



**FORMULASI SEDIAAN KRIM EKSTRAK ETANOL TEMPE KEDELAI
(*Glycine max. L*) SEBAGAI AGEN PEMUTIH KULIT ALAMI**

SKRIPSI

Oleh:
Lintang Ayu P
112210101002

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**FORMULASI SEDIAAN KRIM EKSTRAK ETANOL TEMPE KEDELAI
(*Glycine max. L*) SEBAGAI AGEN PEMUTIH KULIT ALAMI**

SKRIPSI

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

Oleh:

Lintang Ayu P

112210101002

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang telah memberikan kekuatan lahir batin dan kesempatan untuk menuntut ilmu beserta Nabi Muhammad SAW sebagai Rasul-Nya yang selalu menjadi panutan dalam setiap langkah;
2. Orang tua tercinta, Mama Sulastriningrum, Papa Muhammad Yasin, dan Papa Agung Priyono tercinta yang telah memberikan do'a, dukungan, bimbingan, kasih sayang, kerja keras, perjuangan, dan pengorbanan untukku;
3. Guru dan dosen yang telah dengan tulus memberikan ilmu dan mendidiku dengan penuh kasih sayang dan kesabaran dari sejak taman kanak - kanak hingga perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai dari suatu urusan, kerjakan dengan sungguh - sungguh urusan yang lain. Dan hanya kepada Tuhanmu lah hendaknya kamu berharap.

(QS. Al- Insyirah : 6-8)

Apapun yang diberikan kepada kita adalah yang terbaik untuk kita, bukan menurut ukuran kita, tapi menurut ukuran Allah.

(Ahmad Rifa'i Rif'an)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Lintang Ayu P

NIM : 112210101002

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai (*Glycine max. L.*) Sebagai Agen Pemutih Kulit Alami” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi manapun, 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, 3 Juli 2015

Yang menyatakan,



Lintang Ayu P.

NIM 112210101002

SKRIPSI

**FORMULASI SEDIAAN KRIM EKSTRAK ETANOL TEMPE KEDELAI
(*Glycine max. L*) SEBAGAI AGEN PEMUTIH KULIT ALAMI**

Oleh:

Lintang Ayu P

112210101002

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Budipratiwi W., S.Farm., M.sc., Apt.

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

PENGESAHAN

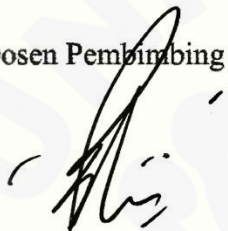
Skripsi berjudul “Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai (*Glycine max. L.*) Sebagai Agen Pemutih Kulit Alami” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

Hari, tanggal : Jum’at, 3 Juli 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,



Budipratiwi W., S. Farm., M.sc., Apt.

NIP.198112272006042003

Dosen Pembimbing Anggota,

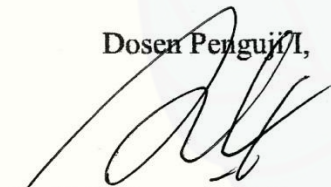


Siti Muslichah, S.Si., M.Sc., Apt.

NIP. 197305132005012001

Tim Penguji

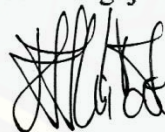
Dosen Penguji I,



Dwi Nurahmanto, S.Farm., Apt., M.Sc.

NIP. 198401242008011001

Dosen Penguji II,



Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm.

NIP. 198204062006042001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



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

NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai (*Glycine max. L*) sebagai Agen Pemutih Kulit Alami; Lintang Ayu P, 112210101002; 2015; 83 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Tempe merupakan makanan yang berasal dari fermentasi kedelai (*Glycine max L.Merr*) oleh jamur *Rhizopus* spp. Tempe mengandung senyawa isoflavon aglikon yang lebih tinggi dari kedelai karena dalam proses fermentasi menghasilkan enzim β -glukosidase yang dapat mengubah isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon melalui proses deglikosilasi. Senyawa isoflavon aglikon meliputi genistein, daidzein, dan glisitein memiliki aktivitas hambatan enzim tirosinase. Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak etanol kedelai terfermentasi memiliki aktivitas hambatan enzim tirosinase yang lebih tinggi dibandingkan kedelai non-fermentasi dengan nilai persen hambatan enzim tirosinase sebesar 75,55%, sedangkan ekstrak etanol kedelai non-fermentasi sebesar 53,21%.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas hambatan enzim tirosinase ekstrak etanol tempe kedelai, mengetahui pengaruh formulasi terhadap kadar isoflavon genistein dalam sediaan krim dan respon kesukaan konsumen terhadap krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan krim tipe M/A sebagai agen pemutih kulit alami. Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pembuatan ekstrak etanol tempe kedelai, kemudian dilakukan penetapan kadar genistein dalam ekstrak etanol tempe kedelai dengan metode KLT-Densitometri. Pada tahap kedua dilakukan uji aktivitas hambatan enzim tirosinase ekstrak etanol tempe kedelai secara *in - vitro* menggunakan *microplate reader*. Tahap selanjutnya dilakukan formulasi sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A dan ditetapkan kadar isoflavon genistein dalam sediaan krim dengan uji presisi dan uji akurasi. Tahap akhir dilakukan uji sifat fisika kimia krim dan uji kesukaan konsumen terhadap krim menggunakan metode kuisisioner, kemudian dilakukan analisis statistik.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa maserasi serbuk tempe kedelai bebas lemak menggunakan pelarut etanol 70% menghasilkan ekstrak etanol tempe kedelai

dengan rendemen sebesar 7,440% b/b. Kadar rata - rata isoflavon genistein dalam ekstrak etanol tempe kedelai sebesar 0,245 % b/b \pm 2,054%. Hasil pengujian aktivitas hambatan enzim tirosinase ekstrak etanol tempe kedelai secara *in-vitro* menghasilkan nilai rata - rata IC₅₀ ekstrak etanol tempe kedelai 55,420 ppm \pm 0,169 ppm lebih rendah dibanding nilai rata - rata IC₅₀ standar genistein sebagai kontrol positif sebesar 130,139 ppm \pm 0,251 ppm, yang berarti ekstrak etanol tempe kedelai memiliki hambatan enzim tirosinase yang lebih baik dibanding standar genistein.

Formulasi sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A dengan dosis ekstrak etanol tempe kedelai berasal dari konversi nilai IC₅₀ yaitu $5,542 \times 10^{-1}$ % b/b. Kadar rata - rata isoflavon genistein dalam sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai presis dengan nilai RSD untuk krim A/M sebesar $0,460 \times 10^{-2}$ % b/b \pm 0,569 % dan krim M/A sebesar $0,460 \times 10^{-2}$ % b/b \pm 0,211%. Berdasarkan hasil analisis statistika menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna terhadap kadar genistein dalam sampel krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A dengan nilai $p > 0,05$ sehingga menunjukkan bahwa formula krim yang berbeda tidak mempengaruhi kadar genistein. Hasil uji akurasi sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai menunjukkan hasil yang akurat dengan nilai *mean recovery* \pm RSD krim A/M sebesar 100,463% \pm 0,909% dan krim M/A sebesar 100,897% \pm 0,743%. Hasil uji sifat fisika kimia krim telah memenuhi spesifikasi yang diharapkan. Hasil uji kesukaan menunjukkan bahwa sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe M/A lebih disukai dibandingkan krim tipe A/M karena memiliki tekstur lembut, tidak berminyak, dan tidak lengket, sehingga lebih nyaman ketika dioleskan dipermukaan kulit, selain itu berwarna putih susu dan bau harum mawar.

