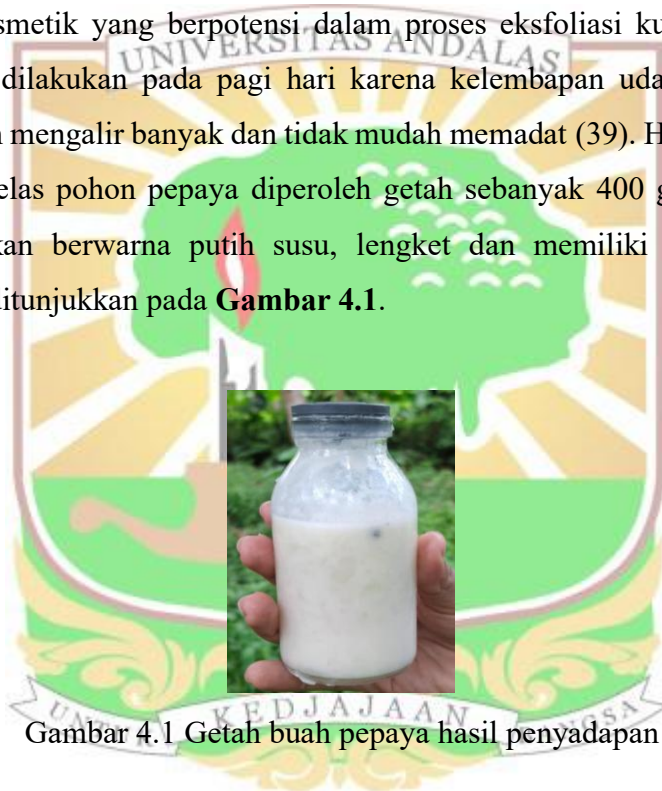


## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pengambilan Sampel Getah Pepaya (*Carica papaya L.*)

Pada penelitian ini dilakukan penyadapan getah buah pepaya yang diambil langsung dari buah pepaya muda yang masih menempel pada batang. Getah yang diperoleh kemudian diolah menjadi serbuk dan diformulasikan ke dalam sediaan stik. Getah buah pepaya dipilih karena mengandung enzim proteolitik sebagai agen fungsional kosmetik yang berpotensi dalam proses eksfoliasi kulit. Penyadapan getah pepaya dilakukan pada pagi hari karena kelembapan udara masih tinggi sehingga getah mengalir banyak dan tidak mudah memadat (39). Hasil penyadapan sekitar lima belas pohon pepaya diperoleh getah sebanyak 400 g. Getah pepaya yang didapatkan berwarna putih susu, lengket dan memiliki bau yang khas sebagaimana ditunjukkan pada **Gambar 4.1**.



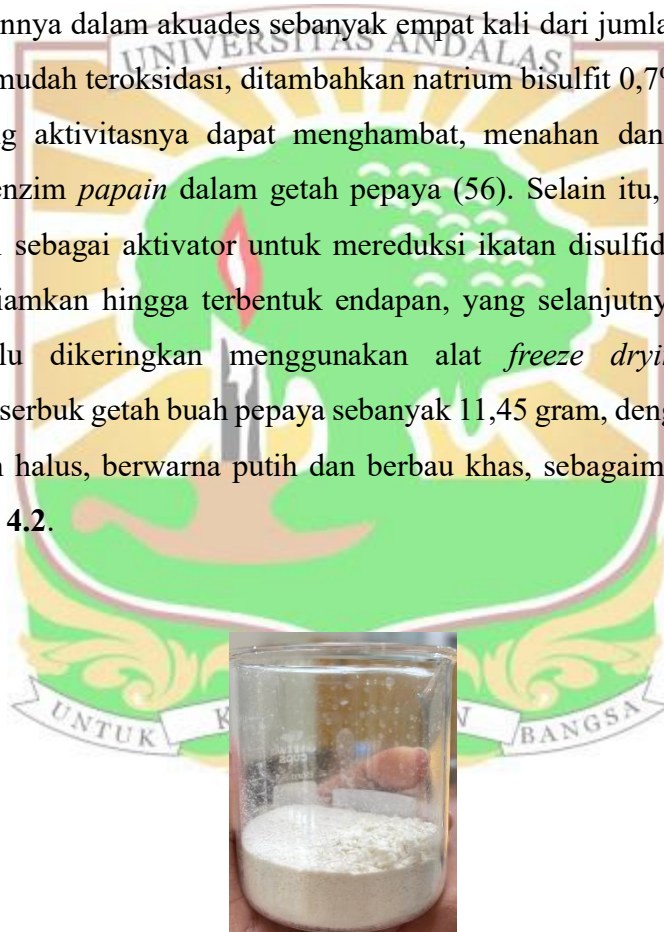
Gambar 4.1 Getah buah pepaya hasil penyadapan

### 4.2 Proses Pengeringan Getah Pepaya

Getah buah pepaya yang mengandung enzim *papain* merupakan protein yang rentan mengalami denaturasi akibat paparan suhu tinggi, sehingga dapat menyebabkan penurunan aktivitas proteolitiknya. Oleh karena itu, proses pengeringan getah pepaya pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode *freeze drying* pada suhu rendah untuk mempertahankan stabilitas enzim. Pemilihan metode ini didasarkan pada penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa kadar protein *papain* kasar yang diperoleh melalui *freeze drying* lebih tinggi dibandingkan

metode pengeringan menggunakan oven, dengan kadar protein yang dapat mencapai 14,19% (55). Metode pemanasan, membutuhkan suhu tinggi dalam waktu yang lama untuk mengubah getah pepaya menjadi serbuk, sehingga berpotensi menyebabkan denaturasi protein yang berdampak pada penurunan kualitas enzim *papain* yang ada dalam getah pepaya.

