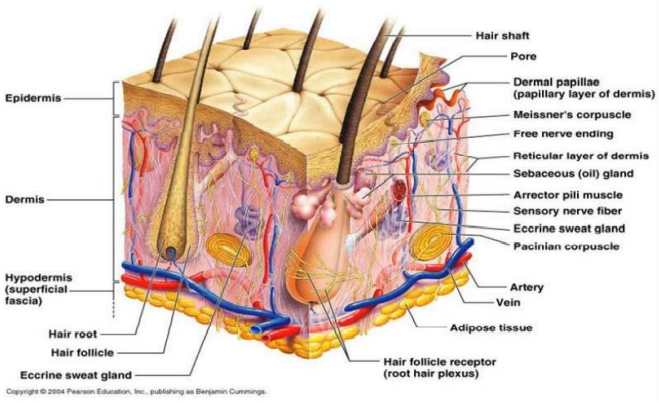
BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit manusia

2.1.1 Anatomi Kulit Manusia

Kulit adalah lapisan yang menutupi tubuh dan sebagai pelindung tubuh dari berbagai macam bahaya yang datang dari luar (Murti *et al*., 2016). Menurut Prof. R.D. Lockhart (1959) Ahli anatomi terkenal berkebangsaan Skotlandia mengatakan bahwa, Tidak ada jubah ajaib yang bisa menandingi kulit dalam berbagai fungsi seperti tahan air, menahan panas, melindungi dari sinar matahari, sebagai pelindung, penyejuk, hipersensitivitas sentuhan, temperatur, dan rasa sakit, ketahanan abrasi serta penyembuhan diri. Kulit memiliki ketebalan, warna, dan tekstur yang berbeda pada lokasi yang berbeda, hal tersebut berdasarkan fungsi spesifik yang berbeda pada bagian tubuh yang berbeda (Kalangi, 2014). Kulit merupakan organ kompleks yang terdiri dari beberapa kompartemen dengan menggunakan fungsi yang tidak sama (Low *et al*., 2021b). Hal tersebut merupakan organ yang menutupi seluruh permukaan luar tubuh ini juga merupakan organ terberat dan terbesar di tubuh manusia, menutupi 16 kali berat tubuhnya. Pada orang dewasa, sekitar 2,7 sampai 3,6 kg berat tubuhnya adalah kulit dengan luas sekitar 1,5 hingga 1,9 m^2 (A. N. Sari, 2015). serta memiliki kontak langsung dengan lingkungan eksternal (Low *et al*., 2021b) kulit sangat kompleks, elastis dan sensitif (hartopo, 2020). Kulit terdiri dari tiga lapisan, yaitu epidermis, dermis, dan hipodermis. Epidermis adalah lapisan pelindung terluar yang mencegah invasi patogen dan mengatur kehilangan air dari tubuh. Dermis mengandung jaringan padat matriks ekstraseluler yang memberi kulit kekuatan mekanik dan elastisitasnya, sedangkan lemak subkutan di jaringan subkutan memberikan isolasi (Low *et al*., 2021b).



Gambar 2. 1 Struktur kulit

2.1.2 Struktur Kulit

Kulit manusia terdiri dari tiga lapisan berbeda yaitu epidermis, dermis, dan hipodermis (Wong *et al*., 2016). Epidermis adalah jaringan epitel yang berasal dari ektoderm. sedangkan dermis adalah jaringan ikat yang cukup padat yang berasal dari mesoderm. Di bawah dermis terdapat lapisan jaringan ikat longgar yang disebut hipodermis, yang di beberapa area sebagian besar terdiri dari jaringan lemak (Kalangi, 2014).

2.1.2.1 Lapisan Epidermis

Epidermis adalah lapisan terluar kulit dan terdiri dari epitel skuamosa bertingkat dengan lapisan stratum bertingkat. Epidermis hanya terdiri dari jaringan epitel, tidak memiliki pembuluh darah atau kelenjar getah bening, maka dari itu semua nutrisi dan oksigen diperoleh dari kapiler lapisan dermal. Epitel skuamosa bertingkat dari epidermis terdiri dari beberapa lapisan sel yang disebut keratinosit. Sel-sel ini terus diperbarui oleh mitosis sel-sel lapisan basal, yang secara bertahap berpindah ke permukaan epitel (Kalangi, 2014). Fungsi lapisan epidermis adalah untuk melindungi bagian terluar tubuh dari luar tubuh (Sayogo, 2017). Terdapat lima lapisan Epidermis yang berbeda yakni:

a) Stratum korneum (lapisan tanduk)

   Stratum korneum merupakan lapisan atas dan terdiri dari sel-sel mati (korneosit) dan keratin. Selaput tipis inti sel kornifikasi mati yang tertanam dalam matriks lipid (Thakre, 2017). Lapisan ini mencegah air menguap, menyerap air dan mudah terurai dengan sendirinya (Han, 2015).

b) Stratum lucidium, (lapisan bening)

Stratum lucidium adalah lapisan tipis transparan pada sel kulit mati yang menebal, seperti telapak tangan dan telapak kaki (Han, 2015). Lapisan ini terdiri dari 2-3 lapis sel pipih yang tembus cahaya dan sedikit eosinofilik. Sel-sel pada lapisan ini tidak memiliki nukleus atau organel. Meskipun desmosom sedikit, lapisan ini kurang memiliki daya rekat sehingga sering terlihat bahwa lapisan kornea dipisahkan dari lapisan di bawahnya oleh garis celah (Kalangi, 2014).

c) Stratum Granulosum (lapisan berbutir)

Lapisan ini terdiri dari 2-4 lapis epitel skuamosa yang mengandung banyak granula basofilik yang disebut granula keratohialin, yang dibawah mikroskop elektron ternyata adalah partikel amorf tanpa membran akan tetapi dikelilingi oleh ribosom. Mikrofilamen melekat di permukaan butiran (Kalangi, 2014).

d) Stratum Spinosum (lapisan taju)

Stratum spinosum juga dikenal sebagai lapisan sel duri dan ditemukan di atas lapisan basal, kedua lapisan ini bersama-sama dikenal sebagai lapisan malpighian (Thakre, 2017). Sratum spinosum terdiri dari sejumlah baris keratinosit yang lebih matang yang terlihat seperti berduri apabila dilihat di bawah mikroskop (Han, 2015).

e) Stratum Germinativum (lapisan basal/lapisan benih)

Stratum basal adalah lapisan dalam setebal satu sel. Ini adalah satu-satunya lapisan epidermis dimana sel mengalami mitosis. basal membentuk persimpangan dermal-epidermal (zona membran *basement*) yang memisahkan epidermis dari dermis (Han, 2015).

2.1.2.2 Lapisan Dermis

Dermis adalah “rumah” dari komponen epidermis lainnya. Dermis adalah rumah bagi sel-sel kekebalan yang melawan infeksi yang menembus kulit. Dermis memberi darah dengan disuplai, nutrisi, dan oksigen pada dirinya sendiri dan juga epidermis. Fungsi dermis juga untuk mengatur suhu kulit dengan pembuluh darah superfisial, dan reseptor saraf bekerjasama dengan indra peraba (Sayogo, 2017). Ketebalan dermis bervariasi di berbagai bagian tubuh, biasanya 1-4 mm. Dermis adalah jaringan yang aktif secara metabolik yang mengandung kolagen, elastin, sel

saraf, pembuluh darah, dan jaringan limfoid. Selain folikel rambut, ada juga kelenjar ekrin, apokrin, dan *sebaceous* (A. N. Sari, 2015). Lapisan dermal adalah lapisan di bawah epidermis yang terdiri dari dua lapisan yaitu stratum papillaris dan stratum retikularis, (Wong *et al*., 2016) ada pembatas antara kedua lapisan tersebut, tidak rapat, tetapi serat di antara keduanya terjalin (Kalangi, 2014).