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah ekstrak etanol tempe kedelai memiliki aktivitas hambatan tirosinase yang lebih baik dibandingkan dengan genistein sebagai kontrol positif. Formulasi krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A tidak mempengaruhi kadar isoflavon genistein dalam sediaan krim. Krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe minyak M/A lebih disukai dibanding krim tipe A/M berdasarkan parameter tekstur, warna, dan bau.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai (*Glycine max. L.*) Sebagai Agen Pemutih Kulit Alami”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Allah SWT, atas izin-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi;
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Ibu Budipratiwi W., S.Farm., M.Sc., Apt., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Siti Muslichah, S.Si., M.Sc., Apt., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah banyak membantu, meluangkan waktu, pikiran dan perhatiannya untuk membimbing penulis untuk menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;
4. Bapak Moh. Amrun, S.Si., Apt., M.Farm., selaku Dosen Pembimbing penelitian “Inhibitor Tirosinase” yang telah banyak membantu, meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis untuk menyelesaikan penelitian ini;
5. Bapak Dwi Nurahmanto, S.Farm., Apt., M.Sc., dan Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm., selaku Dosen Penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji, mengevaluasi, memberikan saran dan penilaian terhadap skripsi ini;
6. Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;

7. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang tanpa lelah telah mengamalkan ilmunya dan memperluas ilmu pengetahuan serta wawasan penulis selama menempuh masa kuliah;
8. Pimpinan dan Para karyawan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas bantuannya selama penulis belajar di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
9. Ibu Widi dan Mbak Anggra selaku teknisi Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi serta Ibu Itus dan Mbak Titin selaku teknisi Laboratorium Teknologi Farmasi Bagian Farmasetika Universitas Jember yang telah membantu penulis selama penelitian;
10. Orang tua tercinta, Mama Sulastriningrum, Papa Mohammad Yasin dan Papa Agung Priyono yang senantiasa memberi do'a, kasih sayang, semangat, dan motivasi yang tidak terhingga untuk mengiringi perjalanan hidup penulis;
11. Mas - masku tersayang Alvian Hendra, Sandhi Anggara dan Erwin Budi, serta Mbak-mbakku tercinta Rosari Mahiro D., Hanifia Istiqomah, dan Rizqy Kiromin Baroroh, atas kasih sayang, do'a, dan semangat yang tiada henti kalian berikan;
12. Rekan kerja sekaligus sahabat seperjuangan Defitri Trimardani, atas kerjasamanya saat penelitian dan kebersamaannya selama masa perkuliahan;
13. Sahabat - sahabat nge-lab di laboratorium Biologi dan Farmasetika, Risti, Fitria, Zahrotul, Liyas, Elisa, Liza, Zuhro, Habibi, Vita, Oktavia, Lily, Indarto, Imroatul, Tintia, Arif, Nurul Imamah, Ajeng, Binta, dan Astika, atas kebersamaan, bantuan, dan kekompakan kalian selama pengerjaan penelitian ini;
14. Sahabat - sahabatku yang telah mewarnai hidupku selama di Jember, Alifia, Rara, Estika, Mbak Ika, Prisma, Puspita, Meyladia, Ichlasul, Tiwi, Ena, Nur , dan Mbak Lutfiana sekeluarga;
15. Teman - teman seperjuangan Angkatan 2011 Fakultas Farmasi Universitas Jember "ASMEF" yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, atas kebaikan dan bantuan yang kalian berikan;

16. Adik - adikku angkatan 2012 dan 2013 Ika, Aulia, Winda, Ulya, dan Putri, atas kebersamaan, semangat, dukungan, dan motivasi selama ini;
17. Teman - teman KKN Desa Tamansari Kec. Mumbulsari Dewi, Pipin, Rika, Dea, Rani, Mas Syahrul, Mas Teguh, dan Heru, atas kebersamaan kalian selama 45 hari di posko KKN;
18. Teman - teman kos MUSLIMAH, Yuli, Shevi, Mita, Putri, Puspita, Mey, Nisa, Arum, Rere, Rara, dan Mbak Era yang selalu bersama penulis selama beberapa tahun terakhir ini dalam suka maupun duka;
19. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas bantuan dan perhatiannya baik langsung maupun tidak langsung serta inspirasi bagi penulis dalam menyelesaikan penelitian ini dan mendo'akan kesuksesan ujian skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat-Nya dan hanya Allah yang dapat membalas semua kebaikannya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis menerima segala kritik dan saran dari pembaca sekalian. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Jember, 3 Juli 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR RUMUS	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Tentang Kulit	5
2.1.1 Anatomi Kulit.....	5
2.1.2 Fungsi Kulit.....	8
2.2 Tinjauan Tentang Proses Pigmentasi Kulit	10
2.3 Tinjauan Tentang Gangguan Proses Pigmentasi Kulit	12
2.4 Tinjauan Tentang Enzim Tirosinase	13
2.5 Tinjauan Tentang Hambatan Tirosinase	14

2.6 Tinjauan Tentang Tempe Kedelai	14
2.6.1 Kandungan Kimia Tempe Kedelai	15
2.6.2 Isoflavon pada Tempe Kedelai	16
2.6.3 Aktivitas Farmakologi Tempe Kedelai	18
2.7 Tinjauan Tentang Krim	19
2.7.1 Kualitas Dasar Krim	20
2.7.2 Penggolongan Krim	20
2.8 Tinjauan tentang Bahan Penelitian	21
BAB 3. METODE PENELITIAN	28
3.1 Jenis Penelitian	28
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	28
3.3 Variabel Penelitian	28
3.3.1 Variabel bebas	28
3.3.2 Variabel terikat	28
3.4 Rancangan Penelitian	29
3.4.1 Rancangan Operasional	29
3.4.2 Definisi Operasional	29
3.5 Populasi dan Sampel	30
3.5.1 Populasi	30
3.5.2 Besar Sampel	30
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	32
3.6.1 Alat	32
3.6.2 Bahan Penelitian	32
3.7 Prosedur Penelitian	33
3.7.1 Preparasi Sampel	33
3.7.2 Pemisahan Lemak (<i>defatting</i>) dari Serbuk Tempe Kedelai	33
3.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	33
3.7.4 Optimasi Kondisi Analisis	33
3.7.5 Validasi Metode Analisis	35

3.7.6 Penetapan Kadar Isoflavon Genistein dalam Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	38
3.7.7 Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase	38
3.7.8 Rancangan Formula Krim Ekstrak Etanol Tempe	40
3.7.9 Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	41
3.7.10 Penetapan Kadar Isoflavon Genistein dalam Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	42
3.7.11 Evaluasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	43
3.7.12 Analisis Data	45
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	47
4.1 Hasil Ekstraksi Isoflavon Tempe Kedelai	48
4.2 Hasil Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	49
4.2.1 Optimasi Kondisi Analisis	50
4.2.2 Validasi Metode Analisis	52
4.2.3 Penetapan Kadar Isoflavon Genistein pada Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	60
4.3 Pengujian Aktivitas Hambatan Tirosinase Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	61
4.4 Hasil Formulasi dan Penetapan Kadar Isoflavon Genistein dalam Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	63
4.4.1 Hasil Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe kedelai	63
4.4.2 Hasil Penetapan Kadar Isoflavon Genistein dalam Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	64
4.5 Hasil Evaluasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	68
4.5.1 Hasil Pengujian Sifat Fisika Kimia Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	68

4.5.2 Hasil Uji Kesukaan Sediaan Krim Ekstrak Etanol

Tempe Kedelai.....	73
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	75
5.1 Kesimpulan.....	75
5.2 Saran.....	75
DAFTAR PUSTAKA.....	76
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN.....	84
LAMPIRAN.....	86

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Formula krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M)	40
3.2 Formula krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe minyak dalam air (M/A)	41
4.1 Perbandingan nilai parameter efisiensi kromatogram pada konsentrasi analit yang berbeda	51
4.2 Kondisi optimum analisis genistein dengan KLT-Densitometri.....	52
4.3 Hasil uji linieritas genistein.....	53
4.4 Hasil uji batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) genistein	54
4.5 Hasil uji kemurnian genistein.....	57
4.6 Hasil uji identitas genistein	57
4.7 Hasil uji presisi repeatibilitas genistein.....	59
4.8 Hasil uji akurasi genistein dalam ekstrak etanol tempe kedelai.....	60
4.9 Kadar genistein pada ekstrak etanol tempe kedelai	61
4.10 Hasil uji presisi dan penetapan kadar isoflavon genistein pada krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M).....	65
4.11 Hasil uji presisi dan penetapan kadar isoflavon genistein pada krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe minyak dalam air (M/A).....	66
4.12 Hasil uji akurasi genistein dalam sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A	67
4.13 Hasil pengujian organoleptis krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A.....	68
4.14 Hasil pengujian pH krim ekstrak etanol tempe kedelai	69
4.15 Hasil pengujian viskositas krim ekstrak etanol tempe kedelai.....	70
4.16 Hasil pengujian daya sebar sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai	73

