



FORMULASI DAN EVALUASI EKSTRAK ETANOL EDAMAME (*Glycine max*) SEBAGAI SEDIAAN KRIM PEMUTIH KULIT

SKRIPSI

Oleh

Liliana A. I. K.

NIM 112210101024

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



FORMULASI DAN EVALUASI EKSTRAK ETANOL EDAMAME (*Glycine max*) SEBAGAI SEDIAAN KRIM PEMUTIH KULIT

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

Liliana A. I. K.

NIM 112210101024

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

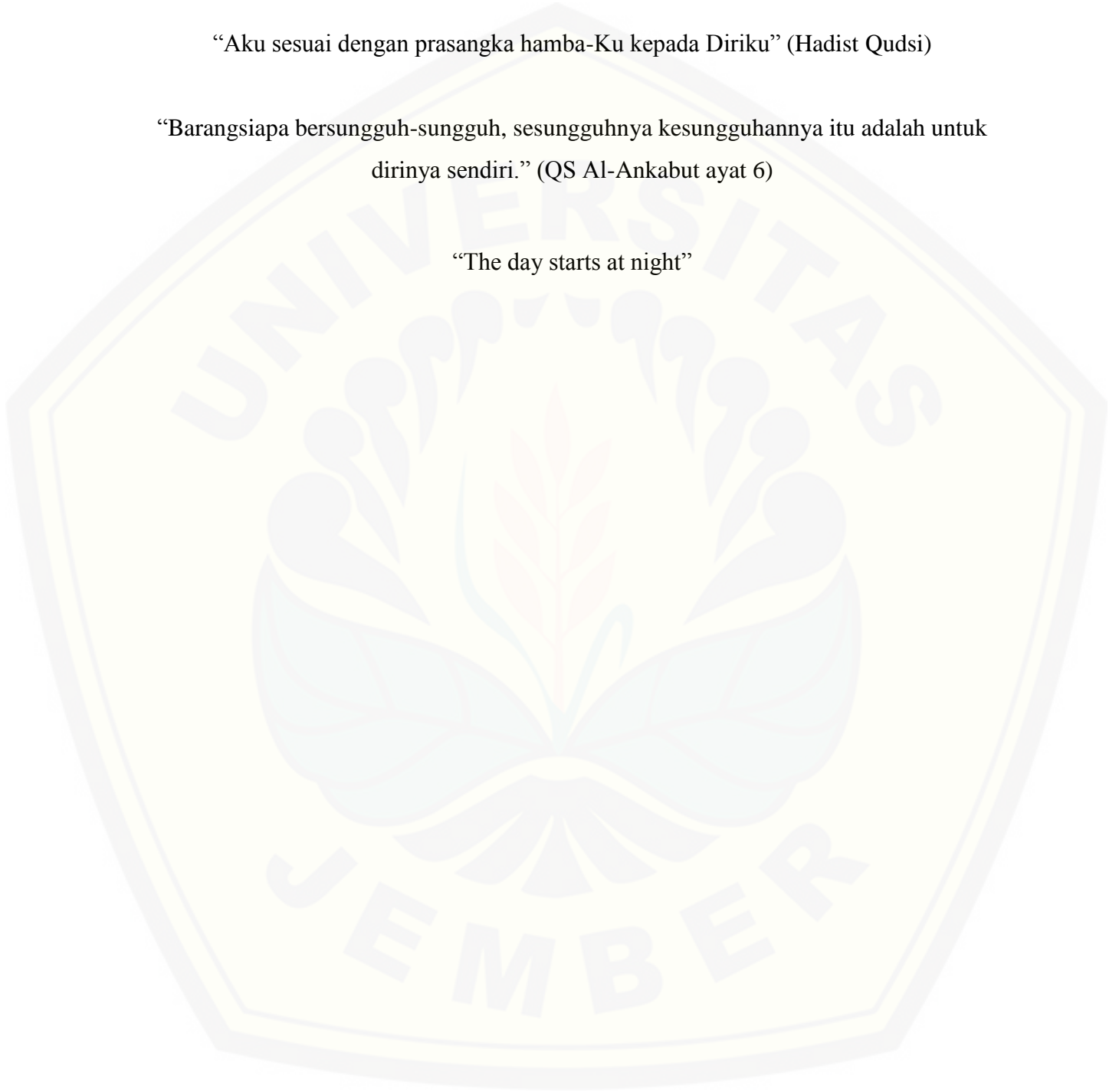
1. Ibunda Khotijah dan Ayah Andika Ali Alwi tercinta
2. Keluarga besar H. Moch. Ali Amir dan Alm. Bapak Siama tersayang
3. Sekolah tercinta, SD Negeri Kamal 1, SMP Negeri 4 Jember, dan SMA Negeri 1 Jember
4. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember

MOTTO

“Aku sesuai dengan prasangka hamba-Ku kepada Diriku” (Hadist Qudsi)

“Barangsiapa bersungguh-sungguh, sesungguhnya kesungguhannya itu adalah untuk dirinya sendiri.” (QS Al-Ankabut ayat 6)

“The day starts at night”



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini ;

Nama : Liliana Anggraini Indra Kusumawati

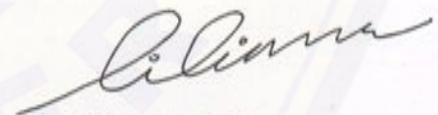
NIM : 112210101024

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Formulasi dan Evaluasi Ekstrak Etanol Edamame (*Glycine max*) sebagai Sediaan Krim Pemutih Kulit” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 2 Juli 2015

Yang menyatakan,



Liliana A. I. K.

NIM. 112210101024

SKRIPSI

FORMULASI DAN EVALUASI EKSTRAK ETANOL EDAMAME (*Glycine max*) SEBAGAI SEDIAAN KRIM PEMUTIH KULIT

Oleh:

Liliana Anggraini Indra Kusumawati

NIM 112210101024

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Budipratiwi Wisudyarningsih, S.Farm, M.Sc, Apt

Dosen Pembimbing Anggota : Siti Muslichah, S.Si.,M.Sc.,Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "Formulasi dan Evaluasi Ekstrak Etanol Edamame (*Glycine max*) sebagai Sediaan Krim Pemutih Kulit" telah diuji dan disahkan pada:

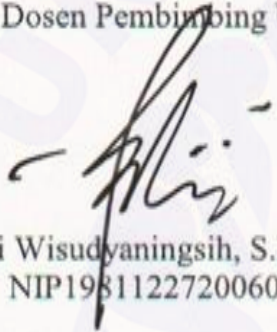
Hari : Kamis

Tanggal : 2 Juli 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,



Budipratiwi Wisudyaningsih, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP198112272006042003


Dosen Pembimbing Anggota,



Siti Muslichah, S.Si., M.Sc., Apt.
NIP197305132005012001

Tim Penguji,

Dosen Penguji I,



Lidya Ameliana, S.Si., Apt., M.Farm.
NIP198004052005012005

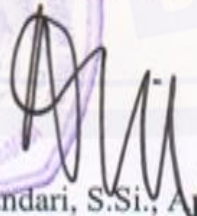
Dosen Penguji II,



Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt.
NIP197806092005012004

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember



Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.
NIP197604142002122001

RINGKASAN

Formulasi dan Evaluasi Ekstrak Etanol Edamame (*Glycine Max*) sebagai Sediaan Krim Pemutih; Liliana Anggraini Indra Kusumawati, 112210101024; 2015; 55 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Tingginya permintaan produk pemutih kerap kali digunakan oleh produsen kosmetik untuk meraih keuntungan besar. Tidak sedikit produk pemutih kulit di pasaran yang mengandung senyawa berbahaya seperti hidrokuinon, merkuri, dan asam retinoat. Berdasarkan fakta tersebut perlu dicari alternatif agen pemutih kulit yang aman digunakan.

Penghambatan tirosinase merupakan salah satu cara untuk mencapai efek pemutih kulit. Enzim ini berperan untuk mengkatalisis hidroksilasi L-tirosin menjadi L-DOPA dan oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon. Salah satu senyawa yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase adalah isoflavon dalam kedelai edamame (*Glycine max*). Tujuan penelitian ini adalah pengembangan formulasi sediaan krim pemutih kulit yang mengandung ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan basis *vanishing cream*.

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah formulasi sediaan *vanishing cream*, evaluasi karakteristik fisika kimia sediaan yang meliputi pengamatan organoleptis, penentuan tipe emulsi, pengujian viskositas, daya sebar, pH, dan penetapan kadar genistein dalam sediaan, optimasi kondisi analisis, dan validasi metode penetapan kadar genistein dalam sediaan dengan metode KLT Densitometri. Kondisi analisis yang dioptimasi meliputi optimasi eluen, panjang gelombang, dan konsentrasi uji. Tahapan validasi metode analisis yang dilakukan meliputi uji linieritas, penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi, uji selektivitas/spesifisitas, uji presisi, dan uji akurasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sediaan *vanishing cream* yang dibuat memiliki warna putih-kekuningan, tekstur lembut, bau mawar, tipe emulsi *oil in*

water (o/w), viskositas sebesar $63,33 \pm 4,56$ dPa.s, daya sebar sebesar $14,67 \pm 0,012$ cm, pH sebesar $6,63 \pm 0,025$. Sediaan *vanishing cream* yang dihasilkan memiliki karakteristik fisika kimia sesuai dengan spesifikasi yang telah ditentukan.

Kondisi optimum untuk analisis genistein dalam sediaan *vanishing cream* menggunakan pelarut metanol p.a, fase diam silika gel 60 F₂₅₄; eluen dengan komposisi toluen : etil asetat : asam format (v/v/v) = 10 : 4 : 1; panjang gelombang 266 nm; konsentrasi uji 25 ppm; dan metode pengembangan menaik. Metode analisis penetapan kadar genistein dalam *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan metode KLT Densitometri memberikan hasil analisis yang linier dengan koefisien korelasi (r) = 0,996, nilai V_{x0} = 4,075 %, dan X_p = 24,406 ng; peka dengan nilai batas deteksi = 5,73 ng dan batas kuantitasi = 17,19 ng; selektif karena mampu memisahkan senyawa genistein dengan senyawa lain yang ada dalam sampel dengan nilai R_s lebih dari 1,5 dan spesifik dengan nilai korelasi spektra pada uji *purity* dan *identity* lebih dari 0,99; presis dengan RSD uji presisi repeatabilitas = 0,7817 % dan RSD uji presisi antara = 1,2823 %; dan akurat dengan *mean recovery* = $99,2364 \pm 0,3195$ %. Metode yang sudah tervalidasi selanjutnya digunakan untuk menetapkan kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*). Nilai % *recovery* kadar genistein dalam sediaan sebesar $100,4849 \pm 1,2764$ %. Nilai ini berada pada rentang % *recovery* dan kurang dari nilai RSD yang dipersyaratkan.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, atas segala limpahan rahmat, kenikmatan, petunjuk dan hidayah sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Formulasi dan Evaluasi Ekstrak Etanol Edamame (*Glycine max*) sebagai Sediaan Krim Pemutih Kulit”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kesempatan kali ini, penulis bermaksud mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang mendukung terselesainya penyusunan skripsi ini, yaitu :

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Budipratiwi W., S.Farm., M.Sc., Apt. dan Ibu Siti Muslichah, S.Si., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, perhatiannya dengan penuh kesabaran memberi ilmu, pengalaman berharga, pengarahan, bimbingan dan saran dalam penulisan skripsi ini;
3. Bapak Yudi Wicaksono S.Si., Apt., M.Si. dan Ibu Diana Holiday, S.F., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik, dan Bapak Moch. Amrun Hidayat, S.Si., M.Farm., Apt., yang telah sabar membimbing, memberi masukan, saran, dan motivasi untuk semangat belajar;
4. Ibu Lidya A., S.Si., Apt., M.Farm. dan Ibu Yuni R., S.Si., M.Si., Apt. selaku Dosen Penguji yang dengan sabar memberikan masukan untuk penulis;
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, berbagi pengalaman dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan, staff dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Orang tua tercinta Ibunda Khotijah, Ayah Andika Ali Alwi, dan adik Harumi Indria Kusumaningrum yang senantiasa memberi doa, kasih sayang, semangat, dan motivasi yang tidak terhingga untuk mengiringi perjalanan hidup penulis;

7. Keluarga besar H. Moch. Ali Amir dan Alm. Bapak Siana yang selalu memberikan dukungan dan hiburan;
8. Teman-teman *Happy Family*, mamia, mbak oo, nyis, dan bundar el, yang telah mengisi hari-hari penulis dalam suka dan duka selama menimba ilmu di Fakultas Farmasi;
9. Tim skripsi kelompok Edamame, Elisa N. A. Dewi, Oktavia C. Xenograf, dan Fitriana D. Kartini, yang selalu memberikan dukungan dan kerempongannya;
10. Teman-teman skripsi sepejuangan di laboratorium farmasetika, biologi, dan kimia, Indarto, Imroa'atul Mufidah, Lintang Ayu, Defitri, Nurul Imamah, Galuh Ajeng, Estika, Sekar Risti, Zahrotul Hikmah, Liyas, Liza, Zuhro, dan Ni Putu Pertiwi yang selalu siap membantu tenaga dan pikiran;
11. Teman sepejuangan Fakultas Farmasi Universitas Jember Angkatan 2011 (ASMEF) yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu;
12. Teman-teman KKN 05, Kikay, Omay, Mbak Prias, Fendi, Mas Bintang, Ihsan, Bhakti, Rio, dan Riza, serta keluarga Bapak Sumardi dan Ibu Yana yang tetap menjadi keluarga setelah masa KKN;
13. Kiki dan keluarga *Police line* lainnya, Finda, Myra, Bella dan keluarga *Dexter* lainnya, Yuntari yang selalu memberikan dukungan dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah. Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 2 Juli 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Batasan Masalah	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kulit	6
2.2 Melanogenesis	7
2.3 Tinjauan Edamame (<i>Glycine max</i>)	9
2.4 <i>Vanishing Cream</i>	12
2.5 Tinjauan Bahan Tambahan	12
2.5.1 Trietanolamin.....	12

2.5.2	Asam Stearat.....	13
2.5.3	Setil Alkohol.....	13
2.5.4	Propilen Glikol.....	14
2.5.5	Metil Paraben.....	14
2.5.6	Propil Paraben.....	15
2.5.7	Lanolin.....	16
2.5.8	Vaselin album.....	16
2.6	Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri.....	16
2.7	Optimasi Kondisi Analisis.....	18
2.7.1	Resolusi.....	18
2.7.2	Nilai <i>Theoretical Plate</i> (N).....	19
2.7.3	Nilai <i>Height Equivalent Theoretical Plate</i> (H).....	19
2.8	Validasi Metode Analisis.....	19
2.8.1	Linieritas.....	20
2.8.2	Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	20
2.8.3	Selektivitas/Spesifisitas.....	21
2.8.4	Presisi.....	21
2.8.5	Akurasi.....	22
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	24
3.1	Rancangan Penelitian.....	24
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
3.3	Alat dan Bahan yang Digunakan.....	24
3.3.1	Alat.....	24
3.3.2	Bahan.....	26
3.4	Prosedur Penelitian.....	26
3.4.1	Formula <i>Vanishing Cream</i> Ekstrak Etanol Edamame (<i>Glycine max</i>).....	26
3.4.2	Evaluasi sediaan <i>Vanishing Cream</i>	27
3.4.3	Optimasi Kondisi Analisis.....	28

3.4.4	Validasi Metode Analisis.....	30
3.4.5	Penetapan Kadar Genistein dalam Sediaan <i>Vanishing Cream</i>	32
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		33
4.1	Hasil Pembuatan <i>Vanishing Cream</i>	33
4.2	Evaluasi Karakteristik Fisika Kimia <i>Vanishing Cream</i>.....	34
4.2.1	Hasil Pengamatan Organoleptis.....	34
4.2.2	Hasil Penentuan Tipe Emulsi.....	35
4.2.3	Hasil Pengujian Viskositas	36
4.2.4	Hasil Pengujian Daya Sebar	37
4.2.5	Hasil Pengukuran pH.....	37
4.3	Optimasi Kondisi Analisis	38
4.3.1	Optimasi Eluen	39
4.3.2	Optimasi Panjang Gelombang.....	40
4.3.3	Optimasi Konsentrasi Uji	40
4.4	Validasi Metode Analisis.....	41
4.4.1	Linieritas	41
4.4.2	Batas Deteksi dan batas Kuantitasi.....	43
4.4.3	Selektivitas/Spesifisitas	44
4.4.4	Presisi.....	46
4.4.5	Akurasi.....	47
4.5	Penetapan Kadar Genistein dalam Sediaan <i>Vanishing Cream</i>	48
BAB 5. PENUTUP.....		49
5.1	Kesimpulan	49
5.2	Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA		51

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Konsentrasi analit berbanding RSD.....	22
2.2 Persen perolehan kembali analit pada konsentrasi berbeda.....	23
3.1 Formula <i>vanishing cream</i> ekstrak etanol edamame (<i>Glycine max</i>).....	26
4.1 Perbandingan organoleptis yang diharapkan dan hasil pengujian.....	35
4.2 Hasil pengujian viskositas	37
4.3 Hasil pengujian daya sebar	37
4.4 Hasil pengukuran pH	38
4.5 Perbandingan karakteristik fisika kimia sediaan yang diharapkan dan hasil pengujian.....	38
4.6 Perbandingan nilai parameter efisiensi kromatogram pada komposisi yang berbeda.....	39
4.7 Perbandingan nilai parameter efisiensi kromatogram pada konsentrasi yang berbeda.....	41
4.8 Kondisi optimum analisis genistein dalam sediaan <i>vanishing cream</i> ekstrak etanol edamame (<i>Glycine max</i>) dengan metode KLT Densitometri	41
4.9 Hasil uji linieritas.....	42
4.10 Hasil pengujian linieritas pada uji BD dan BK	43
4.11 Tabel korelasi uji <i>purity</i> genistein	45
4.12 Tabel korelasi uji <i>identity</i> genistein.....	45
4.13 Hasil uji presisi repeatabilitas	46
4.14 Hasil uji presisi antara	46
4.15 Hasil uji akurasi	47
4.16 Data % <i>recovery</i> kadar genistein	48

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur epidermis	7
2.2 Proses melanogenesis	9
2.3 Biji kedelai edamame (<i>Glycine max</i>).....	10
2.4 Struktur isoflavon	11
2.5 Rumus struktur TEA.....	13
2.6 Rumus struktur asam stearat.....	13
2.7 Rumus struktur setil alkohol.....	14
2.8 Rumus struktur propilen glikol.....	14
2.9 Rumus struktur metil paraben.....	15
2.10 Rumus struktur propilen glikol.....	15
2.11 Densitometer CAMAG.....	17
3.1 Skema langkah kerja penelitian	25
4.1 Sediaan <i>vanishing cream</i> ekstrak etanol edamame (<i>Glycine max</i>).....	34
4.2 Hasil pengujian mikroskopik tipe emulsi	36
4.3 Spektra genistein pada panjang gelombang 200 – 400 nm.....	40
4.4 Kurva linieritas vs massa genistein.....	42
4.5 Kurva linieritas vs massa genistein pada uji BD dan BK.....	43
4.6 Kromatogram pemisahan genistein	44
4.7 Spektra uji <i>purity</i> dan <i>identity</i> genistein	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Data Perhitungan Viskositas	56
B. Data Perhitungan Daya Sebar	56
C. Data Perhitungan pH	58
D. Data Optimasi Eluen	59
E. Data Optimasi Konsentrasi Uji	62
F. Preparasi Larutan Standar	63
F.1 Preparasi Larutan Standar untuk Uji Linieritas	63
F.2 Preparasi Larutan Standar untuk Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	63
G. Data Batas Deteksi Dan Batas Kuantitasi	64
H. Perhitungan Resolusi Puncak Genistein.....	66
I. Perhitungan Data Presisi	67
J. Perhitungan Data Akurasi.....	72
K. Perhitungan Penetapan Kadar Genistein dalam Sediaan <i>Vanishing Cream</i>	75
L. Dokumentasi Penelitian	77

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kosmetika merupakan suatu komponen sandang yang sangat penting peranannya dalam kehidupan masyarakat. Salah satu jenis kosmetik yang memiliki konsumen tinggi di Indonesia adalah kosmetik pemutih kulit, hal ini disebabkan karena sebagian besar penduduknya menyukai warna kulit yang cerah (Suhartini *et al.*, 2013). Menurut Su (2003), Asia merupakan pasar terbesar untuk produk pemutih kulit.

