsi dapat dilakukan dengan uji sentrifugasi. Uji sentrifugasi dilakukan dengan melakukan sentrifugasi pada sediaan pada 3000 rpm selama 30 menit. Sediaan dikatakan stabil bila tidak terjadi pemisahan antara fase minyak dan fase air (Ken, 2011).

3. *Light Exposure Test*

Uji ini dilakukan untuk mengetahui bagaimana stabilitas suatu emulsi bila terkena sinar UV. Uji dilakukan dengan meletakkan krim pada wadah kemudian dipapar pada sinar matahari selama 1 bulan atau pada *light cabinet* (Particle Sience Inc., 2011).

4. *Long Term Stability Test*

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui stabilitas sediaan, baik fisik maupun kimia selama waktu penyimpanan yang dipengaruhi oleh suhu dan kelembaban. Hasil dari uji stabilitas ini dapat digunakan untuk menentukan *shelf life* untuk sediaan farmasetika dan dapat digunakan untuk rekomendasi tempat penyimpanan. Pengujian ini dilakukan pada suhu 30°C/ 65% RH

selama setidaknya 12 bulan. Pengambilan sampel dilakukan tiap 3 bulan pada tahun pertama, tiap 6 bulan pada tahun ke-2, dan tiap 12 bulan pada tahun selanjutnya untuk menentukan *shelf life* dari sediaan (WHO, 2006).

5. *Accelerated Stability Test*

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui stabilitas sediaan, baik fisik maupun kimia selama waktu penyimpanan yang dipengaruhi oleh suhu dan kelembaban. Hasil dari uji stabilitas ini dapat digunakan untuk memperkirakan *shelf life* untuk sediaan farmasetika. Pengujian ini dilakukan dengan waktu yang dipercepat dan suhu yang lebih tinggi daripada *long term stability test*. Pengujian dilakukan pada suhu 40°C/ 75% RH dan direkomendasikan setidaknya selama 6 bulan. Pengambilan sampel dilakukan minimal 3 kali termasuk pengambilan awal dan akhir (WHO, 2006).

6. *Temperature Stress Test*

Temperature stress test atau biasa disebut dengan *stress testing* dapat digunakan untuk memprediksi stabilitas zat aktif dan mengidentifikasi bagaimana laju degradasi dari suatu zat aktif (Baertschi *et al.*, 2005). Kondisi pengujian disesuaikan dengan zat aktif dan jenis sediaan yang digunakan. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan suhu 10°C di atas suhu yang digunakan pada accelerated testing dan kelembaban 75% atau lebih dimana akan mempercepat hidrolisis dari zat aktif (WHO, 2006).

Stress testing dapat digunakan untuk mengetahui bagaimana karakteristik stabilitas dari suatu zat aktif. Ada beberapa aspek stabilitas dari zat aktif, yaitu (Baertschi *et al.*, 2005):

- a. Kondisi yang menyebabkan terjadinya degradasi
- b. Laju degradasi

- c. Struktur dari produk hasil degradasi
- d. Jalur dari degradasi

Ada beberapa kondisi yang mendasari bagaimana terjadinya suatu mekanisme degradasi, yaitu termolitik, hidrolitik, oksidatif, dan fotolitik. Degradasi termolitik adalah suatu mekanisme degradasi yang disebabkan oleh adanya paparan suhu tinggi yang dapat menyebabkan rusaknya ikatan dari suatu molekul. Adanya paparan suhu juga menyebabkan terjadinya hidrolisis, isomerisasi dan beberapa reaksi polimerisasi (Baertschi *et al.*, 2005).