4.17 Hasil uji kesukaan krim ekstrak etanol tempe kedelai 74



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur kulit	5
2.2 Jalur biosintesis melanin	11
2.3 Tempe kedelai	15
2.4 Reaksi deglikosilasi isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon	17
2.5 Struktur setil alkohol	22
2.6 Struktur asam stearat	23
2.7 Struktur kimia gliserin	24
2.8 Struktur kimia tween 80	24
2.9 Struktur kimia span 80	25
2.10 Struktur kimia trietanolamin	25
2.11 Struktur kimia propilen glikol	26
2.12 Struktur kimia metil paraben	26
2.13 Struktur kimia propil paraben	27
3.1 Skema langkah kerja penelitian	31
4.1 Spektra standar genistein pada panjang gelombang 200 – 400 nm	51
4.2 Kurva linieritas massa vs area genistein	53
4.3 Kurva linieritas massa vs area genistein pada uji batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK)	55
4.4 Kromatogram pemisahan pada ekstrak etanol tempe kedelai	56
4.5a Spektra uji kemurnian genistein dalam standar dan sampel	56
4.5b Spektra uji identitas genistein dalam standar dan sampel	57
4.6a Hasil pembuatan sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M)	64
4.6b Hasil pembuatan sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe minyak dalam air (M/A)	64
4.7a Hasil pengamatan mikroskop krim air dalam minyak (A/M)	71

4.7b Hasil pengamatan mikroskop krim minyak dalam air (M/A) 71



DAFTAR RUMUS

	Halaman
3.1 % hambatan tirosinase.....	40



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Randemen Ekstrak Etanol Tempe Kedelai.....	86
B. Data Validasi Ekstrak Etanol Tempe Kedelai dengan metode KLT-Densitometer.....	86
C. Perhitungan Pembuatan Dapar Fosfat 50 mM pH 6,5.....	92
D. Perhitungan Larutan Substrat L-Tirosin 1Mm	93
E. Contoh Perhitungan Preparasi Standar Genistein dan Sampel.....	93
F. Data % Hambatan Tirosinase dan IC ₅₀	94
G. Perhitungan Dosis Ekstrak Etanol Tempe Kedelai untuk Formula Krim	102
H. Perhitungan % tween 80 dan % Span 80 dalam Formula Krim Air dalam Minyak (A/M).....	102
I. Data Hasil Uji Presisi dan Penetapan Kadar Isoflavon Genistein pada Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai.....	104
J. Data Akurasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe kedelai	108
K. Data Evaluasi Fisik Dan Kimia Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai	109
L. Data Hasil Uji Kesukaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai Tipe A/M dan M/A	112
M.Data Hasil Analisis dengan Uji SPSS	115
N. Gambar Hasil Penelitian.....	126
O. Kusioner Uji Kesukaan	131

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Kulit merupakan bagian terluar tubuh manusia yang berperan penting sebagai pertahanan tubuh terhadap berbagai gangguan eksternal baik fisik, kimiawi maupun biologis seperti tekanan, gesekan, tarikan, zat-zat kimia iritan, panas atau dingin, jamur, bakteri, atau virus. Salah satu fungsi utama kulit adalah melindungi tubuh dari paparan sinar ultra violet (UV) (Mitsui, 1997; Wasitaatmadja, 1997). Efek paparan sinar ultra violet yang berbahaya dapat dicegah melalui perlindungan alami kulit yaitu dengan pembentukan melanin (Chang, 2009).

Melanin merupakan pigmen warna kulit yang dibentuk dalam organel melanosom di sel melanosit yang terletak di bagian epidermis kulit. Mekanisme awal pembentukan melanin dikatalisis oleh enzim tirosinase. Enzim tirosinase merupakan enzim katalitik yang mampu mengkatalisis reaksi hidroksilasi tirosin menjadi dihidroksi fenilalanin atau DOPA. Selanjutnya enzim tirosinase akan mengkatalisis oksidasi DOPA menjadi dopakuinon (senyawa kuinon). Dopakuinon yang terbentuk memiliki kereaktifan yang tinggi sehingga akan bereaksi secara spontan membentuk dopakrom melalui auto-oksidasi hingga terbentuk melanin yaitu eumelanin (pigmen warna coklat) dan feomelanin (pigmen warna kemerahan) (Gupta, 2001; Chang *et al.*, 2005; Chang, 2009; Ramsden *et al.*, 2010). Apabila produksi melanin berlebihan atau distribusi melanin tidak merata di bagian-bagian tertentu kulit, maka dapat menyebabkan hiperpigmentasi sehingga kulit tampak menjadi lebih coklat dan timbul noda hitam pada bagian-bagian tertentu kulit, salah satunya adalah kulit bagian wajah (Cayce *et al.*, 2004; Tai *et al.*, 2009).

Proses pembentukan melanin yang berlebihan pada tubuh manusia dapat direduksi dengan beberapa mekanisme yaitu menghambat aktivitas enzim tirosinase,

mengganggu transfer melanosom, meningkatkan pergantian lapisan epidermis, dan menghambat proses transkripsi dan translasi enzim melanogenik (Ebanks *et al.*, 2009). Hambatan tirosinase merupakan salah satu mekanisme depigmentasi yang sering digunakan, karena enzim tirosinase bersifat spesifik hanya diproduksi oleh sel melanosit. Apabila enzim tirosinase dihambat maka produksi melanin akan berkurang sehingga dapat meningkatkan kecerahan kulit (Chang, 2012; Juwita *et al.*, 2011).

Produk pemutih kulit atau *skin whitening* merupakan produk yang mengandung bahan aktif yang dapat menghambat produksi melanin agar jumlah melanin tidak berlebih sehingga akan memberikan warna kulit yang lebih putih (BPOM, 2007). Beberapa bahan aktif kimia sintetis yang banyak digunakan dalam produk pemutih kulit antara lain hidrokuinon, merkuri, dan kombinasi hidrokuinon dengan asam retinoat. Namun penggunaan bahan aktif kimia sintetis tersebut dapat menimbulkan efek samping yang berbahaya, seperti hidrokuinon dapat menyebabkan pengelupasan lapisan luar pelindung kulit, iritasi, kulit menjadi kemerahan (eritema), rasa terbakar, dan gangguan pigmentasi yang *irreversibel* sehingga penggunaan hidrokuinon dibatasi oleh BPOM sebesar 1-2% (BPOM, 2007).

Efek samping yang berbahaya dari penggunaan bahan aktif kimia sintesis sebagai produk pemutih menyebabkan mulai dikembangkan produk pemutih alami menggunakan hasil ekstraksi bahan alam. Bahan alam yang sudah banyak digunakan sebagai agen pemutih kulit yaitu ekstrak *Licorice*, ekstrak *Mulberry*, ekstrak *Camelia sinensis*, ekstrak *Aloe barbadensis* dan lain-lain yang bekerja dengan menghambat enzim tirosinase (Kamakshi, 2011). Menurut Gupta (2001) konsentrasi ekstrak tanaman dalam sediaan pemutih kulit yaitu 1-10%.

Salah satu senyawa alam yang memiliki aktivitas menghambat enzim tirosinase adalah senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid digolongkan menjadi beberapa kelompok, salah satunya adalah senyawa isoflavon. Senyawa isoflavon banyak terdapat pada tanaman kacang-kacangan seperti kedelai. Bentuk isoflavon pada biji kedelai berupa bentuk glikosida dan aglikon (Chang *et al.*, 2009). Chang *et al.* (2005) telah mengisolasi senyawa isoflavon dari kedelai koji yang difermentasi

dengan *Aspergillus oryzae* BCRC 32288, senyawa tersebut yaitu 6,7,4'-trihidroksi isoflavon, daidzein, glisitein, dan genistein yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase (Chang *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007).