Tingginya permintaan akan produk pemutih kulit kerap kali digunakan oleh produsen kosmetik untuk meraih keuntungan besar. Tidak sedikit produk pemutih kulit di pasaran yang mengandung senyawa berbahaya seperti hidrokuinon, merkuri (Hg) dan asam retinoat. Pemerintah telah membatasi konsentrasi penggunaan hidrokuinon, yakni tidak lebih dari 2%, dan melarang penggunaan merkuri dan asam retinoat dalam sediaan kosmetik sejak tahun 1998 dengan dikeluarkannya Peraturan Menteri Kesehatan (Permenkes) RI No. 445/Menkes/Per/V/1998. Efek samping akibat penggunaan jangka panjang bahan tersebut antara lain iritasi kulit yang ditandai dengan kulit terkelupas, kemerahan atau rasa terbakar, kerusakan otak permanen, dan gangguan ginjal serta bersifat teratogenik dan karsinogenik (Damanik *et al.*, 2011).

Berdasarkan fakta tersebut, perlu dicari alternatif agen pemutih kulit yang aman digunakan. Maraknya semboyan *back to nature* membuat produk pemutih kulit yang berasal dari alam lebih disukai dan menguasai pasar, meskipun sejumlah produk untuk mengurangi pigmentasi kulit menggunakan bahan sintesis telah banyak dikembangkan (Fatmawaty *et al.*, 2010).

Penghambatan aktivitas enzim tirosinase adalah salah satu kunci awal untuk mencapai efek pencerah kulit untuk kosmetik pemutih kulit. Enzim tirosinase

memiliki peran utama dalam proses melanogenesis, yakni dengan mengkatalisis hidroksilasi L-tirosin menjadi L-DOPA dan mengkatalisis oksidasi L-DOPA menjadi L-dopakuinon. Senyawa L-dopakuinon akan diubah menjadi dua jenis melanin, yaitu eumelanin dan feomelanin. Eumelanin akan menyebabkan kulit berwarna gelap atau kecoklatan (Gillbro and Olsson, 2011).

Salah satu contoh bahan aktif yang dapat menghambat aktivitas enzim tirosinase adalah flavonoid (Fatmawaty *et al.*, 2010). Tidak semua golongan flavonoid memberikan aktivitas hambatan tirosinase. Beberapa contoh golongan flavonoid yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase adalah kuersetin dari golongan flavonol, streptogenin dari golongan flavanon, taxifolin dari golongan flavanol, dan genistein dan daidzein dari golongan isoflavon (Chang, 2009).

Isoflavon merupakan metabolit sekunder terbesar dalam kedelai (Luthria *et al.*, 2007). Salah satu senyawa isoflavon yang memiliki aktivitas tinggi adalah genistein (Rahayu, 2012). Menurut Chang *et al.* (2005), genistein memiliki aktivitas penghambatan enzim tirosinase yang kuat.

Edamame merupakan varietas kedelai (*Glycine max*) yang dipanen saat masih muda (Konovsky *et al.*, 1994; Rukmana and Yuniarsih, 2012). Kandungan isoflavon saat biji kedelai muda lebih tinggi dibandingkan saat biji kedelai tua (Mebrahtu *et al.*, 2004). Menurut Dewi (2015), ekstrak etanol edamame memiliki aktivitas hambatan enzim tirosinase dengan nilai IC₅₀ sebesar 93,6 ppm.

Mengacu pada beberapa penelitian tersebut, perlu dilakukan pengembangan formulasi sediaan pemutih kulit yang mengandung ekstrak edamame (*Glycine max*). Basis sediaan yang dipilih dalam penelitian ini adalah *vanishing cream*. Basis ini disukai untuk penggunaan sehari-hari karena memiliki kelebihan yaitu setelah pemakaian tidak menimbulkan bekas, memberikan efek dingin pada kulit, tidak berminyak, serta memiliki kemampuan penyebaran yang baik (Ansel *et al.*, 2011). Evaluasi sediaan yang dilakukan meliputi pengamatan organoleptis, pengujian tipe emulsi, pengukuran viskositas, daya sebar, dan pH, serta penetapan kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream*.

Salah satu evaluasi sediaan yang dilakukan adalah penetapan kadar genistein dalam *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan metode KLT Densitometri. Suatu metode analisis yang baru harus divalidasi untuk membuktikan bahwa parameter-parameter kinerjanya mampu mengatasi masalah analisis tertentu serta validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduisibel, dan mampu menganalisis analit tertentu pada kisaran konsentrasi tertentu (Rohman, 2009). Parameter validasi yang diuji pada penelitian ini meliputi linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah karakteristik fisika kimia sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) yang meliputi organoleptis, tipe emulsi, viskositas, daya sebar, dan pH memenuhi persyaratan spesifikasi sediaan topikal yang telah ditentukan?
2. Bagaimanakah kondisi optimum penetapan kadar genistein dalam *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan metode KLT Densitometri?
3. Bagaimanakah validitas metode penetapan kadar genistein dalam *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan metode KLT Densitometri yang meliputi parameter linieritas, kepekaan, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi?
4. Bagaimanakah perolehan kembali kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*)?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui karakteristik fisika kimia sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) yang meliputi organoleptis, tipe emulsi, viskositas, daya sebar, pH, dan kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream*.
2. Mengetahui kondisi optimum penetapan kadar genistein dalam *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan metode KLT Densitometri.
3. Mengetahui validitas metode penetapan kadar genistein dalam *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan metode KLT Densitometri yang meliputi parameter linieritas, kepekaan, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.
4. Mengetahui perolehan kembali kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*).

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Bagi institusi, sebagai bahan acuan atau tinjauan pustaka untuk penelitian selanjutnya.
2. Bagi ilmu pengetahuan, memberikan sumbangan informasi terutama dalam bidang farmasetika mengenai pemanfaatan bahan alam sebagai sediaan topikal pemutih kulit.
3. Bagi peneliti, memperluas wawasan mengenai formulasi dan validasi metode penetapan kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream* ekstrak edamame (*Glycine max*).

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Metode yang digunakan untuk mengekstraksi isoflavon adalah metode sonikasi dengan pelarut etanol 70%.

2. Ekstrak yang digunakan merupakan hasil penelitian yang dilakukan oleh Dewi (2015) dengan kadar genistein sebesar 0,0252 %b/b dan nilai IC_{50} enzim tirosinase sebesar 93,6 ppm.



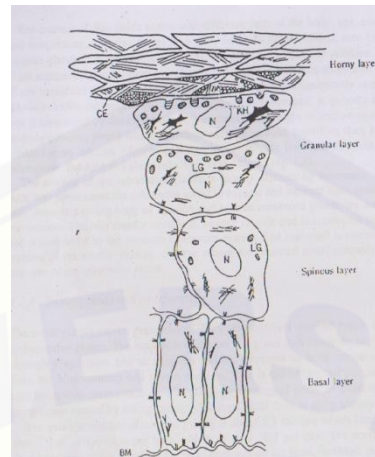
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit

Kulit adalah organ terbesar dari tubuh, memiliki massa lebih dari 10% dari total massa tubuh. Kulit terdiri dari empat lapisan, yaitu epidermis (lapisan *stratum corneum*), epidermis hidup, dermis, dan jaringan subkutan (Gibson, 2009). Namun ada beberapa sumber yang membagi kulit menjadi tiga lapisan, yaitu lapisan epidermis, dermis, dan subkutan (Mitzui, 1997; Lachman *et al.*, 1994).

Epidermis tersusun atas lapisan-lapisan sel dengan ketebalan 0,1 - 0,3 mm. Lapisan penyusun epidermis adalah stratum korneum (*horny layer*), stratum granulosum, stratum spinosum, dan stratum germinativum atau stratum basal (Mitzui, 1997). Epidermis memiliki empat tipe sel, yaitu sel keratinosit, melanosit, sel Langerhan, dan sel Merkel (Paye *et al.*, 2006).

Sel pada stratum basal terus menerus membelah dan kemudian bermigrasi ke arah permukaan membentuk stratum spinosum. Stratum spinosum terdiri dari beberapa lapis sel dan sel-sel penyusun stratum spinosum ini dihubungkan oleh desmosom. Stratum ini merupakan lapisan yang paling tebal dalam epidermis dan di atas lapisan ini terbentuk dua atau tiga lapis stratum granulosum yang mengandung granul keratohialin. Sel yang bergerak ke permukaan mengalami perubahan membentuk stratum korneum. Perubahan tersebut adalah hilangnya beberapa organela sel termasuk nukleus dan terisinya sel oleh protein fibrosa yang disebut keratin (Mitzui, 1997). Keratin penyusun stratum korneum merupakan sel yang mati dan memipih. Nilai koefisien difusi dari stratum korneum seribu kali (bahkan lebih) lebih kecil dari lapisan kulit lainnya sehingga menghasilkan daya tahan yang lebih tinggi dan umumnya sulit untuk ditembus oleh benda asing (Lachman *et al.*, 1994). Struktur epidermis dapat dilihat pada Gambar 2.1.



N: nukleus; LG: *lamellar granule*; BM: *basement membrane*; KH: granul keratohialin; CE: *cornified envelope*

Gambar 2.1 Struktur epidermis (Mitzui, 1997)

Keratinosit akan memproduksi keratin yang merupakan suatu protein yang tersusun seperti benang-benang yang kuat. Melanosit adalah jenis sel yang berbeda fungsi dan pertumbuhannya. Sel ini terdapat pada stratum basal. Melanosit mengandung enzim tirosinase yang mampu mengubah L-tirosin menjadi L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) dan mengubah L-DOPA menjadi L-dopakuinon yang nantinya akan membentuk melanin. Melanin berfungsi untuk melindungi kulit dari paparan sinar ultraviolet (UV). Sel Langerhan mempunyai fungsi mengeluarkan respon imun sebagai bentuk perlindungan terhadap benda asing. Sel Merkel dapat ditemui di stratum basal. Sel ini mengandung banyak granul tebal dalam sitoplasmanya (Paye *et al.*, 2009).

2.2 Melanogenesis

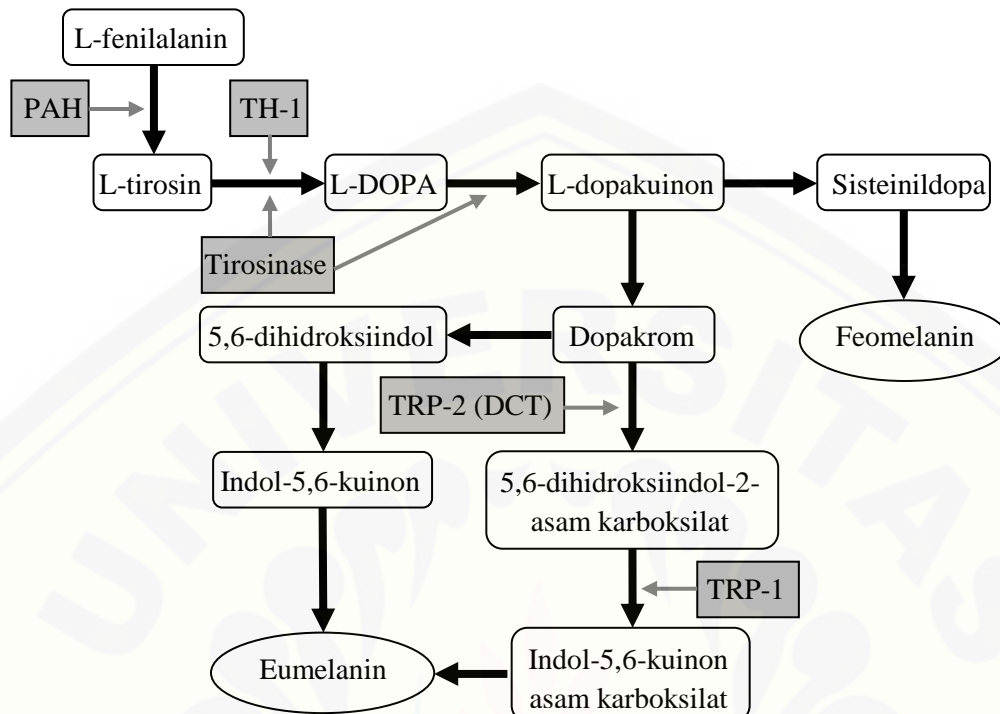
Melanin adalah suatu senyawa yang dihasilkan oleh sel melanosit yang terdapat pada lapisan epidermis. Proses pembentukan melanin disebut melanogenesis yang terjadi di melanosom. Proses ini bertujuan untuk melindungi kulit dari paparan radiasi *ultraviolet* (UV) (Park *et al.*, 2010). Melanin yang disintesis dibagi menjadi

dua macam, yaitu feomelanin dan eumelanin. Feomelanin berwarna merah-kuning atau polimer terlarut yang dibentuk oleh konjugasi sistein atau glutation, sedangkan eumelanin berwarna coklat-hitam atau polimer tidak larut yang berwarna gelap (Videira *et al.*, 2013).

Aktivasi enzim tirosinase adalah kunci awal dari proses melanogenesis. Tirosinase merupakan suatu glikoprotein yang terdapat di membran melanosom yang terdapat di dalam melanosit. Tirosinase berperan sebagai katalis reaksi hidroksilasi L-tirosin menjadi L-DOPA dan reaksi oksidasi L-DOPA menjadi L-dopakuinon (Draeos and Thamana, 2006; Gillbro and Olsson, 2011).

Melanogenesis diawali dengan perubahan asam amino essensial L-fenilalanin oleh fenilalanin hidroksilase (PAH) menjadi L-tirosin. Dengan adanya enzim tirosinase atau isoenzim tirosinase dihidroksilase 1 (TH-1), L-tirosin akan mengalami hidroksilasi menjadi L-DOPA. Selanjutnya L-DOPA akan dioksidasi oleh enzim tirosinase menjadi L-dopakuinon. Pembentukan feomelanin sangat bergantung pada keberadaan asam amino sistein yang ditransport secara aktif melalui membran melanosomal. Sistein akan bereaksi dengan L-dopakuinon membentuk sisteinil-dopa. Sisteinil-dopa selanjutnya akan diubah menjadi kuinolimina, alanin-hidroksil-dihidrobenzotazina dan polimernya yang akan membentuk feomelanin (Gillbro and Olsson, 2011).

Pada pembentukan eumelanin, L-dopakuinon akan diubah menjadi dopakrom yang selanjutnya akan diubah secara spontan menjadi 5,6-dihidroksiindol atau dikonversi secara enzimatik oleh *dopachrome tautomerase* (DCT) menjadi 5,6-dihidroksiindol-2-asam karboksilat. Dua senyawa tersebut akan diubah menjadi suatu polimer indol dengan kuinon yang selanjutnya akan membentuk eumelanin (Gillbro and Olsson, 2011). Proses melanogenesis dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Proses melanogenesis (Gillbro and Olsson, 2011)

2.3 Tinjauan Edamame (*Glycine max*)

Edamame merupakan kedelai yang berasal dari Jepang dan cukup populer di Asia (Rukmana and Yuniarsih, 2012). Kedelai ini disebut juga kedelai sayur karena dipanen saat polongnya masih muda dan hijau yakni pada stadia tumbuh R-6 atau R-7 atau ketika pengisian biji sudah hampir penuh (80 - 90% pengisian) saat ukuran polongnya besar, sedangkan kedelai (*grain soybean*) umumnya dipanen pada stadia R-8 (Konovsky *et al.*, 1994). Biji kedelai edamame berukuran besar dengan berat 30 - 56 gram/100 biji, berwarna kuning hingga hijau, berbentuk bulat hingga bulat telur, dilapisi oleh lapisan berwarna hijau terang, dan mengandung gula yang tinggi (Samsu, 2001; Sciarappa *et al.*, 2007). Gambar biji kedelai edamame dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Biji kedelai edamame (*Glycine max*) (Dokumentasi pribadi)

Kedelai edamame merupakan varietas kedelai yang memiliki nama latin *Glycine max* (Konovsky *et al.*, 1994; Rukmana and Yuniarsih, 2012). Adapun klasifikasi kedelai edamame adalah:

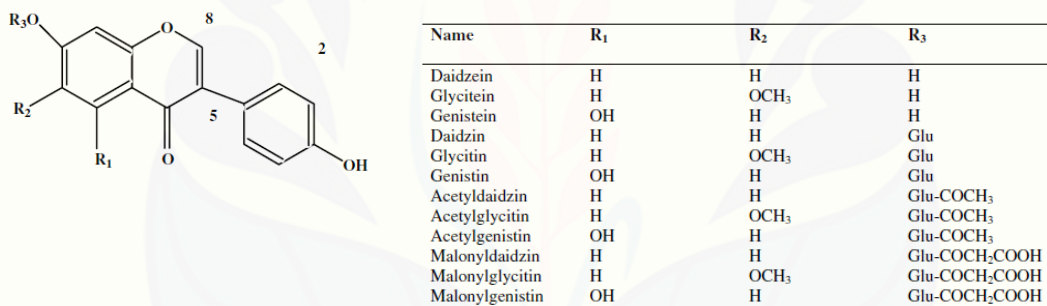
Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Rosidae
Ordo	: Fabales
Familia	: Fabaceae
Genus	: <i>Glycine</i>
Spesies	: <i>Glycine max</i> (L) Merrill

(USDA, 2010).

Edamame (*Glycine max*) mengandung nutrisi tinggi dan kaya protein. Kedelai ini tidak hanya dikonsumsi sebagai camilan, tetapi juga sebagai sayuran yang ditambahkan pada makanan sup (Konovsky *et al.*, 1994). Edamame mengandung isoflavon yang tinggi. Kandungan isoflavon saat biji kedelai muda lebih tinggi dibandingkan saat biji tua (Mebrahtu *et al.*, 2004). Isoflavon banyak terdapat di kotiledon, sekitar 80 - 90% (Tsukamoto *et al.*, 1995). Senyawa ini memiliki banyak

aktivitas biologis, seperti sebagai agen estrogenik, fungitoksik, dan antioksidan (Georgetti *et al.*, 2006).

Isoflavon merupakan senyawa heterosiklik golongan flavonoid yang mengandung rangka 3-fenilkroman yang terhidroksilasi pada posisi 4' dan 7 (Luthria *et al.*, 2007; Rahayu, 2012). Senyawa isoflavon di kedelai ditemukan dalam bentuk glikosida (genistin, daidzin, glisitin), aglikon (genistein, daidzein, glisitein), dan malonil glikosida (malonilgenistin, malonildaidzin, malonilglisitin) (Yoshiara *et al.*, 2012). Jenis isoflavon dalam kedelai dapat dilihat pada Gambar 2.4. Dalam tanaman, isoflavon umumnya terdapat dalam bentuk glikosida (Barners, 1998; Yamaguchi and Gao-Balch, 2013). Isoflavon tersebut adalah dapat terhidrolisis menjadi bentuk aglikonnya selama proses fermentasi (Park *et al.*, 2010).



Gambar 2.4 Struktur isoflavon (Luthria *et al.*, 2007)

Genistein (4',5',7'-trihidroksiisoflavon) adalah bentuk aglikon dari isoflavon genistin (4',5',7'-trihidroksi-7-glukosida). Senyawa ini memiliki aktivitas hambatan terhadap enzim tirosinase, topoisomerase I dan topoisomerase II, dan ribosomal 6S kinase, serta merubah profilerasi sel (Chang *et al.*, 2005; Georgetti *et al.*, 2006). Genistein memiliki lipofilisitas yang tinggi dan nilai Log koefisien partisi oktanol-air sebesar 2,94 (Chadha, 2009). Menurut Rostagno *et al.* (2004) kadar genistein dalam kedelai paling tinggi dibandingkan dengan daidzein dan glisitein.

2.4 *Vanishing Cream*

Vanishing cream adalah adalah suatu sistem emulsi minyak dalam air (*O/W*) yang mengandung air dalam persentase besar dan asam stearat atau komponen minyak lainnya (Ansel *et al.*, 2011). *Vanishing cream* mengandung emulgator yang bersifat basa seperti trietanolamin, kalium, amonium, dan natrium hidroksida, dan emulgator bersifat asam lemak seperti asam stearat. Kombinasi emulgator ini akan membentuk suatu massa sediaan yang berkilau seperti mutiara (Voight, 1994). *Vanishing cream* disukai untuk penggunaan sehari-hari karena memiliki kelebihan yaitu:

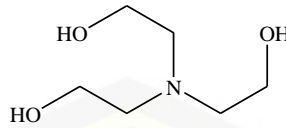
- 1 Tidak lengket dan terasa ringan saat digunakan pada kulit
- 2 Terdispersi dengan baik saat digunakan pada kulit
- 3 Mempunyai efek *cooling* karena adanya penguapan dari air sebagai fase luar
- 4 Tidak tampak setelah dioleskan

(Ansel *et al.*, 2011).