Persamaan Arrhenius merupakan suatu persamaan yang sering digunakan untuk memprediksi bagaimana laju degradasi suatu zat aktif yang disebabkan oleh adanya paparan beberapa suhu yang berbeda. Persamaan ini paling sering digunakan untuk mengevaluasi hubungan antara kecepatan reaksi dan suhu untuk mendapatkan orde reaksi (Baertschi *et al.*, 2005). Dari orde reaksi yang didapatkan kemudian dapat dihitung laju reaksi dari masing-masing orde. Hasil perhitungan laju reaksi (k) kemudian digunakan untuk penentuan energi aktivasi (E_a) yang kemudian digunakan dalam persamaan Arrhenius (Florence dan Attwood, 2006):

$$\text{Log } k = \text{log } A - \frac{E_a}{2,303RT}$$

2.5 Spektrofotometri UV

Spektrofotometri merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengukur berapa banyak suatu substansi kimia yang menyerap cahaya dengan mengukur intensitas cahaya yang melewati larutan sampel. Instrument dasar untuk spektroskopi UV terdiri dari suatu sumber energi, sampel, alat pendispersi

cahaya (biasanya prisma atau kisi), dan suatu detektor. Cahaya yang meradiasi cuplikan (dalam sel atau kuvet), selanjutnya didispersikan oleh alat pendispersi. Cahaya terdispersi ini disinkronkan dengan sumbu-X perekam (*recorder*) yang menunjukkan panjang gelombang radiasi. Selanjutnya ditangkap atau dideteksi oleh detektor melalui celah (*slit*). Sinyal dari detektor ditransmisikan ke sumbu-Y perekam, dan menunjukkan bagaimana radiasi diabsorpsi oleh cuplikan pada berbagai panjang gelombang. Sumber energy pada spektrofotometer UV menggunakan lampu UV, yaitu suatu filament yang memberikan radiasi elektromagnetik yang bekerja pada daerah panjang gelombang UV (Sutrisno, 2011).

Spektroskopi UV pada dasarnya berarti adanya transisi elektronik yang terjadi di daerah spectrum elektromagnetik yang mampu dijangkau oleh spektrofotometer UV dan bekerja pada λ di daerah 200-380 nm. Absorpsi cahaya UV menyebabkan terjadinya eksitasi suatu elektron dari keadaan dasar (E_1) menuju bentuk tereksitasinya (E_2) (Sutrisno, 2011).

Detektor spektrofotometri UV mengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan (I_0) melalui pelarut yang digunakan (blanko) dan dibandingkan dengan intensitas cahaya yang ditransmisikan melalui sel cuplikan (I). Absorbansi (A) dihitung berdasarkan perbandingan I_0 dan I sesuai dengan persamaan sebagai berikut (Sutrisno, 2011):

$$A = \log_{10} I_0/I$$

Menurut Lambert-Beer, absorbansi suatu larutan berbanding lurus dengan panjang lintasan yang dilalui cahaya yang meradiasi (l , tebal kuvet dalam cm) dan konsentrasi (C , dalam mol per liter atau molar) molekul pengabsorpsi, sesuai dengan persamaan berikut (sutrisno, 2011):

$$A = \epsilon C l$$

Jadi pita absorpsi UV dikarakterisasi oleh panjang gelombang dimana terjadi absorpsi maksimum, dan besaran ini yang disebut dengan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) dan ϵ . Harga ϵ berhubungan dengan jenis atau tipe kromofor. Untuk selanjutnya, koefisien ekstingsi molar biasanya dinyatakan dalam bentuk $\log_{10}(\epsilon)$; dimana nilai ini dapat digunakan untuk memperoleh makna yang lebih mudah untuk dipahami. Namun demikian, adanya ketidakmurnian (*impurity*) dari zat yang dianalisis akan mempengaruhi secara nyata sifat absorpsi sehingga mengakibatkan kesalahan dalam interpretasinya (Sutrisno, 2011).

2.6 Metode Analisis Statistik

Statistik dalam arti sempit dapat diartikan sebagai data, namun dalam arti luas statistik dapat diartikan sebagai alat. Alat yang digunakan untuk analisis dan membuat keputusan. Sedangkan pengertian lain menyebutkan bahwa statistik merupakan salah satu alat yang penting yang digunakan dalam pengumpulan data, penyajian, proses analisis, dan penyimpulan dari data tersebut (Sujarweni, 2012).

2.6.1 Uji Normalitas

Uji normalitas merupakan uji yang dilakukan sebelum data diolah menjadi model-model penelitian. Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui distribusi data dalam variabel yang digunakan dalam penelitian. Data yang baik dan layak digunakan dalam penelitian adalah data yang memiliki distribusi normal (Sujarweni, 2012).