Tempe merupakan makanan tradisional Indonesia yang berasal dari fermentasi kedelai (*Glycine max* L.Merr) oleh jamur *Rhizopus* spp seperti *R. oligosporus*, *R. Stolonifer*, dan *R. Oryzae* (Nurrahman *et al.*, 2013; Kasmidjo, 1990). Tempe mengandung senyawa isoflavon aglikon yang lebih tinggi dari kedelai karena dalam proses fermentasi jamur *Rhizopus* spp menghasilkan enzim β -glukosidase yang dapat mengubah bentuk senyawa isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon yang memiliki aktivitas biologi yang lebih tinggi melalui proses deglikosilasi. Senyawa isoflavon glikosida dalam biji kedelai meliputi daidzin, genistin, dan glisitin. Senyawa isoflavon aglikon meliputi genistein (5,7,4'-trihidroksi isoflavon), daidzein (7,4'-dihidroksi isoflavon), serta glisitein (6-metoksi-7,4'-dihidroksi isoflavon) yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase (Pratt dan Hudson, 1985; Pawiroharsono, 2001; Kang *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2011; Nurrahman *et al.*, 2013; Chang, 2014).

Berdasarkan latar belakang tersebut, dilakukan penelitian mengenai formulasi krim ekstrak etanol tempe kedelai sebagai agen pemutih alami. Sebelum dilakukan proses formulasi, akan dilakukan uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase secara *in-vitro* dari ekstrak etanol tempe kedelai untuk mendapatkan nilai *Inhibitor Concentration* (IC₅₀). Selanjutnya ekstrak etanol tempe kedelai diformulasi menjadi bentuk sediaan krim air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A). Dipilih sediaan krim karena sediaan krim memiliki banyak kelebihan dibandingkan bentuk sediaan lainnya yaitu penyebarannya merata di permukaan kulit, nyaman digunakan di kulit wajah, dan tidak lengket di kulit (Ansel, 2005). Selanjutnya dilakukan uji kesukaan menggunakan metode kuisisioner untuk mengetahui respon kesukaan konsumen terhadap sediaan krim air dalam minyak (A/M) dan krim minyak dalam air (M/A) meliputi tekstur, warna, bau dan konsistensi krim ketika dioleskan di kulit (Rimawi, 2014).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Bagaimanakah aktivitas ekstrak etanol tempe kedelai dalam menghambat enzim tirosinase (IC_{50}) ?
2. Bagaimanakah pengaruh formulasi terhadap kadar isoflavon genistein dalam sediaan krim air dalam minyak (A/M) dan krim minyak dalam air (M/A)?
3. Bagaimanakah respon kesukaan konsumen terhadap sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) sebagai agen pemutih alami?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini diantaranya adalah :

1. Mengetahui aktivitas ekstrak etanol tempe kedelai dalam menghambat enzim tirosinase (IC_{50}).
2. Mengetahui pengaruh formulasi terhadap kadar isoflavon genistein dalam sediaan krim air dalam minyak (A/M) dan krim minyak dalam air (M/A).
3. Mengetahui respon kesukaan konsumen terhadap sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) sebagai agen pemutih alami.

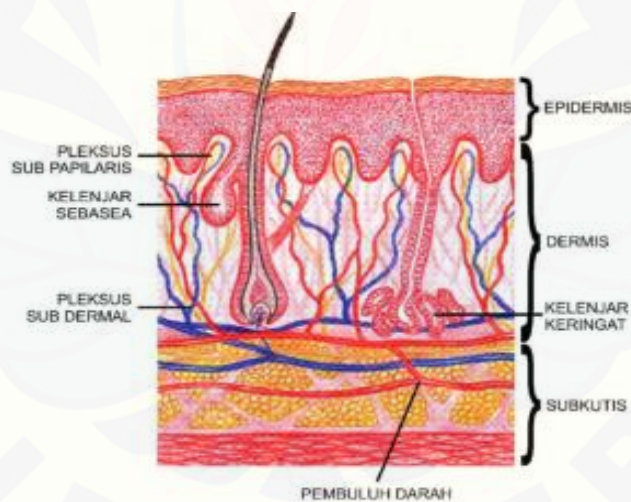
1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah yang bermanfaat mengenai formulasi sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai sehingga menghasilkan sediaan pemutih alami yang memiliki efek memutihkan kulit dan dapat diterima oleh masyarakat.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Kulit

Kulit merupakan suatu lapisan yang menutupi permukaan tubuh dan memiliki fungsi utama sebagai pelindung dari berbagai macam gangguan dan rangsangan luar. Luas kulit manusia rata-rata \pm 2 meter persegi dengan berat 10 kg jika dengan lemaknya atau 4 kg tanpa lemak (Tranggono dan Latifah, 2007). Tebalnya kulit bervariasi mulai 0,5 mm sampai 6 mm tergantung dari letak, umur dan jenis kelamin. Kulit tipis terletak pada kelopak mata, penis, labium minus dan kulit bagian medial lengan atas, sedangkan kulit tebal terdapat pada telapak tangan, telapak kaki, punggung, bahu dan bokong (Perdanakusuma, 2007).



Gambar 2.1 Struktur kulit (Perdanakusuma, 2007)

2.1.1 Anatomi Kulit

Kulit secara embriologis terbagi atas dua lapisan utama yaitu epidermis (kulit ari) sebagai lapisan epitel paling luar berasal dari ektoderm dan dermis (korium,

kutis, kulit jangat) sebagai lapisan dalam yang berasal dari mesoderm. Di bawah dermis terdapat subkutis atau jaringan lemak bawah kulit (Tranggono dan Latifah, 2007; Perdanakusuma, 2007). Struktur kulit dapat dilihat pada Gambar 2.1.

a. Epidermis

Epidermis merupakan bagian kulit paling luar yang tipis, avaskuler, dan terdiri dari sel epitel berlapis pipih bertanduk, keratinosit, mengandung sel melanosit, langerhans dan merkel (Perdanakusuma, 2007). Epidermis terdiri dari lima lapisan yaitu:

1) Stratum korneum (lapisan tanduk)

Stratum korneum terdiri atas beberapa lapis sel yang pipih dengan ketebalannya 20-30 lapisan dan $\frac{3}{4}$ dari ketebalan epidermis, sel mati, tidak memiliki inti, tidak mengalami proses metabolisme, tidak berwarna, dan sangat sedikit mengandung air. Lapisan ini sebagian besar terdiri atas keratin yaitu protein yang tidak larut dalam air, dan sangat resisten terhadap bahan-bahan kimia, hal ini berkaitan dengan fungsi kulit untuk memproteksi tubuh dari pengaruh luar. Secara alami, sel-sel yang sudah mati dipermukaan kulit akan melepaskan diri untuk beregenerasi (Tranggono dan Latifah, 2007).

2) Stratum lusidum (lapisan jernih)

Stratum lusidum terletak tepat di bawah stratum korneum, merupakan lapisan tipis, jernih, mengandung eleidin, sangat tampak jelas pada telapak tangan dan telapak kaki. Antara stratum lucidum dan stratum granulosum terdapat lapisan keratin tipis yang disebut *rein's barrier* yang tidak bisa ditembus (*impermeable*) (Tranggono dan Latifah, 2007).

3) Stratum granulosum (lapisan berbutir-butir)

Stratum granulosum tersusun oleh sel-sel keratinosit yang berbentuk poligonal pipih dengan inti ditengah dan sitoplasma terisi oleh granula basofilik kasar yang dinamakan granula keratohialin yang mengandung protein kaya akan histidin. Pada lapisan granulosum terdapat sel Langerhans, tidak memiliki mukosa dan tampak jelas pada telapak tangan dan kaki (Perdanakusuma, 2007).

4) Stratum spinosum (lapisan malphigi)

Stratum spinosum memiliki sel yang berbentuk kubus dan seperti berduri, berinti besar dan oval. Setiap sel berisi filamen-filamen kecil yang terdiri atas serabut protein yang dinamakan tonofibril yang berfungsi untuk mempertahankan kohesi sel dan melindungi terhadap efek abrasi. Diantara sel-sel stratum spinosum terdapat sel Langerhans yang berperan dalam sistem imun tubuh (Tranggono dan Latifah, 2007; Perdanakusuma, 2007; Wasitaatmadja, 1997).