a) Stratum papilaris

Lapisan ini terlihat pada papila kulit yang jumlahnya bervariasi antara 50 – 250/mm2, sehingga susunan lapisan-lapisan tersebut tampak lebih longgar. Ada banyak diantaranya dan biasanya terletak di tempat-tempat yang mendapat tekanan signifikan dari tubuh manusia, seperti di telapak kaki. Papila ini memiliki kapiler yang mengantarkan nutrisi ke jaringan epitel di atasnya. Di sisi lain, papila juga mengandung saraf sensorik berupa sel darah *meissner*. Serabut kolagen tersusun rapat tepat di bawah epidermis.

b) Stratum retikularis

Lapisan yang lebih tebal dan lebih dalam dikenal sebagai stratum reticularis. Serat elastin membentuk ikatan yang kuat dan tidak teratur dengan bantuan kumpulan kolagen kasar. Melihat bagian yang lebih dalam, sambungan tampak lebih terbuka, karena rongga diisi dengan jaringan lemak, folikel rambut, kelenjar *sebaceous* dan keringat. Serat otot polos terdapat pada bagian tubuh manusia tertentu, seperti skrotum dan puting payudara. Sebaliknya, serat otot yang melekat pada tulang wajah dan leher menembus jaringan ikat dermis. Karena otot ini berperan penting dalam ekspresi wajah manusia. Lapisan retikular terhubung ke hipodermis luar, yang terdiri dari jaringan ikat longgar dan mengandung lebih banyak sel lemak (Kalangi, 2014)

2.1.2.3 Lapisan Hipodermis

Hipodermis, yaitu jaringan di bawah kulit, merupakan lapisan lemak dan jaringan ikat dengan banyak pembuluh darah dan saraf. Lapisan ini penting untuk mengatur kulit dan suhu tubuh (Sayogo, 2017). Hipodermis berada di bawah dermis. Tujuannya yaitu untuk menghubungkan kulit ke tulang dan otot di bawahnya dan memasoknya dengan pembuluh darah dan saraf. Ini terdiri dari

jaringan ikat longgar dan elastin. Jenis sel utama adalah fibroblas, adiposit, makrofag. Nama lain dari hipodermis yaitu jaringan subkutan (Thakre, 2017).

2.1.3 Fungsi Kulit

Kulit manusia memiliki banyak fungsi penting. Secara khusus, penting sebagai garis pertahanan pertama untuk melindungi tubuh dari berbagai unsur yang berasal dari lingkungan luar tubuh. Saat kulit rusak, integritas pertahanan kulit terganggu sehingga menjadi pintu masuk berbagai mikroorganisme seperti bakteri dan virus. Kulit juga berperan penting dalam kesehatan mental serta status sosial manusia (Sayogo, 2017). Fungsi utama kulit yaitu untuk melindungi dari gangguan potensial seperti patogen, bahan kimia, dan stres fisik, dan bertindak sebagai penghalang yang membantu menjaga keseimbangan homeostatis di dalam tubuh. Menyediakan fungsi penghalang fisik yang terletak pada keratinosit epidermis, dengan stratum korneum yang berkontribusi signifikan pada sifat penghalang (Low *et al*., 2021b).

2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah salah satu bentuk senyawa reaktif, umumnya dikenal sebagai senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan pada kulit terluarnya (Susanty, 2019). Radikal bebas merupakan senyawa dengan sifat tidak stabil, reaktivitas tinggi dan mempunyai kemampuan menangkap elektron dari molekul lain, dan cenderung mengubah molekul lain menjadi radikal. Radikal bebas mirip dengan senyawa oksigen dalam hal daya tarik elektron, oleh karena itu radikal bebas disebut akseptor elektron. Tingkat radikal bebas yang tinggi menyebabkan stres oksidatif, proses berkelanjutan yang merusak beberapa atau semua sel dalam tubuh. Stres oksidatif mengarah pada perkembangan penyakit kronis dan degeneratif tubuh, seperti kanker, artritis, asma, bronkitis, penyakit autoimun, penyakit kardiovaskular, neurodegenerasi, dan penuaan dini (Lian & Parfati, 2020). Radikal bebas juga berperan dalam proses Degeneratif, dimana jaringan secara perlahan kehilangan kemampuannya untuk mengganti/ memperbaiki diri dan mempertahankan fungsi normalnya. Perubahan tersebut dapat mempengaruhi sistem muskuloskeletal, sistem saraf, sistem kardiovaskular, sistem pernapasan, sistem sensorik (penglihatan, pendengaran, rasa dan sentuhan) dan organ dalam (Sulaiman & Anggriani, 2018).

Denham Harman, seorang dokter Amerika yang dikenal sebagai "bapak teori penuaan radikal bebas", berhipotesis bahwa radikal oksigen dapat terbentuk sebagai produk sampingan dari reaksi enzimatik dalam kehidupan. Pada tahun 1956 ia menggambarkan radikal bebas sebagai kotak Pandora yang dapat menyebabkan kerusakan sel yang parah, mutagenesis, kanker dan, yang tak kalah pentingnya, proses degeneratif penuaan biologis (Droge, 2002). Sumber radikal bebas bisa berasal dari tubuh kita sendiri (endogen) yang terbentuk dari proses metabolisme lain (proses pembakaran), protein, karbohidrat dan lemak yang kita cerna. Radikal bebas juga dapat diperoleh dari luar tubuh (eksogen) melalui polusi udara, asap kendaraan, berbagai bahan kimia, makanan yang dikarbonisasi (berkarbonasi), dan sinar UV (A. N. Sari, 2015).

Tubuh memiliki sistem pertahanan alami yang menetralisir radikal bebas agar tidak berkembang dan menjadi berbahaya bagi tubuh. Pengaruh lingkungan dan kebiasaan buruk seperti paparan radiasi sinar ultraviolet, polusi, kebiasaan mengkonsumsi "junk food" dan merokok dapat menyebabkan sistem pertahanan tubuh menjadi tidak mampu menahan radikal bebas dalam jumlah besar (Rizkayanti *et al*., 2017). Radikal bebas dapat dicegah atau dikurangi dengan pemberian atau konsumsi antioksidan (Halliwell, 2007). Menurut Cockell dan Knowland (1999), Efek radikal bebas dapat menyebabkan inflamasi dan penuaan serta merangsang karsinogen penyebab kanker. Untuk menetralisir radikal bebas, tubuh membutuhkan antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dan mengurangi efek negatifnya (Susanty, 2019). Walaupun manusia juga dapat menghasilkan senyawa yang dapat berperan aktif melawan radikal bebas, seperti enzim SOD (*superoksida dismutase*), *glutathione* dan katalase, namun jumlahnya seringkali tidak mencukupi sehingga diperlukan konsumsi makanan yang kaya antioksidan. seperti vitamin C, E, betakaroten dan fitokimia dari golongan fenol, mereka dapat melindungi dari serangan radikal bebas. Sumber antioksidan alami ini terdapat pada buah-buahan dan sayur-sayuran (Maryam *et al*., 2016).

2.3 Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu senyawa kimia yang mampu melindungi tubuh dengan cara meredam dampak negatif dari radikal bebas serta menghambat

reaksi oksidasi dengan menyumbangkan atom hidrogen sehingga dapat memperlambat proses penuaan dini dan dapat mencegah terjadinya kerusakan tubuh yang ditimbulkan oleh penyakit degeneratif (Muflihunna *et al*., 2019). Senyawa antioksidan dihasilkan oleh tubuh, tetapi antioksidan yang secara alami dihasilkan oleh tubuh jumlahnya terbatas untuk berkompetisi dengan radikal bebas yang dihasilkan setiap harinya. Maka dari itu, dibutuhkan asupan antioksidan dari luar tubuh. Ada banyak bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami. Tumbuhan merupakan kebanyakan dari sumber antioksidan alami dan umumnya adalah senyawa fenolik yang tersebar di seluruh bagian tumbuhan (Nurulita *et al*., 2019). Untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas, seperti sinar UV, diperlukan antioksidan yang berfungsi guna menstabilkan radikal bebas dengan cara melengkapi kekurangan elektron dari radikal bebas sehingga menghambat terjadinya reaksi berantai. Antioksidan dapat bertindak sebagai penyumbang radikal hidrogen atau dapat bertindak sebagai akseptor radikal bebas sehingga dapat menunda tahap inisiasi pembentukan radikal bebas (A. N. Sari, 2015).