Proses pengeringan menggunakan *freeze drying*, bekerja dengan prinsip sublimasi, dimana kandungan air dalam getah beku diubah langsung menjadi gas tanpa melalui fase cair, sehingga struktur enzim dalam getah dapat lebih terjaga selama proses pengeringan (69). Getah terlebih dahulu diproses dengan mendispersikannya dalam akuades sebanyak empat kali dari jumlah getah. Karena getah pepaya mudah teroksidasi, ditambahkan natrium bisulfit 0,7% sebagai bahan pengawet yang aktivitasnya dapat menghambat, menahan dan memperlambat dekomposisi enzim *papain* dalam getah pepaya (56). Selain itu, natrium bisulfit juga berfungsi sebagai aktivator untuk mereduksi ikatan disulfida (70). Dispersi kemudian didiamkan hingga terbentuk endapan, yang selanjutnya dikumpulkan, dibekukan lalu dikeringkan menggunakan alat *freeze drying*. Proses ini menghasilkan serbuk getah buah pepaya sebanyak 11,45 gram, dengan karakteristik berupa butiran halus, berwarna putih dan berbau khas, sebagaimana ditunjukkan pada **Gambar 4.2**.



Gambar 4.2 Getah Buah Pepaya Hasil Freeze drying

Setelah itu dilakukan perhitungan rendemen untuk mengetahui besarnya rendemen sebagai gambaran hasil proses pengolahan getah papaya menjadi serbuk, hasil perhitungan ditampilkan pada **Tabel 4.1** dengan langkah perhitungan yang dapat dilihat pada **lampiran 1.1**.

Tabel 4.1 Hasil Rendemen Serbuk Getah Pepaya

Parameter	Nilai (%)
Rendemen total	2,86

Nilai rendemen pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa hanya sebagian kecil dari getah pepaya segar yang dapat dikonversi menjadi serbuk. Rendemen total yang diperoleh dari proses *freeze drying* yaitu 2,86%. Hal ini bisa dipengaruhi oleh tingginya kandungan air yang menguap selama proses sublimasi, karena sebagian besar getah pepaya tersusun atas air dan komponen non-protein. (37). Meskipun demikian, metode *freeze drying* tetap dipilih karena mampu mempertahankan aktivitas enzim *papain* dibandingkan dengan metode pemanasan.

#### 4.3 Penentuan Kurva Standar Tirosin

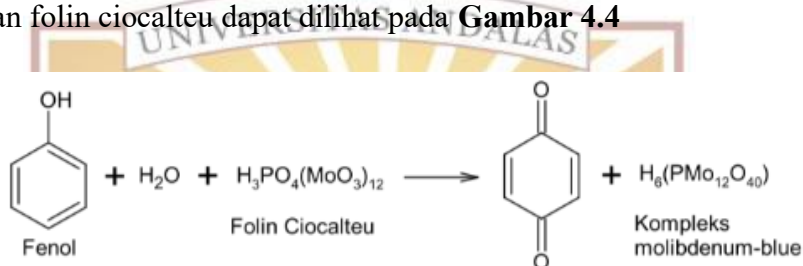
Penentuan kurva standar tirosin dilakukan sebagai tahap awal dalam analisis aktivitas proteolitik serbuk getah pepaya. Kurva standar ini digunakan untuk memperoleh hubungan antara konsentrasi tirosin dengan nilai absorbansi yang dihasilkan, sehingga dapat digunakan sebagai dasar dalam kuantifikasi tirosin hasil hidrolisis protein oleh enzim protease. Tirosin dipilih sebagai parameter karena merupakan salah satu produk hasil pemutusan ikatan peptida pada substrat protein (kasein), sehingga jumlah tirosin yang terbentuk dapat mencerminkan aktivitas enzim proteolitik. Dengan adanya kurva standar ini, nilai absorbansi yang diperoleh dari sampel dapat dikonversi menjadi konsentrasi tirosin secara kuantitatif.

Kurva standar dibuat menggunakan larutan tirosin dengan rentang konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, dan 340  $\mu\text{L}$ . Larutan tirosin merupakan senyawa fenolik yang dapat direaksikan dengan reagen Folin-Ciocalteu dalam kondisi basa dengan penambahan natrium karbonat. Dilakukan pada kondisi basa karena reaksi reduksi kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat hanya dapat terjadi secara optimal pada pH basa. Pada kondisi ini, terjadi reaksi reduksi yang menghasilkan kompleks berwarna biru yang dapat diukur absorbansinya secara spektrofotometri pada panjang gelombang 660 nm (71), sebagaimana ditunjukkan pada **Gambar 4.3**.