5) Stratum germinativum atau membran basal (lapisan basal)

Stratum germinativum merupakan lapisan terbawah epidermis. Di dalam stratum germinativum terdapat sel-sel melanosit, yaitu sel-sel yang tidak mengalami keratinisasi dan fungsinya hanya membentuk pigmen melanin dan melalui dendrit diberikan ke sel-sel keratinosit. Satu sel melanin untuk sekitar 36 sel keratinosit disebut unit melanin epidermal (Tranggono dan Latifah, 2007).

Adapun fungsi epidermis adalah sebagai proteksi kulit untuk melawan stimuli dari luar seperti dehidrasi, sinar ultraviolet dan faktor fisik lainnya seperti faktor kimia, organisasi sel, tempat untuk mesintesis vitamin D dan sitokin, pembelahan dan mobilisasi sel, pigmentasi kulit (melanosit) dan pengenalan alergen (sel Langerhans) (Perdanakusuma, 2007; Mitsui, 1997).

a. Dermis

Dermis merupakan lapisan yang lebih dalam dari epidermis, terdiri dari serabut kolagen dan elastin yang berada di dalam substansi dasar yang bersifat koloid dan terbuat dari gelatin mukopolisakarida. Serabut kolagen dapat mencapai 72% dari keseluruhan berat kulit manusia bebas lemak. Dermis mempunyai banyak jaringan pembuluh darah, dan di dalam dermis terdapat adneksa kulit seperti folikel rambut, papila rambut, kelenjar keringat, saluran keringat, kelenjar sebacea, otot penegak rambut, ujung pembuluh darah dan ujung saraf, juga sebagian serabut lemak yang terdapat pada lapisan lemak bawah kulit (hipodermis) (Tranggono dan Latifah, 2007). Adapun fungsi dermis yaitu sebagai struktur penunjang, *mechanical strength*, suplai nutrisi, menahan *shearing forces* dan respon inflamasi (Perdanakusuma, 2007).

b. Hipodermis (subkutis)

Hipodermis atau subkutis terdiri atas jaringan ikat longgar berisi sel-sel lemak yang menghubungkan kulit secara longgar dengan jaringan di bawahnya. Sel lemak merupakan sel bulat, besar dengan inti terdesak ke pinggir karena sitoplasma lemak yang bertambah. Pada lapisan sel lemak terdapat ujung-ujung saraf tepi, pembuluh darah, dan saluran getah bening. Lapisan sel lemak disebut panikulus adiposus berfungsi sebagai cadangan makanan, menunjang suplai darah ke dermis untuk regenerasi, melekat ke struktur dasar, mengisolasi panas, mengontrol bentuk tubuh dan *mechanical shock absorber* (Wasitaatmadja, 1997; Perdanakusuma, 2007).

2.1.2 Fungsi Kulit

a. Fungsi perlindungan

Kulit melindungi tubuh dari berbagai gangguan eksternal, baik fisik kimiawi maupun biologis meliputi tekanan, gesekan, tarikan, zat-zat kimia iritan, gangguan panas atau dingin, gangguan sinar ultraviolet, gangguan kuman, jamur, bakteri, atau virus. Serabut elastis pada dermis dan jaringan lemak subkutan berfungsi untuk mencegah gangguan fisik dan mekanik pada tubuh bagian dalam. Lapisan tanduk dan mantel lemak kulit menjaga kadar air dengan mencegah masuknya air dari luar tubuh dan penguapan air, serta sebagai *barrier* terhadap racun dari luar. Mantel asam kulit dapat mencegah pertumbuhan bakteri dikulit. Sel melanin dapat menyerap sebagian sinar ultraviolet (Mitsui, 1997; Wasitaatmadja, 1997).

b. Fungsi pengaturan panas

Pengaturan suhu tubuh diatur dengan mekanisme pengeluaran keringat dan dilatasi atau konstiksi pembuluh darah kapiler kulit (Mitsui, 1997).

c. Fungsi sensoris

Kulit bertanggung jawab sebagai indera terhadap adanya rangsangan luar. Rangsangan tersebut kemudian diterima oleh reseptor dan diteruskan ke sistem saraf pusat yang selanjutnya diinterpretasi oleh korteks serebri. Reseptor - reseptor yang

terdapat di kulit antara lain *Meissner* sebagai reseptor raba, *Pacini* sebagai reseptor tekanan, *Ruffini* dan *Krausse* sebagai reseptor suhu, dan *Nervus End Plate* sebagai reseptor nyeri (Mitsui, 1997).

d. Fungsi absorpsi

Absorpsi melalui kulit terdiri dari dua jalur, yaitu melalui epidermis dan melalui kelenjar sebacea. Bahan-bahan yang mudah larut dalam lemak akan lebih mudah diabsorpsi dibandingkan dengan air ataupun bahan yang dapat larut dalam air (Mitsui, 1997). Kemampuan absorpsi kulit dipengaruhi oleh tebal tipisnya kulit, hidrasi, kelembaban udara, metabolisme, dan jenis pembawa zat yang menempel di kulit (Wasitaatmadja, 1997).

e. Fungsi ekskresi

Kelenjar - kelenjar pada kulit mengeluarkan zat-zat yang tidak berguna atau sisa metabolisme dalam tubuh misalnya NaCl, urea, asam urat, ammonia, dan sedikit lemak (Wasitaatmadja, 1997).

f. Fungsi pembentukan pigmen (melanogenesis)

Sel pembentuk pigmen melanin kulit yaitu melanosit terletak di stratum germinativum atau lapisan basal. Sel melanosit berasal dari rige saraf, jumlahnya 1:10 dari sel basal. Sinar matahari mempengaruhi produksi melanin, semakin lama kulit terpapar sinar matahari maka produksi melanin akan meningkat (Wasitaatmadja, 1997).

g. Fungsi keratinisasi

Keratinisasi dimulai dari sel basal kuboid bermitosis ke atas sehingga bentuknya menjadi lebih poligonal yaitu sel spinosum, terangkat keatas menjadi lebih pipih, dan bergranula menjadi sel granulosum, kemudian sel tersebut terangkat ke atas menjadi lebih pipih dan granula serta intinya hilang dan akhirnya sampai dipermukaan kulit menjadi sel tanduk yang mati, protoplasmanya mengering menjadi keras, pipih, tak berinti. Proses ini berlangsung terus - menerus pada lapisan epidermis disebut *Cel Turn Over Time* dan berguna untuk rehabilitasi kulit agar dapat

melaksanakan fungsinya dengan baik (Tranggono dan Latifah, 2007; Wasitaatmadja, 1997).

h. Fungsi produksi vitamin D

Kulit juga dapat memproduksi vitamin D dari 7-dihidroksikolesterol dengan bantuan sinar matahari (Wasitaatmadja, 1997).

