

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

Astri Astuti¹ and Noor Fitri²

¹ Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta 55585

² Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta 55585

*Corresponding E-mail : noor.fitri@uii.ac.id or nfitri1@gmail.com

ABSTRAK

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 diuji 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 iritasi, DPPH

ABSTRACT

*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, irritation test, DPPH

1. Pendahuluan

Produk perawatan kulit (*skincare*) menjadi yang paling diminati, salah satunya *skincare* untuk wajah. Kulit wajah 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 yang mampu hidup bebas dan memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan sehingga memiliki sifat reaktif [1]. Jumlah radikal bebas yang terus meningkat akibat faktor tersebut dapat menyebabkan sistem pertahanan tubuh yang menurun, kondisi *degeneratif* seperti penuaan dini, kerutan, dan kanker kulit [2]. Efek negatif dari radikal bebas dapat dicegah dengan penggunaan antioksidan dan anti-aging (anti penuaan).

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 sintetik. Akan tetapi, penggunaan jangka panjang antioksidan sintetik dapat menyebabkan masalah kesehatan, seperti alergi kulit, masalah saluran pencernaan, dan dalam beberapa kasus meningkatkan resiko kanker [3]. 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 mengandung senyawa tertinggi *caryophyllene* yang memiliki aktivitas penangkal radikal bebas dalam melawan radikal hidroksil, anion superoksida dan peroksida lipid [4]. Penelitian tanaman yang memiliki potensi farmakologis mulai dilakukan guna pengembangan sediaan kosmetik serum yang mengandung zat antioksidan dari bahan alam. Serum diformulasikan sebagai produk dengan konsentrasi berbasis air atau minyak yang memiliki sifat penyerapan dan kemampuan menembus lapisan kulit lebih dalam, efektif dan praktis dalam mengatasi masalah kulit serta dapat digunakan oleh setiap usia [5]. Formula serum wajah umumnya terdiri dari zat aktif, minyak pembawa (*carrier oil*), dan minyak

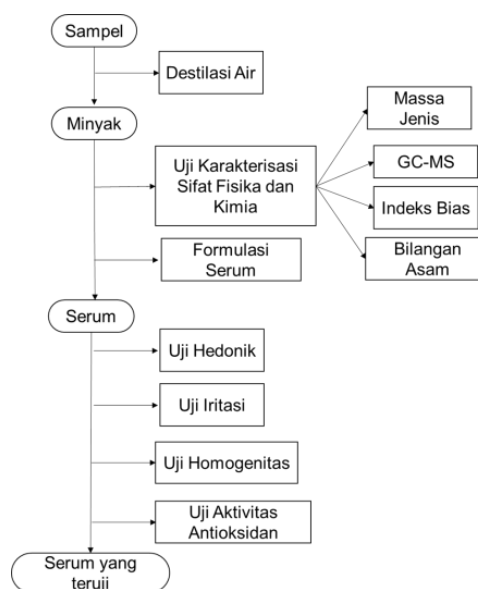
pengikat. Minyak pembawa yang dapat digunakan adalah minyak zaitun atau VCO, sedangkan minyak pengikat zat aktif dapat digunakan minyak atsiri nilam [6].

Identifikasi aktivitas antioksidan serum dilakukan dengan uji DPPH. Metode ini melibatkan penurunan serapan DPPH karena reaksi elektron DPPH dengan antioksidan melalui perubahan warna ungu yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm hingga panjang gelombang maksimal 517 nm [7]. Identifikasi terhadap antioksidan lada hitam telah dilakukan melalui pengujian DPPH dan ABTS menunjukkan minyak lada hitam memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami [8], potensi aktivitas antioksidannya sebesar $11,24 \pm 1,36$ hingga $64,46 \pm 1,05\%$ [9].

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).