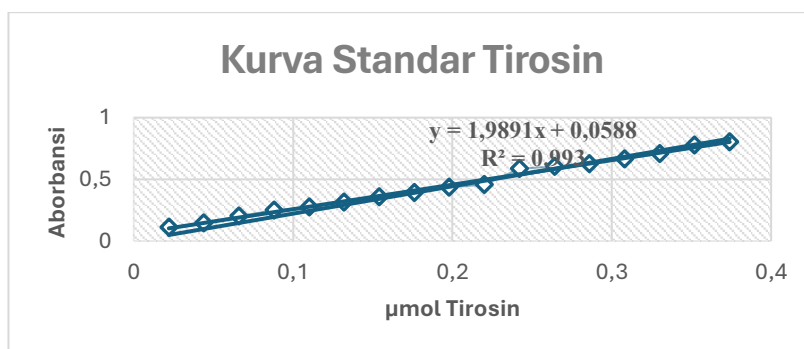
Gambar 4.3 Larutan Tirosin

Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan jumlah tirosin yang dilepaskan, sehingga dapat mencerminkan aktivitas proteolitik enzim dalam sampel. Dengan demikian, semakin tinggi jumlah tirosin yang dilepaskan maka semakin tinggi aktivitas proteolitik enzim dalam sampel (72). Reaksi senyawa fenolik dengan folin ciocalteu dapat dilihat pada **Gambar 4.4**



Gambar 4.4 Reaksi senyawa fenolik dengan folin ciocalteu (73)

Hasil pengukuran menghasilkan persamaan regresi linier  $y = 1,9891x + 0,0588$  dengan nilai koefisien determinasi  $R^2 = 0,993$ . Hal ini dapat dilihat pada **Gambar 4.5**. Nilai  $R^2$  yang mendekati 1 menunjukkan hubungan linier antara konsentrasi tirosin dengan absorbansi yang dihasilkan, sehingga persamaan tersebut dapat digunakan sebagai acuan dalam menghitung jumlah tirosin yang dibebaskan selama reaksi hidrolisis kasein oleh enzim protease (74).



Gambar 4.5 Kurva Standar Tirosin

Persamaan regresi linier yang telah diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung aktivitas proteolitik serbuk getah pepaya. Nilai absorbansi hasil pengujian sampel dimasukkan ke dalam persamaan regresi untuk menentukan konsentrasi tirosin yang terbentuk selama reaksi hidrolisis kasein. Selanjutnya, nilai konsentrasi tirosin tersebut dikonversi menjadi jumlah tirosin per satuan waktu sesuai dengan kondisi pengujian, sehingga dapat dihitung sebagai aktivitas enzim dalam satuan U/mL. Dengan demikian, persamaan regresi tidak hanya berfungsi sebagai hubungan matematis antara konsentrasi dan absorbansi, tetapi juga menjadi dasar kuantifikasi aktivitas proteolitik dalam penelitian ini.

#### **4.4 Pemilihan Konsentrasi Serbuk Getah Pepaya untuk Formulasi**

Pemilihan rentang konsentrasi ini didasarkan pada penelitian Anggraini D (2020), yang menggunakan konsentrasi 10-20% dalam formulasi krim untuk penyembuhan penebalan kulit telapak tangan, serta penelitian Ervianingsih *et al.* (2016), yang memformulasikan foot lotion serbuk getah pepaya 5% dan terbukti efektif mengatasi tumit pecah-pecah. Kedua penelitian tersebut diaplikasikan pada kulit tangan dan kaki yang memiliki lapisan kulit lebih tebal dibandingkan kulit wajah, sehingga untuk sediaan yang diaplikasikan untuk kulit wajah dipilih konsentrasi yang lebih kecil karena kulit wajah lebih tipis dan lebih sensitif dibandingkan dengan kulit kaki, yaitu 0,002%; 0,004%; 0,008%; 0,015%; 0,031%; 0,062%; 0,125%; 0,25%.

#### **4.5 Pengujian Aktivitas Proteolitik Serbuk Getah Pepaya**

Serbuk getah pepaya yang diperoleh diuji aktivitas proteolitiknya sebelum diformulasikan ke dalam sediaan, untuk memastikan bahwa enzim *papain* yang terkandung dalam getah pepaya masih aktif setelah proses pengeringan. Pengujian aktivitas proteolitik dilakukan sesuai dengan protokol Sigma SSCASE01.001 (1999) menggunakan kasein sebagai substrat. Kasein dipilih karena merupakan protein yang mudah dihidrolisis oleh enzim proteolitik, sehingga menghasilkan asam amino, terutama tirosin, yang dapat dideteksi secara kuantitatif.

Dalam pengujian aktivitas proteolitik menggunakan sampel serbuk getah pepaya, digunakan beberapa reagen seperti natrium karbonat, folin ciocalteu, buffer dan TCA. Penggunaan buffer untuk melarutkan serbuk getah pepaya bertujuan untuk menjaga pH agar tetap optimal bagi aktivitas enzim. Buffer yang tersusun

atas asam lemah dan garamnya juga berperan dalam memperkuat interaksi hidrofobik, sehingga membantu enzim mempertahankan strukturnya dan mencegah terjadinya denaturasi protein. TCA berfungsi untuk menghentikan reaksi hidrolisis protein dengan cara mendenaturasi protein tersebut. Sebagai asam kuat, TCA mampu menyebabkan enzim kehilangan struktur fungsionalnya. Selain itu, penambahan TCA juga mengakibatkan protein yang tidak terhidrolisis mengalami pengendapan (73). Selanjutnya larutan direaksikan dengan natrium karbonat dan reagen folin ciocalteu sama dengan pembuatan standar tirosin.