2.4 Daun kelor

Kelor (*Moringa oleifera* L.) termasuk dalam Famili *Moringaceae*. *Moringaceae* merupakan Famili *monogeric* dengan satu genus yaitu Moringa yang mempunyai 33 spesies, di mana 4 spesies statusnya diterima, 4 spesies yaitu sinonim dan 25 spesies belum terverifikasi (Mabberley, 1987, dikutip dalam Purba, 2020). jumlah spesies yang telah disebutkan diatas, terdapat 13 spesies berasal dari daerah tropis (Olson, 2002). Moringa berasal dari Asia Selatan di mana ia tumbuh sebagian besar di kaki pegunungan Himalaya dari Pakistan timur laut hingga Benggala Barat Laut (India), tetapi kemudian diperkenalkan dan didistribusikan secara luas di banyak daerah subtropis di tempat lain di India, Pakistan, Afganistan, Bangladesh, Sri Lanka, Asia Barat, Arab, Afrika timur & barat, Florida Selatan, semua Hindia Barat, dan dari Meksiko ke Peru, Paraguay, dan Brasil (Navaratne *et al*., 2019). India merupakan penghasil Moringa terbesar (Navaratne *et al*., 2019).

Tanaman kelor (*Moringa oleifera* L.) merupakan jenis tanaman tropis yang tumbuh dan berkembang di daerah tropis seperti Indonesia (Kusmardika, 2020). Kelor (*Moringa oleifera* L.) mudah tumbuh. Tanaman kelor banyak ditemukan di

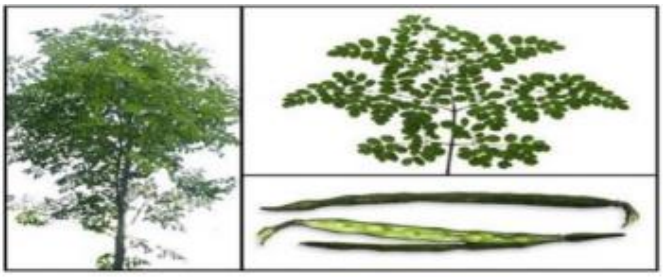
Aceh, Kalimantan, Sulawesi dan Kupang. Tanaman kelor menyebar ke Afrika dan seluruh Asia, kebanyakan di daerah beriklim tropis seperti Indonesia. Pohon kelor Indonesia tumbuh di pedesaan namun belum dimanfaatkan secara optimal (Sandi *et al*., 2019). Kelor merupakan tanaman semak setinggi 7-11 meter yang tumbuh subur di dataran rendah hingga 700 meter di atas permukaan laut. Kelor dapat tumbuh di daerah tropis dan subtropis pada semua jenis tanah, tahan kekeringan dan bertahan hingga 6 bulan serta mudah tumbuh dan tidak memerlukan perawatan yang intensif (Simbolan dan Katharina, 2007, dikutip dalam Isnan & M, 2017).

Pohon kelor memiliki beberapa julukan diantaranya; *The Miracle Tree*, pohon kehidupan dan pohon ajaib. Julukan tersebut muncul karena bagian-bagian dari pohon kelor mulai dari daun, buah, biji, bunga, kulit kayu, batang dan diakhiri dengan akar memiliki khasiat yang luar biasa. Selain itu tanaman kelor memiliki beberapa kandungan yang bermanfaat, sehingga dapat digunakan dalam makanan, kosmetik dan industri (Anwar *et al*., 2007).

2.4.1 Klasifikasi Kelor

Menurut (Ganatra *et al*., 2012) klasifikasi tanaman kelor sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Magnoliophyta
Sub Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Capparales
Famili	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Spesies	: *Moringa oleifera* Lamk.



Gambar 2. 2 Tanaman kelor

2.4.2 Morfologi Daun Kelor

Tanaman kelor merupakan pohon yang dapat mencapai ketinggian 12 meter dan diameter 30 cm. Kayunya termasuk jenis kayu lunak dan kualitasnya buruk. Daun tanaman kelor dicirikan oleh sirip yang tidak lengkap, kecil, lonjong, seukuran ujung jari. Daunnya berwarna hijau atau coklat kehijauan, berbentuk bulat telur atau lonjong terbalik, panjang 1-3 cm, lebar 4-1 cm, ujung daunnya tumpul, pangkal membulat, tepi rata. Kulit akar mempunyai rasa dan berbau tajam dan pedas, kuning muda di dalam, beralur halus, tetapi bening dan melintang. Akarnya sendiri tidak keras, bentuknya tidak beraturan, permukaan luar kulit kayu cukup halus, permukaan dalam cukup berserat, kayunya berwarna coklat muda atau krem berserat, sebagian besar terpisah (Isnan & M, 2017).

2.4.3 Kandungan Daun Kelor

Berdasarkan hasil uji fitokimia, daun kelor (*Moringa oleifera* L.) menunjukkan kandungan alkaloid, flavonoid, saponin, fenol, steroid/triterpenoid, dan tanin (Dwika *et al*., 2016) yang semuanya merupakan antioksidan. Flavonoid berperan sebagai antioksidan yang dapat mencegah oksidasi sel tubuh (Lusi, 2016). Kandungan fenolik pada daun memberikan sifat penangkal radikal bebas (Pandey, 2012). Daun kelor segar memiliki kandungan fenolik 3,4%, sedangkan ekstrak daun kelor memiliki kandungan fenolik 1,6% (Foidl & Hps, 2001). Menurut penelitian saat ini, daun kelor segar memiliki efek antioksidan 7 kali lebih kuat dari vitamin C, 100 gram daun kelor (*Moringa oleifera* L.) mengandung hingga 220 mg vitamin C (Fuglie, 2001, dikutip dalam Lian & Parfati, 2020). Kandungan antioksidan yang tinggi pada *Moringa oleifera* dapat digunakan pada pasien yang menderita penyakit radang seperti kanker, hipertensi dan penyakit kardiovaskular (Toripah *et al*., 2014). *Moringa oleifera* juga telah terbukti bertindak sebagai antioksidan. Kombinasi banyak senyawa antioksidan dalam daun *Moringa oleifera* telah terbukti

lebih efektif daripada antioksidan tunggal karena mekanisme sinergis dan potensiasi mekanisme *cascade* antioksidan (Ganatra *et al*., 2012; Toripah *et al*., 2014).