2. Metode Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini meliputi, biji lada hitam; minyak atsiri nilam; *olive oil*; *virgin coconut oil*; kontrol positif (serum komersial); DPPH (*2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazylhydrate*); dan kelinci jantan umur ± 2 bulan. Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: rangkaian alat destilasi;



Gambar 1. Bagan Alir Prosedur Penelitian

piknometer; botol serum; labu ukur; gelas beker; pipet tetes; pipet micro; *shaker*; Refraktometer; GC-MS dan Spektrophotometer Uv-vis. Pada Gambar 1. ditampilkan bagan alir prosedur penelitian.

Destilasi Minyak Atsiri Lada Hitam

Minyak atsiri lada hitam diperoleh melalui teknik destilasi air. Lada hitam kering ditimbang sebanyak 2 kg kemudian dihaluskan dan dimasukkan ke dalam ketel dan ditambahkan air suling hingga sampel terendam. Destilasi dilakukan selama 4-5 jam. Destilasi 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 Na₂SO₄ untuk mengikat hidrosol yang masih terdapat dalam minyak. Setelah itu, hasil minyak disimpan dalam botol gelap yang tertutup rapat.

Uji Kualitatif Minyak Atsiri

Minyak atsiri dianalisis menggunakan GC-MS untuk menganalisis kandungan dari komponen minyak atsiri. Analisis dilakukan di Laboratorium Terpadu UII. Kondisi operasional alat GC-MS adalah: temperatur injeksi 200°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 °C.

Uji Karakterisasi

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 (m1). 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 ditimbang (m2) hingga diperoleh massa konstan. Adapun persamaan untuk penentuan nilai massa jenis, sebagai berikut:

$$\text{Massa Jenis} = \frac{(m2)-m}{(m1)-m} \times \text{massa jenis air} \quad (1)$$

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.

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. Penentuan bilangan asam dilakukan berdasarkan SNI 01-3555-1998. Sebanyak 1 gram 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.

$$\text{Bilangan asam} = \frac{V_s \times N \times 56,1}{G} \quad (2)$$

Keterangan:

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

N = Normalitas larutan KOH

G = Berat sampel (g)

56,1 = Berat ekivalen KOH

Pembuatan serum

Formula serum antioksidan terdiri atas 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 kemudian di*shaker* selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm. Setelah minyak atsiri dan minyak nilam dicampurkan, ditambahkan olive oil dengan kecepatan 250 rpm selama 1 hari.

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.

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.

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 x 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 x 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 diatas 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.

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.

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 perbandingan (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:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\% \quad (3)$$

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®.

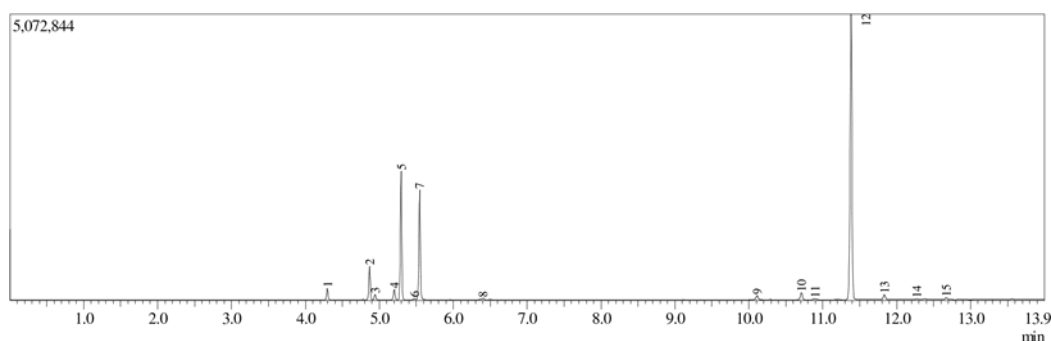
3. Hasil Dan Pembahasan

Ekstraksi Minyak Lada Hitam

Ekstraksi minyak lada hitam dilakukan dengan metode destilasi air. Lada hitam dihaluskan, dimasukkan kedalam ketel sebanyak 2 kg dan air ± 1 liter. Hasil minyak diperoleh 39 mL dengan rendemen sebesar 1,69% yang didapat selama destilasi 5 jam. Pada beberapa literatur rendemen minyak atsiri lada hitam berkisar 1,24% [10] hingga 3,1% [11].