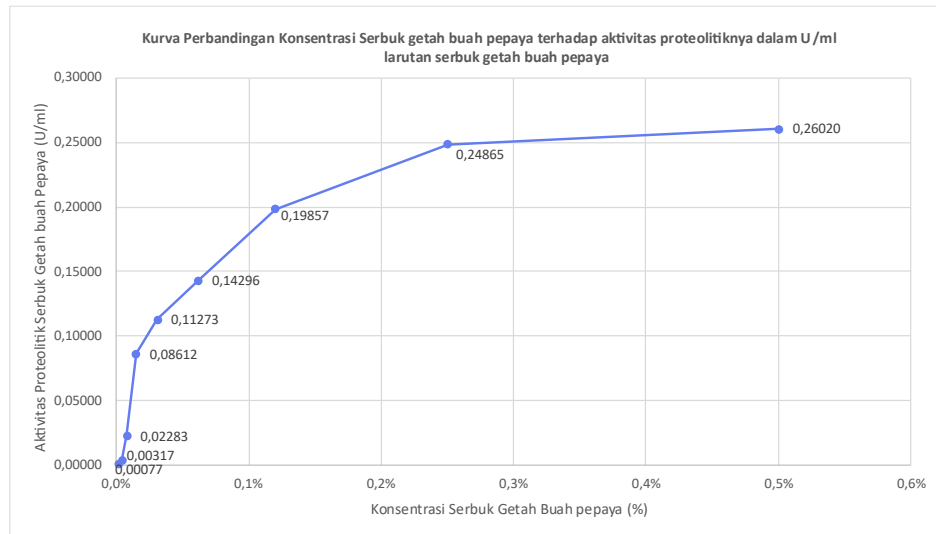
Hasil pengujian pada rentang konsentrasi 0,002%; 0,004%; 0,008%; 0,015%; 0,031%; 0,062%; 0,125%; 0,25% ditunjukkan pada Tabel 4.2 berikut ini.

Tabel 4.2 Pengujian Aktivitas Proteolitik Serbuk Getah Pepaya

Konsentrasi (%)	U/mL (Rata-rata±SD)
0,002	0,001±0,0000
0,004	0,003±0,0000
0,008	0,023±0,0006
0,015	0,086±0,0000
0,031	0,113±0,0001
0,062	0,143±0,0001
0,125	0,199±0,0002
0,25	0,249±0,0015

Berdasarkan Tabel 4.2 terlihat bahwa peningkatan konsentrasi serbuk getah pepaya diikuti oleh peningkatan aktivitas proteolitik. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak enzim yang tersedia, maka peluang interaksi antara enzim dan substrat juga meningkat. Namun, pada konsentrasi yang lebih tinggi, peningkatan aktivitas mulai cenderung konstan, yang mengindikasikan enzim telah mendekati kondisi kejenuhan substrat. Kondisi ini menyebabkan tidak semua molekul enzim dapat berikatan dengan substrat secara optimal. Selain itu, pada konsentrasi tinggi juga dimungkinkan terjadi interaksi antar molekul enzim yang dapat menghambat aktivitas katalitik. Hal ini berkaitan dengan kondisi kejenuhan enzim (*enzyme saturation*), di mana pada jumlah enzim yang berlebih, sistem mencapai batas

maksimum laju reaksi ( $V_{max}$ ) karena keterbatasan substrat. Akibatnya, penambahan enzim tidak lagi meningkatkan laju reaksi secara signifikan (75,76). Hal ini dapat dilihat dalam kurva pada Gambar 4.6 berikut



Gambar 4.6 Kurva perbandingan antara konsentrasi serbuk getah buah pepaya dan aktivitas protolitik dalam U/mL

Penentuan konsentrasi serbuk getah pepaya dalam penelitian ini didasarkan pada hasil uji aktivitas proteolitik dalam satuan U/mL, mengingat sampel yang digunakan berupa getah pepaya kasar tanpa penetapan kadar protein total, sehingga aktivitas spesifik (U/mg) tidak digunakan sebagai dasar utama. Berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap aktivitas proteolitik, terlihat bahwa peningkatan konsentrasi diikuti oleh peningkatan aktivitas hingga mencapai kecenderungan plateau pada rentang 0,25%-0,5%. Peningkatan konsentrasi dari 0,25% menjadi 0,5% hanya menghasilkan kenaikan aktivitas yang relatif kecil, yaitu sekitar 0,0115 U/mL, yang menunjukkan bahwa sistem telah mendekati kondisi aktivitas maksimum. Hal ini mengindikasikan bahwa pada rentang tersebut enzim mulai mengalami keterbatasan efektivitas, kemungkinan akibat kondisi mendekati saturasi substrat atau keterbatasan sistem reaksi.

Oleh karena itu, konsentrasi 0,25% dipilih sebagai dasar karena menunjukkan aktivitas tertinggi dalam kondisi pengujian yang sama, sedangkan konsentrasi 0,31% digunakan dalam formulasi sebagai peningkatan terbatas dari konsentrasi dasar tersebut. Konsentrasi 0,31% berada pada fase awal plateau, di

mana aktivitas enzim telah mendekati maksimum namun masih dalam batas efisiensi penggunaan bahan. Pemilihan ini bertujuan untuk memperoleh aktivitas proteolitik yang optimal tanpa meningkatkan konsentrasi secara berlebihan, mengingat peningkatan lebih lanjut tidak memberikan peningkatan aktivitas yang signifikan. Selain itu, pendekatan ini juga mempertimbangkan aspek keamanan dan potensi iritasi, karena penggunaan enzim protease dalam konsentrasi tinggi dapat meningkatkan risiko over-eksfoliasi pada kulit. Dengan demikian, konsentrasi 0,31% dipilih sebagai parameter antara efektivitas, efisiensi, dan keamanan dalam formulasi sediaan kosmeseutikal.

