

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan penelitian eksperimental, yang dilakukan di laboratorium untuk menguji efektivitas krim pencerah kulit berbahan aktif asam kojat. Penelitian eksperimental dipilih karena bertujuan untuk menguji pengaruh variasi sumber karbon terhadap produksi asam kojat dan efektivitas krim dalam mengurangi hiperpigmentasi. Data yang dikumpulkan bersifat deskriptif, seperti uji organoleptik, pH, viskositas, dan daya sebar, yang bertujuan untuk menggambarkan kualitas dan karakteristik produk. Penelitian ini juga menguji karakteristik fisik dan stabilitas krim anti-hiperpigmentasi yang dihasilkan.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian ini akan dilaksanakan dari bulan Februari 2025 sampai dengan bulan Mei 2025 di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi dan laboratorium Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana Bandung.

3.3 Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental yang dilaksanakan di laboratorium. Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, dimulai dengan penyiapan alat dan bahan yang diperlukan untuk eksperimen. Tahap pertama adalah optimasi dan evaluasi basis krim, di mana dilakukan pengujian untuk mengetahui formulasi terbaik yang dapat mendukung pembuatan krim dengan kualitas yang optimal. Setelah itu, dilakukan formulasi dan pembuatan sediaan krim pencerah kulit yang mengandung asam kojat sebagai bahan aktif. Tahapan terakhir adalah evaluasi terhadap sediaan krim yang meliputi berbagai uji untuk menilai kualitas dan efektivitas produk yang dihasilkan. Evaluasi ini bertujuan

untuk memastikan bahwa krim yang diformulasikan dapat memenuhi standar yang diinginkan, baik dari segi stabilitas fisik maupun efektivitas dalam mengurangi hiperpigmentasi pada kulit.

3.3.1 Alat dan Bahan

a. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain inkubator, sentrifugal, pH meter, viskometer *Brookfield*, tabung sentrifugasi, *shaker* inkubator, kompor listrik, cawan penguap, mikropipet, *microtube*, *rotary evaporator*, dan LC-MS/MS (*Xevo G2-XS QTOF, Waters*)

b. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi jamur *Aspergillus oryzae*, media *Potato Dextrose Broth* (PDB), krim asam kojat (Kojie San), enzim tirosinase (*Sigma-Aldrich*), *Lactophenol Cotton Blue*, NaCl fisiologis, etil asetat, akuades, FeCl₃ 1%, H₂O, *isopropil miristat* (IPM), *triethanolamin* (TEA), asam stearat, *phenoxyethanol*, dapar fosfat pH 6, alkohol, serta dapar fosfat pH 7,4.

3.4 Produksi Asam Kojat dari Jamur *Aspergillus Oryzae*

a. Pewarnaan Jamur

Untuk mengidentifikasi jamur *Aspergillus oryzae* yaitu diambil sedikit jamur *Aspergillus oryzae*, kemudian dimasukkan ke dalam vial. Lalu ditambahkan larutan NaCl fisiologis, kemudian dihomogenkan. Diteteskan larutan tersebut ke kaca preparat, difiksasi, dan ditambahkan dengan beberapa tetes *lactophenol cotton blue*. Morfologi konidia diamati di bawah mikroskop (Suryadi & Sukarna, 2018).

b. Fermentasi Asam Kojat

Jamur *Aspergillus oryzae* diinokulasikan dari media padat ke dalam media cair yaitu tanpa penambahan sumber karbon dan dengan penambahan glukosa 1%, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 9 hari menggunakan shaker inkubator. Setelah masa inkubasi, kultur cair disentrifugasi pada kecepatan 6500 rpm selama 15 menit untuk memisahkan

pelet dan supernatan. Pelet yang diperoleh kemudian ditimbang untuk pengukuran biomassa, sedangkan supernatan digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif.

c. Identifikasi Asam Kojat Secara Kualitatif

Identifikasi asam kojat dilakukan dengan menggunakan reagen FeCl₃ 1%, sebanyak 100 µL. Supernatan dari kultur fermentasi ditambahkan ke *microtube* dan kemudian diberikan satu tetes FeCl₃ 1%. Kultur mengandung asam kojat jika berwarna coklat kemerahan, semakin pekat menunjukkan kultur menghasilkan biomassa sel lebih banyak.