2.5 Tinjauan Bahan Tambahan

2.5.1. Trietanolamin

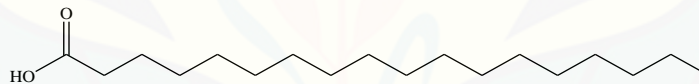
Trietanolamin (TEA) memiliki rumus empiris $C_{16}H_{15}NO_3$. Rumus struktur TEA dapat dilihat pada Gambar 2.5. TEA merupakan campuran basa yang tersusun atas 2,2',2''-nitrilotrietanol, 2,2'-iminobisetanol (dietanolamin) dan sejumlah kecil 2-aminoetanol (monoetanolain). TEA berupa cairan kental yang sangat higroskopis dengan bau amoniak ringan, jernih, tidak berwarna sampai kuning pucat. Kelarutan TEA pada 20 °C yakni larut dalam etil eter (1:63), larut dalam benzena (1:24) dan dapat bercampur dengan air, aseton dan metanol. Titik lebur TEA 20-21 °C . TEA telah digunakan secara luas dalam sediaan topikal sebagai *alkalizing agent* dan *emulsifying agent* (Rowe *et al.*, 2009).



Gambar 2.5 Rumus struktur TEA

2.5.2. Asam Stearat

Asam stearat memiliki rumus empiris $C_{18}H_{36}O_2$. Rumus struktur asam stearat dapat dilihat pada Gambar 2.6. Asam stearat berbentuk kristal padat atau serbuk, berwarna putih atau sedikit kuning, keras, berbau lemah, dan rasanya memberikan kesan berlemak. Asam stearat praktis tidak larut dalam air. Titik lebur asam stearat 69-70 °C. Pada sediaan topikal, asam stearat digunakan sebagai bahan pengemulsi dan pelarut. Asam stearat biasanya digunakan dalam pembuatan krim dengan netralisasi menggunakan bahan alkalis yang digunakan atau trietanolamin. Penampilan dan kekenyalan krim ditentukan dari jumlah bahan alkalis yang digunakan (Rowe *et al.*, 2009).

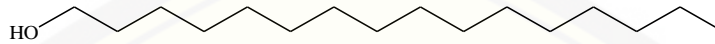


Gambar 2.6 Rumus struktur asam stearat

2.5.3. Setil Alkohol

Setil alkohol memiliki rumus empiris $C_{16}H_{34}O$. Rumus struktur setil alkohol dapat dilihat pada Gambar 2.7. Setil alkohol berbentuk seperti lilin dan berupa serpihan putih berbentuk granul atau kubus. Setil alkohol bersifat tidak larut dalam air, tetapi larut dalam etanol dan eter. Kelarutannya bertambah dengan adanya peningkatan temperatur. Titik leburnya adalah sekitar 45-52 °C dan 49 °C untuk material murni. Setil alkohol berfungsi sebagai *coating agent*, *emulsifying agent* dan *stiffening agent*. Setil alkohol sering digunakan dalam formulasi suppositoria, emulsi, lotion, krim, dan salep. Setil alkohol dapat meningkatkan stabilitas sediaan pada

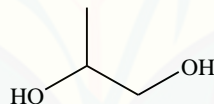
emulsi minyak dalam air jika dikombinasikan dengan larutan *aqueous emulsifier* pada sediaan emulsi semisolid yang ditujukan untuk membentuk fase kontinyu viskoelastis serta mencegah terjadinya koalesen (Rowe *et al.*, 2009).



Gambar 2.7 Rumus struktur setil alkohol

2.5.4. Propilen Glikol

Propilen glikol memiliki rumus empiris $C_3H_8O_2$. Rumus struktur propilen glikol dapat dilihat pada Gambar 2.8. Propilen glikol merupakan cairan jernih, tidak berwarna, kental, tidak berbau, dan berasa manis. Propilen glikol dapat campur dengan aseton, kloroform, etanol (95%), gliserin, dan air. Propilen glikol larut dalam eter (1:6), tidak campur dengan *mineral oil*, tetapi dapat larut dalam beberapa minyak essensial. Bahan ini dapat digunakan sebagai pengawet, desinfektan, humektan, plastisizer, pelarut, *stabilizing agent*, dan kosolvent. Propilen glikol inkompatibel dengan oksidator kuat (Rowe *et al.*, 2009).

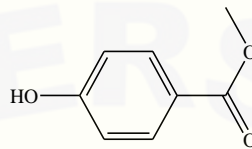


Gambar 2.8 Rumus struktur propilen glikol

2.5.5. Metil Paraben

Metil paraben, disebut juga nipagin, memiliki rumus empiris $C_8H_8O_3$. Rumus struktur metil paraben dapat dilihat pada Gambar 2.9. Metil paraben berbentuk kristal berwarna atau bubuk kristal putih dan tidak berbau atau hampir tidak berbau. Metil paraben dalam formulasi farmasetika, produk makanan, dan terutama dalam kosmetik biasanya digunakan sebagai bahan pengawet. Bahan ini dapat digunakan sendiri maupun dikombinasi dengan jenis paraben lain. Kelarutan metil paraben pada 25 °C yakni 1:400 dalam air, 1:50 dalam air suhu 50 °C, 1:30

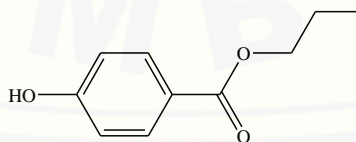
dalam air suhu 30 °C, 1:2 dalam etanol, 1:3 dalam etanol 95%, 1:6 dalam etanol 50%, 1:10 dalam eter, 1:60 dalam gliserol, dalam *mineral oil*, 1:200 dalam *peanut oil*, dan 1:5 dalam propilen glikol. Efektivitas pengawet ini berada pada rentang pH 4-8 dan menurun dengan adanya surfaktan nonionik. Titik lebur metil paraben sebesar 125-128 °C (Rowe *et al.*, 2009).



Gambar 2.9 Rumus struktur metil paraben

2.5.6. Propil paraben

Propil paraben, disebut juga nipasol, memiliki rumus empiris $C_{10}H_{12}O_3$. Rumus struktur propil paraben dapat dilihat pada Gambar 2.10. Propil paraben berbentuk kristal atau bubuk berwarna putih, tidak berbau dan tidak berasa. Propil paraben digunakan sebagai bahan pengawet. Aktivitas antimikroba ditunjukkan pada pH antara 4-8 dan menurun dengan adanya surfaktan nonionik. Kelarutan propil paraben yakni 1:2500 dalam air, 1:4350 dalam air suhu 15 °C, 1:225 dalam air suhu 80 °C, 1:1,1 dalam etanol 95%, 1:5,6 dalam etanol 50%, larut dalam eter, 1:250 dalam gliserol, 1:3330 dalam *mineral oil*, 1:70 dalam *peanut oil*, 1:3,9 dalam propilen glikol, dan 1:110 dalam propilen glikol 50%. Titik lebur propil paraben berada pada rentang 96-99 °C. Bahan ini secara luas digunakan sebagai bahan pengawet dalam kosmetik, makanan, dan produk farmasetika. Penggunaan kombinasi paraben dapat meningkatkan aktivitas antimikroba (Rowe *et al.*, 2009).



Gambar 2.10 Rumus struktur propil paraben

2.5.7. Lanolin

Lanolin, disebut juga *adeps lanae cum aqua*, merupakan bentuk hidrat lanolin, berwarna kuning pucat dan berbau khas. Lanolin praktis tidak larut dalam kloroform, eter, dan air, serta hanya komponen lemak dari lanolin yang dapat larut dalam pelarut organik. Bahan ini sering digunakan sebagai *emulsifying agent* dan basis salep (Rowe *et al.*, 2009).

2.5.8. Vaseline Album

Vaseline memiliki rumus empiris C_nH_{2n+2} . Vaseline berwarna kuning pucat hingga kuning terang, tembus, dan memiliki massa yang lembut. Tidak berbau, tidak berasa, dan dapat berfluoresensi pada siang hari, meskipun meleleh. Vaseline album praktis tidak larut dalam aseton, etanol, etanol (95%) panas atau dingin, gliserol, dan air; larut dalam benzena, karbon disulfida, kloroform, eter, dan heksan, serta sebagian besar stabil dalam minyak. Pada sediaan farmasi vaselin terutama digunakan dalam sediaan topikal dan kosmetik. Vaseline memiliki fungsi sebagai basis salep dan emolien (Rowe *et al.*, 2009).

2.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri

Metode kromatografi merupakan metode analisis dengan prinsip fase gerak melewati sebuah fase diam sedemikian rupa sehingga campuran zat dipisahkan menjadi beberapa komponen. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan sebuah metode untuk menganalisis campuran dengan cara memisahkan senyawa dalam campuran. Metode KLT dapat digunakan untuk menentukan jumlah senyawa dalam campuran dan kemurnian suatu senyawa (Deinstrop, 2007).



Gambar 2.11 Densitometer CAMAG (Dokumentasi pribadi)

Densitometri merupakan metode analisis instrumental dalam penentuan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi antara radiasi elektromagnetik dan analit yang merupakan noda pada KLT. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada KLT yang ditentukan adalah absorpsi, transmisi, pantulan (refleksi), dan fluoresensi dari radiasi semula. Analisis secara kuantitatif dapat dilakukan dengan cara membandingkan densitas noda standar yang kadarnya telah diketahui dengan noda sampel yang akan ditentukan kadarnya. Analisis secara kualitatif dapat dilakukan dengan cara membandingkan nilai R_f sampel dengan nilai R_f senyawa acuan standar, biasanya dilakukan pada kondisi kromatografi yang sama dan pelat lapis tipis yang sama. Selain itu dapat ditentukan dengan membandingkan spektrum panjang gelombang kromatogram sampel dengan spektrum panjang gelombang senyawa standar, apabila panjang gelombang kromatogram maksimum sampel sama dengan panjang gelombang maksimum standar maka kemungkinan zat tersebut sama (Mulja and Suharman, 1995). Penelitian ini menggunakan Densitometer CAMAG TLC *scanner* 3 yang bisa dilihat pada Gambar 2.11.

Sumber radiasi yang digunakan dapat dipilih yaitu sinar UV (lampu deuterium), sinar VIS (lampu tungsten), dan sinar fluoresensi (lampu merkuri). Sinar yang dipancarkan berupa sinar polikromatik masuk melewati celah monokromator, di dalam monokromator sinar didispersikan menjadi sinar monokromatik dengan teknik grating. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih keluar melalui celah keluar monokromator (Wulandari, 2011).

Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih dipantulkan melalui cermin sehingga mengenai objek (lempeng KLT). Sinar yang datang dapat dipantulkan maupun diteruskan. Sinar yang dipantulkan atau diteruskan ditangkap oleh pengganda foton (*photomultiplier*) yang berfungsi untuk menggandakan sinar yang datang sehingga dihasilkan elektron yang terbaca oleh sistem komputer sebagai data output (Wulandari, 2011).

2.7 Optimasi Kondisi Analisis

Prinsip kromatografi adalah pemisahan analit dari campuran. Optimasi proses kromatografi perlu dilakukan untuk meningkatkan kualitas pemisahan dengan cara mengubah satu atau lebih parameter dari sistem kromatografi (Kowalska and Prus, 2003). Optimasi yang perlu dilakukan adalah optimasi kondisi analisis karena untuk mendapatkan pemisahan yang baik harus digunakan kondisi analisis yang optimum. Pemilihan kondisi analisis yang akan digunakan didasarkan pada penilaian parameter efisiensi sistem kromatografi. Parameter yang menentukan efisiensi kromatogram antara lain nilai resolusi (R_s), nilai *theoretical plate* (N), dan nilai *height equivalent of theoretical plate* (H) (Wulandari, 2011).

2.7.1 Resolusi

Resolusi merupakan kemampuan kondisi analisis untuk memisahkan dua senyawa dalam sampel. Resolusi analit dengan zat lain sebaiknya lebih dari 1,5. Semakin besar nilai resolusi semakin baik pemisahan yang terjadi. Apabila resolusi kromatografi kecil, yaitu kurang dari 1,5, maka perlu dilakukan evaluasi kondisi analisis yang digunakan. Secara matematik nilai R_s dirumuskan sebagai berikut.

$$R_s = \frac{2 \{(Z)a - (Z)b\}}{W_a + W_b}$$

keterangan

R_s	= pemisahan antara dua puncak kromatogram (zat a dan zat b)
$(Z)a$	= jarak migrasi zat a
$(Z)b$	= jarak migrasi zat b
W_a	= lebar dasar puncak zat a

Wb = lebar dasar puncak zat b
(Wulandari, 2011)

2.7.2 Nilai *Theoretical Plate* (N)

Nilai *theoretical plate* atau lempeng teoritis merupakan nilai atau angka pelebaran zona yang menunjukkan satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam. Secara matematik nilai N dirumuskan sebagai berikut.

$$N = 16 \left[\frac{Zs}{W} \right]^2$$

keterangan

N = nilai pelebaran zona untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam
Zs = jarak migrasi analit
W = lebar dasar puncak
(Wulandari, 2011)

2.7.3 Nilai *Height Equivalent of Theoretical Plate* (H)

Nilai H merupakan panjang jarak tempuh eluen yang dibutuhkan sampai terjadinya satu kali kesetimbangan dalam fase gerak dan fase diam. Secara matematik nilai H dirumuskan sebagai berikut.

$$H = \frac{Zf}{N}$$

keterangan

H = jarak tempuh analit untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase diam dan fase gerak
Zf = jarak migrasi fase gerak
N = nilai pelebaran zona untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam
(Wulandari, 2011)

2.8 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu proses yang dilakukan dengan pengujian laboratorium untuk menunjukkan kinerja metode memenuhi persyaratan yang dimaksudkan dalam aplikasi analisis. Oleh karena itu, validasi merupakan

langkah penting yang harus dilakukan untuk menentukan realibilitas dan reproduibilitas dari suatu metode karena dapat mengetahui apakah suatu metode dapat dilakukan pada suatu sistem tertentu (Indrayanto and Yuwono, 2003).

2.8.1. Linieritas

Linieritas adalah suatu kemampuan metode analisis yang memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel, baik secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, (Harmita, 2004). Untuk pengujian linieritas, direkomendasikan menggunakan 5-10 konsentrasi standar dengan rentang 80-200%, 25-200%, atau 50-150% dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto and Yuwono, 2003).

Koefisien korelasi (r) sering digunakan sebagai parameter adanya hubungan linier pada analisis regresi linier $Y = bX + a$. Hubungan linier yang ideal memiliki nilai $b=0$ dan $r= +1$ atau -1 bergantung arah garis, sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama kepekaan instrumen yang digunakan (Harmita, 2004). Penggunaan nilai r saja sebagai parameter linieritas tidak lagi digunakan karena nilai r tidak mengindikasikan linieritas sehingga harus ditambah dengan parameter lain seperti nilai standar deviasi (V_{x0}) dan X_p (Indrayanto and Yuwono, 2003).

2.8.2. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (BD) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas kuantitasi (BK) diartikan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004). Penentuan BD dan BK dapat dilakukan dengan menggunakan 5 - 10 tingkat konsentrasi analit yang relatif rendah (Indrayanto and Yuwono, 2003).

2.8.3. Selektivitas/Spesifisitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuan yang hanya mampu mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada di dalam matriks sampel. Tujuan dilakukan pengujian ini adalah untuk menunjukkan bahwa suatu metode tidak memberikan respon positif terhadap senyawa atau analit lain (Harmita, 2004).

Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusi (R_s). Nilai R_s sebaiknya $> 1,5$ (Harmita, 2004). Parameter untuk mengetahui spesifisitas metode dapat ditentukan berdasarkan pengamatan identitas (*identity*) dan kemurnian (*purity*) analit dalam sampel. Uji kemurnian spektra diambil dari lereng puncak pertama berkorelasi dengan puncak maksimum spektra dan puncak maksimum dengan salah satu lereng bawah atau akhir puncak. Korelasi ini diidentifikasi sebagai $r(s,m)$ dan $r(m,e)$ pada winCATS, dengan s menunjukkan mulai puncak, m puncak maksimum, dan e merupakan akhir puncak (Indrayanto and Yuwono, 2003).

2.8.4. Presisi

Presisi atau keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran homogen (Harmita, 2004). Menurut International Conference on Harmonization (1994), penentuan presisi dapat dilakukan pada 3 kategori, yaitu:

a. Repeatabilitas

Repeatabilitas (*intra-assay precision*) menunjukkan presisi di bawah kondisi percobaan yang sama meliputi laboratorium, analisis, serta peralatan yang digunakan yang dilakukan pada waktu yang singkat. Repeatabilitas dapat dinilai dengan pengukuran minimal 9 kali (misalnya 3 konsentrasi dan masing-masing 3 replikasi) atau dapat dinilai dengan suatu pengukuran sebanyak minimal 6 kali pada 100% konsentrasi uji.

b. Presisi Antara

Presisi antara menunjukkan presisi yang dilakukan pada hari yang berbeda atau oleh analis yang berbeda atau dapat juga dilakukan dengan peralatan yang berbeda namun dalam laboratorium yang sama.

c. Reprodusibilitas

Reprodusibilitas menunjukkan presisi yang dilakukan pada laboratorium yang berbeda, biasanya dilakukan untuk proses standarisasi metode.

Dari ketiga kategori presisi yang telah disebutkan, yang wajib dilakukan adalah repeatabilitas dan presisi antara (Indrayanto and Yuwono, 2003). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku atau koefisien variasi sebesar 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel bergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Menurut AOAC (1998), kriteria penerimaan uji presisi ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Konsentrasi analit berbanding %RSD

Analit (%)	Unit	RSD (%)
100	100%	1,3
10	10%	1,9
1	1%	2,7
0,01	0,1%	3,7
0,001	100 ppm	5,3
0,0001	10 ppm	7,3
0,00001	1 ppm	11,0
0,000001	100 ppb	15,0
0,0000001	10 ppb	21,0
0,00000001	1 ppb	30,0

Sumber: AOAC (1998)

2.8.5. Akurasi

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*% recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita,

2004). Menurut Indrayanto and Yuwono (2003), akurasi dapat ditentukan dengan dua metode, yaitu metode simulasi dan metode penambahan standar. Rentang nilai *mean recovery* yang diijinkan oleh AOAC (1998) pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Persen perolehan kembali analit pada konsentrasi yang berbeda

Analit (%)	Unit	<i>Mean recovery</i> (%)
100	100%	98-102
10	10%	98-102
1	1%	97-103
0,01	0,1%	95-105
0,001	100 ppm	90-107
0,0001	10 ppm	80-110
0,00001	1 ppm	80-110
0,000001	100 ppb	80-110
0,0000001	10 ppb	65-115
0,00000001	1 ppb	40-120

Sumber: AOAC (1998)

a. Metode simulasi

Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*), yaitu pengukuran sejumlah analit bahan murni yang ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang sebenarnya. Penentuan persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 80 - 120% dari kadar analit yang diperkirakan.

b. Metode penambahan standar

Metode penambahan standar atau pembanding (*standar addition method*), yaitu menambahkan sejumlah tertentu analit dalam sampel yang telah dianalisis untuk selanjutnya dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya. Penambahan analit ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 30-60% dari kadar analit yang diperkirakan.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi: (1) Formulasi sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*); (2) Evaluasi karakteristik fisika kimia sediaan *vanishing cream* yang meliputi pengamatan organoleptis, penentuan tipe emulsi, pengujian viskositas, pengujian daya sebar, dan pengukuran pH; (3) Optimasi kondisi analisis; (4) Validasi metode analisis penetapan kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream*; (5) Penetapan kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream*. Skema langkah kerja penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.