Meskipun konsentrasi 0,015% menunjukkan nilai aktivitas spesifik (U/mg) yang relatif tinggi, berdasarkan data pendukung yang disajikan pada **lampiran 1.5**. Namun, parameter tersebut tidak digunakan sebagai dasar utama dalam penentuan konsentrasi karena tidak dilakukan penetapan kadar protein total, sehingga aktivitas spesifik yang diperoleh tidak sepenuhnya merepresentasikan aktivitas enzim secara akurat. Oleh karena itu, pembahasan difokuskan pada aktivitas proteolitik dalam satuan U/mL yang lebih sesuai dengan kondisi sampel berupa getah pepaya kasar.

Literatur Trevisol et al. (2022) melaporkan bahwa enzim papain dengan aktivitas proteolitik dapat memberikan efek eksfoliasi melalui kemampuan menghidrolisis protein penyusun kulit. Namun, perbandingan secara kuantitatif tidak dapat dilakukan secara langsung dalam penelitian ini karena perbedaan bentuk enzim yang digunakan, yaitu enzim murni pada literatur dan enzim dalam bentuk kasar pada penelitian ini. Oleh karena itu, literatur tersebut hanya digunakan sebagai acuan kualitatif untuk mendukung bahwa aktivitas proteolitik berperan dalam mekanisme eksfoliasi (11).

#### **4.6 Uji Pendahuluan Basis Stik**

Sebelum serbuk getah pepaya diformulasikan ke dalam sediaan, terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan basis stik untuk menentukan konsentrasi cera alba yang optimal. Cera alba dipilih sebagai komponen yang divariasikan karena berperan sebagai bahan pengeras utama dalam sediaan stik yang menentukan konsistensi dan kekuatan sediaan (49). Selain cera alba komponen basis lipofilik seperti lanolin, shea butter dan vaselin alba digunakan untuk membentuk struktur sediaan, meningkatkan kekerasan stik, serta memberikan efek oklusif untuk

menjaga kelembaban kulit. Vaseline alba juga digunakan sebagai basis utama karena memiliki stabilitas yang baik, sifat inert, serta kemampuan membentuk lapisan pelindung pada kulit sehingga memperpanjang waktu kontak bahan aktif dengan permukaan kulit. Lanolin dan shea butter ditambahkan sebagai emolien untuk meningkatkan kelembutan sediaan dan memperbaiki karakteristik sensorik saat diaplikasikan (77).

VCO (Virgin Coconut Oil) berfungsi sebagai emolien sekaligus pelarut fase minyak yang juga dapat meningkatkan penetrasi bahan aktif. Propilen glikol digunakan sebagai humektan dan kosolven yang mampu meningkatkan hidrasi kulit serta membantu kelarutan bahan dalam sistem sediaan A/M. Span 80 berperan sebagai surfaktan non-ionik lipofilik yang membantu kestabilan sistem sediaan A/M dengan menurunkan tegangan antarmuka antara fase minyak dan air. Vitamin E ditambahkan sebagai antioksidan untuk mencegah oksidasi komponen lipid dalam formulasi sehingga dapat meningkatkan stabilitas fisik dan kimia sediaan selama penyimpanan (58).

Metil paraben digunakan sebagai pengawet antimikroba untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme pada sediaan yang mengandung fase air, sehingga dapat meningkatkan keamanan dan memperpanjang umur simpan produk. Akuades berfungsi sebagai fase air dalam sistem sediaan A/M yang mendukung distribusi bahan hidrofilik dalam matriks sediaan stik (58). Kombinasi seluruh komponen tersebut diharapkan menghasilkan sediaan stik yang stabil secara fisik, mudah diaplikasikan, serta memiliki efektivitas bahan aktif yang optimal pada penggunaan topikal.

Setelah semua bahan diformulasikan, tiga formula basis diuji dengan variasi konsentrasi cera alba yaitu 15% ; 17% ; 20%, dimana vaselin alba digunakan sebagai komponen pelengkap hingga 100% sehingga jumlahnya menyesuaikan dengan perubahan konsentrasi cera alba pada masing-masing formula. Evaluasi basis dilakukan terhadap dua parameter utama yaitu kekerasan dan titik leleh, karena kedua parameter tersebut merupakan parameter yang sangat penting untuk menentukan kualitas fisik sediaan stik dan kemudahan pengaplikasiannya pada kulit (48,78). Kemudian hasil evaluasi pendahuluan basis dibandingkan dengan evaluasi stik komersial merek wardah, karena belum terdapat standar baku yang

pasti terkait parameter kekerasan dan titik leleh sediaan stik. Hasil evaluasi pendahuluan basis ditunjukkan pada tabel 4.4

Tabel 4.3 Hasil Evaluasi Pendahuluan Basis

Parameter	F1 (15%)	F2 (17%)	F3 (20%)	Pembanding
Kekerasan	80 g	90 g	110 g	116,67 g
Titik leleh	50°C	55°C	60°C	60°C

Hasil pengujian kekerasan sediaan stik dilakukan menggunakan metode penggantungan beban secara bertahap hingga stik mengalami patah. Kekerasan dinyatakan sebagai beban maksimum yang dapat ditahan oleh stik sebelum patah selama waktu 30 detik. Pengujian dilakukan dengan tiga kali replikasi pada masing-masing formula untuk memperoleh nilai rata-rata yang representatif.