d. Ekstraksi Asam Kojat

Asam kojat yang terkandung dalam supernatan hasil pemisahan sebelumnya diekstraksi menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Supernatan dicampurkan dengan etil asetat dalam perbandingan 1:1, kemudian campuran tersebut dikocok selama 1 menit setiap 2 menit dan diulangi sebanyak 10 kali. Setelah itu, campuran didiamkan selama 1 jam hingga terbentuk dua lapisan, lalu lapisan etil asetat dipisahkan. Pelarut etil asetat kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Zhao et al., 2019).

e. Identifikasi asam kojat menggunakan LC-MS/MS

1. Preparasi Sampel

Sampel (ekstrak atau fraksi) disaring dan dimasukkan ke dalam vial autosampler berkapasitas 1,5 mL dengan kondisi Kromatografi (LC) :

Sistem LC : *Shimadzu LC-30AD* dengan *autosampler SIL-30AC*

Modus elusi : *Gradien biner*

Fase gerak : Pompa A : Pelarut etil asetat
Pompa B : Dimulai dengan konsentrasi 20%
dan dinaikkan ke 95% (menunjukkan adanya program gradien)

Laju alir : 0,2 mL/menit

Waktu analisis : 95 menit

Kolom : Tidak disebutkan spesifik, namun panjang kolom adalah 150 mm

Temperatur oven : 35°C

2. Parameter Autosampler

Volume bilas : 500 µL

Kecepatan sampling : 5 µL/detik

Pendingin : 20°C

Mode pembilasan : Sebelum dan sesudah aspirasi

3. Deteksi dengan MS/MS

- Sistem MS : *Triple quadrupole*, mode Q3 Scan

- Interface : ESI (*Electrospray Ionization*)

- Polarity : Positif & negatif (mode ganda)

- Rentang m/z : 100 – 1000

- Scan speed : 909 u/sec

- Tegangan interface : 4,0 kV

- Temperatur:

 - Interface : 300°C

 - DL : 250°C

 - Heat block : 400°C

 - Desolvasi : 526°C

- Gas:

 - Nebulizer : 3 L/min

 - Heating & Drying : 10 L/min

4. Parameter Kuantifikasi

- Metode : Standar eksternal

- Jumlah level kalibrasi 3

- Tipe kurva kalibrasi : Linear

- Unit konsentrasi : ppb

- Perhitungan berdasarkan : Area puncak kromatogram

Cara Kerja:

Sampel yang telah disiapkan terlebih dahulu dimasukkan ke dalam alat untuk dianalisis. Autosampler kemudian secara otomatis menyuntikkan kromatogramistem. Pada tahap kromatografi cair (LC), senyawa-senyawa dalam sampel dipisahkan berdasarkan sifat kimianya. Senyawa hasil pemisahan selanjutnya masuk ke dalam sistem spektrometri massa (MS), di mana senyawa tersebut diionisasi. Ion yang terbentuk kemudian dideteksi oleh MS berdasarkan rasio massa terhadap muatannya (m/z), khususnya untuk mengidentifikasi ion dari asam kojat. Hasil akhir analisis ditampilkan dalam bentuk kromatogram yang menunjukkan kandungan asam kojat dalam sampel.

f. Pembuatan Sediaan Krim

Optimasi basis dilakukan terlebih dahulu untuk menentukan komposisi yang memberikan karakteristik fisik dan stabilitas yang optimal. Setelah memperoleh basis yang sesuai, formulasi dengan penambahan bahan aktif asam kojat kemudian disiapkan dan diuji lebih lanjut.