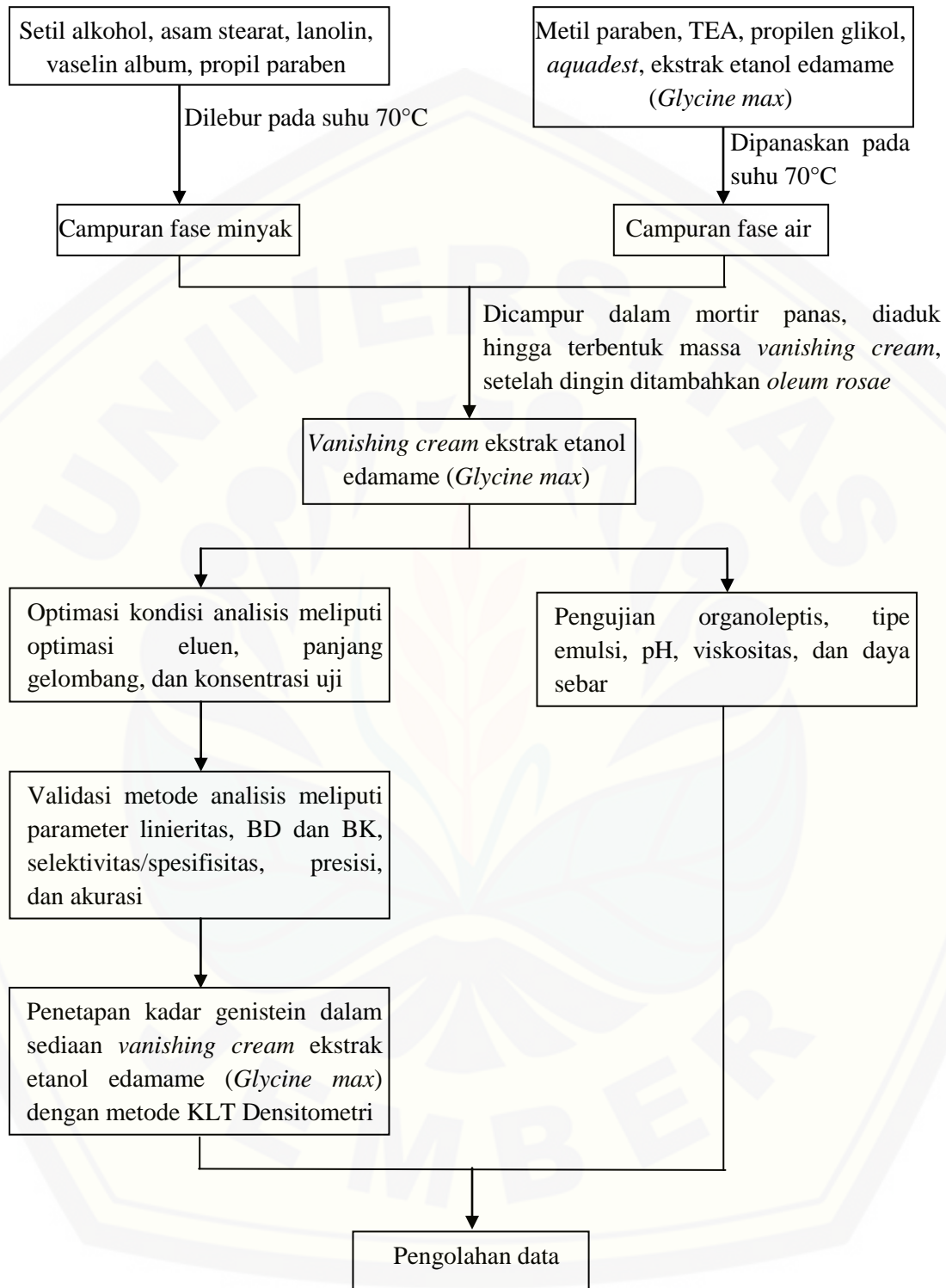
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Bagian Farmasetika dan Laboratorium Biologi Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember pada bulan Desember 2014 - Mei 2015.

3.3 Alat dan Bahan yang Digunakan

3.3.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam adalah densitometer (CAMAG TLC 3), timbangan analitik (Adventure Ohaus), *waterbath* (Mettler), pH meter (Denver), mikroskop (Olympus BX53), alat pengujian viskositas (Viskotester Rion VT 04), mortir dan stamper, alat pengujian daya sebar, pipa kapiler, chamber (CAMAG), botol vial, kertas saring, sendok ekstrak, aluminium foil, dan alat-alat gelas (Pyrex).



Gambar 3.1 Skema langkah kerja penelitian

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) hasil penelitian Dewi (2015) dengan kadar genistein sebesar 0,0252 %b/b dan nilai IC₅₀ enzim tirosinase sebesar 93,6 ppm, etanol p.a (Smart Lab Indonesia), standar genistein (Tocris), *aquadest* (Makmur Sejati), metanol p.a (Smart Lab Indonesia), lempeng KLT Silika Gel 60 F₂₅₄ (Merck), toluen p.a (Smart Lab Indonesia), etil asetat p.a (Smart Lab Indonesia), aseton p.a (Smart Lab Indonesia), asam format p.a (Smart Lab Indonesia), asam stearat (Brataco Chemika), TEA (Brataco Chemika), setil alkohol (Brataco Chemika), propilen glikol (Brataco Chemika), metil paraben (Brataco Chemika), propil paraben (Brataco Chemika), lanolin (Mulya Jaya), vaselin album (Brataco Chemika), *oleum rosae*, dan metilen biru.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Formula *Vanishing Cream* Ekstrak Etanol Edamame (*Glycine max*)

Pada penelitian ini dibuat satu konsentrasi ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dalam formula *vanishing cream*, yakni 5 %b/b. Formula sediaan *vanishing cream* dapat dilihat pada Tabel 3.1

Table 3.1 Formula *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*)

Nama Bahan	Fungsi	Komposisi (% b/b)
Ekstrak	Bahan aktif	5,0
Setil alkohol	<i>Stiffening agent</i>	2,0
Lanolin	Pembawa	2,50
Vaselin album	Pelembab	3,00
Asam stearat	<i>Emulsifying agent</i>	4,00
TEA	<i>Emulsifying agent</i>	1,00
Propilen glikol	Pelarut	5,00
Nipagin	Pengawet	0,10
Nipasol	Pengawet	0,05
<i>Oleum rosae</i>	<i>Corigen odoris</i>	0,05
<i>Aquadest</i>	Pelarut	77,30

Pembuatan sediaan *vanishing cream* dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut: bahan-bahan fase minyak yaitu setil alkohol, lanolin, vaselin putih, asam stearat, dan propil paraben dilebur di atas *waterbath* pada suhu 70°C. Bahan-bahan fase air yaitu TEA, propilen glikol, metil paraben, *aquadest*, dan ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dicampur dan dipanaskan pada suhu 70°C. Fase minyak dan fase air dicampur dalam mortir panas dan diaduk sampai terbentuk massa *vanishing cream*. Setelah dingin, kemudian ditambahkan *oleum rosae* dan diaduk sampai homogen.

3.4.2 Evaluasi Sediaan *Vanishing Cream*

Evaluasi sediaan *vanishing cream* yang dilakukan yang meliputi pengamatan organoleptis, penentuan tipe emulsi, pengujian viskositas, pengujian daya sebar, pengukuran pH, dan penetapan kadar genistein dalam sediaan. Penetapan kadar genistein dalam sediaan dilakukan setelah validasi metode analisis

a. Pengamatan organoleptis

Pengamatan organoleptis dilakukan secara visual tanpa bantuan alat khusus, meliputi warna, tekstur, bau sediaan, dan ada tidaknya pemisahan antara fase air dan fase minyak. Bentuk sediaan yang diharapkan berwarna putih-kekuningan, bertekstur lembut, dan berbau mawar.

b. Penentuan tipe emulsi

Penentuan tipe emulsi *vanishing cream* ditentukan dengan ditambahkan reagen metilen biru. Kelarutan metilen biru diamati secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik dilakukan secara visual dengan cara melarutkan metilen biru ke dalam sediaan. Jika sediaan berubah menjadi warna biru merata, tipe emulsi adalah *oil in water (O/W)* karena metilen biru dapat larut dalam fase air. Pengamatan mikroskopik dilakukan menggunakan bantuan mikroskop untuk memastikan kelarutan metilen biru dalam fase eksternal *vanishing cream*. Tipe emulsi yang diharapkan adalah *O/W* (Lachman *et al.*, 1994).

c. Pengujian viskositas

Pengujian viskositas dilakukan menggunakan alat *Viscotester* VT-04. Spindel dipilih dan dicelupkan ke dalam *vanishing cream* yang telah dibuat. Nilai viskositas yang diharapkan sebesar 50-100 dPas (Agnessya, 2008).

d. Pengujian daya sebar

Pengujian daya sebar sediaan *vanishing cream* dilakukan menggunakan alat ekstensiometer yang terdiri dari dua lempeng kaca bulat. Pada lempeng bawah terdapat skala pengukur diameter. Sebanyak 1 gram sediaan diletakkan di pusat antara dua lempeng kaca bulat, diberi beban seberat 5 gram, dan didiamkan selama 1 menit. Selanjutnya beban ditambah dengan interval 5 gram hingga diameter sediaan menunjukkan nilai yang konstan. Diameter sediaan *vanishing cream* diinginkan sebesar 13-16 cm (Agnessya, 2008).

e. Pengukuran pH

Pengukuran pH sediaan *vanishing cream* dilakukan dengan menggunakan pH meter digital. Elektroda dicuci terlebih dahulu dengan *aquadest*, dikeringkan, dan distandardisasi dengan larutan standard pH 7, pH 4, dan pH 10. Sebanyak 1 gram sediaan dilarutkan dalam *aquadest* sampai volume 10 mL. Elektroda dimasukkan ke dalam larutan sampel dan dicatat pH yang terukur. pH sediaan *vanishing cream* yang diharapkan sebesar 6-7 (Purwaningsih *et al.*, 2014; Caesar *et al.*, 2014).

3.4.3 Optimasi Kondisi Analisis

Optimasi kondisi analisis diawali dengan preparasi larutan standar dan sediaan *vanishing cream*. Preparasi larutan standar dilakukan dengan membuat larutan induk dengan menimbang genistein sebanyak 5 mg. Standar genistein dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a hingga didapat konsentrasi larutan induk 500 ng/ μ L. Preparasi sediaan *vanishing cream* dilakukan dengan menimbang sebanyak 6 g sediaan *vanishing cream* dan dilarutkan dalam metanol p.a ad 10 mL, kemudian dipisahkan menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.

Supernatan yang mengandung genistein dipisahkan dari endapan dan dianalisis dengan eluen terpilih (Yuan *et al.*, 2006).

Kondisi analisis yang dioptimasi pada metode ini meliputi optimasi fase gerak atau eluen, panjang gelombang, dan konsentrasi uji dari analit.

a. Optimasi Eluen

Eluen yang digunakan untuk optimasi eluen didasarkan pada penelitian Yuan *et al.* (2006) dengan komposisi sebagai berikut:

Toluen : etil asetat : aseton : asam format (v/v/v/v) = 20:4:2:1

Toluen : etil asetat : asam format (v/v/v) = 10:4:1

Toluen : etil asetat : asam format (v/v/v) = 5:4:1

Eluen yang digunakan dalam penelitian Yuan *et al.* (2006) toluen : etil asetat : aseton : asam format (20:4:2:1), kemudian dilakukan modifikasi dengan menghilangkan aseton dan mengubah komposisi eluen. Aseton memiliki kepolaran yang mirip dengan asam format, sehingga dipilih salah satu saja, yakni asam format.

Sebanyak 2 standar genistein dengan konsentrasi berbeda ditotolkan sebanyak 2 μL dan sampel ditotolkan sebanyak 6 μL pada lempeng KLT, kemudian dieluasi dengan masing-masing eluen dan *discanning* pada panjang gelombang 266 nm. Pemilihan eluen optimum didasarkan pada parameter efisiensi kromatogram yang meliputi nilai N (*Theoretical Plate Number*) yang paling besar, nilai H (*Height Equivalent a Theoretical Plate*) yang terkecil, nilai Rf (*Retardation factor*) antara 0,2-0,8, dan menghasilkan kromatogram dengan puncak genistein yang simetris dengan nilai $R_s > 1,5$ (Wulandari, 2011).

b. Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan *scanning* noda analit pada CAMAG TLC Scanner 3 (Densitometer) dan *software* program winCATS. Penilaian panjang gelombang dilakukan pada area panjang gelombang 200-400 nm. Penilaian panjang gelombang optimum dipilih berdasarkan pada panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum paling tinggi.

c. Optimasi Konsentrasi Uji

Optimasi konsentrasi uji menggunakan tiga konsentrasi uji. Penentuan konsentrasi uji didasarkan pada hasil optimasi eluen terpilih yang menunjukkan perkiraan kandungan genistein dalam sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*). Pembuatan sampel uji dilakukan dengan cara menimbang sejumlah tertentu sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dan dipreparasi seperti yang telah dijelaskan sebelumnya sehingga didapatkan larutan sampel yang mengandung genistein dengan konsentrasi sesuai dengan yang akan dioptimasi. Larutan sampel kemudian ditotolkan pada Lempeng KLT sebanyak 6 μL dan larutan standar sebanyak 2 μL . Lempeng kemudian dieluasi menggunakan eluen terpilih dan *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Pemilihan konsentrasi uji optimum berdasarkan parameter efisiensi kromatogram yaitu nilai N yang paling besar, nilai H yang paling kecil, dan kemudahan preparasi sampel.

3.4.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis penentuan genistein dalam sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan metode KLT Densitometri meliputi parameter linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.

a. Linieritas

Larutan induk genistein diencerkan menggunakan metanol p.a dan dibuat seri konsentrasi standar dengan 5 tingkat konsentrasi dalam rentang 80-200% dari konsentrasi uji hasil optimasi. Larutan standar kemudian ditotolkan pada lempeng KLT silika Gel 60 F₂₅₄ masing-masing 2 μL . Lempeng KLT kemudian dieluasi dengan eluen terpilih dan *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai parameter linieritas menggunakan program *Validation Method of Analysis*. Kriteria penerimaan untuk linieritas adalah nilai $r \geq 0,99$, $V_x0 < 5\%$, dan X_p lebih kecil dari konsentrasi terkecil yang digunakan (Indrayanto and Yuwono, 2003).

b. Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Penentuan BD dan BK dilakukan dengan mengeluasi 5 tingkat konsentrasi larutan standar di bawah konsentrasi linieritas dengan eluen terpilih dan *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Selanjutnya dilakukan perhitungan BD dan BK menggunakan program *Validation Method of Analysis* (Indrayanto and Yuwono, 2003).

c. Selektivitas/spesifisitas

Sebanyak 2 konsentrasi standar genistein dengan konsentrasi berbeda ditotolkan sebanyak 2 μL pada lempeng KLT dan sampel dengan konsentrasi terpilih ditotolkan sebanyak 6 μL pada lempeng KLT, kemudian dieluasi dengan eluen terpilih dan *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Pengujian selektivitas ditentukan melalui perhitungan nilai R_s dan nilai R_s yang diharapkan $> 1,5$. Parameter spesifisitas ditentukan berdasarkan nilai $r(s,m)$ dan $r(m,e)$ pengujian *purity* dan nilai $r(s,s)$ dan $r(s,a)$ pengujian *identity* spektra genistein sampel dan standar. Nilai korelasi yang diharapkan $> 0,99$ (Harmita, 2004).

d. Presisi

Pengujian presisi yang dilakukan meliputi kategori repeatabilitas dan presisi antara. Seri konsentrasi standar dengan 5 tingkat konsentrasi ditotolkan sebanyak 2 μL dan larutan sampel dengan konsentrasi terpilih (6x replikasi) ditotolkan sebanyak 6 μL . Lempeng KLT kemudian dieluasi dengan eluen terpilih dan *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Data RSD % *recovery* genistein dalam sampel digunakan sebagai data repeatabilitas. Prosedur pengujian repeatabilitas dilakukan sebanyak tiga kali pada tiga hari yang berbeda untuk pengujian presisi antara. Kriteria penerimaan nilai RSD berdasarkan tabel penerimaan yang ditetapkan oleh AOAC (1998) pada Tabel 2.1.

e. Akurasi

Pengujian parameter akurasi menggunakan metode penambahan standar (*standard addition method*). Pengujian akurasi dilakukan dengan dua tahap, yaitu pembuatan sampel akurasi dengan penambahan standar sebanyak 30%, 45%, dan

60% dari konsentrasi analit dalam sampel sesuai dengan hasil uji presisi (repeatabilitas) dan pembuatan kurva baku (Harmita, 2004).

Pembuatan sampel akurasi dilakukan dengan menimbang sejumlah tertentu sampel, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, dan dilarutkan dengan metanol p.a (tidak sampai batas tanda). Selanjutnya ditambahkan sejumlah tertentu larutan standar yang mengandung genistein sebanyak 30%, 45%, dan 60% dari jumlah analit yang diperkirakan dalam sampel. Penotolan standar, penotolan sampel, eluasi, dan *scanning* dilakukan seperti pada pengujian presisi (Point d). Nilai % *recovery* dan RSD yang dipersyaratkan sesuai dengan tabel penerimaan yang ditetapkan oleh AOAC (1998) pada Tabel 2.2.

3.4.5 Penetapan Kadar Genistein dalam Sediaan *Vanishing Cream*

Seri konsentrasi standar dengan 5 tingkat konsentrasi ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 2 μL dan sampel (3x replikasi) ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 6 μL untuk setiap totolan. Lempeng KLT kemudian dieluasi menggunakan eluen terpilih dan *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Selanjutnya dihitung perolehan kembali kadar genistein dalam sampel (% *recovery*). Kriteria penerimaan *mean recovery* sesuai dengan tabel penerimaan yang ditetapkan oleh AOAC (1998) pada Tabel 2.2.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Pembuatan *Vanishing Cream*

Sediaan *vanishing cream* dibuat dengan bahan aktif ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan konsentrasi sebesar 5%. Dipilih sediaan *vanishing cream* karena memberikan efek dingin pada kulit, tidak menimbulkan bekas setelah pemakaian, tidak berminyak, dan memiliki kemampuan menyebar yang baik (Ansel *et al.*, 2011). Kombinasi lanolin dan vaselin album akan menghasilkan sediaan semisolida yang lembut dan membantu penembusan senyawa aktif menuju sel target (Rowe *et al.*, 2009). Pemilihan pengawet metil paraben dan propil paraben didasarkan bahwa mikroorganisme dapat tinggal dalam fase air atau fase minyak sehingga pengawet yang dipilih harus mampu berada pada level yang efektif dalam kedua fase. Umumnya digunakan pengawet yang larut dalam fase minyak dan pengawet yang larut fase air. Kombinasi pengawet metil paraben dan propil paraben merupakan kombinasi pengawet yang sesuai karena metil paraben larut dalam fase air, sedangkan propil paraben larut dalam fase minyak (Lachman *et al.*, 1994). *Oleum rosae* digunakan sebagai *corigen odoris* untuk menutupi aroma lanolin yang kurang akseptabel, yakni berbau domba. Pelarut yang digunakan adalah propilen glikol dan *aquadest*. *Aquadest* adalah pelarut yang umum digunakan dalam sediaan semisolida karena bersifat netral, tidak berwarna, tidak berbau, kompatibel dengan hampir semua bahan tambahan, dan dapat membantu masuknya bahan aktif dengan cara menghidrasi stratum korneum. Metil paraben sukar larut dalam *aquadest*, namun mudah larut dalam propilen glikol, sehingga digunakan propilen glikol untuk membantu pelarutan metil paraben dalam fase air (Rowe *et al.*, 2011).

Sediaan dibuat dengan teknik pencampuran. Bahan-bahan fase minyak yaitu setil alkohol, lanolin, vaselin putih, asam stearat, dan propil paraben dilebur suhu 70 °C. Bahan-bahan fase air yaitu TEA, propilen glikol, metil paraben, *aquadest*, dan

ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dicampur dan dipanaskan pada suhu 70 °C. Fase minyak dan fase air dicampur dalam mortir panas dan diaduk sampai terbentuk massa *vanishing cream*. Setelah dingin, kemudian ditambahkan *oleum rosae* dan diaduk sampai homogen. Sediaan *vanishing cream* yang dibuat memiliki warna putih-kekuningan. Hasil sediaan *vanishing cream* dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*)

4.2 Evaluasi Karakteristik Fisika Kimia *Vanishing Cream*

Sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) yang telah dihasilkan selanjutnya dievaluasi karakteristik fisika kimia sediaan. Evaluasi sediaan yang dilakukan meliputi pengamatan organoleptis, penentuan tipe emulsi, pengujian viskositas, pengujian daya sebar, dan pengukuran pH.

4.2.1. Hasil Pengamatan Organoleptis

Pengamatan organoleptis bertujuan untuk mengetahui karakteristik fisika untuk dibandingkan dengan kriteria yang diinginkan. Pengujian dilakukan secara visual meliputi warna, tekstur, bau sediaan, dan ada tidaknya pemisahan antara fase air dan fase minyak. Sediaan yang diharapkan berwarna putih-kekuningan, bertekstur lembut, dan berbau mawar. Hasil pengamatan organoleptis dapat dilihat pada Tabel 4.1.