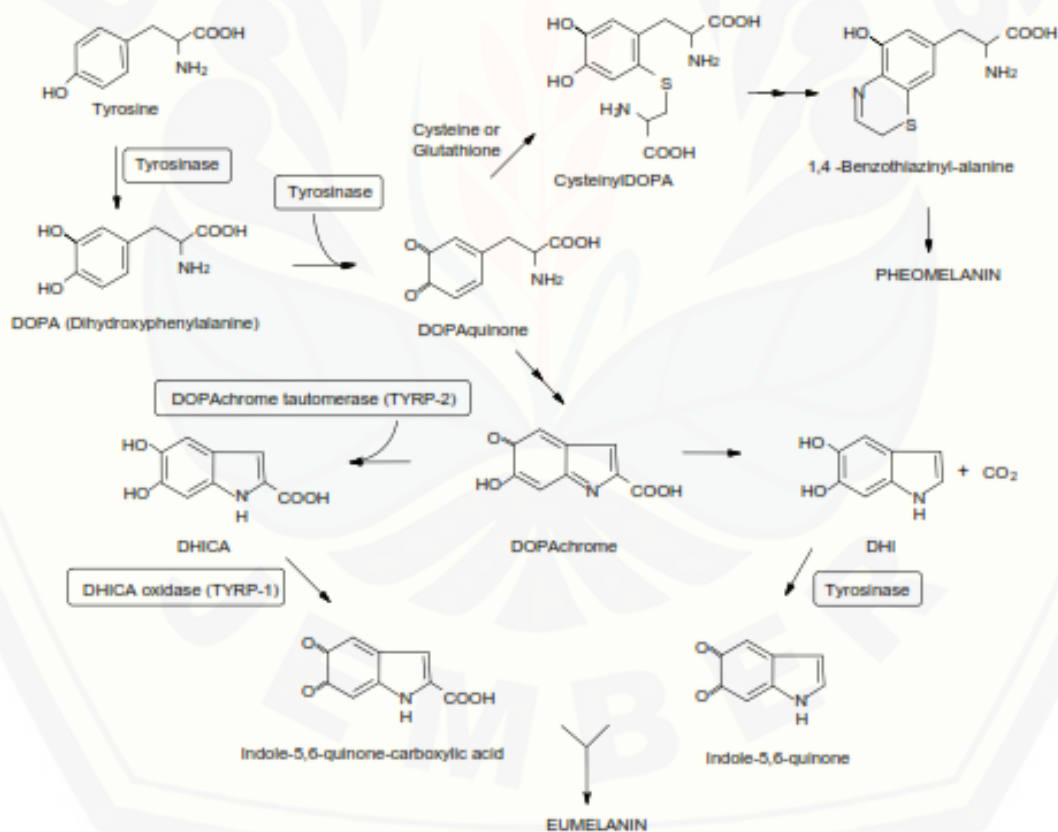
2.2 Tinjauan Tentang Proses Pigmentasi Kulit

Melanin merupakan pigmen penentu warna kulit yang paling penting di lapisan epidermal kulit. Melanin ditransfer di dekat keratinosit melalui dendrit dari melanosit. Dalam kulit manusia, melanosit terdiri atas antara 1 hingga 7 atau 8 sel basal dalam lapisan basal epidermal, akar rambut dan selubung akar terluar. Densitas tidak mempengaruhi variasi antara ras yang berbeda. Oleh karena itu, variasi warna kulit ras disebabkan oleh perbedaan produksi melanosom dalam tiap melanosit, jumlah melanosom yang ditransfer ke keratinosit, dan derajat kematangan dan dispersi melanosom dalam keratinosit (Mitsui, 1997). Satu sel melanosit dikelilingi oleh sekitar 36 sel keratinosit, dan kesatuan ini dinamakan unit melanin epidermal (Tranggono dan Latifah, 2007).

Melanin dibentuk dengan beberapa tahapan reaksi yang dikatalisis oleh enzim dalam melanosom. Pembentukan melanin diawali dengan enzim tirosinase mengkatalisis hidrosilasi tirosin menjadi dihidroksi fenilalanin atau DOPA. DOPA merupakan kofaktor dalam proses oksidasi berikutnya dan sebagai substrat enzim tirosinase. DOPA akan teroksidasi menjadi dopakuinon dikatalisis oleh enzim tirosinase. Dopakuinon yang terbentuk memiliki kereaktifan yang tinggi sehingga akan bereaksi secara spontan membentuk dopakrom melalui auto-oksidasi hingga terbentuk melanin (Chang, 2009). Melanin yang terbentuk ada dua tipe yaitu eumelanin dan feomelanin. Eumelanin (pigmen warna coklat) terbentuk melalui serangkaian reaksi oksidasi dari dihidroksiindol (DHI) dan asam dihidroksiindol - 2 - karboksilat (DHICA) yang merupakan produk reaksi dari dopakrom (Chang, 2009).

Eumelanin akan memberikan warna kulit coklat dan putih (Gupta, 2001), sedangkan feomelanin (pigmen warna kuning) dapat memberikan warna kulit kuning agak kemerahan karena adanya sistein atau glutathion yang mengkonversi dopakuinon menjadi sisteinil dopa atau glutathionil dopa (Chang, 2009).

Sintesis melanin merupakan reaksi berurutan yang berlangsung secara spontan pada nilai pH fisiologis dengan adanya enzim tirosinase, *tyrosinase related protein 1* (TYRP1) dan *DOPAcrome tautomerase* (TYRP2) serta enzim lain yang terlibat dalam jalur melanogenik. Melanin berperan penting dalam melindungi kulit manusia dari efek radiasi sinar UV matahari yang berbahaya dan menentukan warna kulit manusia (Chang, 2009). Adapun jalur biosintesis melanin ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Jalur biosintesis melanin (Ebanks *et al.*, 2009)

2.3 Tinjauan Tentang Gangguan Proses Pigmentasi Kulit

Melanin memiliki fungsi fotoprotektif pada kulit manusia, namun akumulasi dari jumlah melanin yang abnormal karena produksi melanin secara berlebihan atau distribusi melanin yang tidak merata pada epidermis, dermis atau keduanya menyebabkan kulit menjadi terlihat lebih gelap dan timbul noda hitam pada bagian-bagian tertentu kulit sehingga menghasilkan bercak yang berpigmen yang mungkin menjadi masalah estetika menyebabkan gangguan pigmen wajah hiperpigmentasi kulit (Cayce *et al.*, 2004).

Adapun gangguan hiperpigmentasi yang lebih umum meliputi:

a. Melasma

Melasma adalah gangguan pigmentasi yang ditandai dengan peningkatan melanin secara lambat, hipermelanosis simetris dengan warna yang tidak teratur mulai dari coklat muda hingga abu-abu dan coklat tua. Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap perkembangan melasma meliputi paparan sinar UV, kehamilan, terapi hormon, pengaruh genetik, kosmetik tertentu, disfungsi endokrin atau hepatic (Cayce *et al.*, 2004).

b. Lentigo

Lentigo merupakan bintik-bintik coklat akibat peningkatan jumlah melanosit di epidermis. Lentigo mencakup berbagai lesi hiperpigmentasi, meliputi lentigo simpleks, spilus nevus, lentigo *agminated*, solar lentigo, dan lentigo maligna. Bagian tubuh yang sering mengalami solar lentigo meliputi punggung tangan, wajah, lengan, punggung, leher, dan dada (Cayce *et al.*, 2004).

c. Hiperpigmentasi Postinflamasi

Hiperpigmentasi postinflamasi ditandai dengan adanya makula yang memisah secara samar dengan tepi berbulu disebabkan karena terjadi peradangan, erupsi pada kulit seperti jerawat, dermatitis kontak, dermatitis atopik, trauma dan ruam. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya melanin yang banyak di dasar epidermis, terutama pada orang-orang berkulit coklat tua yang beresiko tinggi mengalami hiperpigmentasi dibandingkan orang berkulit putih (Cayce *et al.*, 2004).

2.4 Tinjauan Tentang Enzim Tirosinase

Enzim adalah polimer biologis yang mengkatalisis reaksi kimia. Enzim yang mengkatalisis perubahan satu atau lebih senyawa (substrat) menjadi satu atau lebih senyawa lain (produk) meningkatkan laju reaksi setidaknya 10^6 kali dibandingkan jika tidak dikatalisis (Murray *et al.*, 2006).

Enzim tirosinase (EC 1.14.18.1) merupakan enzim mono-oksigenase yang memiliki ion logam tembaga (Cu) dengan berat molekul sebesar 113.000 dalton (Warrington dan Saville, 1999). Enzim ini terdapat pada mikroorganisme, tanaman dan hewan. Pada jamur dan vertebrata, enzim tirosinase berperan sebagai katalisator dalam pembentukan pigmen melanin dimana gugus ion tembaga (Cu) dalam enzim merupakan suatu *active site* yang dapat berikatan dengan substrat hingga terbentuk melanin (Chang, 2009). Enzim tirosinase mengkatalisis reaksi pembentukan melanin yakni enzim tirosinase mengkatalisis reaksi hidroksilasi asam amino tirosin menjadi dihidroksi fenilalanin atau DOPA. DOPA merupakan kofaktor dalam proses oksidasi berikutnya dan sebagai substrat enzim tirosinase, selanjutnya enzim tirosinase mengkatalisis oksidasi DOPA menjadi dopakuinon (senyawa kuinon). Dopakuinon yang terbentuk memiliki kereaktifan yang tinggi sehingga akan bereaksi secara spontan membentuk dopakrom melalui auto-oksidasi hingga terbentuk melanin (Chang, 2009; Ramsden *et al.*, 2010).