2.5 Tinjauan Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penghilangan senyawa-senyawa kimia yang dapat larut dengan cara memisahkannya dari bahan-bahan yang tidak larut dalam suatu cairan pelarut (Erawati, 2012). Mekanisme proses ekstraksi dimulai dengan perpindahan pelarut dari larutan ke permukaan padatan (adsorpsi), diikuti difusi pelarut ke dalam padatan dan pelarutan pelarut oleh pelarut, kemudian difusi ikatan terlarut-pelarut ke dalam padatan, dan desorpsi campuran zat terlarut-pelarut permukaan padat pada permukaan padat, badan pelarut (Pramudono *et al*., 2008). Coulson dan Richardson mengatakan bahwa *leaching* sering digunakan untuk mengekstrak bagian tanaman obat seperti akar, daun dan batang (Gustia *et al*., 2017). Faktor penting yang mempengaruhi ekstraksi padat-cair adalah ukuran partikel, jenis pelarut, suhu dan campuran (Gustia *et al*., 2017). Jenis metode ekstraksi yang dapat digunakan (Agung, 2017) adalah sebagai berikut:

a. Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi yang paling sederhana dan tertua. Karena metode ini mempunyai beberapa keunggulan seperti biaya rendah, peralatan sederhana dan tanpa perlakuan panas, masih banyak digunakan yang menjadikannya pilihan yang tepat untuk ekstraksi senyawa tidak tahan panas (*termolabile*).

b. Perkolasi

Perkolasi dan maserasi memiliki kesamaan yaitu tidak memerlukan panas dalam proses ekstraksi. Alat utamanya adalah perkolator, sebuah bejana berbentuk silinder atau kerucut terbalik dengan lubang atau keran di bagian bawah. Proses perkolasi sendiri dilakukan dengan cara melarutkan metabolit pada bahan yang akan diekstrak dengan cara mengalirkan pelarut yang sesuai ke dalam matriks bahan atau sampel dikemas atau disusun dalam perkolator agar metabolit terserap ke dalam pelarut dan aliran keluar bejana disesuaikan. Proses ini membutuhkan banyak waktu dan banyak pelarut.

c. Sokhlet

Metode *Soxhlet* adalah metode ekstraksi bahan yang telah dihaluskan dan dibungkus dengan kertas saring kemudian ditempatkan pada alat *Soxhlet* dimana pelarutnya terlebih dahulu ditempatkan pelarut pada labu *Soxhlet* pada bagian bawah. *Hot plate* diletakkan langsung di bawah botol *Soxhlet* untuk memanaskan botol *Soxhlet*. Ketika *soxhlet* dipanaskan, pelarut di dalam *soxhlet* menguap dan karena sistem pendingin di bagian atas, ia mengembun lagi (kondensasi), yang melelehkannya kembali dengan menuangkan bahan ke dalam kertas saring dan merendamnya lebih awal. Hasilnya adalah pelarut mengekstrak bahan/sampel dan melarutkan senyawa metabolit. Setelah beberapa waktu, larutan ekstraksi mencapai volume tertentu, dan melalui mekanisme *Soxhlet*, larutan dipompa dan dialirkan ke dalam labu *Soxhlet*. Pada saat yang sama botol dalam keadaan panas sehingga larutan menguap lagi menyisakan ekstrak di dalam botol dan hanya pelarut yang menguap kembali menjadi kental. Proses ini berlangsung terus-menerus terpapar pada efek mekanik dan kimia dari pelarut, membuat proses ekstraksi lebih cepat dan lebih efisien.

d. Refluk

Refluk adalah ekstraksi dengan pelarut menggunakan suhu titik didihnya untuk waktu tertentu dan jumlah pelarut yang terbatas dan relatif konstan dengan adanya refluks. Refluk mengacu pada pelarut yang berulang kali atau terus menerus didaur ulang dengan dikondensasi berulang kali dalam perangkat kondensor.

2.6 Sediaan Masker

Masker merupakan kosmetik yang aman digunakan pada tahap akhir perawatan wajah. Dioleskan setelah dipijat, dipijat ke seluruh wajah, kecuali alis, mata dan bibir, sehingga seolah-olah memakai topeng wajah. Masker juga termasuk kosmetik yang berkerja secara mendalam (*deep cleansing*) karena dapat mengangkat sel-sel keratin yang mati. penggunaan masker yaitu sebagai pencegahan, menyamarkan, pengurangan keriput dan hiperpigmentasi. Meningkatkan dan mengencangkan warna kulit (daya bingkas). menghaluskan dan

melembutkan kulit (Tresna, 2010). Masker merupakan salah satu produk kosmetik yang paling sering digunakan untuk perawatan wajah (Khodijah *et al*., 2015).

2.6.1 Gel

Gel, kadang-kadang disebut Jeli, adalah sistem semi-padat yang terdiri dari suspensi partikel anorganik kecil atau molekul organik besar yang diserap oleh cairan. Jika massa gel terdiri dari jaringan partikel kecil individu, gel diklasifikasikan sebagai sistem dua fase. misalnya Gel Aluminium Hidroksida. Dalam sistem dua fase, ketika ukuran partikel fase terdispersi relatif besar, massa gel kadang-kadang dinyatakan dalam bentuk magma, seperti Magma bentonit. Gel fase tunggal terdiri dari makromolekul organik yang tersebar merata dalam cairan sehingga tidak ada ikatan yang terlihat antara makromolekul yang terdispersi dan cairan. Gel fase tunggal dapat dibuat dari makromolekul sintetik atau gom alam (Depkes RI, 2014).

2.6.1.1 Keuntungan Gel

Sediaan dalam bentuk gel memiliki viskositas dan daya lengket yang tinggi, sehingga tidak mudah mengalir di permukaan kulit, bersifat tiksotropik, sehingga mudah diaplikasikan secara merata, tidak meninggalkan bekas, hanya membentuk lapisan tipis seperti film. saat digunakan, mudah dicuci dengan air dan memberikan rasa sejuk setelah digunakan. memiliki daya rekat tinggi yang tidak menyumbat pori-pori, sehingga tidak mengganggu pernapasan pori-pori (Nabi *et al*., 2016).

2.6.1.2 Kekurangan Gel

Saat menyimpan produk gel, pelarut dapat menguap dari formulasi dan gel dapat mengering. Sebagian besar gel mengandung air, yang dapat mencapai hingga 90% dari total kandungan gel. Kandungan air dapat meningkatkan serangan mikroba atau jamur pada gel (Nabi *et al*., 2016) Selain itu, gel tidak dapat berkontak lama dengan kulit karena sebagian besar bahan penyusun gel adalah air, sehingga mudah hilang jika terkena air (Rathod & Mehta, 2015).

2.6.1.3 Karakteristik Sediaan Gel

Menurut Sharma *et al*., (2022) sifat atau karakteristik sediaan gel antara lain:

- *Swelling*

  Gel memiliki kemampuan membengkak dan menyerap cairan saat mengembang. Ini dapat dilihat sebagai awal dari proses dekomposisi.

Interaksi gel-gel digantikan oleh interaksi gel-pelarut karena pelarut menembus matriks gel. Ikatan silang normal dalam matriks gel, yang mencegah degradasi sempurna, menyebabkan pembengkakan terbatas. Jika kombinasi pelarut memiliki parameter kelarutan yang sama dengan garis, gel akan membengkak secara signifikan.

- Sineresis

  Setelah didiamkan, banyak struktur gel yang mengalami kompresi. Cairan interstisial berkomunikasi dan berkumpul di lapisan atas gel. Siklus ini, yang dikenal sebagai sineresis, diamati tidak hanya pada hidrogel alami tetapi juga pada hidrogel organogel dan anorganik. Sineresis sering meningkat ketika gugus polimer menjadi lebih kecil. Pelepasan beberapa kekhawatiran selama pengerasan gel dikreditkan ke perangkat menyusut. Ruang interstisial yang tersedia untuk disolusi berkurang karena muatan ini terasa jauh lebih baik dan memaksa cairan untuk bermanifestasi. Efek osmotik diamati dalam sineresis gel yang dibentuk oleh ion pembentuk gel gelatin atau *psyllium*, serta efek pengikatan pH dan elektrolit.

- *Ageing*

  Akumulasi yang lambat dan tidak terkendali sering terjadi pada struktur koloid. Telah disarankan bahwa hubungan ini berkembang. Saat gel matang, organisasi gelasi khusus yang padat secara bertahap terbentuk. Saat media cair dihilangkan dari gel yang baru terbentuk, perendaman berhipotesis bahwa interaksi ini menyerupai siklus gelasi awal dan berlanjut setelah gelasi yang mendasarinya.

- Struktur

  Dalam gelasi, keberadaan organisasi yang terdiri dari partikel pintar menyebabkan gel mengeras. Struktur organisasi dan sifat gel ditentukan oleh konsep partikel dan sifat gaya yang bertanggung jawab untuk pengikatan. Partikel koloid hidrofilik yang terisolasi dapat terdiri dari makromolekul tunggal, agregat bulat, atau isometrik dari atom kecil.