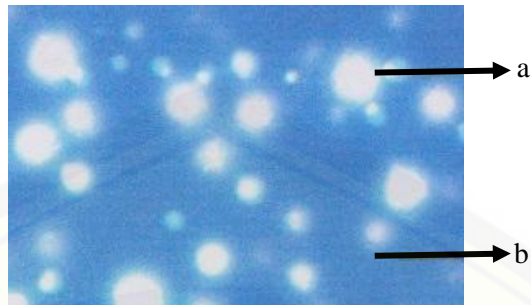
Tabel 4.1 Perbandingan organoleptis yang diharapkan dan hasil pengujian

Parameter	Spesifikasi yang Diharapkan	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
Warna	Putih-kekuningan	Putih-kekuningan	Putih-kekuningan	Putih-kekuningan
Tekstur	Lembut	Lembut	Lembut	Lembut
Bau	Mawar	Mawar	Mawar	Mawar

Berdasarkan Tabel 4.1, sediaan *vanishing cream* yang dihasilkan memiliki karakteristik organoleptis seperti yang diharapkan, yakni berwarna putih-kekuningan, bertekstur lembut, dan berbau mawar. Warna putih-kekuningan sediaan *vanishing cream* disebabkan oleh adanya lanolin yang berwarna kuning. Tekstur lembut sediaan *vanishing cream* didapatkan karena adanya kombinasi lanolin dan vaselin album. Bau mawar pada sediaan *vanishing cream* diakibatkan karena adanya penambahan *oleum rosae*.

4.2.2. Hasil Penentuan Tipe Emulsi

Penentuan tipe emulsi *vanishing cream* bertujuan untuk mengetahui tipe emulsi yang dihasilkan. Pengujian dilakukan dengan metode pewarnaan menggunakan reagen metilen biru. Kelarutan metilen biru diamati secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik dilakukan secara visual dengan cara melarutkan metilen biru ke dalam sediaan. Jika sediaan berubah menjadi warna biru merata, tipe emulsi adalah *oil in water (O/W)* karena metilen biru dapat larut dalam fase air. Pengamatan mikroskopik dilakukan menggunakan bantuan mikroskop untuk memastikan kelarutan metilen biru dalam fase eksternal *vanishing cream*. Tipe emulsi yang diharapkan adalah *O/W* (Lachman *et al.*, 1994). Hasil pengamatan tipe emulsi secara mikroskopik dapat dilihat pada Gambar 4.2.



a : fase minyak; b : fase air

Gambar 4.2 Hasil pengujian mikroskopik tipe emulsi

Berdasarkan Gambar 4.2, dapat diketahui bahwa sediaan *vanishing cream* yang dihasilkan memiliki tipe emulsi *O/W* karena distribusi merata warna biru pada fase luar. Metilen biru bersifat larut air sehingga hanya akan mewarnai fase air. Tipe emulsi *O/W* memiliki fase luar berupa air sehingga pada pengujian tipe emulsi dengan penambahan metilen biru akan menghasilkan fase luar berwarna biru yang terdistribusi merata seperti pada Gambar 4.2. Pengamatan tipe emulsi yang dilakukan menggunakan mikroskop Olympus BX53 perbesaran 40X menunjukkan adanya droplet-droplet yang merupakan fase minyak. Droplet tersebut berwarna bening karena metilen biru tidak dapat larut dalam fase minyak.

4.2.3. Hasil Pengujian Viskositas

Pengujian viskositas bertujuan untuk mengetahui tingkat kekentalan sediaan *vanishing cream* yang telah dibuat. Pengujian viskositas dilakukan menggunakan alat *Viscotester* VT-04 dengan spindel nomor 2. Nilai viskositas yang diharapkan berada pada rentang 50-100 dPas (Agnessya, 2008). Hasil pengujian viskositas dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan perhitungan dapat dilihat pada Lampiran A.

Tabel 4.2 Hasil pengujian viskositas

Replikasi	Viskositas (dPa.s)	Rata-rata (dPa.s)	SD (dPa.s)
1	65	63,33	4,56
2	60		
3	65		

Berdasarkan Tabel 4.2, nilai viskositas rata-rata sediaan *vanishing cream* yang dibuat sebesar $63,33 \pm 4,56$ dPa.s. Nilai viskositas ini memenuhi nilai viskositas yang dipersyaratkan.

4.2.4. Hasil Pengujian Daya Sebar

Pengujian daya sebar sediaan *vanishing cream* bertujuan untuk mengetahui kemampuan penyebaran sediaan. Pengujian daya sebar dilakukan menggunakan ekstensiometer dengan penambahan beban sebesar 5 gram setiap menit. Diameter sediaan *vanishing cream* diinginkan sebesar 13-16 cm (Agnessya, 2008). Hasil pengujian daya sebar dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan data selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran B.

Tabel 4.3 Hasil pengujian daya sebar

Replikasi	Daya sebar (cm)	Rata-rata (cm)	SD (cm)
1	14,68	14,67	0,012
2	14,66		
3	14,66		

Berdasarkan Tabel 4.3, nilai daya sebar rata-rata sediaan *vanishing cream* yang dibuat sebesar $14,67 \pm 0,012$ cm dengan beban sebesar 50 g. Sediaan *vanishing cream* yang dihasilkan memiliki memiliki daya sebar sesuai spesifikasi daya sebar yang diharapkan.

4.2.5. Hasil Pengukuran pH

Pengukuran pH sediaan *vanishing cream* bertujuan untuk mengetahui nilai pH sediaan yang dihasilkan. Nilai pH sediaan *vanishing cream* yang diharapkan

sebesar 6-7 (Purwaningsih *et al.*, 2014; Caesar *et al.*, 2014). Hasil pengukuran pH dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan perhitungan dapat dilihat pada Lampiran C. Berdasarkan tabel 4.4, nilai pH rata-rata sediaan *vanishing cream* yang dibuat sebesar $6,63 \pm 0,025$. Nilai pH ini berapa pada rentang pH sediaan yang diharapkan.

Tabel 4.4 Hasil pengukuran pH

Replikasi	pH	Rata-rata	SD
1	6,65		
2	6,60	6,63	0,025
3	6,63		

Berdasarkan hasil evaluasi karakteristik fisika kimia sediaan yang dilakukan, yakni pengamatan organoleptis, pengujian tipe emulsi, pengukuran viskositas, daya sebar, dan pH, dapat disimpulkan bahwa sediaan *vanishing cream* yang dibuat memenuhi persyaratan spesifikasi sediaan topikal yang telah ditentukan. Perbandingan spesifikasi sediaan dengan hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Perbandingan karakteristik fisika kimia sediaan yang diharapkan dan hasil pengujian

Karakteristik	Spesifikasi yang Diharapkan	Hasil Pengujian
Organoleptis	Warna putih-kekuningan, tekstur lembut, berbau mawar	Warna putih-kekuningan, tekstur lembut, berbau mawar
Tipe emulsi	O/W	O/W
Viskositas	50-100 dPa.s	$63,33 \pm 4,56$ dPa.s*
Daya sebar	13-16 cm	$14,67 \pm 0,012$ cm*
pH	6-7	$6,63 \pm 0,025$ *

* Data disajikan sebagai rata-rata \pm SD (n=3)

4.3 Optimasi Kondisi Analisis

Optimasi kondisi analisis dilakukan untuk mendapatkan pemisahan yang baik pada kromatografi. Pemilihan kondisi analisis didasarkan pada penilaian parameter efisiensi kromatogram yang meliputi nilai Rf, nilai N, dan nilai H. Kromatogram yang efisien memiliki nilai N yang besar, nilai H yang kecil, Rf antara

0,2-0,8, dan menghasilkan kromatogram dengan satu puncak yang simetris (Wulandari, 2011). Optimasi kondisi analisis yang dilakukan adalah optimasi eluen, panjang gelombang, dan konsentrasi uji.

4.3.1. Optimasi Eluen

Eluen yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada hasil penelitian Yuan *et al.* (2006) dan kemudian dilakukan modifikasi untuk mendapatkan eluen yang optimum. Hasil optimasi eluen ditunjukkan pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Perbandingan parameter efisiensi kromatogram pada komposisi yang berbeda

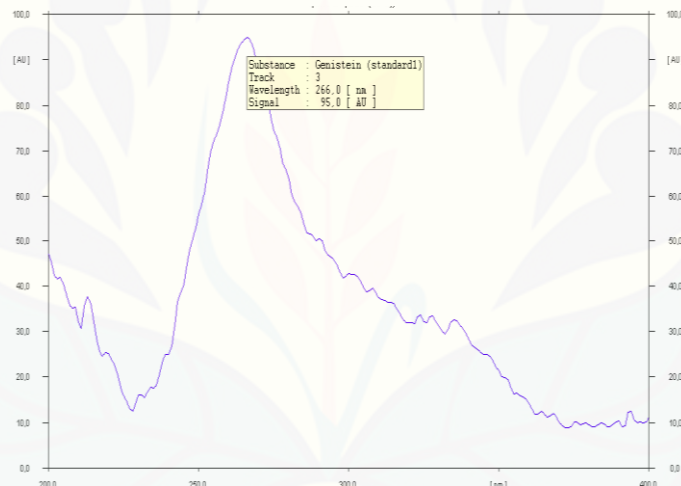
No	Komposisi Eluen	Parameter Penilaian		
		Rf	N	H
1	T:EA:AS:AF (v/v/v/v) = 20:4:2:1	0,35	544,44	0,174
2	T:EA:AF (v/v/v) = 10:4:1	0,47	2209,00	0,043
3	T:EA:AF (v/v/v) = 5:4:1	0,71	5041,00	0,018

Ket. T=toluen; EA=etil asetat; AS=aseton; AS=asam format

Berdasarkan hasil optimasi eluen, komposisi eluen terpilih adalah eluen dengan komposisi tolue : etil asetat : asam format (10:4:1) yang menghasilkan nilai N sebesar 2209,00; nilai H sebesar 0,043; Rf sebesar 0,47; dan menghasilkan puncak yang simetris dengan nilai $R_s > 1,5$. Berdasarkan Tabel 4.6, eluen dengan komposisi tolue : etil asetat : asam format (5:4:1) menghasilkan nilai N paling besar yaitu 5041,00; nilai H paling kecil yaitu 0,018; dan nilai Rf sebesar 0,71. Namun eluen dengan komposisi ini tidak dipilih karena menghasilkan puncak genistein dengan nilai $R_s < 1,5$ seperti yang ditunjukkan pada Lampiran D.3 dan mempunyai Rf yang paling tinggi. Perhitungan efisiensi kromatogram dan gambar kromatogram masing-masing eluen dapat dilihat pada Lampiran D.

4.3.2. Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan menotolkan larutan standar genistein pada lempeng KLT, kemudian diekspansi menggunakan eluen terpilih, yakni toluen : etil asetat : asam format (10:4:1). Noda yang dihasilkan di-scanning pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang terpilih adalah panjang gelombang yang memberikan intensitas spektrum paling tinggi. Hasil scanning spektra genistein dapat dilihat pada Gambar 4.3. Berdasarkan Gambar 4.3, dapat diketahui bahwa intensitas spektrum paling tinggi terjadi pada panjang gelombang 266 nm, sehingga panjang gelombang terpilih dan digunakan dalam pengukuran selanjutnya adalah 266 nm.



Gambar 4.3 Spektra genistein pada panjang gelombang 200-400 nm

4.3.3. Optimasi Konsentrasi Uji

Konsentrasi uji yang digunakan dalam pengujian ini adalah 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm. Perhitungan jumlah sampel yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran E. Optimasi konsentrasi uji dilakukan dengan memilih konsentrasi yang memberikan nilai N paling besar, nilai H paling kecil, dan kemudahan dalam preparasi sampel. Kemudahan preparasi sampel dilihat dari jumlah sampel dan pelarut yang digunakan. Data hasil optimasi konsentrasi uji dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Perbandingan nilai parameter efisiensi kromatogram pada konsentrasi yang berbeda

Konsentrasi (ppm)	N	H
20	1413,76	0,067
25	1474,56	0,064
30	1024,00	0,092

Berdasarkan data efisiensi kromatogram yang ditampilkan dalam Tabel 4.7, konsentrasi uji yang memenuhi parameter efisiensi kromatogram adalah konsentrasi uji 25 ppm, serta pada konsentrasi ini, preparasi sampel lebih mudah dilakukan. Perhitungan parameter efisiensi kromatogram dapat dilihat pada Lampiran E. Dari keseluruhan optimasi kondisi analisis yang dilakukan, didapatkan kondisi optimum untuk analisis genistein dalam sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) yang dapat dilihat pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Kondisi optimum analisis genistein dalam sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan metode KLT Densitometri

No	Kondisi Analisis	Kondisi Optimum
1	Pelarut	Metanol p.a
2	Fase diam	Silika Gel 60 F ₂₅₄
3	Eluen	toluen:etil asetat:asam format (v/v/v) = 10:4:1
4	Panjang gelombang	266 nm
5	Konsentrasi uji	25 ppm
6	Metode pengembangan	Menaik

4.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi parameter linieritas, BD dan BK, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.

4.4.1. Linieritas

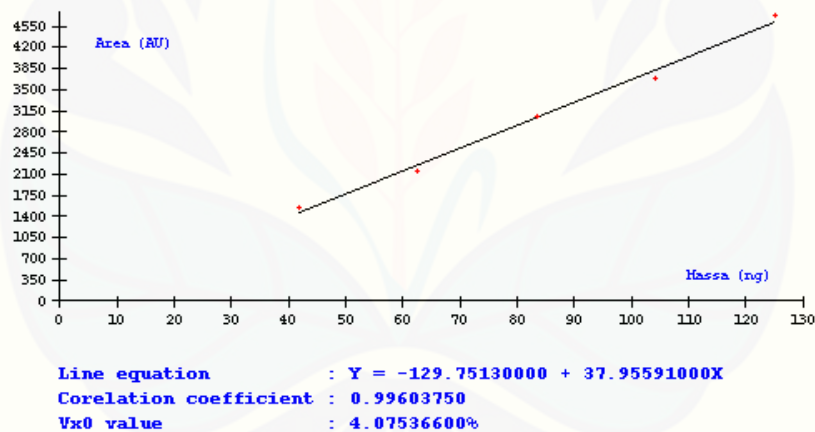
Pengujian linieritas pada penelitian ini menggunakan 5 titik konsentrasi standar dengan rentang 80 - 200%. Perhitungan preparasi standar genistein dapat dilihat pada Lampiran F.1. Data yang diperoleh dari hasil *scanning* densitometer dihitung menggunakan program *Validation Method of Analysis*. Kriteria penerimaan

linieritas adalah nilai koefisien korelasi ($r \geq 0,99$), koefisien variasi fungsi ($V_{x0} < 5\%$), dan X_p lebih kecil dari konsentrasi terkecil analit yang digunakan. Hasil uji linieritas dapat dilihat pada Tabel 4.9.

Tabel 4.9 Hasil uji linieritas genistein

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
20,852	41,70	1540,48
31,278	62,56	2163,44
41,704	83,41	3055,72
52,130	104,26	3682,47
62,556	125,11	4738,27
Persamaan regresi linier		$Y = -129,7513 + 37,95591X ; r = 0,996$ $V_{x0} = 4,075 \%$ $X_p = 24,406 \text{ ng}$

Linieritas



Gambar 4.4 Kurva linieritas massa vs area genistein

Berdasarkan Tabel 4.9 dan Gambar 4.4 dapat diketahui bahwa hasil uji linieritas menunjukkan hubungan yang proporsional antara massa analit dan area yang ditunjukkan dengan nilai $r = 0,996$, $V_{x0} = 4,075 \%$, dan $X_p = 24,406 \text{ ng}$. Nilai r , V_{x0} , dan X_p yang diperoleh memenuhi persyaratan linieritas, yaitu nilai $r \geq 0,99$, $V_{x0} < 5\%$, dan $X_p < 41,70$.

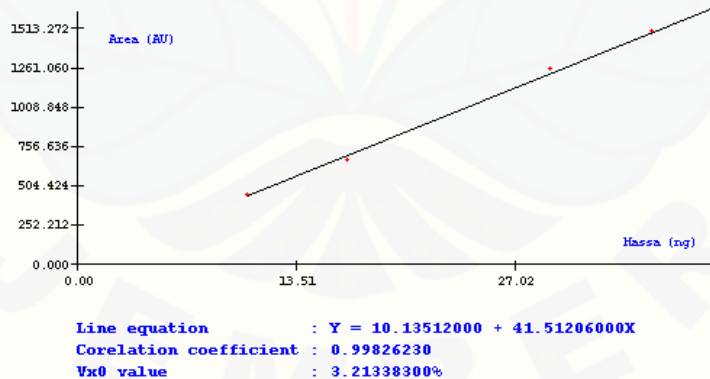
4.4.2. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Pengujian Batas deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK) pada penelitian ini menggunakan 5 titik konsentrasi standar di bawah konsentrasi linieritas. Nilai parameter linieritas, yakni r , V_{x0} , dan X_p harus terpenuhi terlebih dahulu melalui program *Validation Method of Analysis*, kemudian nilai BD dan BK ditentukan menggunakan program yang sama, yakni *Validation Method of Analysis*. Hasil pengujian linieritas pada uji BD dan BK dapat dilihat pada Tabel 4.10 dan Gambar 4.5.

Tabel 4.10 Hasil pengujian linieritas pada uji BD dan BK genistein

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
5,213	10,43	451,32
8,341	16,68	671,61
14,596	29,19	1261,95
17,742	35,45	1494,31
19,809	39,61	1624,51
Persamaan regresi linier	$Y = 10,13512 + 41,51206X$; $r = 0,998$ $V_{x0} = 3,213\%$; $X_p = 5,730\text{ ng}$	

BD dan BK



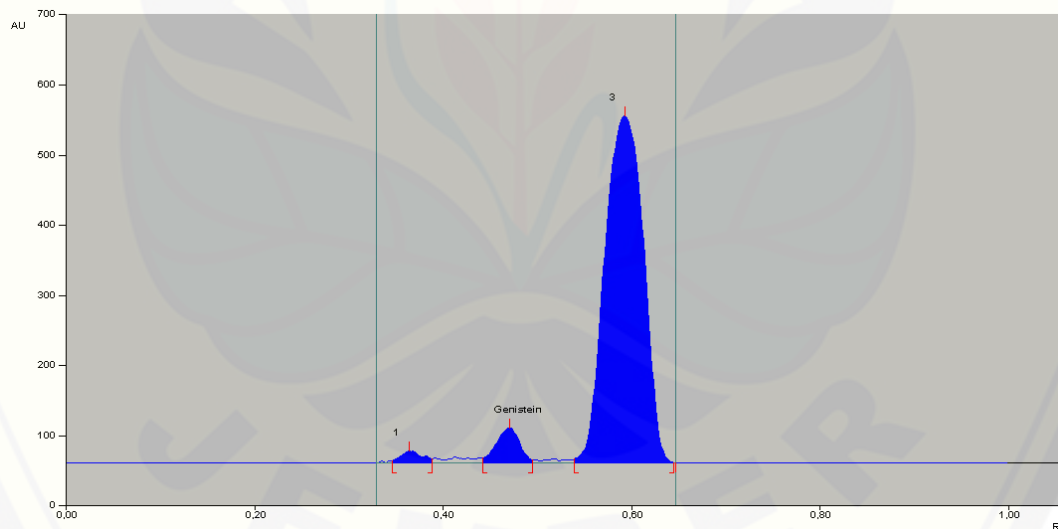
Gambar 4.5 Kurva linieritas massa vs area genistein pada uji BD dan BK

Berdasarkan Tabel 4.10 dan Gambar 4.5 diketahui bahwa parameter linieritas terpenuhi pada rentang konsentrasi 5,213–19,809 ppm. Perhitungan preparasi standar genistein dapat dilihat pada Lampiran F.2. Nilai BD sama dengan

nilai X_p , yaitu 5,73 ng dan nilai BK sebesar 17,19 ng. Data perhitungan BD dan BK dapat dilihat pada Lampiran G.