Uji GC-MS pada Minyak Atsiri Lada Hitam

Hasil data untuk kromatogram minyak atsiri lada hitam ditunjukkan pada Gambar 2. Terdapat 15 senyawa penyusun dengan waktu retensi berbeda. Senyawa dalam minyak lada hitam terdiri dari β-Pinene, β-Myrcene, α-Phellandrene, β-Ocimene, Limonene, p-Cymene, α-Terpinolene, α-Copaene, α-Humulene, trans-Caryophyllene, Cyclohexane, dan delta-Cadinene. Dilihat dari %area, terdapat 3 senyawa dengan kelimpahan terbesar pada puncak 5,7 dan 12 yaitu: *limonene* (17,82%), *β-ocimene* (15,87%) dan *trans-caryophyllene* (52,31%).



Gambar 2. Kromatogram Minyak Lada Hitam

Karakteristik Minyak Atsiri Lada Hitam

Minyak atsiri lada hitam yang dihasilkan tidak berwarna dengan aroma yang menyengat khas lada. Bilangan asam minyak lada hitam diperoleh menggunakan metode titrasi basa, hasilnya diperoleh sebesar 2,980 mg KOH/g.

Karakteristik hasil minyak atsiri lada hitam dibandingkan dengan Standar Internasional ISO 3061:2008 dan hasil penelitian Anggraini (2018) yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Minyak Atsiri Lada Hitam Hasil Penelitian dengan Literatur [12]

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

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 kemudian di *shaker* selama 1 jam dengan kecepatan 150 rp. Selanjutnya ditambahkan olive oil dan di *shaker* dengan kecepatan 250 rpm selama 1 hari. Formulasi serum lada hitam ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Formulasi Serum Minyak Lada Hitam

M. Lada (mL) \ M. Nilam (mL)	1,1	1,2	1,3	1,4
0,1	1,8	1,95	2,1	2,25
0,15	1,875	2,025	2,175	2,325
0,2	1,95	2,1	2,25	2,4
0,25	2,025	2,175	2,325	2,475

= Olive oil

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). Hasil data nilai uji kesukaan (*hedonic test*) menunjukkan 2 formula serum lada hitam dengan nilai tertinggi yaitu N1L1 dan N3L3 dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Uji Hedonik Serum Anti-aging Minyak Atsiri Lada Hitam

Serum Formula	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	51	43	63	61	63	57	433
N1L2	43	43	43	38	62	52	63	52	406
N1L3	44	47	46	44	63	67	64	57	432
N1L4	39	48	41	45	65	64	64	53	419
N2L1	48	42	47	45	62	67	59	53	423
N2L2	42	43	46	43	55	66	57	55	407
N2L3	43	39	48	44	63	64	63	52	416
N2L4	35	40	47	40	58	63	60	50	393
N3L1	44	43	51	41	60	65	61	62	427
N3L2	44	43	44	45	62	64	63	57	422
N3L3	50	46	51	46	62	64	61	54	434
N3L4	46	45	50	47	56	65	58	55	422
N4L1	50	41	48	47	61	67	62	56	430
N4L2	48	44	48	45	59	64	54	55	417
N4L3	45	38	52	49	62	65	62	49	422
N4L4	46	44	49	44	62	65	59	52	421

Uji Iritasi pada Kelinci

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. Kelinci yang digunakan adalah kelinci lokal jantan berusia ± 3 bulan dengan bobot ± 2 kg, dalam kondisi sehat tanpa cacat fisik dan belum pernah digunakan sebagai penelitian sebelumnya.