- Rheologi

  Larutan bahan pembentuk gel dan dispersi padatan flokulan adalah pseudoplastik, yaitu yang menunjukkan perilaku aliran non-Newtonian

yang ditandai dengan penurunan viskositas dan peningkatan laju geser. Struktur longgar partikel anorganik yang terdispersi air dihancurkan oleh tegangan geser yang diterapkan karena putusnya asosiasi antar partikel, menunjukkan kecenderungan yang lebih besar untuk mengalir. Demikian pula, tegangan geser yang diterapkan pada makromolekul menyelaraskan molekul ke arah tegangan, meluruskannya dan mengurangi hambatan.

2.6.1.4 Klasifikasi Gel

Berdasarkan komponennya, basis gel dibedakan menjadi dua kelompok yaitu basis gel hidrofilik dan basis gel hidrofobik (Joseph, 1990).

- Basis Gel Hidrofilik

  Umumnya memiliki basis yang tersusun dari molekul organik besar yang dapat larut dalam fase terdispersi. Sistem koloid hidrofilik lebih mudah dibuat dan lebih stabil daripada sistem koloid hidrofobik. Gel hidrofilik umumnya mengandung bahan-bahan seperti pengembang, air, bahan pembasah, dan pengawet (Joseph, 1990). Sifat-sifat gel jenis ini adalah fluiditas, *thixotropic*, tidak lengket, mudah menyebar, mudah dibersihkan, kompatibilitas dengan beberapa eksipien, dan kelarutan air.

- Basis Gel Hidrofobik,

  Memiliki basis yang umumnya terdiri dari parafin cair dan polietilen atau minyak lemak yang mengandung silika koloid atau aluminium atau zat pembentuk gel sabun seng (Lieberman dalam Joseph, 1990). Gel ini terdiri dari partikel anorganik dan ketika ditambahkan ke fase terdispersi, interaksi terjadi interaksi antara basis gel dan fase terdispersi. Basis gel hidrofobik tidak menyebar secara spontan (Joseph, 1990).

2.6.2 Masker Gel *Peel Off*

Produk masker yang beredar di masyarakat dan tersedia dalam berbagai model di pasaran antara lain masker bubuk, masker krim, masker gel, dan masker kertas. Masker praktis adalah masker gel yang dapat langsung dilepas setelah kering, atau biasa dikenal dengan masker gel *peel off* (Muflihunna *et al*., 2019). Oleh karena itu dikembangkan produk masker *peel off* (Muflihunna *et al*., 2019). Masker *peel off* adalah produk kosmetik perawatan wajah yang berbentuk seperti gel dan setelah lama dioleskan pada kulit, segera mengering, produk ini membentuk

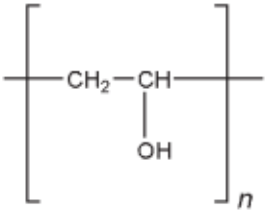
lapisan *film* transparan yang elastis, sehingga dapat dikelupas (Morris, 1993). Masker gel (*Peel off Mask*) biasanya mengandung bahan dasar yang bersifat seperti gel yaitu gum, latex dan biasanya dikemas dalam tube (Silvia & Dewi, 2022). Dengan masker gel *peel-off*, efek pengelupasan terletak pada bahannya yang lengket sehingga dapat membentuk lapisan *film* yang mudah terkelupas setelah dikeringkan (Darma *et al*., 2015).

Masker wajah *peel-off* memiliki keunggulan dalam pengaplikasiannya yaitu mudah terkelupas, atau seperti film elastis, mudah terkelupas (Rahmawanty *et al*., 2015). Aplikasinya dibalurkan dan diratakan langsung pada kulit wajah. Tunggu hingga masker mengering rata-rata ± 15-20 menit. Sedangkan untuk mengangkat, menariknya, mengangkatnya secara perlahan dari dagu ke pipi, diakhiri di dahi (Tresna, 2010). Masker wajah yang dapat dilepas dapat meningkatkan hidrasi kulit, kemungkinan karena adanya oklusi (Velasco *et al*., 2014). Hary, *et al*., 1982 (dikutip dalam Merwanta *et al*., 2019) menyatakan bahwa sediaan masker wajah *peel off* sangat mudah digunakan karena tidak menimbulkan rasa sakit, gelnya cepat mengering setelah gel mengering, dibersihkan dengan menghilangkan lapisan gel pada kulit tanpa air, sehingga lebih nyaman digunakan.

Beberapa keunggulan masker *peeling gel* dibandingkan masker lainnya adalah sediaan berupa gel pendingin dapat merelaksasikan dan membersihkan wajah secara optimal, dapat memberikan efek mendinginkan karena air perlahan menguap dari kulit, tidak mengganggu fisiologis. Berfungsi pada kulit dan tidak menyumbat pori-pori kulit (Shai *et al*., 2009, dikutip dalam Astuti *et al*., 2018), dapat menjaga keremajaan kulit dan memperbaiki kulit wajah yang mengalami masalah kerutan dan penuaan, melembutkan dan meningkatkan elastisitas kulit, menghilangkan kulit mati, biasanya menghilangkan kulit kusam, viskositas tinggi, lapisan gel lebih fleksibel dan tidak lengket (Merwanta *et al*., 2019).

2.7 Bahan Tambahan Masker Gel *Peel Off*

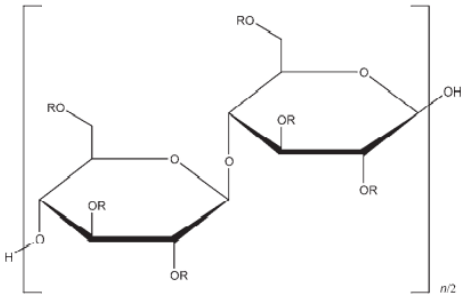
2.7.1 Polivinil Alkohol (PVA)



Gambar 2. 3 Struktur Kimia Polivinil Alkohol

Polivinil alkohol juga dikenal sebagai PVA, Alcotex, Airvol, Elvanol, Celvol, Gohsenol, Gelvatol, Mowiol, Lemol, poly (alcohol vinylicus), Polyvinol, vinyl alcohol polymer. Polivinil alkohol, memiliki rumus molekul $(C_2H_4O)n$, merupakan polimer sintetik yang larut dalam air, sedikit larut dalam etanol 95%, tidak larut dalam pelarut organik, dan memiliki berat molekul sekitar 20.000-200.000. Organoleptis pada polivinil alkohol yaitu tidak berbau, bubuk butiran putih atau putih pudar. Bahan ini dapat bertindak sebagai penstabil, pelumas, agen pelapis dan peningkat viskositas. Di bidang teknik farmasi, polivinil alkohol digunakan dalam formulasi topikal dan optalmik dan bertindak sebagai penstabil emulsi (0,25-3,0% b/v) (Rowe, 2009). Selain itu, polivinil alkohol juga dapat digunakan sebagai pembentuk *film* pada masker gel yang dapat dilepas. PVA memiliki sifat adesif yang memungkinkannya membentuk lapisan *film* yang mudah terkelupas setelah dikeringkan (Birck *et al*., 2014). Kandungan PVA merupakan faktor terpenting yang mempengaruhi kemampuan pembentukan *film* masker wajah *peel-off* (Beringhs *et al*., 2013). PVA digunakan sebagai pembentuk *film* untuk masker wajah lepasan dengan konsentrasi 10-16% (Sulastri & Chaerunisaa, 2018). PVA tidak menyebabkan iritasi kulit dan mata ketika PVA digunakan pada konsentrasi kurang dari 10% dalam kosmetik dengan konsentrasi hingga 7% (Saputra *et al*., 2019).