4.4.3. Selektivitas/spesifisitas

Parameter selektivitas pada metode analisis kromatografi ditentukan melalui pemisahan puncak analit dengan puncak matriks (R_s). Nilai R_s yang baik adalah $> 1,5$. Nilai R_s pada penelitian ini dihitung berdasarkan pemisahan antara puncak genistein dengan dua puncak lain (*unknown*) pada kromatogram sampel. Pemisahan puncak genistein terhadap puncak *unknown* dapat dilihat pada Gambar 4.6. Nilai R_s puncak genistein terhadap puncak *unknown* 1 sebesar 2,20 dan nilai R_s puncak genistein terhadap puncak *unknown* 3 sebesar 1,71. Perhitungan nilai R_s dapat dilihat pada Lampiran H. Hasil ini menunjukkan pemisahan yang baik antara puncak genistein terhadap puncak *unknown* sehingga dapat dikatakan bahwa metode analisis yang digunakan selektif.



Gambar 4.6 Kromatogram pemisahan genistein

Parameter spesifisitas pada metode analisis kromatografi ditentukan melalui uji *purity* dan *identity* spektra genistein. Spektra hasil uji *purity* dan *identity* pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 4.7 dan korelasi spektra dapat dilihat pada Tabel 4.11 dan Tabel 4.12.

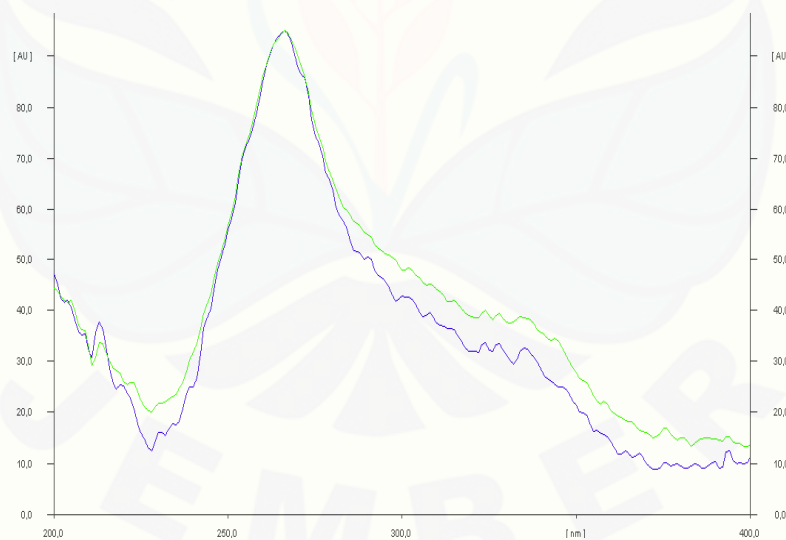
Tabel 4.11 Tabel korelasi uji *purity* genistein

Track	Rf	r(s,m)	r(m,e)	Purity
Standar	0,52	0,997824	0,996526	OK
Sampel	0,52	0,999292	0,998340	OK

Kemurnian spektra genistein dilihat berdasarkan korelasi posisi awal puncak dengan posisi puncak atau r(s,m) dan korelasi posisi puncak dengan posisi akhir puncak atau r(m,e). Suatu spektra dikatakan murni apabila nilai r(s,m) dan r(m,e) lebih dari 0,99. Berdasarkan Tabel 4.11, nilai r(s,m) dan r(m,e) sampel maupun standar lebih dari 0,99 sehingga dapat dikatakan bahwa spektra genistein pada kromatogram standar dan analit murni.

Tabel 4.12 Tabel korelasi uji *identity* genistein

Track	Rf	r(s,s)	r(s,a)	Identity
Standar	0,52	0,992043	0,997227	OK
Sampel	0,52	0,992043	0,997760	OK



= spektra standar genistein

= spektra genistein dalam sampel

Gambar 4.7 Spektra uji *purity* dan *identity* genistein

Identitas spektra genistein dilihat dengan cara membandingkan nilai $r(s,s)$ dan $r(s,a)$. Nilai $r(s,s)$ menunjukkan korelasi spektra antara dua *track* standar, sedangkan nilai $r(s,a)$ menunjukkan korelasi *track* standar dan *track* analit. Suatu spektra dikatakan identik apabila nilai korelasinya lebih dari 0,99. Berdasarkan Tabel 4.12, nilai korelasi spektra lebih dari 0,99 sehingga dapat dikatakan bahwa spektra genistein pada kromatogram standar dan analit identik. Berdasarkan penilaian parameter selektivitas dan spesifisitas, dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan bersifat selektif dan spesifik.

4.4.4. Presisi

Parameter presisi yang dilakukan pada penelitian ini adalah repeatabilitas dan presisi antara. Syarat penerimaan uji presisi nilai RSD tidak lebih dari kriteria penerimaan yang ditetapkan oleh AOAC (1998) pada Tabel 2.1, yakni 5,3%. Data hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.13 dan 4.14.

Tabel 4.13 Hasil uji presisi repeatabilitas genistein

Penimbangan (mg)	Massa Genistein Hasil Percobaan (mg)	Massa Genistein Teoritis (mg)	Recovery (%)	RSD (%)
6.125	0,0798	0,0774	103,1668	0,7817
6.125	0,0787	0,0774	101,7171	
6.020	0,0776	0,0761	102,0069	
6.000	0,0764	0,0758	100,7210	
6.050	0,0776	0,0764	101,5334	
6.100	0,0784	0,0771	101,6847	
Rata-rata			101,8050	

Tabel 4.14 Hasil uji presisi antara genistein

Hari ke-	Recovery (%)	RSD (n=6)
1	101,8050	0,7817
2	98,4484	1,3742
3	98,01537	1,6910
Rata-rata		1,2823

Berdasarkan data hasil uji presisi dalam Tabel 4.13 dan Tabel 4.14, nilai RSD uji presisi repeatabilitas sebesar 0,7817% dan nilai RSD uji presisi antara sebesar 1,2823%. Nilai ini memenuhi nilai RSD yang dipersyaratkan, yakni kurang dari 5,3% sehingga dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memberikan hasil yang presis. Data perhitungan hasil uji presisi dapat dilihat pada Lampiran I.

4.4.5. Akurasi

Metode penentuan akurasi dilakukan dengan metode penambahan standar (*standard addition method*). Konsentrasi standar yang digunakan adalah 30%, 45%, dan 60% dari kadar analit dalam sampel yang diperoleh dari hasil uji presisi repeatabilitas. Data perhitungan uji akurasi dapat dilihat pada Lampiran J dan hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.15.

Tabel 4.15 Hasil uji akurasi genistein

Adisi	Massa Hasil Percobaan (ng)	Massa Teoritis (ng)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	RSD (%)
30%	59,1966	59,5045	99,4826	99,3384	0,1265
	59,4546	59,8854	99,2807		
	59,2862	59,7330	99,2520		
45%	66,5268	66,7807	99,6199	99,2629	0,3434
	65,9980	66,7045	98,9408		
	66,1895	66,7045	99,2280		
60%	73,6695	74,0035	99,5486	99,1078	0,4885
	73,3022	73,9045	99,1850		
	72,8622	73,9045	98,5896		
	Rata-rata			99,2364	0,3195

Kriteria penerimaan uji akurasi dengan kadar analit lebih dari 0,001% adalah *mean recovery* yang diperoleh berada pada rentang 90-107% dengan RSD kurang dari 5,3 % (AOAC, 1998). Berdasarkan Tabel 4.15, *mean recovery* yang diperoleh sebesar 99,2364 % dengan RSD 0,3195 %. Hasil yang diperoleh memenuhi kriteria

penerimaan uji akurasi yang dipersyaratkan sehingga dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan dapat menghasilkan data yang akurat.

Berdasarkan hasil pengujian parameter validasi yang telah dilakukan, yaitu linieritas, BD dan BK, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi, dapat disimpulkan bahwa metode analisis genistein dalam sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) menghasilkan analisis yang valid.

4.5 Penetapan Kadar Genistein dalam Sediaan *Vanishing Cream*

Tahap terakhir dalam penelitian ini adalah penetapan kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) menggunakan metode analisis yang sudah divalidasi. Penetapan kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream* merupakan bagian dari evaluasi karakteristik fisika kimia sediaan. Penetapan kadar genistein dalam sediaan bertujuan untuk melihat perbandingan antara kadar genistein hasil analisis dengan kadar genistein sebenarnya yang dinyatakan dalam persen perolehan kembali (% *recovery*). Hasil penetapan kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dapat dilihat pada Tabel 4.16.

Tabel 4.16 Data % *recovery* kadar genistein

Replikasi	Massa Hasil Percobaan (mg)	Massa Teoritis (mg)	<i>Recovery</i> (%)	RSD (%)
1	0,0754	0,0758	99,5295	
2	0,0781	0,0766	101,9426	1,2764
3	0,0758	0,0758	99,9825	
Rata-rata	0,0765	0,0761	100,4849	

Berdasarkan Tabel 4.16, rata-rata nilai % *recovery* sebesar 100,4849 % dan RSD sebesar 1,2764 %. Data perhitungan kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream* dapat dilihat pada Lampiran K. Nilai % *recovery* dan RSD dari penetapan kadar genistein dalam sediaan telah memenuhi persyaratan, yakni 90-107 % untuk % *recovery* dan kurang dari 5,3% untuk RSD (AOAC, 1998).

BAB 5. PENUTUP

5.1. Kesimpulan

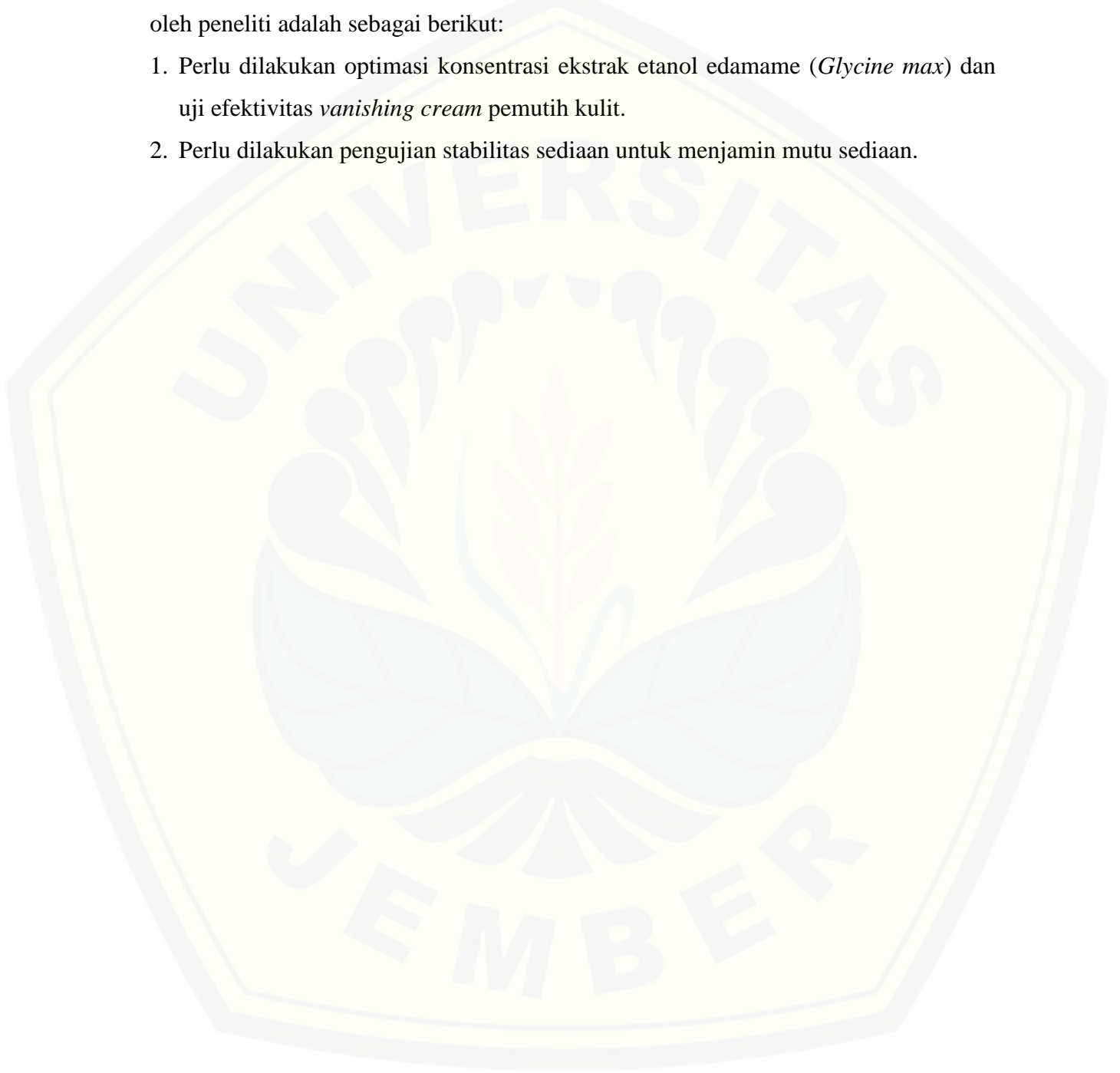
Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa:

1. Karakteristik fisika kimia sediaan *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) yang meliputi organoleptis, tipe emulsi, viskositas, daya sebar, dan pH, memenuhi persyaratan spesifikasi sediaan topikal yang telah ditentukan.
2. Kondisi optimum penetapan kadar genistein dalam *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan metode KLT Densitometri yaitu digunakan pelarut metanol p.a; fase diam silika gel 60 F₂₅₄; eluen dengan komposisi toluen : etil asetat : asam format (v/v/v) = 10:4:1; panjang gelombang 266 nm; konsentrasi uji 25 ppm; dan metode pengembangan menaik.
3. Metode analisis penetapan kadar genistein dalam *vanishing cream* ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dengan metode KLT Densitometri memberikan hasil analisis yang valid, yaitu memenuhi parameter linieritas dengan nilai r sebesar 0,996, V_{x0} sebesar 4,075%, dan X_p sebesar 24,046 ng, kepekaan dengan nilai BD sebesar 5,73 ng dan nilai BK sebesar 17,19 ng, selektivitas karena mampu memisahkan genistein dengan senyawa lain yang ada di dalam sampel dengan nilai R_s lebih dari 1,5 dan spesifisitas karena memiliki nilai korelasi pada uji *purity* dan *identity* lebih dari 0,99, presisi dengan nilai RSD kurang dari 5,3%, dan akurasi dengan nilai % *recovery* berada pada rentang 90-107% dan nilai RSD kurang dari 5,3%.
4. Perolehan kembali kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream* sebesar 100,4849±1,2764 % dan nilai ini berada pada rentang nilai % *recovery* dan kurang dari nilai RSD yang dipersyaratkan, yaitu 90-107% untuk nilai % *recovery* dan 5,3% untuk nilai RSD

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan oleh peneliti adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan optimasi konsentrasi ekstrak etanol edamame (*Glycine max*) dan uji efektivitas *vanishing cream* pemutih kulit.
2. Perlu dilakukan pengujian stabilitas sediaan untuk menjamin mutu sediaan.



DAFTAR PUSTAKA

- Agnessya, R. (2008). *Kajian Pengaruh Penggunaan Natrium Alginat dalam Formulasi Skin Lotion*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Ansel, H. C., Allen, L. V. and Popovich, N. G. (2011). *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- AOAC. (1998). *Peer-Verified Methods Program: Manual on Policies and Procedures*. Arllington, VA. [Online]. Available at: <http://www.aoac.org/vmeth/PVM.pdf>.
- Barners, S. (1998). Phytoestrogens and Breast Cancer. *Brailiere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 12 (4), p.559–579.
- Caesar, R. Y., Hapsari, I. and Dhiani, B. A. (2014). Formulation and from Bacterial Activities Essential Oils Lotion of Adas Fruit (*Foeniculum vulgare* Mill). *Media Farmasi*, 11 (1), p.41–54.
- Chadha, G. S. (2009). *Transdermal Delivery of Genistein as A Chemoprotective Drug for Melanoma*. Alabama: Auburn University.
- Chang, T.-S. (2009). An Update Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci*, 10, p.2440–2475.
- Chang, T.-S., Ding, H.-Y. and Lin, H.-C. (2005). Identifying 6,7,4'-Trihydroxyisoflavone as a Potent Tyrrosinase Inhibitor. *Bioscience Biotechnology Biochem.*, 69, p.1999–2001.
- Damanik, B. T., Etnawati, K. and Padmawati, R. S. (2011). Perception of Female Teenagers in Ambon about Hazardous Cosmetics Exposure Risk and Their Behavior of Choosing and Using Cosmetics. *Berita Kedokteran Masyarakat*, 27, p.1–9.
- Deinstrop, E. H. (2007). *Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes*. 2nd ed. Germany: Wiley-VCH.

- Dewi, E. N. A. (2015). *Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Edamame (Glycine Max) in vitro*. Skripsi, Jember: Universitas Jember.
- Draelos, Z. D. and Thamana, L. A. (2006). *Cosmetic Formulation of Skin Care Products*. New York: Taylor & Francis Group.
- Fatmawaty, A., Aswad, M., Kolobani, M. N., Manggau, M. A. and Alam, G. (2010). Effectivity of Several Medicinal Plants as Skin-Whitening Agents Effect: In Vitro Study of Antityrosinase Activity. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 7, p.219–213.
- Georgetti, S., Casagrande, R., Mouradecarvalhovicientini, F., Verrijr, W. and Fonseca, M. (2006). Evaluation of The Antioxidant Activity of Soybean Extract by Different In Vitro Methods and Investigation of This Activity after Its Incorporation in Topical Formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64 (1), p.99–106.
- Gibson, M. (2009). *Pharmaceutical Preformulation and Formulation*. 2nd ed. New York: Informa Healthcare USA.
- Gillbro, J. M. and Olsson, M. J. (2011). The Melanogenesis and Mechanisms of Skin-Lightening Agents - Existing and New Approaches: Melanogenesis and Skin-lightening Agents. *Int. J. of Cosmetic Sci.*, 33 (3), p.210–221.
- Harmita. (2004). *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. 1 (3), p.117–135.
- Huber, L. (2007). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. 2nd ed. New York: Informa Healthcare USA.
- Indrayanto, G. and Yuwono, M. (2003). *Validation of TLC Analysis in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Press.
- International Conference on Harmonization. (1994). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. European Union, Japan, USA: ICH Expert Working Group.
- Konovsky, J., Lumpkin, T. A. and McClary, D. (1994). *Edamame: The Vegetable Soybean*. Binghamton.: Haworth Press.
- Kowalska, T. and Prus, W. (2003). *Optimization of Thin Layer Chromatography in Encyclopedia of Chromatography*. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Lachman, L., Lieberman, H. A. and Kanig, J. L. (1994). *Teori dan Praktek Farmasi Industri*. 3rd ed. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Luthria, D., Biswas, R. and Natarajan, S. (2007). Comparison of Extraction Solvents and Techniques Used for The Assay of Isoflavones from Soybean. *Food Chemistry*, 105 (1), p.325–333.
- Mebrahtu, T., Mohamed, C., Wang, C. Y. and Andebrhan, T. (2004). Analysis of Isoflavone Contents in Vegetable Soybeans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, p.55–61.
- Mitzui, T. (1997). *New Cosmetic Science*. 1st ed. Elsevier.
- Mulja, M. and Suharman. (1995). *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Park, J.-S., Kim, D. H., Lee, J. K., Lee, J. Y., Kim, D. H., Kim, H. K., Lee, H.-J. and Kim, H. C. (2010). Natural Ortho-dihydroxyisoflavone Derivatives from Aged Korean Fermented Soybean Paste as Potent Tyrosinase and Melanin Formation Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20 (3), p.1162–1164.
- Paye, M., Barel, A. O. and Maibach, H. I. (2006). *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. 2nd ed. New York: Taylor & Francis Group.
- Paye, M., Barel, A. O. and Maibach, H. I. (2009). *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. 3rd ed. New York: Taylor & Francis Group.
- Purwaningsih, S., Salamah, E. and Budiarti, T. A. (2014). Formulation of Skin Lotion with Addition of Carrageenan and Natural Antioxidant from *Rhizopora mucronata* Lamk. *Jurnal Akuatika*, 5 (1), p.55–62.
- Rahayu, T. (2012). Deteksi Senyawa Isoflavon Daidzein dan Genistein pada Kultur In Vitro Kalus Kedelai (*Glycine max*). *Berkala Penelitian Hayati*, 18, p.75–78.
- Rohman, A. (2009). *Kromatografi untuk Analisis Obat*. 1st ed. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Rostagno, M. A., Palma, M. and Barroso, C. G. (2004). Pressurized Liquid Extraction of Isoflavones from Soybeans. *Analytica Chimica Acta*, 533, p.169–177.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J. and Quinn, M. E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. Grayslake: Pharmaceutical Press.