Berdasarkan Tabel 4.3 formula dengan konsentrasi cera alba 15% menghasilkan kekerasan rata-rata sebesar 80 gram, formula 17% sebesar 90 gram, dan formula 20% sebesar 110 gram. Nilai kekerasan ketiga formula tersebut dibandingkan dengan sediaan stik komersial yang beredar di pasaran sebagai pembanding, yang memiliki kekerasan rata-rata 116,67 gram. Hasil ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi cera alba berbanding lurus dengan peningkatan kekerasan sediaan.

Formula dengan konsentrasi cera alba 15% dan 17% menghasilkan sediaan yang terlalu lunak dan kurang mampu menahan beban, sehingga berpotensi mudah patah selama penggunaan. Sebaliknya, formula dengan konsentrasi 20% menunjukkan kekerasan yang paling mendekati sediaan pembanding, sehingga dinilai memiliki kekuatan yang lebih baik dan sesuai untuk sediaan stik.

Peningkatan kekerasan ini disebabkan oleh sifat cera alba sebagai bahan pembentuk struktur (*structuring agent*) yang mampu membentuk matriks padat dalam sistem sediaan. Semakin tinggi konsentrasi cera alba, semakin rapat struktur matriks yang terbentuk, sehingga meningkatkan kekuatan dan ketahanan stik terhadap tekanan (77).

Metode pengujian menggunakan penggantungan beban ini digunakan sebagai pendekatan sederhana untuk mengevaluasi kekuatan mekanik sediaan stik,

mengingat keterbatasan alat uji kekerasan yang spesifik. Meskipun bersifat sederhana, metode ini tetap dapat memberikan gambaran komparatif antar formula dalam menentukan basis dengan karakteristik fisik yang paling optimal.

Hasil pengujian titik leleh menunjukkan bahwa formula dengan konsentrasi 15% memiliki titik leleh rata-rata 50°C, formula dengan konsentrasi 17% memiliki titik leleh rata-rata sebesar 55°C, dan formula dengan konsentrasi 20% memiliki titik leleh rata-rata sebesar 60°C. Titik leleh formula 20% sama dengan titik leleh sediaan pembanding yaitu 60°C, menunjukkan bahwa formula tersebut memiliki stabilitas termal yang setara dengan produk komersial yang telah terbukti memenuhi standar penggunaan.

Peningkatan titik leleh seiring peningkatan konsentrasi cera alba terjadi karena cera alba memiliki titik leleh yang relatif tinggi. Semakin tinggi konsentrasi cera alba yang digunakan, semakin besar fraksi komponen padat dalam sistem, sehingga diperlukan energi yang lebih tinggi untuk mengubah fase padat menjadi cair. Hal ini menunjukkan bahwa cera alba berperan dalam meningkatkan stabilitas termal sediaan stik (77). Formula dengan konsentrasi 15% dan 17% memiliki titik leleh yang lebih rendah, sehingga berpotensi mengalami pelunakan atau deformasi pada suhu lingkungan yang lebih tinggi. Sebaliknya, formula 20% menunjukkan titik leleh yang lebih tinggi dan mendekati sediaan pembanding, sehingga lebih stabil terhadap perubahan suhu selama penyimpanan maupun penggunaan.

Berdasarkan hasil evaluasi kekerasan dan titik leleh tersebut, formula dengan konsentrasi cera alba 20% dipilih sebagai formula basis terbaik karena menghasilkan nilai kekerasan yang masuk pada rentang kekerasan pada sediaan pembanding yaitu 110-120 gram dan titik leleh yang sama dengan sediaan pembanding, sehingga dinilai memiliki karakteristik fisik yang optimal untuk digunakan sebagai basis sediaan stik eksfoliasi yang mengandung serbuk getah pepaya pada konsentrasi 0,31%.

#### 4.7 Formula Stik Terpilih

Tabel 4.4 Formula Stik

No	Bahan	Konsentrasi (%)	
		F0	F1
1.	Serbuk getah pepaya	-	0,31
2.	Cera alba	20	20
3.	VCO	10	10
4.	Lanolin	17	17
5.	Shea butter	10	10
6.	Propilen glikol	5	5
7.	Span 80	3	3
8.	Vitamin E	0,05	0,05
9.	Akuades	5	5
10.	Metil paraben	0,1	0,1
11.	Vaselin alba	Ad 100	Ad 100

Selanjutnya basis cera alba 20% digunakan dalam formulasi sediaan stik, baik tanpa bahan aktif (F0) maupun dengan penambahan serbuk getah pepaya 0,31% (F1). Setelah diformulasikan dilakukan evaluasi karakteristik fisik pada sediaan stik untuk menilai stabilitas serta melihat pengaruh penambahan serbuk getah pepaya terhadap mutu fisik sediaan stik. Uji stabilitas dilakukan dengan metode Freeze-Thaw sebanyak enam siklus untuk mengetahui stabilitas sediaan terhadap perubahan suhu ekstrem. Satu siklus freeze-thaw dilakukan selama 24 jam pada suhu 4°C dan 24 jam pada suhu 40°C. Evaluasi karakteristik fisik yang dilakukan yaitu organoleptik, titik leleh, homogenitas dan kekerasan yang dilakukan sebelum dan sesudah freeze-thaw.