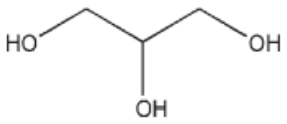
2.7.2 Hypromellose (HPMC)



Gambar 2. 4 Struktur Kimia Hypromellose

Hypromellose disebut juga dengan Benecel MHPC, E464, hydroxypropyl methylcellulose, HPMC, hypromellosum, Methocel, methylcellulose propylene glycol ether, methyl hydroxypropylcellulose, Metolose, MHPC, Pharmacoat, Tylopur, Tylose MO. hypromellose Larut dalam air dingin, membentuk koloid kental larutan, praktis tidak larut dalam air panas, kloroform, etanol (95%), dan eter, tetapi larut dalam campuran etanol dan diklorometana, campuran metanol dan diklorometana, dan campuran air dan alkohol. Nilai tertentu dari hypromellose larut dalam larutan aseton encer, campuran dari diklorometana dan propan-2-ol, dan pelarut organik lainnya. dan memiliki berat molekul kira-kira 10.000–1.500.000. Hypromellose tidak berbau dan tidak berasa, berwarna putih atau putih krem, serbuk berserat atau granular. Bahan ini dapat berfungsi sebagai zat penstabil, agen pembentuk *film*, agen pelapis dan agen untuk meningkatkan viskositas. Pada bidang teknologi farmasi *hypromellose* digunakan dalam formulasi sediaan topikal, oral, hidung dan optalmik. Selain itu, HPMC berfungsi sebagai *gelling agent* pembentuk gel. HPMC merupakan *gelling agent* semi sintetik turunan selulosa yang tahan terhadap fenol dan stabil pada pH 3 sampai 11. HPMC dapat membentuk gel yang jernih dan bersifat netral serta memiliki viskositas yang stabil pada penyimpanan jangka panjang. dalam pembentuk lapisan *film* masker wajah *peel off* rentang HPMC yang digunakan yaitu konsentrasi 2-7% (Rowe, 2009).

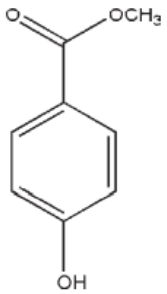
2.7.3 Glycerin



Gambar 2. 5 Struktur Kimia Glycerin

Gliserin adalah cairan bening, tidak berwarna, tidak berbau, kental, higroskopis, rasanya manis, kira-kira 0,6 kali lebih manis dari sukrosa. Nama lain dari glycerin yaitu Croderol, E422, glicerol, glycerine, glycerolum, Glycon G-100, Kemstrene, Optim, Pricerine, 1,2,3-propanetriol, trihydroxypropane glycerol. Rumus empiris dari glycerin $C_3H_8O_3$ dengan berat molekul 92.09 dimana gliserin sedikit larut dalam aseton, Praktis tidak larut dalam Benzena, Praktis tidak larut dalam kloroform, larut dalam etanol (95%), Eter 1 dalam 500, Etil asetat 1 dalam 11, Larut dalam Metanol, Praktis tidak larut dalam minyak, larut dalam air. Gliserin berfungsi sebagai pengawet antimikroba, *cosolvent*, emolien, humektan, *plasticizer*, pelarut, bahan pemanis, agen tonisitas. Di bidang teknologi farmasi gliserin digunakan dalam berbagai formulasi farmasi termasuk sediaan oral, optik, mata, topikal, dan parenteral. Dalam formulasi farmasi dan kosmetik topikal, gliserin digunakan terutama untuk sifat humektan dan emoliennya. Gliserin digunakan sebagai pelarut atau *cosolvent* dalam krim dan emulsi. Selain itu gliserin juga digunakan sebagai *plasticizer* dan pelapis film dalam industri kosmetik (Rowe, 2009).

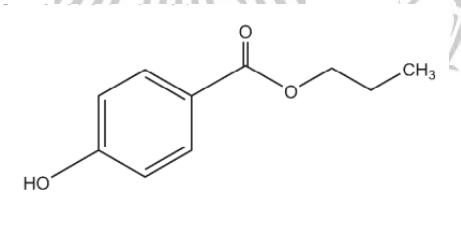
2.7.4 Metilparaben (Nipagin)



Gambar 2. 6 Struktur Kimia Metilparaben

Rumus empiris metilparaben adalah $C_8H_8O_3$ dengan berat molekul 152,15 dan merupakan serbuk kristal tidak berwarna atau kristal putih, tidak berbau atau hampir tidak berbau. Methylparaben juga disebut Nipagin M, Aseptoform M, Metil asam 4- hidroksibenzoat ester, CoSept M, Methyl Chemosept, metagin, methylis parahydroxybenzoas, Solbrol M, metil p-hidroksibenzoat, Tegosept M. Metilparaben banyak digunakan sebagai pengawet antimikroba dalam kosmetik, sediaan makanan, dan farmasi. Methylparaben dapat digunakan sendiri atau dikombinasikan dengan ester paraben lain atau agen antimikroba lainnya. Paraben efektif dalam kisaran pH yang luas dan memiliki spektrum aktivitas antimikroba yang luas. Aktivitas antimikroba meningkat dengan bertambahnya panjang rantai gugus alkil. Sifat pengawet juga ditingkatkan dengan menambahkan propilen glikol (2-5%) atau dengan menggunakan paraben bersama dengan agen antimikroba lainnya seperti imidurates. Karena kelarutan paraben yang buruk, garam paraben (terutama garam natrium) lebih sering digunakan dalam formulasi. Penggunaan metilparaben dalam formula dapat membuat pH sediaan menjadi lebih basa karena kelarutan paraben yang buruk, terutama dalam garam natrium. Kombinasi propilparaben dengan konsentrasi 0,02% dan metilparaben dengan konsentrasi 0,18% dapat digunakan dalam berbagai formulasi obat parenteral (Rowe, 2009).

2.7.5 Propilparaben (Nipasol)



Gambar 2. 7 Struktur Kimia Propilparaben

Propylparaben adalah serbuk kristal putih, tidak berbau dan tidak berasa, dengan sinonim Nipasol M, Aseptoform P, Propil Aseptoform, 4- hidroxybenzoic acid propyl ester, CoSept P, propil butex, Nipagin P, propagin, Propyl Chemosept, propil hidroksibenzoat, Propyl Parasept, Solbrol P, Tegosept P. Rumus molekul propilparaben adalah $C_{10}H_{12}O_3$ dengan berat molekul 180,20. Propylparaben bertindak sebagai pengawet mikroba. Dalam bidang teknologi farmasi, Propilparaben digunakan sebagai pengawet antimikroba pada kosmetik, makanan,

dan obat-obatan. Propylparaben dapat digunakan sendiri atau dikombinasikan dengan ester paraben lain atau agen antimikroba lainnya. Paraben efektif dalam kisaran pH yang luas dan memiliki spektrum aktivitas antimikroba yang luas. Penggunaan propilparaben dalam formula dapat mempengaruhi pH sediaan menjadi lebih basa karena rendahnya kelarutan paraben, terutama dalam garam natrium. Dengan konsentrasi propilparaben 0,02% b/v dan metilparaben konsentrasi 0,18% b/v, kombinasi tersebut dapat digunakan untuk berbagai formulasi sediaan parenteral (Rowe, 2009).

2.7.6 Aquadest

Aquadest memiliki beberapa sinonim, yaitu Aqua, aqua purificata, dan hydrogen oxide. aquadest merupakan cairan bening, tidak berwarna, tidak berbau dan tidak berasa. Aquadest bisa larut dalam kebanyakan pelarut polar. Aquadest digunakan sebagai bahan baku, Pelarut dalam pengolahan, formulasi dan pembuatan produk farmasi, *Active Pharmaceutical Ingredients* (API) dan intermediet dan reagen analitis. Secara kimiawi aquadest stabil dalam semua keadaan fisik (es, cair dan uap). Khususnya sistem penyimpanan dan distribusi harus ada pastikan aquadest terlindungi dari ion dan kontaminasi organik, masing-masing mengarah ke pertumbuhan konduktivitas dan karbon organik total. Selain itu, juga harus dilindungi terhadap penetrasi partikel asing dan mikroorganisme pertumbuhan mikroba dapat dicegah atau diminimalkan. Namun, aquadest untuk tujuan tertentu harus disimpan dalam wadah yang sesuai (Rowe, 2009).