Data yang berdistribusi normal memiliki artian bahwa data tersebut memiliki sebaran yang normal, dengan profil yang dapat dikatakan dapat mewakili populasi. Uji normalitas sendiri merupakan uji yang digunakan untuk mengukur apakah data memiliki distribusi normal atau tidak. Uji data berdistribusi normal dapat digunakan dalam statistik parametrik dan data tidak berdistribusi normal dapat digunakan statistic non parametrik. Uji normalitas adalah suatu uji yang membandingkan antara data yang dimiliki dengan data berdistribusi normal yang memiliki *mean* dan standar deviasi yang sama dengan data kita (Sujarweni, 2012).

Salah satu uji yang dapat digunakan untuk uji normalitas adalah uji Shapiro-Wilk. Uji Shapiro-Wilk digunakan jika sampel yang digunakan kurang dari 50 sampel karena uji ini dianggap lebih akurat untuk jumlah sampel yang kecil. Keputusan uji normalitas data adalah dengan melihat sig. atau p value sebesar $>0,05$ yang berarti data berdistribusi normal, dimana hipotesis nol gagal ditolak yang berarti data yang diuji memiliki distribusi yang mengikuti distribusi normal (Sujarweni, 2012).

2.6.2 Uji Beda Parametrik

Uji beda digunakan untuk mengetahui apakah sebuah sampel memiliki perbedaan yang nyata atau berbeda secara signifikan dengan sampel yang lain. Syarat yang harus dipenuhi untuk uji beda parametrik adalah data yang digunakan harus berdistribusi normal (diuji dengan uji normalitas terlebih dahulu). Pada uji ini sampel dikatakan berbeda secara nyata atau signifikan jika nilai sig $< 0,05$ Uji yang dapat dilakukan adalah (Sujarweni, 2012):

1. *Independent sample t test* atau uji T

Uji ini digunakan untuk membandingkan antara dua grup yang tidak saling berhubungan satu sama lain.

2. *Paired sample t test* atau Uji T

Uji ini digunakan pada dua sampel yang tidak berpasangan untuk menentukan ada tidaknya perbedaan rata-rata dua sampel bebas. Dua sampel yang dimaksudkan adalah sampel yang sama namun memiliki dua data.

3. Uji ANOVA

Uji ini digunakan untuk menguji tiga sampel atau lebih yang tidak saling berhubungan.

2.6.3 Uji Beda Non Parametrik

Statistik non parametrik digunakan pada kondisi tertentu seperti pada data yang tidak terdistribusi normal, pada jumlah sampel yang kecil (kurang dari 30) yang cenderung lebih sederhana sehingga kesimpulannya kadang diragukan. Pada uji ini sampel dikatakan berbeda secara nyata atau signifikan jika nilai sig < 0,05. Uji beda yang dapat digunakan pada statistic non parametrik yaitu (Sujarweni, 2012):

1. Uji Tanda (Sign)

Uji ini merupakan bagian dari statistic non parametrik yang menguji perbedaan dua sampel yang saling berhubungan.

2. Uji Wilcoxon

Uji wilcoxon digunakan untuk menentukan ada tidaknya perbedaan *mean* dua sampel yang saling berhubungan.

3. Uji Mann-Whitney

Uji Mann-Whitney merupakan bagian dari statistic non parametrik yang bertujuan untuk membedakan dua kelompok berbeda yang tidak saling berhubungan. Uji ini digunakan untuk menguji beda dengan menggunakan rata-rata variabel dan jumlah data sampel penelitian yang sangat sedikit (kurang dari 30) atau tidak terdistribusi normal. Uji Mann-Whitney digunakan untuk menguji satu variabel data katagori dan satu variabel data interval.

4. Uji Kruskal Wallis

Uji Kruskal Wallis merupakan salah satu alat uji dalam statistic non parametrik yang sering digunakan untuk menguji perbedaan tiga sampel atau lebih yang tidak saling berhubungan.