#### 4.8 Evaluasi Sediaan Stik

Tabel 4.5 Hasil evaluasi fisik sediaan stik sebelum dan sesudah uji freeze-thaw

Evaluasi	Sebelum freeze-thaw		Sesudah freeze-thaw	
	F0	F1	F0	F1
Organoleptik	Berwarna putih kekuningan, memiliki tekstur padat dan tidak terlalu lengket, bau khas basis dan tidak ada bau tengik	Berwarna putih kekuningan, memiliki tekstur padat dan tidak terlalu lengket, bau khas getah pepaya dan tidak ada bau tengik	Berwarna putih kekuningan, memiliki tekstur agak lunak dan agak lengket, bau khas basis dan tidak ada bau tengik	Berwarna putih kekuningan, memiliki tekstur agak lunak dan agak lengket, bau khas getah pepaya dan tidak ada bau tengik
Homogenitas	Homogen	Homogen	Homogen	Homogen
Kekerasan	110 gram	110 gram	70 gram	80 gram
Titik leleh	60°C	60°C	55°C	55°C

Berdasarkan hasil evaluasi sediaan stik sebelum dan sesudah freeze-thaw pada tabel 4.6 untuk evaluasi organoleptik menunjukkan bahwa sebelum perlakuan freeze and thaw, baik F0 maupun F1 memiliki warna putih kekuningan, bentuk padat, tidak terlalu lengket, serta bau khas tanpa adanya bau tengik. Setelah dilakukan siklus freeze and thaw, tidak terjadi perubahan warna dan bau pada kedua formula, yang menunjukkan bahwa sediaan tetap stabil secara visual, yang dapat dilihat pada Gambar 4.8 dibawah ini. Namun, terjadi perubahan pada tekstur, dimana sediaan menjadi agak lunak dan sedikit lengket. Perubahan ini mengindikasikan adanya pengaruh fluktuasi suhu ekstrem terhadap stabilitas fisik sediaan.



Gambar 4. 7 Sediaan Stik

Selanjutnya yaitu pengujian homogenitas, baik sebelum dan sesudah perlakuan freeze-thaw seluruh formula menunjukkan hasil yang homogen, sebagaimana terlihat pada gambar di **Lampiran 3**. Hal ini ditandai dengan tidak adanya butiran kasar atau pemisahan fase pada sediaan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa sistem basis yang digunakan mampu mempertahankan distribusi bahan secara merata meskipun mengalami suhu ekstrem. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa perlakuan freeze-thaw tidak mempengaruhi homogenitas sediaan secara signifikan.

Hasil pengujian kekerasan menunjukkan bahwa sebelum perlakuan freeze-thaw, F0 dan F1 mampu menahan beban hingga 110 gram sebelum patah. Hal ini menunjukkan bahwa kedua formula memiliki kekuatan yang cukup baik dalam mempertahankan bentuknya. Setelah perlakuan freeze-thaw, terjadi penurunan daya tahan terhadap beban, dimana F0 hanya mampu menahan beban hingga 70 gram dan F1 hingga 80 gram. Penurunan ini mengindikasikan bahwa siklus suhu ekstrem menyebabkan melemahnya struktur internal sediaan sehingga lebih mudah mengalami deformasi dan patah.

Hasil pengujian titik leleh menunjukkan bahwa sebelum perlakuan freeze-thaw, kedua formula memiliki titik leleh sebesar 60°C. Setelah perlakuan, titik leleh menurun menjadi 55°C pada kedua formula. Penurunan ini mengindikasikan adanya perubahan struktur fisik atau interaksi antar komponen dalam basis sediaan akibat paparan suhu ekstrem berulang. Perubahan ini dapat disebabkan oleh gangguan pada struktur kristal lipid, sehingga menurunkan energi yang dibutuhkan untuk melelehkan sediaan (79).

Selain evaluasi fisik sediaan, dilakukan juga pengujian aktivitas proteolitik pada sediaan antara formula kontrol tanpa serbuk getah pepaya (F0) dan formula

yang mengandung serbuk getah pepaya (F1). Pengujian dilakukan setelah sediaan selesai diformulasikan, sehingga nilai yang diperoleh menggambarkan aktivitas enzim dalam sediaan. Sebelum pengujian, dilakukan proses ekstraksi enzim dari sediaan menggunakan buffer fosfat untuk menjaga kestabilan pH enzim dan penambahan Triton X-100 sebagai surfaktan non-ionik yang dapat mendispersikan komponen lipid sehingga enzim mudah diekstraksi ke dalam fase air (68).

Proses homogenisasi dan sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan fase air yang mengandung enzim dari komponen basis yang tidak larut, sehingga enzim protease yang terdispersi dalam sediaan dapat dianalisis aktivitasnya secara optimal. Supernatan yang diperoleh kemudian digunakan sebagai sampel dalam pengujian aktivitas proteolitik dengan metode yang sama seperti pengujian sebelumnya.