- Rukmana, R. and Yuniarsih, Y. (2012). *Kedelai, Budidaya dan Pasca Panen*. Yogyakarta: Kanisius.
- Samsu, H. S. (2001). *Membangun Agroindustri Bernuansa Ekspor: Edamame (Vegetable Soybean)*. Jember: Graha Ilmu dan Florentina.
- Sciarappa, W. J., Hunsberger, L. K., Shen, D., Wu, Q.-L., Simon, J. and Hulme, B. (2007). *Evaluation of Edamame Cultivars in New Jersey and Maryland*. p.223–227.
- Su, E. G. (2003). An Overview on Skin Whitening. *Sino Lion*, p.1–10.
- Suhartini, S., Fatimawali and Citraningtyas, G. (2013). Analisis Asam Retinoat pada Kosmetik Krim Pemutih yang Beredar di Pasaran Kota Manado. *Pharmacon*, 2 (1), p.1–7.
- Tsukamoto, C., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokobun, M., Kazuyoshi, O. and Kitamura, K. (1995). Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds: Changes in Isoflavones, Saponins, and Composition of Fatty Acids at Different Temperatures during Seed Development. *Journal Agric. Food Chemistry*, 43, p.1184–1192.
- USDA. (2010). [Online]. Available at: www.plants.usda.gov
- Videira, I. F. dos S., Magina, S. and Moura, D. F. L. (2013). Mechanisms Regulating Melanogenesis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88.
- Voight, R. (1994). *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. 5th ed. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Wulandari, L. (2011). *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT Taman Kampus Presindo.
- Yamaguchi, M. and Gao-Balch, Y. H. (2013). Role of Dietary Soybean Genistein in Osteoporosis Prevention. *Int. J. of Food, Science, Nutrition, and Dietetics*, 2 (2), p.1–11.
- Yoshiara, L. Y., Madeira, T. B., Delarozza, F., da Silva, J. B. and Ida, E. I. (2012). Optimization of Soy Isoflavone Extraction with Different Solvents Using The Simplex-centroid Mixture Design. *Int. J. of Food Sciences and Nutrition*, 63 (8), p.978–986.

Yuan, D., Chen, Y., Bai, X., Pan, Y. and Kano, Y. (2006). TLC and HPLC Analysis of Soy Isoflavones in Semen Sojae Praeparatum. *Asian Journal of Traditional Medicine*, 1, p.3-4.



LAMPIRAN

A. Data Perhitungan Viskositas

Replikasi	Viskositas (dPa.s)	Rata-rata (dPa.s)	SD (dPa.s)
1	65		
2	60	63,33	4,56
3	65		

Perhitungan:

- Rata-rata = $\frac{65+60+65}{3} = 63,33$

- SD = $\sqrt{\frac{[(65-63,33)^2+(60-63,33)^2+(65-63,33)^2]}{3-1}} = 4,56$

B. Data Perhitungan Daya Sebar

- Tabulasi hasil pengujian daya sebar

Beban (g)	Daya Sebar (cm)		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
5	4,0	4,1	4,0
	4,0	4,1	4,1
	4,1	4,0	4,1
	4,0	4,0	4,0
	4,1	4,1	4,1
10	6,1	6,2	6,1
	6,3	6,1	6,2
	6,0	6,0	6,0
	6,4	6,3	6,1
	6,2	6,2	6,2
15	7,4	7,4	7,5
	7,6	7,5	7,6
	7,6	7,5	7,6
	7,7	7,4	7,6
	7,5	7,4	7,6
20	8,7	8,5	8,8
	8,8	8,7	8,9
	8,8	8,6	8,5
	8,7	8,7	8,6
	8,8	8,5	8,6

25	10,1	10,2	10,3
	10,1	10,3	10,2
	10,2	10,4	10,4
	10,3	10,5	10,5
30	10,4	10,1	10,4
	11,6	11,3	11,5
	11,3	11,4	11,4
	11,5	11,5	11,5
	11,6	11,5	11,3
35	11,5	11,5	11,6
	12,1	12,2	12,3
	12,1	12,3	12,4
	12,3	12,4	12,5
	12,2	12,2	12,5
40	12,1	12,2	12,4
	12,9	13,0	13,2
	12,8	13,0	12,9
	13,0	13,0	13,0
	12,9	12,9	12,8
45	13,1	13,0	13,2
	13,9	13,8	13,9
	14,2	14,0	14,1
	14,2	14,0	14,3
	14,2	14,0	14,1
50	14,1	14,0	14,3
	14,6	14,7	14,6
	14,5	14,5	14,8
	14,8	14,8	14,8
	14,9	14,7	14,5
	14,6	14,6	14,6

- Tabulasi hasil pengujian daya sebar dengan beban 50 g

Replikasi	Daya Sebar Rata-rata (cm)	Rata-rata (cm)	SD (cm)
1	14,68	14,67	0,012
2	14,66		
3	14,66		

Perhitungan:

- Rata-rata = $\frac{14,68+14,66+14,66}{3} = 14,67$

- SD = $\sqrt{\frac{[(14,68-14,67)^2+(14,66-14,67)^2+(14,66-14,67)^2]}{3-1}} = 0,012$

C. Data Perhitungan pH

Replikasi	pH	Rata-rata	SD
1	6,65	6,63	0,025
2	6,60		
3	6,63		

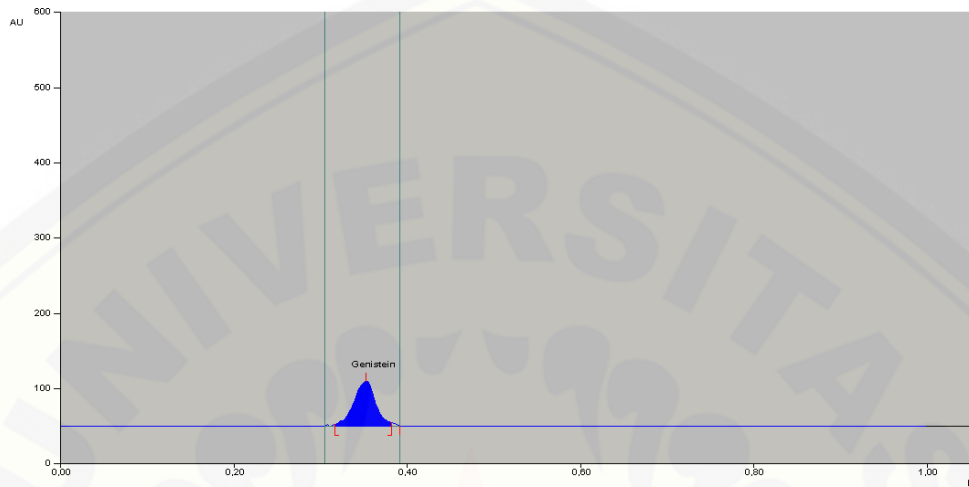
Perhitungan:

- Rata-rata $= \frac{6,65+6,60+6,63}{3} = 6,63$

- SD $= \sqrt{\frac{[(6,65-6,63)^2+(6,60-6,63)^2+(6,63-6,63)^2]}{3-1}} = 0,025$

D. Data Optimasi Eluen

D.1. Toluene : Atil asetat : Aseton : Asam format (v/v/v/v) = 20:4:2:1

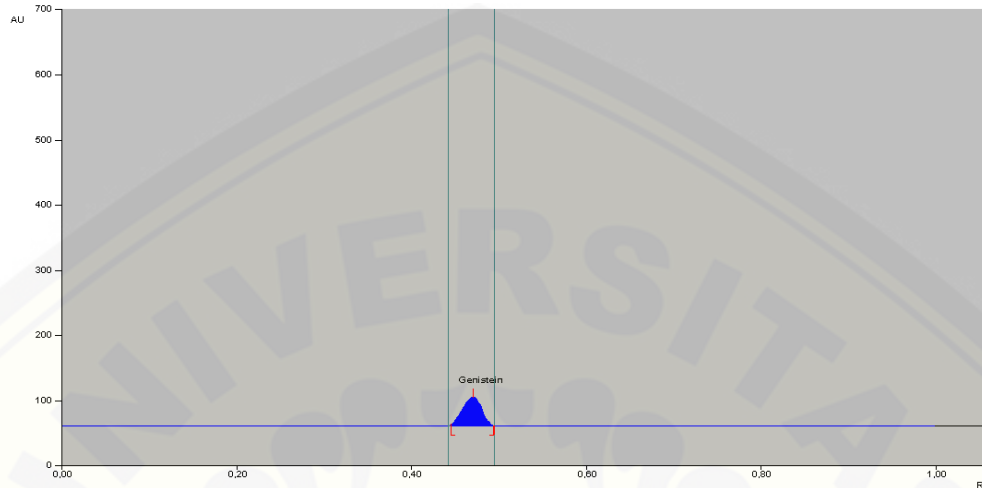


Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
1	0,32 Rf	2,5 AU	0,35 Rf	59,7 AU	100,00%	0,38 Rf	5,0 AU	1487,1 AU	100,00 %	Genistein

$$N = 16 \left(\frac{Z_s}{w} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,35}{0,38 - 0,32} \right)^2 = 544,44$$

$$H = \frac{Z_f}{N} = \frac{95}{544,44} = 0,174$$

D.2. Toluena : Atilasetat : Asam format (v/v/v) = 10:4:1

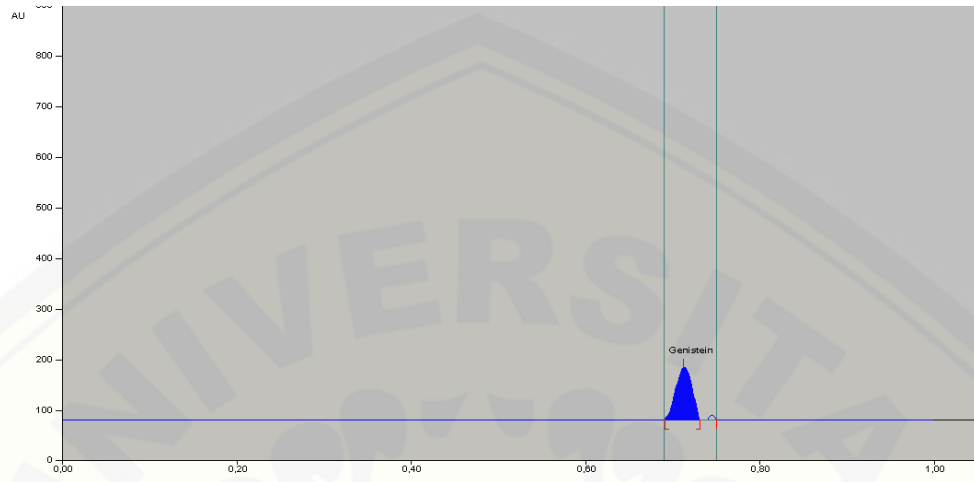


Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
1	0,45 Rf	2,5 AU	0,47 Rf	44,3 AU	100,00%	0,49 Rf	0,1 AU	958,0 AU	100,00 %	Genistein

$$N = 16 \left(\frac{Z_s}{w} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,47}{0,49 - 0,45} \right)^2 = 2.209,00$$

$$H = \frac{Z_f}{N} = \frac{95}{2.209,00} = 0,043$$

D.3. Toluena : Atilasetat : Asam format (v/v/v) = 5:4:1



Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
1	0,69 Rf	2,4 AU	0,71 Rf	103,1AU	100,00%	0,73 Rf	0,5 AU	1897,4 AU	100,00 %	Genistein

$$N = 16 \left(\frac{Z_s}{w} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,71}{0,73 - 0,69} \right)^2 = 5.041,00$$

$$H = \frac{Z_f}{N} = \frac{95}{5.041} = 0,018$$

E. Data Optimasi Konsentrasi Uji

- Berdasarkan hasil *scanning* menggunakan eluen terpilih, sebanyak 6 g sediaan *vanishing cream* mengandung 25 ppm genistein (dalam 6 μ L sampel), sehingga dilakukan penyetaraan massa sediaan untuk mendapatkan konsentrasi uji yang diharapkan.

$$\frac{20 \text{ ppm}}{25 \text{ ppm}} \times 6 \text{ g} = 4,8 \text{ g}$$

$$\frac{30 \text{ ppm}}{25 \text{ ppm}} \times 6 \text{ g} = 7,2 \text{ g}$$

- Data perbandingan nilai efisiensi kromatogram pada konsentrasi analit yang berbeda

Konsentrasi (ppm)	Start Position	Max Position	End Position	N	H
20	0,44 Rf	0,47 Rf	0,49 Rf	1413,76	0,067
25	0,45 Rf	0,48 Rf	0,50 Rf	1474,56	0,064
30	0,44 Rf	0,48 Rf	0,50 Rf	1024,00	0,092

- Contoh perhitungan

$$N = 16 \left(\frac{Z_s}{w} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,47}{0,49 - 0,44} \right)^2 = 1413,76$$

$$H = \frac{Z_f}{N} = \frac{95}{981,78} = 0,067$$

F. Preparasi Larutan Standar Genistein

$$\text{Massa genistein} = 5,213 \text{ mg}$$

$$\text{Volume} = 10 \text{ mL}$$

$$\text{Konsentrasi genistein} = \frac{\text{massa (mg)}}{\text{Volume (L)}} = \frac{5,213 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 521,3 \text{ ppm}$$

F.1 Pengenceran larutan standar induk untuk uji linieritas

- $\frac{40 \text{ } \mu\text{L}}{1000 \text{ } \mu\text{L}} \times 521,3 \text{ ppm} = 20,852 \text{ ppm}$
- $\frac{60 \text{ } \mu\text{L}}{1000 \text{ } \mu\text{L}} \times 521,3 \text{ ppm} = 31,278 \text{ ppm}$
- $\frac{80 \text{ } \mu\text{L}}{1000 \text{ } \mu\text{L}} \times 521,3 \text{ ppm} = 41,704 \text{ ppm}$
- $\frac{100 \text{ } \mu\text{L}}{1000 \text{ } \mu\text{L}} \times 521,3 \text{ ppm} = 52,13 \text{ ppm}$
- $\frac{120 \text{ } \mu\text{L}}{1000 \text{ } \mu\text{L}} \times 521,3 \text{ ppm} = 62,556 \text{ ppm}$

F.2 Pengenceran larutan standar induk untuk uji BD dan BK

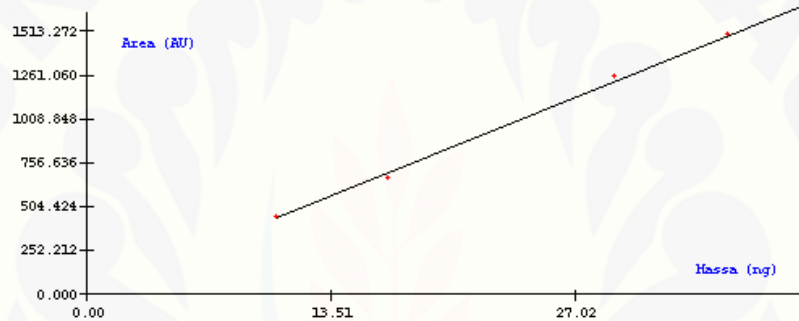
- $\frac{10 \text{ } \mu\text{L}}{1000 \text{ } \mu\text{L}} \times 521,3 \text{ ppm} = 5,213 \text{ ppm}$
- $\frac{16 \text{ } \mu\text{L}}{1000 \text{ } \mu\text{L}} \times 521,3 \text{ ppm} = 8,341 \text{ ppm}$
- $\frac{28 \text{ } \mu\text{L}}{1000 \text{ } \mu\text{L}} \times 521,3 \text{ ppm} = 14,596 \text{ ppm}$
- $\frac{34 \text{ } \mu\text{L}}{1000 \text{ } \mu\text{L}} \times 521,3 \text{ ppm} = 17,724 \text{ ppm}$
- $\frac{38 \text{ } \mu\text{L}}{1000 \text{ } \mu\text{L}} \times 521,3 \text{ ppm} = 19,809 \text{ ppm}$

G. Data Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Hasil pengujian linieritas pada uji BD dan BK genistein

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
5,213	10,43	451,32
8,341	16,68	671,61
14,596	29,19	1261,95
17,742	35,45	1494,31
19,809	39,61	1624,51

BD dan BK



Line equation : $Y = 10.13512000 + 41.51206000X$
 Correlation coefficient : 0.99826230
 Vx0 value : 3.21338300%

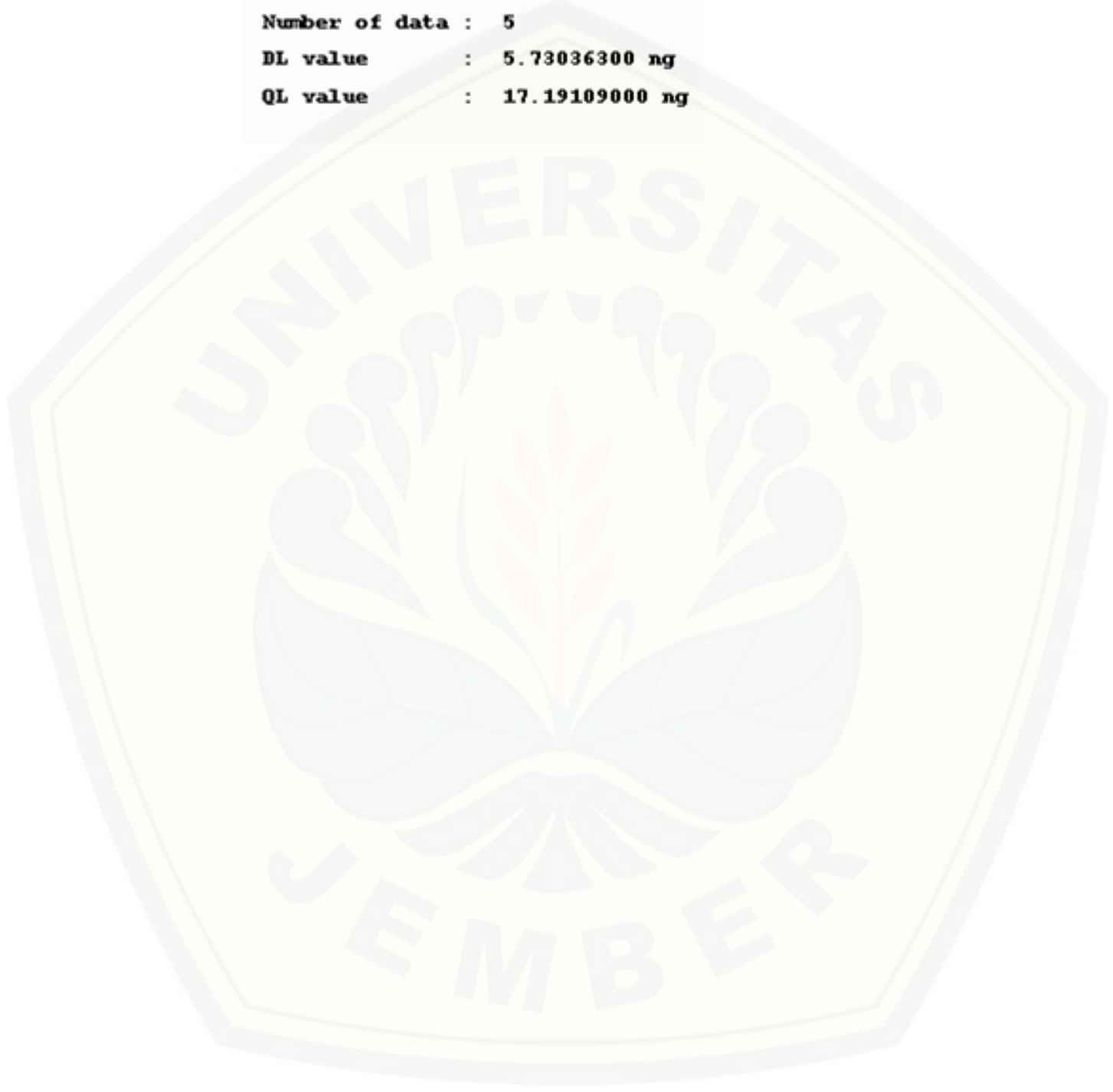
Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 5
 Line equation : $Y = 10.13512000 + 41.51206000X$
 Correlation coefficient : 0.99826230
 Sy value : 35.04531000
 Vx0 value : 3.21338300%
 Xp value : 5.73036300

The Correlation coefficient is fulfilled the requirement (> 0.99)