Tabel 1. Formulasi sediaan

Bahan	Formula (%)				Fungsi
	F0	F1	F2	F3	
Asam kojat	0	1	1,5	2	Zat aktif
Isopropil Miristat	9	9	9	9	Peningkat penetrasi
TEA	3	3	3	3	Pengemulsi
Asam stearat	6	6	6	6	Pengemulsi
Fenoksietanol	0,5	0,5	0,5	0,5	Pengawet
Aquadest ad	100	100	100	100	Pelarut

Alat dan bahan disiapkan terlebih dahulu. Komponen minyak yang terdiri dari asam stearat dan isopropil miristat dilebur dan dipanaskan pada suhu 60–70°C (fase minyak). TEA, asam kojat, dan aquadest dimasukkan ke dalam cawan penguap, lalu dipanaskan di atas kompor listrik pada suhu 60–70°C (fase air). Fenoksietanol dilarutkan dengan cara dimasukkan ke dalam cawan yang berisi isopropil miristat dan asam stearat yang telah dilebur. Lumpang dipanaskan, kemudian fase air yang telah dilebur dimasukkan ke

dalam lumpang dan digerus perlahan hingga homogen. Setelah itu, fase minyak yang telah dilebur ditambahkan sedikit demi sedikit sambil terus digerus perlahan hingga diperoleh campuran yang homogen. Sediaan krim yang telah terbentuk dimasukkan ke dalam wadah jar yang sebelumnya telah dibersihkan menggunakan alkohol (Nurleni et al., 2023).

g. Evaluasi Sediaan Krim

1. Uji Organoleptik

Pengujian organoleptis dilakukan dengan mengamati perubahan warna dan aroma krim yang baru dibuat dan telah disimpan menggunakan panca indra. Krim yang stabil harus menunjukkan karakter yang sama berupa warna dan bau yang sama sebelum dan setelah kondisi penyimpanan dipercepat (Mardikasari et al., 2020).

2. Uji pH

pH meter dinyalakan, kemudian bagian elektroda sensornya dibilas dengan aquadest dan dikeringkan menggunakan tisu. Alat dikalibrasi dengan cara dicelupkan ke dalam larutan buffer pH basa, netral, dan asam, serta dibilas dengan aquadest setiap kali terjadi pergantian larutan. Sebanyak 1 gram sediaan krim ditimbang dan diencerkan dengan 10 ml aquadest. Setelah itu, pH meter yang telah dikalibrasi dicelupkan ke dalam sampel untuk mengukur pH sediaan. Nilai pH yang diperoleh kemudian dicatat.

3. Uji Viskositas

Viskositas sediaan krim diukur menggunakan Viskometer *Brookfield*. Alat dijalankan dengan kecepatan 6 rpm. Hasil viskositas dicatat setelah viskometer menunjukkan angka yang stabil (Nurleni et al., 2023).

4. Uji Daya Sebar

Sebanyak 0,5 gram krim ditimbang dan diletakkan di tengah kaca bulat. Kaca lain yang telah ditimbang diletakkan di atas krim, lalu dibiarkan selama 1 menit. Setelah itu, diameter penyebaran krim diukur. Beban sebesar 250 gram ditambahkan secara bertahap dengan kenaikan

50 gram setiap kali. Krim dibiarkan selama 1 menit, kemudian diameter krim diukur pada empat sisi, dan luas penyebaran krim ditentukan (Apitalau et al., 2021).

5. Uji Homogenitas

Pemeriksaan homogenitas dilakukan dengan menggunakan gelas objek dimana sejumlah sediaan krim dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan lainnya yang cocok, sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Nurleni et al., 2023).

6. Uji Iritasi

Uji iritasi dilakukan pada 10 responden wanita dengan mengaplikasikan 0,5 gram krim uji dan 0,5 gram basis sebagai kontrol negatif pada area kulit lengan bagian dalam dengan luas 2 cm x 2 cm. Setelah aplikasi, area tersebut ditutup menggunakan kain kasa dan plester. Pengamatan dilakukan selama 24 jam untuk memeriksa adanya reaksi kulit seperti kemerahan (eritema) atau pembengkakan (edema) (Armadany et al., 2019).

7. Uji sentrifugasi dan kestabilan emulsi

Uji sentrifugasi dilakukan terhadap krim yang baru dibuat. Pengujian dilakukan dengan cara memasukkan sediaan krim dalam tabung sentrifugasi, kemudian diputar pada kecepatan 6.000 rpm selama 18 menit, kemudian diamati bentuk fisik krim. Krim yang tidak stabil ditandai dengan terjadinya pemisahan fase (Nurleni et al., 2023).