Enzim tirosinase juga terdapat dalam tanaman. Jika jaringan tanaman mengalami luka maka akan terjadi proses oksidasi oleh tirosinase yang menyebabkan terjadinya pencoklatan. Enzim tirosinase dapat diekstraksi dari jamur *Streptomyces glausescens*, jamur *Neurospora crassa* dan *Agricus bisporus* yang homolog dengan tirosinase mamalia dan sangat sesuai untuk uji melanogenesis secara *in - vitro* (Chang, 2012).

2.5 Tinjauan Tentang Hambatan Enzim Tirosinase

Hambatan enzim tirosinase atau hambatan melanogenesis, yakni senyawa yang dapat mengganggu pembentukan melanin, baik secara langsung menghambat atau hanya berinteraksi dengan enzim (Chang, 2009). Chang (2012) menyebutkan bahwa penghambatan aktivitas enzim tirosinase merupakan mekanisme depigmentasi yang paling sering digunakan, karena penghambatan bersifat spesifik dengan target melanogenesis di sel melanosit tanpa menimbulkan efek samping.

Menurut Chang (2009), agen hambatan enzim tirosinase dapat dikelompokkan menjadi lima golongan yaitu senyawa polifenol, turunan benzaldehid dan benzoat, steroid dan lipid rantai panjang, hambatan alami atau sintetik, agen inaktivator ireversibel berdasarkan struktur kimia atau mekanisme penghambatan. Polifenol merupakan senyawa yang termasuk kelompok terbesar sebagai hambatan tirosinase. Flavonoid termasuk senyawa polifenol yang paling banyak tersebar di daun, biji, kayu, dan bunga pada tanaman. Flavonoid dapat dibagi ke dalam tujuh kelompok yaitu flavon, flavonol, flavanon, flavanol, isoflavon, kalkon dan katekin.

Senyawa isoflavon merupakan golongan flavonoid yang dapat menghambat aktivitas enzim tirosinase dengan mengkhelat logam tembaga (Cu) yang merupakan *active site* enzim tirosinase akibat adanya gugus hidroksil pada cincin A dan B pada isoflavon (gugus OH pada C6 - C8 dan C4') (Chang, 2009). Posisi gugus hidroksil dan jumlah gugus hidroksil memiliki peranan penting dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase. Semakin banyak jumlah gugus OH pada cincin benzen, maka semakin kuat dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase, sedangkan, adanya gugus metil dan konjugat gula pada cincin benzen dapat menurunkan aktivitas penghambatan (Kim *et al.*, 2006).

2.6 Tinjauan Tentang Tempe Kedelai

Tempe adalah makanan tradisional Indonesia yang dibuat dari kedelai (*Glycine max* L.Merr) yang difermentasi oleh jamur *Rhizopus* spp seperti

R. oligosporus, *R. Stolonifer* dan *R. Oryzae* dengan karakteristik berwarna putih, tekstur kompak, dan rasa khas dari jamur dan kedelai (Gambar 2.3). Warna putih disebabkan oleh miselia jamur yang tumbuh pada permukaan biji-bijian. Tekstur yang kompak juga disebabkan oleh miselia-miselium jamur yang menghubungkan antara biji-biji. Rasa yang khas dan spesifik tempe disebabkan karena terjadi degradasi komponen-komponen dalam kedelai selama proses fermentasi (Nurahman *et al.*, 2013; Kasmidjo, 1990).



Gambar 2.3 Tempe kedelai (Sukiadi, 2014)

2.6.1 Kandungan Kimia Tempe Kedelai

Proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh jamur menghasilkan enzim β -glukosidase yang dapat mendekomposisi protein, lemak dan karbohidrat sehingga terjadi peningkatan nilai gizi karena tempe mengandung komposisi kimia yang tinggi yaitu kelembaban 65%, 17,5% protein yang mudah dicerna dan asam amino yang tinggi, 9,2% lemak, 7,6% karbohidrat, 0,6% abu, asam lemak bebas, vitamin E, vitamin C serta mengandung zat anti nutrien seperti antitripsin dan asam fitat lebih rendah di tempe daripada di kedelai. Proses fermentasi juga dapat menyebabkan peningkatan proses biotransformasi dan biosintesa senyawa aktif yaitu senyawa isoflavon aglikon yang lebih banyak daripada kedelai meliputi daidzein, genistein, dan glisitein. (Suparmo dan Markakis, 1987; Ferreira *et al.*, 2011 ; Nurrahman *et al.*, 2013; Haron *et al.*, 2009; Frias *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011). Song *et al.* (1998) telah menganalisis kandungan dan jumlah isoflavon aglikon pada tempe meliputi

daidzein sebesar 318 µg/gram, genistein sebesar 518 µg/gram, dan glisitein sebesar 31 µg/gram, selain itu dalam tempe kedelai juga mengandung isoflavon glikosida, isoflavon malonil glikosida, dan isoflavon asetil glikosida dengan jumlah yang lebih kecil dibanding isoflavon aglikon.

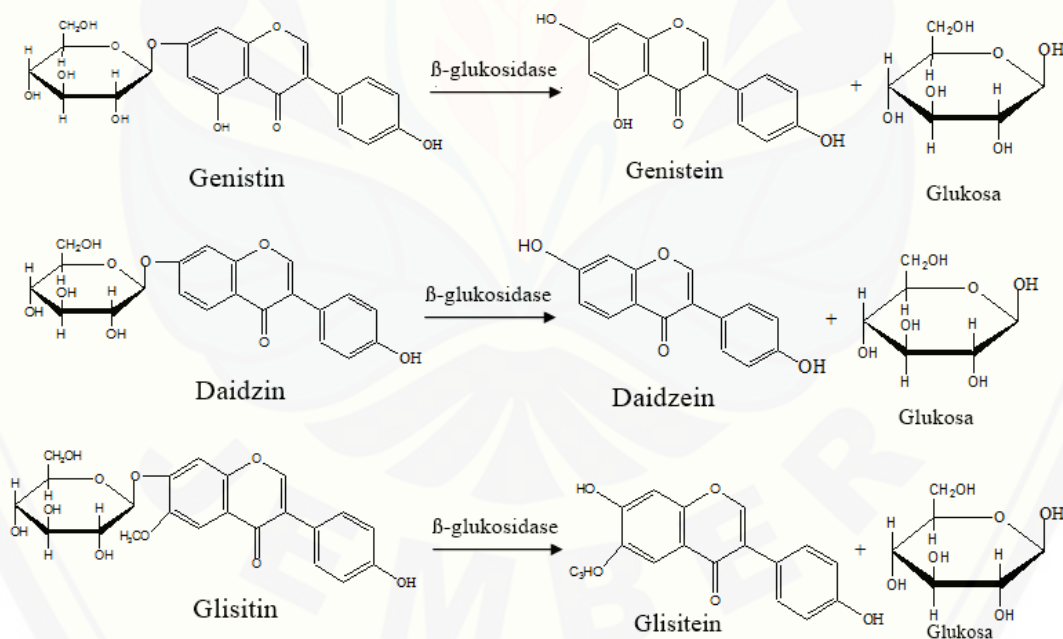
2.6.2 Isoflavon pada Tempe Kedelai

Isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesis oleh tanaman yang termasuk golongan senyawa flavonoid yang penyebarannya terbatas dan banyak terdapat pada tanaman kacang-kacangan (*Leguminoceae*) terutama kedelai (Harborne, 1973). Isoflavon yang terdiri atas struktur dasar C3 - C6, secara alami disintesis oleh tumbuh-tumbuhan dan senyawa asam amino aromatik fenilalanin atau tirosin dan tidak disintesis oleh mikroorganisme (Pawiroharsono, 2001).