Pencukuran hewan uji dilakukan di daerah punggung kelinci untuk menghindari jangkauan dari kelinci sehingga serum yang akan dioleskan tidak termakan oleh hewan uji dan kinerja serum agar langsung terserap pada kulit. Terdapat dua sampel serum yang diujikan






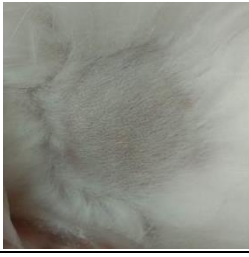


yaitu N1L1 dan N3L3. Masing-masing sampel diaplikasikan pada kulit kelinci sebanyak satu tetes. Area punggung kiri kelinci merupakan area serum N1L1 dan area punggung kanan kelinci untuk serum N3L3. Kemudian ditutup dengan kasa steril dan diberi plester. Selanjutnya dilakukan pengamatan setiap 24, 48, dan 72 jam. Hasil pengamatan ditunjukkan pada Tabel 4.

Iritasi ditandai dengan munculnya alergi berupa eritema dan edema [13]. 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 tidak menimbulkan reaksi eritema dan edema menunjukkan sampel serum lada hitam aman bila digunakan pada kulit.

Formula serum N1L1 dan N3L3 dibuat formulanya dengan VCO untuk mengetahui pengaruh pada minyak pembawa (*carrier oil*) yang digunakan pada formula serum lada hitam serta mengetahui formula serum yang lebih optimal dalam menangkal radikal bebas.

Tabel 4. 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		

Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui stabilitas sediaan serum minyak lada hitam pada penurunan suhu. Hasil pengamatan uji homogenitas menunjukkan

bahwa serum O.N1L1, O.N3L3, C.N1L1 dan C.N3L3 tidak menunjukkan perubahan pada setiap penurunan suhu. Dibuktikan dengan tidak terbentuknya perbedaan fase pada larutan dan

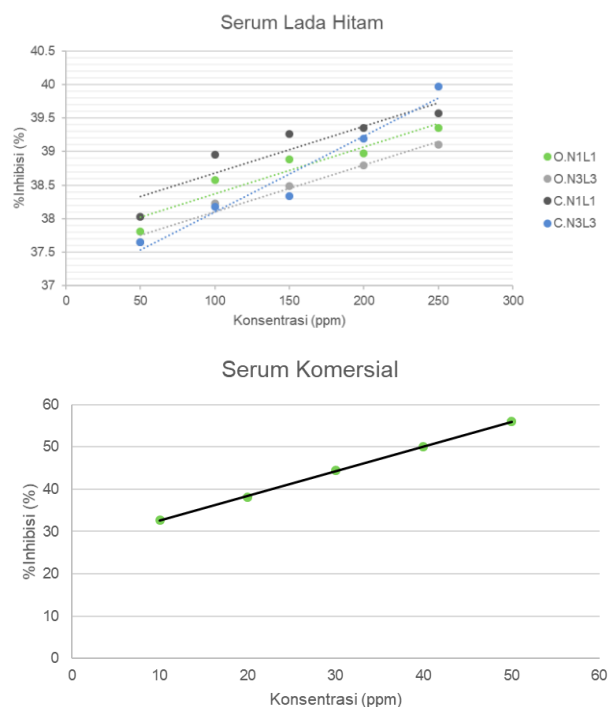
tidak ditemukannya gumpalan atau endapan pada serum minyak lada hitam.

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Serum Minyak Lada Hitam dan Serum Komersial

Aktivitas antioksidan ditentukan melalui metode DPPH. Metode DPPH merupakan uji antioksidan berdasarkan transfer elektron yang memiliki daya serap pada rentang 515-517 nm. Metode ini paling sering dilakukan dalam pengujian aktivitas antioksidan karena merupakan metode sederhana, hanya memerlukan sampel 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. 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 digunakan memiliki konsentrasi 0,08 mM. Pengukuran serapan dilakukan setelah inkubasi 30 menit. Semakin cepat sampel mendekolorisasi DPPH menjadi kuning maka sampel tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. 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 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. Diagram dari serum minyak lada hitam dan serum komersial dapat dilihat pada Gambar 2. dengan rincian hasil uji aktivitas antioksidan



Gambar 2. Diagram Serum Minyak Lada Hitam dan Serum Komersial

serum lada hitam dan serum komersial pada Tabel 5.