2.8 Iritasi Kulit

Iritasi adalah fenomena peradangan yang terjadi karena adanya zat asing di kulit. Gejala dapat berupa panas akibat pelebaran pembuluh darah pada area yang terpapar benda asing, ditandai dengan kemerahan pada area tersebut (eritema) dan dapat juga menyebabkan pembengkakan (Fajriyah *et al*, 2020). Potensi iritasi kulit tidak hanya terkait dengan iritasi yang melekat (yaitu bahaya) dari bahan kimia, tetapi juga dengan jenis paparan bahan kimia yang terkait dengan produk. Penilaian paparan mencakup informasi tentang konsentrasi, durasi, frekuensi, area tubuh, jenis paparan (misalnya, tertutup atau tidak tertutup) dan jenis produk (misalnya, dicuci atau dibiarkan). Sebagai contoh, dimungkinkan untuk memformulasi bahan kimia kaustik dalam produk tertentu pada tingkat rendah yang tidak menyebabkan

iritasi, sementara bahan iritan yang relatif ringan pada tingkat tinggi pada produk yang dioleskan secara topikal dan dibiarkan pada kulit dapat menyebabkan iritasi yang tidak dapat diterima (Robinson, 2002). Bahan kosmetik yang dapat mengiritasi kulit antara lain bahan pengawet (antimikroba), antioksidan, pewangi, pewarna, dan pelindung sinar UV. Komponen-komponen ini sering terdapat dalam komposisi kosmetik dalam jumlah yang sangat kecil sehingga biasanya tidak mempengaruhi potensi iritasi keseluruhan dari produk akhir (Epstein, 2009). kemungkinan iritasi kulit juga dipengaruhi oleh tingkat keasaman (pH) produk. Produk kosmetik dengan nilai pH terlalu tinggi (di atas 8) atau terlalu rendah (di bawah 4) dapat menyebabkan iritasi kulit (Tranggono & Latifah, 2007).

2.9 Uji Iritasi

Uji iritasi akut dermal adalah percobaan pada hewan untuk mendeteksi efek toksik yang terjadi setelah terpapar sediaan uji pada dermal selama 3 menit sampai 4 jam. Prinsip uji iritasi akut dermal adalah paparan sediaan uji dalam dosis tunggal pada kulit hewan uji dengan area kulit yang tidak diberi perlakuan berfungsi sebagai kontrol. Tingkat iritasi diukur pada interval waktu tertentu yaitu pada jam ke 1, 24, 48 dan 72 jam setelah paparan sediaan uji dan untuk melihat reversibilitas, pengamatan dilanjutkan hingga 14 hari. Tujuan uji iritasi akut dermal bertujuan untuk mengetahui adanya efek iritasi pada kulit dan untuk menilai serta mengevaluasi karakteristik suatu zat apabila terpapar pada kulit (BPOM, 2014).

Pengujian iritasi adalah pengujian yang amat penting dalam sediaan topikal sebab hal tersebut adalah salah satu syarat sediaan topikal yang baik merupakan tidak mengiritasi kulit (Fajriyah *et al*, 2020). Oleh sebab itu perlu dilakukannya pengujian keamanan pada sediaan kosmetika. Keamanan suatu produk adalah syarat terpenting yang harus diperhatikan sebelum diedarkan kepada masyarakat luas. Salah satu prosedur guna memastikan keamanan suatu produk yaitu uji iritasi (Robinson & Perkins, 2002). Dilakukannya uji iritasi guna mengetahui efek iritasi dari sediaan gel sesudah digunakan pada kulit sehingga dapat diketahui tingkat keamanan sediaan gel. Pengujian iritasi dilakukan, guna mencegah timbulnya efek samping pada kulit (Fajriyah *et al*, 2020). Jenis metode pada uji iritasi sangatlah beragam baik secara in vivo, in vitro atau ex vivo. Terdapat tiga metode in vivo / ex vivo, yaitu: uji korosi kulit (Corrositex®), uji opacity dan permeabilitas kornea

bovine (*Bovine Corneal Opacity* dan *Permeability*), dan uji pada telur ayam menggunakan bagian membran *chorioallantoic* (*Hen's Egg Test on the Chorioallantoic*) (Cazedey *et al*., 2009).

2.9.1 Metode Uji Korosi Kulit

Metode uji korosi kulit adalah sebuah metode alternatif in vitro ke metode in vivo yang bertujuan untuk menilai potensi bahan kimia yang dapat menyebabkan korosi pada kulit. Bahan-bahan kimia yang bersifat korosif terhadap kulit dalam metode ini dapat dikelompokkan menjadi 3 sub kelompok : (1.) bahaya besar, (2.) bahaya sedang, dan (3.) bahaya paling kecil. Pada pengelompokan tersebut didasarkan pada hasil korosi membran atau hasil pewarnaan pada sistem deteksi. Bahan pengujian yang digunakan dalam metode ini yaitu tabung plastik yang diisi dengan sistem deteksi kimia (*Chemical Detection System*) lalu ditutupi oleh membran. Sediaan yang diujikan ditempatkan pada membran. Apabila zat kimia bersifat korosif maka akan menembus membran dan menghasilkan perubahan warna pada CDS, tetapi jika zat kimia non-korosif, bentuk membran akan tetap utuh dan tidak terjadi perubahan warna. Dua jam sebelum melakukan pengujian harus dilakukan persiapan matriks membran. Matriks membran ini dilengkapi dengan membran berbentuk serbuk serta pengencernya. Dalam melakukan prosedur pada metode tersebut, harus dilakukannya pengadukan serta dipanaskan sampai 70 ºC pada penangas air hingga matriks membran benar-benar larut lalu dinginkan hingga suhu mencapai 2ºC – 8ºC (Cazedey *et al*., 2009).

2.9.2 Metode Bovine Corneal Opacity dan Permeability Assay

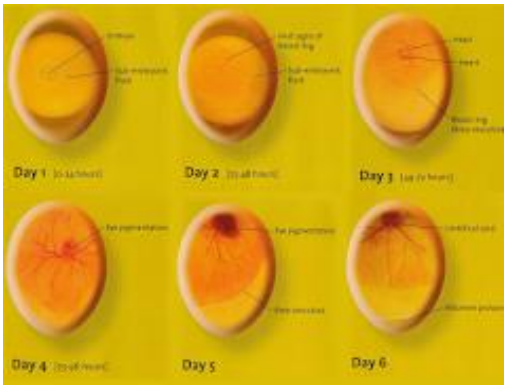
Pada metode BCOP, dikembangkan sebagai alternatif dari Draize *Test*. Tujuan pada penggunaan metode tersebut yaitu untuk mengevaluasi potensi iritasi pada mata dari bahan uji sebagai ukuran kapasitas menginduksi opasitas atau permeabilitas kornea. Adanya denaturasi protein, presipitasi, atau induksi pembengkakan seluler stroma disebabkan oleh opasitas kornea. Permeabilitas kornea dinilai dengan menggunakan *fluorescein* yang ditandai dengan hilangnya hubungan dan sifat penghalang membran sel epitel kornea. Pengujian yang digunakan pada metode ini dibagi dalam 2 pengujian yaitu opasitas dan permeabilitas. Pada pengujian opasitas digunakan kornea mata sapi setelah sapi tersebut mati, lalu diletakkan dalam larutan garam dingin. Kornea sapi yang

digunakan sebelumnya diperiksa dengan teliti untuk dipilih yang masih bagus dan ditempatkan di ruang BCOP khusus bersamaan dengan media esensial minimum (*Minimum Essential Medium* / MEM) yang mana tetap berhubungan dengan epitel dan endothelium kornea. Setelah proses inkubasi selama 1 jam dengan temperatur 32ºC dan dilakukannya pembacaan awal opasitas (*pretest*) menggunakan opasitometer. Nilai opasitas yang diperoleh dengan inkubasi lalu dikurangi dari nilai opasitas yang dibaca dalam *pre-test* guna memberikan nilai yang benar (Cazedey *et al*., 2009).