Tahapan ini penting untuk memastikan bahwa enzim protease yang ada dalam getah pepaya tetap aktif setelah formulasi. Dengan demikian, hasil yang diperoleh dapat memberikan gambaran mengenai stabilitas dan ketersediaan enzim dalam sistem sediaan yang telah diformulasikan. Hasil aktivitas proteolitik yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 4.6

Tabel 4.6 Hasil Aktivitas Proteolitik Setelah Formulasi

Parameter	Formula	
	F0	F1
Aktivitas proteolitik (U/mL)	0,01190±0,00011	0,01595±0,00011

Hasil pengujian aktivitas proteolitik setelah formulasi menunjukkan penurunan aktivitas. Sebelum diformulasikan, serbuk getah pepaya pada konsentrasi 0,31% telah diuji dan menunjukkan aktivitas 0,098 U/mL. Berdasarkan tabel tersebut hasil pengujian aktivitas proteolitik sediaan stik menunjukkan bahwa formula blanko (F0) yang tidak mengandung serbuk getah pepaya memiliki rata-rata aktivitas sebesar 0,01190 U/mL, sedangkan formula (F1) yang mengandung serbuk getah pepaya 0,31% menunjukkan rata-rata aktivitas sebesar 0,01595 U/mL. Penurunan ini terjadi kemungkinan karena dipengaruhi oleh basis atau eksipien dari formulasi.

Nilai aktivitas yang terdeteksi pada F0 kemungkinan besar bukan berasal dari aktivitas enzim proteolitik, karena F0 tidak mengandung sumber enzim proteolitik. Nilai tersebut diduga berasal dari adanya absorbansi yang dihasilkan oleh komponen basis atau akibat keterbatasan metode analisis yang digunakan. Namun demikian, terdapat peningkatan aktivitas proteolitik pada F1 dibandingkan F0, yang mengindikasikan bahwa aktivitas enzim proteolitik dari serbuk getah pepaya masih terdeteksi setelah diformulasikan ke dalam sediaan stik.

Adanya aktivitas yang terdapat pada F0 karena keterbatasan metode analisis yang digunakan, yaitu metode hidrolisis kasein yang dikombinasikan dengan reagen Folin-Ciocalteu. Reagen Folin-Ciocalteu diketahui bersifat non-spesifik karena tidak hanya bereaksi dengan tirosin hasil hidrolisis protein oleh enzim proteolitik, tetapi juga dengan berbagai senyawa lain yang memiliki sifat reduktor, seperti senyawa fenolik, tiol, vitamin, serta beberapa jenis karbohidrat dan asam amino (80). Oleh karena itu, keberadaan senyawa-senyawa tersebut dalam sistem pengujian dapat memberikan kontribusi terhadap nilai absorbansi, khususnya pada formula kontrol (F0), namun tidak mencerminkan aktivitas enzim proteolitik yang sebenarnya.

Selain itu, eksipien yang digunakan dalam formulasi sediaan juga berpotensi memberikan kontribusi terhadap nilai absorbansi yang terukur. Salah satu contohnya adalah metil paraben yang memiliki gugus fenolik, sehingga dapat bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu dan menghasilkan warna biru yang terdeteksi pada spektrofotometer. Disamping itu, propilen glikol sebagai pelarut dan humektan dapat berkontribusi terhadap peningkatan nilai absorbansi, bukan karena aktivitas enzim, melainkan akibat pengaruhnya terhadap sistem reaksi dalam metode pengujian. Senyawa ini dapat memodifikasi lingkungan reaksi sehingga berpotensi mempengaruhi pembacaan absorbansi (80). Namun demikian, propilen glikol dalam formulasi tetap diperlukan karena berfungsi untuk meningkatkan kelembapan serta membantu penetrasi zat aktif ke kulit (58,81).

Selain itu, karakteristik basis sediaan juga dapat mempengaruhi hasil pengujian aktivitas enzim. Basis lipofilik seperti cera alba, vaselin alba, dan lanolin membentuk matriks hidrofob yang mempengaruhi pola pelepasan enzim dari sediaan. Dalam sistem ini, pelepasan enzim cenderung berlangsung lebih lambat

dibandingkan sistem hidrofilik, sehingga interaksi antara enzim dan substrat selama pengujian *in vitro* menjadi terbatas. Kondisi ini dapat menyebabkan aktivitas enzim yang terukur lebih rendah, meskipun tidak secara langsung mencerminkan potensi aktivitas enzim saat diaplikasikan pada kulit. Penggunaan basis lipofilik dalam formulasi tetap dipilih karena memberikan kestabilan fisik yang baik serta sesuai dengan karakteristik sediaan stik yang diharapkan (77).

Dengan demikian, nilai aktivitas proteolitik pada F0 dapat dipengaruhi oleh interferensi metode dan komponen formula. Namun demikian, perbedaan nilai antara F0 dan F1 tetap menunjukkan adanya aktivitas proteolitik dari enzim proteolitik dalam formula F1, sehingga dapat dikatakan bahwa enzim masih memiliki aktivitas dalam sediaan meskipun dipengaruhi oleh kondisi formulasi dan pengujian. Hal ini diperkuat dengan hasil uji statistik pada **Lampiran 2** menggunakan uji T tidak berpasangan yang menunjukkan perbedaan signifikan antara F0 dan F1 yaitu ( $p < 0,05$ ). Dengan demikian, perbedaan nilai aktivitas proteolitik tersebut diduga berasal dari enzim proteolitik dalam serbuk getah pepaya, karena F1 menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan F0.

Data hasil evaluasi fisik sediaan yang meliputi organoleptik, homogenitas, kekerasan dan stabilitas dianalisis secara deskriptif untuk memberikan gambaran karakteristik fisik sediaan stik yang dihasilkan serta menilai kesesuaiannya dengan parameter mutu yang diharapkan. Analisis ini menunjukkan bahwa sediaan memiliki karakteristik yang sesuai dan mengalami perubahan pada kekerasan dan titik leleh setelah uji *freeze-thaw*.