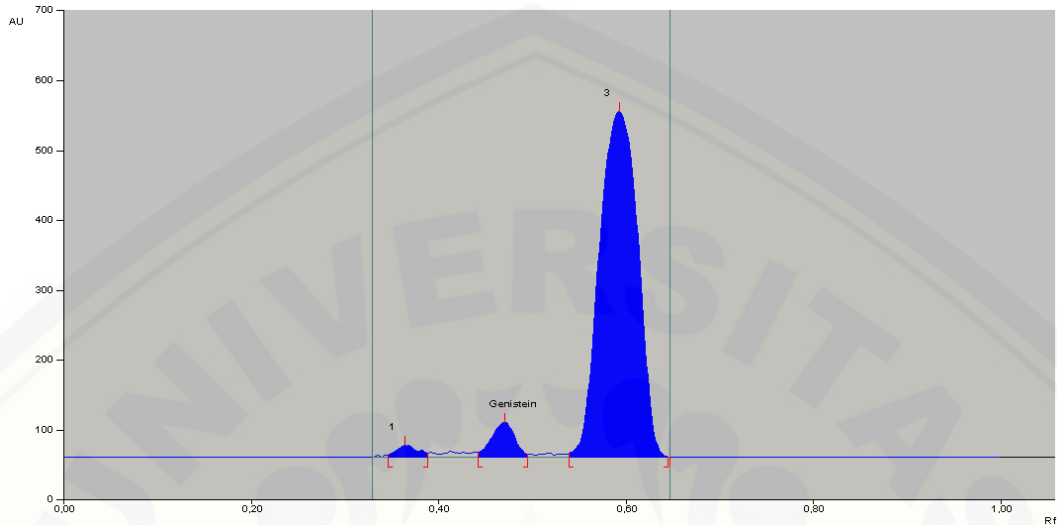
The Vx0 value is fulfilled the requirement (0% to 5%)

The Xp value is OK (< 10.43000000)

Method : **DL - QL**
Number of data : **5**
DL value : **5.73036300 ng**
QL value : **17.19109000 ng**



H. Perhitungan Resolusi Puncak Genistein



Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
1	0,35 Rf	3,3 AU	0,36 Rf	16,4 AU	2,93 %	0,39 Rf	5,1 AU	390,1 AU	1,81 %	Unknown*
2	0,44 Rf	6,7 AU	0,47 Rf	49,8 AU	8,89 %	0,50 Rf	4,4 AU	1215,2 AU	5,64 %	Genistein
3	0,54 Rf	5,7 AU	0,59 Rf	494,4 AU	88,18 %	0,62 Rf	0,4 AU	19937,2 AU	92,55 %	Unknown*

- Resolusi puncak genistein dengan puncak *unknown* 1

$$R_s = \frac{2[(Z)a-(Z)b]}{W_a + W_b} = \frac{2(0,47-0,36)}{(0,50-0,44)+(0,39-0,35)} = 2,20$$

- Resolusi puncak genistein dengan puncak *unknown* 2

$$R_s = \frac{2[(Z)a-(Z)b]}{W_a + W_b} = \frac{2(0,59-0,47)}{(0,62-0,54)+(0,50-0,44)} = 1,71$$

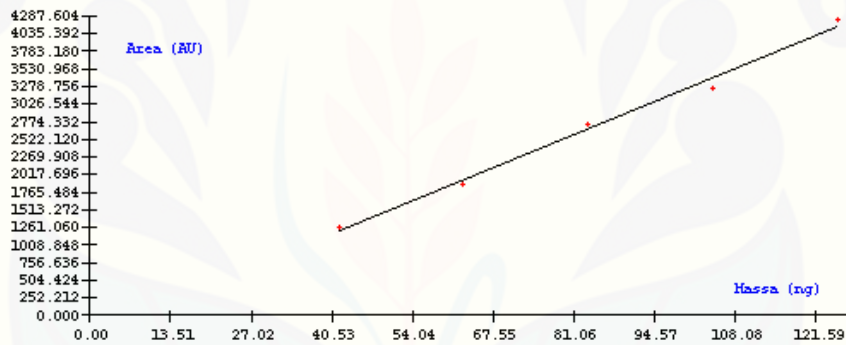
I. Perhitungan Data Presisi

I.1 Presisi hari ke-1

- Kurva baku uji presisi hari ke-1

Massa (ng)	Area
41,700	1261,06
62,560	1889,88
83,410	2734,02
104,260	3255,86
125,110	4237,21

Linieritas



Line equation : $Y = -249.89700000 + 35.09619000X$
 Corelation coefficient : 0.99606060
 Vx0 value : 4.06344900%

Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 5
 Line equation : $Y = -249.89700000 + 35.09619000X$
 Corelation coefficient : 0.99606060
 Sy value : 118.94950000
 Vx0 value : 4.06344900%
 Xp value : 24.34097000

The Correlation coefficient is fulfilled the requirement (> 0.99)
 The Vx0 value is fulfilled the requirement (0% to 5%)
 The Xp value is OK (< 41.70000000)

- Hasil uji presisi repeatabilitas genistein hari ke-1

Penimbangan (mg)	Area	Massa (ng)	Massa percobaan (mg)	Massa teoritis (mg)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	SD (%)	RSD (%)
6.125	1429,18	47,9020	0,0798	0,0774	103,1668	101,8050	0,7958	0,7817
6.125	1405,56	47,2288	0,0787	0,0774	101,7171			
6.020	1381,79	46,5514	0,0776	0,0761	102,0069			
6.000	1355,84	45,8119	0,0764	0,0758	100,7210			
6.050	1382,31	46,5663	0,0776	0,0764	101,5334			
6.100	1398,27	47,0211	0,0784	0,0771	101,6847			

- Contoh Perhitungan

$$Y = -251,7 + 35,09X$$

$$\text{Replikasi 1: } 1429,18 = -251,7 + (35,09X)$$

$$X = 47,9020 \text{ ng}$$

$$\text{Volume penotolan} = 6 \mu\text{L}$$

$$\text{Volume sampel} = 10.000 \mu\text{L}$$

$$\text{Kadar genistein} = 0,252 \text{ mg} / 1 \text{ g ekstrak}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 7,5205 \text{ g} / 150 \text{ g sediaan } \textit{vanishing cream}$$

$$\text{Massa percobaan} = \frac{10.000}{6} \times \frac{47,9020}{1000000} = 0,0798 \text{ mg}$$

$$\text{Massa teoritis} = \frac{7,5205 \text{ mg}}{150.000 \text{ mg}} \times 6.125 \text{ mg} \times 0,252 \text{ mg} = 0,0774 \text{ mg}$$

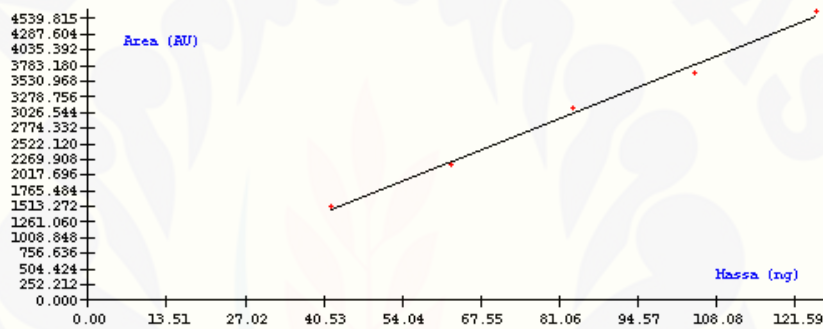
$$\% \textit{ recovery} = \frac{\text{massa percobaan}}{\text{massa teoritis}} \times 100\% = \frac{0,0798}{0,0774} \times 100\% = 103,1668\%$$

I.2 Presisi hari ke-2

- Kurva baku uji presisi hari ke-2

Massa (ng)	Area
41,700	1522,700
62,560	2181,250
83,410	3104,070
104,260	3656,770
125,110	4663,570

Linieritas



Line equation : $Y = -77.22305000 + 37.20140000X$
 Corelation coefficient : 0.99655780
 Vx0 value : 3.79697500%

Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 5
 Line equation : $Y = -77.22305000 + 37.20140000X$
 Corelation coefficient : 0.99655780
 Sy value : 117.81610000
 Vx0 value : 3.79697500%
 Xp value : 22.88288000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)
 The Vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)
 The Xp value is OK (< 41.70000000)

- Hasil uji presisi repeatabilitas genistein hari ke-2

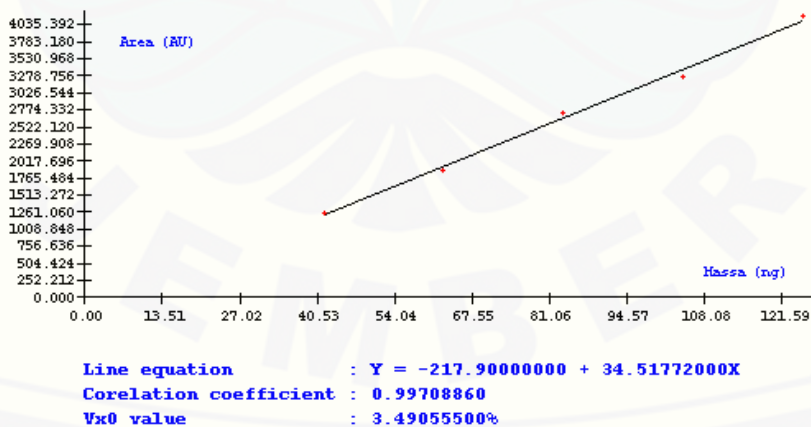
Penimbangan (mg)	Area	Massa (ng)	Massa percobaan (mg)	Massa teoritis (mg)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	SD (%)	RSD (%)
6,1250	1646,94	46,3484	0,0772	0,0774	99,8209	98,4484	1,3529	1,3742
6,1250	1632,83	45,9691	0,0766	0,0774	99,0040			
6,0500	1607,51	45,2884	0,0755	0,0764	98,7472			
6,1000	1621,28	45,6586	0,0761	0,0771	98,7383			
6,0000	1544,48	43,5941	0,0727	0,0758	95,8449			
6,0200	1595,56	44,9672	0,0749	0,0761	98,5354			

I.3 Presisi hari ke-3

- Kurva baku uji presisi hari ke-3

Massa (ng)	Area
41,700	1255,500
62,560	1889,880
83,410	2734,020
104,260	3254,210
125,110	4172,160

Linieritas



Method : **Linearity**
Probability : **95%**
Number of data : **5**
Line equation : **Y = -217.90000000 + 34.51772000X**
Corelation coefficient : **0.99708860**
Sy value : **100.49490000**
Vx0 value : **3.49055500%**
Xp value : **21.18324000**

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

The Vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)

The Xp value is OK (< 41.70000000)

- Hasil uji presisi repeatabilitas genistein hari ke-3

Penimbangan (mg)	Area	Massa (ng)	Massa percobaan (mg)	Massa teoritis (mg)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	SD (%)	RSD (%)
6,1250	1391,59	46,6384	0,0777	0,0774	100,4454	98,0137	1,6574	1,6910
6,1250	1356,16	45,6117	0,0760	0,0774	98,2343			
6,0000	1289,95	43,6931	0,0728	0,0758	96,0627			
6,0200	1333,01	44,9409	0,0749	0,0761	98,4777			
6,0500	1343,79	45,2533	0,0754	0,0764	98,6705			
6,1000	1317,14	44,4810	0,0741	0,0771	96,1917			

I.4 Hasil uji presisi antara

Hari ke-	Recovery (%)	RSD (n=6)
1	101,8050	0,7817
2	98,4484	1,3742
3	98,0137	1,6910
Rata-rata		1,2823

- Perhitungan

$$\text{RSD rata-rata} = \frac{0,7817 + 1,3742 + 1,6910}{3} = 1,2823\%$$

J. Perhitungan Data Akurasi

- Contoh perhitungan pembuatan sampel akurasi

Massa genistein rata-rata = 0,0781 mg

Penimbangan rata-rata = 6.070 mg

Kadar genistein rata-rata = $\frac{0,0781 \text{ mg}}{6.070 \text{ mg}} \times 100\% = 0,00128 \text{ \% b/b}$

1. Sampel adisi 30%

Bila ditimbang 6 g sampel, maka jumlah standar genistein yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

$$\frac{6\text{g} \times 0,00128 \times 0,3}{100\text{g}} = 0,023319 \text{ mg standar genistein}$$

Larutan standar genistein = 20,852 µg/mL

Cara kerja:

- Sebanyak 6 g sediaan ditimbang dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan metanol p.a (tidak sampai batas tanda)
- Sebanyak 1,118 mL (setara dengan 0,023 mg) larutan standar ditambahkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian *disentrifuge* pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.
- Supernatan dipisahkan dari endapan dan dianalisis dengan metode KLT Densitometri.

2. Sampel adisi 45%

Bila ditimbang 6 g sampel, maka jumlah standar genistein yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

$$\frac{6\text{g} \times 0,00128 \times 0,45}{100\text{g}} = 0,034979 \text{ mg standar genistein}$$

Larutan standar genistein = 20,852 µg/mL

Cara kerja:

- a. Sebanyak 6 g sediaan ditimbang dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan metanol p.a (tidak sampai batas tanda)
- b. Sebanyak 1,678 mL (setara dengan 0,035 mg) larutan standar ditambahkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian *disentrifuge* pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.
- c. Supernatan dipisahkan dari endapan dan dianalisis dengan metode KLT Densitometri.

3. Sampel akurasi 60%

Bila ditimbang 6 g sampel, maka jumlah standar genistein yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

$$\frac{6g \times 0,00128 \times 0,6}{100g} = 0,046639 \text{ mg standar genistein}$$

Larutan standar genistein = 20,852 $\mu\text{g/mL}$

Cara kerja:

- a. Sebanyak 6 g sediaan ditimbang dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan metanol p.a (tidak sampai batas tanda)
- b. Sebanyak 2,237 mL (setara dengan 0,047 mg) larutan standar ditambahkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian *disentrifuge* pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.
- c. Supernatan dipisahkan dari endapan dan dianalisis dengan metode KLT Densitometri.

- Hasil uji akurasi

	Penimbang- an (mg)	Area	Massa percobaan (ng)	Massa teoritis (ng)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	SD (%)	RSD (%)
Adisi 30%	6.000	2152,81	59,1966	59,5045	99,4826	99,3384	0,1257	0,1265
	6.050	2161,85	59,4546	59,8854	99,2807			
	6.030	2155,95	59,2862	59,7330	99,2520			
Adisi 45%	6.010	2409,66	66,5268	66,7807	99,6199	99,2629	0,3409	0,3434
	6.000	2391,13	65,9980	66,7045	98,9408			
	6.000	2397,84	66,1895	66,7045	99,2280			
Adisi 60%	6.013	2659,94	73,6695	74,0035	99,5486	99,1078	0,4842	0,4885
	6.000	2647,07	73,3022	73,9045	99,1850			
	6.000	2631,65	72,8622	73,9045	98,5896			
Rata-rata						99,2364	0,3169	0,3195

- Contoh perhitungan % *recovery*

Misal: pada sampel adisi 30% replikasi 1

$$\frac{0,00128 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 6 \text{ g} = 0,0762 \text{ mg} + 0,023 \text{ mg} = 0,0992 \text{ mg}$$

$$\frac{0,0992 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \times 6 \mu\text{L} = 59,5045 \text{ ng}$$

Hasil percobaan = 59,1966 ng

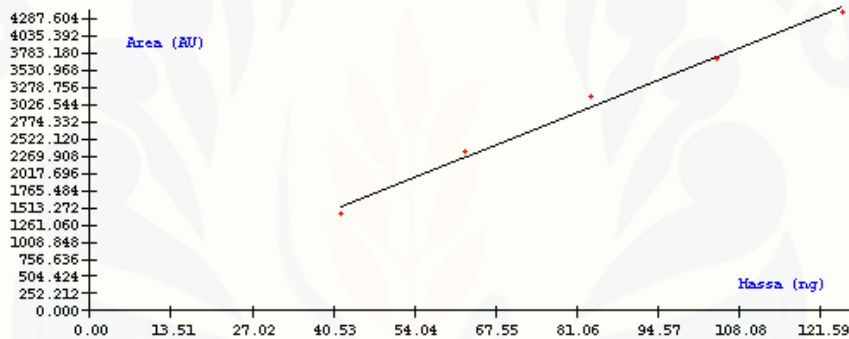
$$\% \text{ recovery} = \frac{59,1966}{59,5045} \times 100\% = 99,4826$$

K. Perhitungan Penetapan Kadar Genistein dalam Sediaan *Vanishing Cream*

- Kurva baku uji akurasi

Massa (ng)	Area
41,70	1420,36
62,56	2339,71
83,41	3157,05
104,26	3695,89
125,11	4396,38

Linieritas



Line equation : $Y = 78.56679000 + 35.04833000X$
 Correlation coefficient : 0.99544980
 Vx0 value : 4.36917000%

Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 5
 Line equation : $Y = 78.56679000 + 35.04833000X$
 Corelation coefficient : 0.99544980
 Sy value : 127.72440000
 Vx0 value : 4.36917000%
 Xp value : 25.99117000

The Correlation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)
 The Vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)
 The Xp value is OK (< 41.70000000)

- Hasil penetapan kadar genistein dalam sediaan *vanishing cream*

Penimbangan (mg)	Area	Massa (ng)	Massa percobaan (mg)	Massa teoritis (mg)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	SD (%)	RSD (%)
6.000	1644,82	45,2700	0,0754	0,0758	99,5295	100,4849	1,2826	1,2764
6.065	1720,88	46,8699	0,0781	0,0766	101,9426			
6.000	1672,04	46,4760	0,0758	0,0758	99,9825			

- Contoh Perhitungan

$$Y = 78,56 + 35,04X$$

$$\text{Replikasi 1: } 1644,82 = 78,56 + (35,04X)$$

$$X = 45,2700 \text{ ng}$$

$$\text{Volume penotolan} = 6 \mu\text{L}$$

$$\text{Volume sampel} = 10.000 \mu\text{L}$$

$$\text{Kadar genistein} = 0,252 \text{ mg} / 1 \text{ g ekstrak}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 7,5205 \text{ g} / 150 \text{ g sediaan } \textit{vanishing cream}$$

$$\text{Massa percobaan} = \frac{10.000}{6} \times \frac{45,2700}{1000000} = 0,0758 \text{ mg}$$

$$\text{Massa teoritis} = \frac{7,5205 \text{ mg}}{150.000 \text{ mg}} \times 6.000 \text{ mg} \times 0,252 \text{ mg} = 0,0761 \text{ mg}$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{massa percobaan}}{\text{massa teoritis}} \times 100\% = \frac{0,0758}{0,0761} \times 100\% = 99,5295\%$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{99,5295 + 101,9426 + 99,9825}{3} = 100,4849$$

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{[(99,5295 - 100,4849)^2 + (101,9426 - 100,4849)^2 + (99,9825 - 100,4849)^2]}{3-1}} = 1,2826$$

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\text{Rata-rata}} \times 100\% = \frac{1,2826}{100,4849} \times 100\% = 1,2764\%$$

$$\text{Kadar genistein dalam sediaan} = \frac{\text{rata-rata massa genistein}}{\text{rata-rata penimbangan}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,0765 \text{ mg}}{6021,7 \text{ mg}} \times 100\%$$

$$= 0,00127\%$$

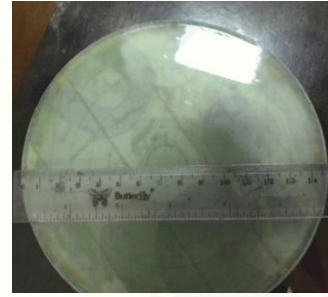
L. Dokumentasi Penelitian



Proses pembuatan sediaan *vanishing cream*



Pengukuran viskositas sediaan



Pengukuran daya sebar



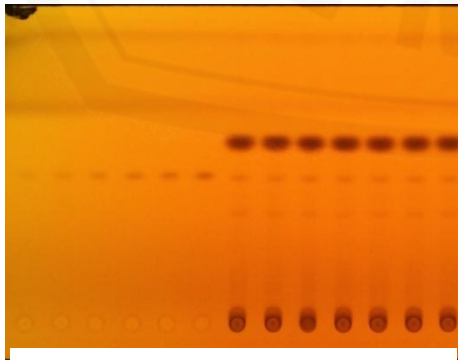
Pengukuran pH sediaan



Proses sentrifugasi



Proses eluasi



Lempeng hasil eluasi



Analisis penetapan kadar genistein