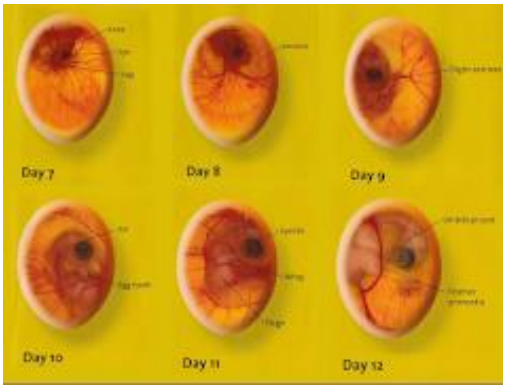
Berikutnya dilakukan pengujian permeabilitas dengan cara melihat hasil pengukuran *fluorescein* pada kornea. Rata-rata pada sampel yang diambil dari ruang posterior, diukur dengan menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 490 nm guna menentukan jumlah *fluorescein* yang telah ada (Cazedey *et al*., 2009).

2.9.3 Metode Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane

Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HETCAM) merupakan metode alternatif lain pada eksperimen hewan untuk menguji sifat korosif atau iritasi okular yang menggunakan membran *chorioallantoic* dari telur ayam yang berembrio. Metode ini dinilai dari kerusakan yang ada pada membran guna menentukan potensi terjadinya iritasi pada konjungtiva. Efek yang dihasilkan pada pembuluh darah kecil dan protein dari jaringan lunak membran *chorioallantoic* diperkirakan mempunyai kesamaan dengan efek yang terlihat pada zat yang ada pada mata kelinci. Membran *chorioallantoic* (CAM) merupakan jaringan lengkap yang mengandung pembuluh arteri, pembuluh vena, dan pembuluh kapiler, secara teknis mudah dipelajari. CAM dapat merespons inflamasi yang sama dengan hasil yang diamati dengan menggunakan Draize *Test*. Hasil pengamatan dalam vaskularisasi yang berkembang dengan baik memberikan hasil yang ideal pada studi iritasi mata. Pada prinsip dalam menggunakan metode ini berdasarkan pada zat uji (sediaan padat 0,3g dan sediaan cair 0,1ml sampai 0,3ml) pada membran *chorioallantoic* telur yang sudah dibuahi selama pengembangan 9 sampai 10 hari yang hasilnya dapat dinilai dengan berdasarkan jenis iritasi (lisis, perdarahan atau koagulasi) (Cazedey *et al*., 2009).



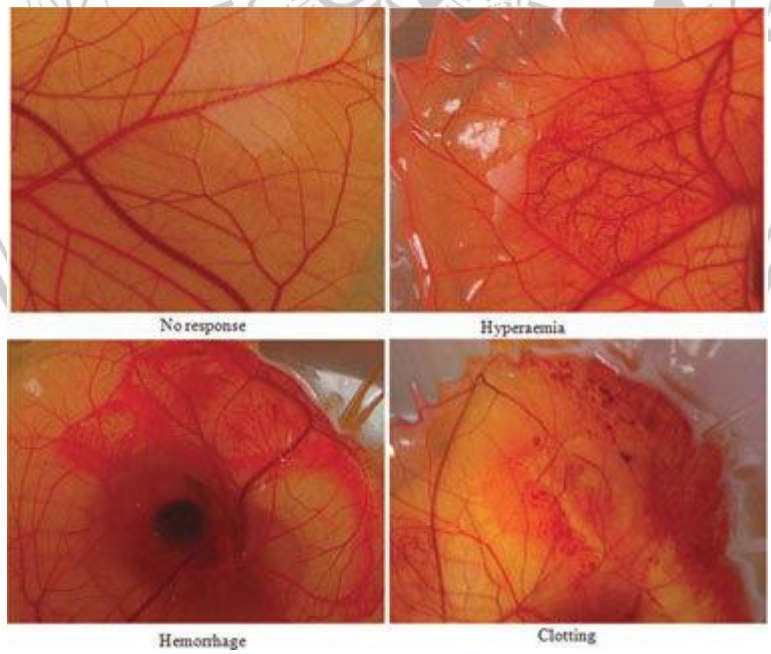
Gambar 2. 8 embrio ayam usia 1-6 hari



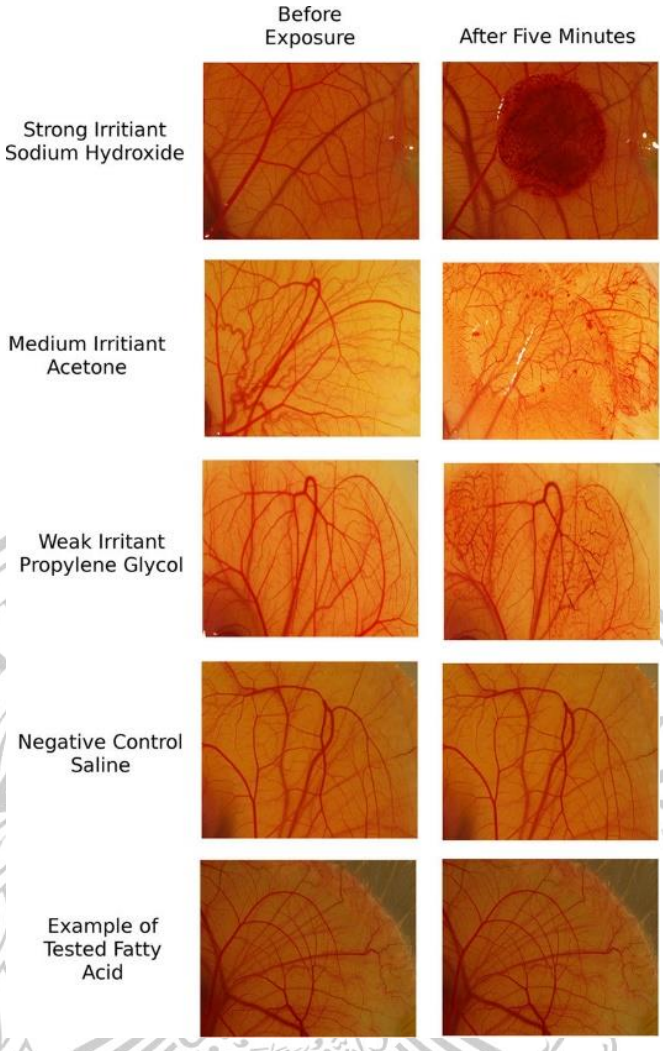
Gambar 2. 9 embrio ayam usia 7-12 hari

Gambar 2. 10 embrio ayam usia 13-18 hari

Gambar 2. 11 embrio ayam usia 19-21 hari



Gambar 2. 12 tidak iritasi, lisis, hemoragi, koagulasi



Gambar 2. 13 iritasi ringan, sedang dan berat

Pada penelitian ini menggunakan metode HET-CAM (*Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane*) dengan mempertimbangkan dalam keuntungan pada penggunaannya yaitu dapat mempersingkat waktu serta biaya dalam pengujian sementara pada analisis kuantitatif digunakannya dalam beberapa parameter. Metode ini kemungkinan terjadi adanya keterlambatan dalam tanggapan cukup minim, tidak terdapatnya lapisan yang mampu meningkatkan kemungkinan munculnya positif palsu, serta ketidakmampuan untuk menilai kerusakan yang dapat dikembalikan.