Dari setiap grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh tiap serum formula dan serum komersial diperoleh persamaan regresinya. Dari hasil IC_{50} serum formula berbasis minyak *olive oil* memiliki aktivitas antioksidan yang rendah. Dari keempat serum formula lada hitam aktivitas antioksidan yang berbasis minyak VCO lebih rendah dari *olive oil* atau memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi.

Serum komersial yang digunakan memiliki kandungan *ascorbic acid* (vitamin C) 10% yang sudah terbukti berperan sebagai antioksidan dalam menangkal radikal bebas dan telah dipasarkan. Dari setiap grafik hubungan antara konsentrasi vs %inhibisi radikal DPPH oleh tiap serum formula dan serum komersial diperoleh persamaan regresinya. hasil IC_{50} serum formula berbasis minyak *olive oil* memiliki aktivitas antioksidan yang rendah.

Tabel 5. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Serum Lada Hitam dan Serum Komersial

Formula Serum	Persamaan garis	Linearitas	IC50 (ppm)
O.N1L1	$y = 0,007x + 37,676$	$R^2 = 0,9030$	1760,571
O.N3L3	$y = 0,0069x + 37,412$	$R^2 = 0,9772$	1824,347
C.N1L1	$y = 0,007x + 37,985$	$R^2 = 0,8318$	1716,428
C.N3L3	$y = 0,0113x + 36,972$	$R^2 = 0,9517$	1152,920
Komersial	$y = 0,5869x + 26,655$	$R^2 = 0,9997$	39,776

Dari keempat serum formula lada hitam aktivitas antioksidan yang berbasis minyak VCO lebih rendah dari *olive oil* atau memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi.

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 IC₅₀ menunjukkan semakin rendah aktivitas antioksidannya, begitu juga sebaliknya jika kadar IC₅₀ suatu sampel rendah maka aktivitas antioksidan yang dimiliki semakin kuat atau tinggi sehingga konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk meredam 50% radikal bebas semakin sedikit.

4. Kesimpulan

Formulasi serum minyak lada hitam yang paling disukai adalah N1L1 dan N3L3. Hasil uji iritasi menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut bersifat non iritan sehingga aman untuk digunakan. Serum minyak atsiri lada hitam berbasis *olive oil* dan VCO yaitu O.N1L1, O.N3L3, C.N1L1, dan C.N3L3 memiliki aktivitas antioksidan lemah. Hasil serum C.N3L3 memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dibanding ketiga serum lainnya.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menghaturkan terima kasih kepada Jurusan Kimia UII atas fasilitas yang diberikan.

Daftar Pustaka

[1] Kurutas, E. B., 2015, The Importace of Antioxidants Which Play the Role in

Cellular Response Against Oxidative/Nitrosative

[2] Alleman, I. B., and Baumann, L., 2008, Antioxidants Used in Skin Care Formulations, 1-8.

[3] 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.

[4] 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.

[5] Sasidharan, S., Pyarry Joseph, P., Junise, 2014, Formulation and Evaluation of Fairness Serum Using Polyherbal Extracts, *Internationa Journal of Pharmacy*, 4(3): 105-112.

[6] Fitri, N., Fatimah, I., Chabib, L., and Fajarwati, F. I., 2017, Formulation of Antiacne Serum Based on Lime Peel Essential Oil and In Vitro Antibacterial Activity Test Against Propionibacterium Acnes, *International Conference on Chemistry, Chemical Process and Engineering*, 020123: 1-7.

[7] 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.

[8] 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.

[9] Purkait,S., Bhattacharya, A., Bag, A., and Chattopadhyay, R. R., 2018, Antibacterial and Antioxidant Potntial of Essential Oils of

- Five Spices, *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 5:61-71.
- [10] 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.
- [11] 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*.
- [12] Anggraini, R., Jayuska, A., Alimuddin, A. H., 2018. Isolasi dan Karakterisasi Minyak Atsiri Lada Hitam (*Piper Nigrum L.*) Asal Sajingan Kalimantan Barat, *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 7(4), 124-133.
- [13] 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.