Proses fermentasi kedelai menjadi tempe dapat menyebabkan terjadi proses biokonversi senyawa isoflavon glikosida yang berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan - O - glikosidik meliputi daidzin, genistin dan glisitin. Isoflavon glikosida akan terdeglisosilasi oleh enzim β - glukosidase sehingga dapat membebaskan senyawa gula dan senyawa isoflavon bebas yaitu isoflavon aglikon yang memiliki aktivitas biologi lebih tinggi yaitu genistein (*5,7,4'*- trihidroksi isoflavon) dan glukosa, daidzein (*7,4'*- dihidroksi isoflavon) dan glukosa, serta glisitein (*6 - metoksi - 7,4'*- dihidroksi isoflavon) dan glukosa (Pratt dan Hudson, 1985; Pawiroharsono, 2001; Chang, 2014). Nakajima *et al* (2005) juga melaporkan bahwa jumlah aglikon meningkat dengan waktu fermentasi, dan secara efektif dua kali lipat setelah fermentasi 24 jam. Senyawa isoflavon aglikon daidzein dan genistein dapat mengalami transformasi lebih lanjut membentuk senyawa baru, yaitu faktor-II (Pawiroharsono, 2001). Senyawa faktor-II ini hanya terdapat pada tempe, tidak dijumpai pada kedelai yang tidak difermentasi (Ariani, 2001).

Enzim β -glukosidase (β -glukosida glukohidrolase) merupakan enzim yang berperan utama dalam metabolisme karbohidrat yang berlangsung di bakteri. Enzim β -glukosidase merupakan enzim yang terdapat pada tanaman, bakteri dan jamur (Kuo dan Lee, 2008). Enzim ini memiliki peranan penting dalam proses biotransformasi, seperti degradasi selulosa (Khan dan Akhtar, 2010), sianogenik glikosida (Lei *et al.*, 1999), dan perubahan flavonoid glikosida (Marotti *et al.*, 2007).

Deglikosilasi merupakan proses penghilangan glikosil akibat aktivitas glikosil hidrolase, seperti β -glukosidase. Enzim β -glukosidase menyerang glukosa yang berikatan pada flavonoid posisi C3 dan C7. Enzim ini memiliki kemampuan untuk dapat menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidat pada aril dan alkil β -D-glukosida (Huynh *et al.*, 2014). Gambar 2.4 menunjukkan proses deglikosilasi isoflavon glikosida dengan adanya enzim β -glukosidase menghasilkan isoflavon aglikon dan glukosa.



Gambar 2.4 Reaksi deglikosilasi isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon (Ariani, 2003; Pandit *et al.*, 2011)

2.6.3 Aktivitas Farmakologi Tempe Kedelai

Tempe mengandung isoflavon aglikon daidzein dan genistein yang lebih tinggi dari kedelai. Daidzein dan genistein adalah fitoestrogen yang berpotensi sebagai agen pemutih kulit, agen antioksidan yang dapat melindungi DNA dari serangan radikal bebas, estrogenik, anti estrogenik, antikanker, antivirus, anti jamur (Mazur, 1998; Haron *et al.*, 2009). Genistein dapat menghambat enzim tirosinase sehingga enzim tirosinase akan mengalami *down* regulasi dan menyebabkan terjadi penghambatan proses melanogenesis sehingga dapat digunakan sebagai agen pemutih kulit, selain itu genistein secara kimia bertindak sebagai antioksidan yang dapat melawan oksigen reaktif (Kang *et al.*, 2003; Chang, 2014).

Chang *et al.* (2005) telah mengisolasi senyawa dari kedelai koji yang difermentasi dengan *Aspergillus oryzae* BCRC 32288, senyawa tersebut yaitu 6,7,4'-trihidroksi isoflavon, daidzein, glisitein, dan genistein. Keempat senyawa tersebut memiliki aktivitas hambatan tirosinase dengan IC₅₀ sebesar 0,009; 0,237; 0,264; dan 0,822 mM (Chang *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007). Penelitian juga telah dilakukan Chae dan Ha (2011) menunjukkan bahwa ekstrak etanol kedelai berfermentasi memiliki aktivitas hambatan enzim tirosinase yang lebih tinggi dibandingkan kedelai non-fermentasi. Ekstrak etanol kedelai berfermentasi memiliki nilai persen hambatan tirosinase sebesar 75,55%, sedangkan nilai persen hambatan tirosinase ekstrak etanol kedelai non-fermentasi sebesar 53,21%. Senyawa turunan isoflavon hasil isolasi dari kedelai Korea yang difermentasi (*Doenjang*) yaitu 7,8,4'-trihidroksi isoflavon dan 7,3',4'-trihidroksi isoflavon memiliki aktivitas hambatan enzim tirosinase dengan IC₅₀ sebesar 11,21 ± 0,8 µM dan 5,23 ± 0,6 µM. Kedua senyawa ini merupakan senyawa turunan isoflavon dengan gugus hidroksil pada cincin aromatis (Park *et al.*, 2010).

Isoflavon lainnya yaitu glisitein dan faktor II hanya ada di tempe. Faktor-II berpotensi tinggi dibanding dengan jenis isoflavon lainnya yaitu sebagai antioksidan yang 10 kali lebih besar aktivitasnya dari vitamin A dan sekitar 3 kali dari senyawa isoflavon aglikon lainnya dan berpotensi sebagai antihemolitik (Jha, 1985). Isoflavon

juga dapat mengurangi gejala menopause dan mengurangi resiko penyakit kronis seperti kardiovaskuler, hipertensi, osteoporosis, kanker payudara, kanker prostat dan kanker usus besar, aterosklerosis, diabetes melitus (Nurahman *et al.*, 2013; Kasmidjo, 1990; Chang, 2014).

2.7 Tinjauan Tentang Krim

Menurut FI III (1979) krim adalah sediaan setengah padat berupa emulsi mengandung air tidak kurang dari 60 % dan dimaksudkan untuk pemakaian luar. Menurut FI IV (1995) krim adalah bentuk sediaan setengah padat mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai. Istilah ini secara tradisional telah digunakan untuk sediaan setengah padat yang mempunyai konsistensi relatif cair diformulasi sebagai emulsi air dalam minyak atau minyak dalam air.

Stabilitas krim akan rusak jika terganggu sistem pencampurannya terutama disebabkan perubahan suhu dan perubahan komposisi disebabkan penambahan salah satu fase secara berlebihan ataupun pencampuran dua tipe krim jika zat pengemulsinya tidak tercampurkan satu sama lain. Pengenceran krim hanya dapat dilakukan jika diketahui pengencer yang cocok yang harus dilakukan teknik aseptik (Depkes, 1979). Krim mudah digunakan dan diaplikasikan pada kulit serta banyak dijumpai pada sebagian besar formulasi. Krim lebih disukai dibandingkan dengan salep karena memiliki daya tarik estetika. Krim bertekstur lembut, sedikit berminyak, tidak lengket dan mudah menyebar dengan rata dan mudah meresap ketika dioleskan dipermukaan kulit sehingga terasa nyaman, selain itu krim mampu melekat pada permukaan kulit dalam waktu yang cukup lama dan mudah dihilangkan (Mitsui, 1997; Lachman *et al.*, 2008).

2.7.1 Kualitas Dasar Krim

1. Stabil, selama masih dipakai mengobati, krim harus bebas dari inkompatibilitas, stabil pada suhu kamar, dan kelembaban yang ada dalam kamar.
2. Lunak, yaitu semua zat dalam keadaan halus dan seluruh produk menjadi lunak dan homogen.
3. Mudah dipakai, umumnya krim tipe emulsi adalah yang paling mudah dipakai dan dihilangkan dari kulit.
4. Dasar krim yang cocok
5. Terdistribusi merata, obat harus terdispersi merata melalui dasar krim padat atau cair pada penggunaan (Anief, 2004).

2.7.2 Penggolongan Krim

Krim terdiri dari emulsi minyak dalam air atau dispersi mikrokristal asam-asam lemak atau alkohol berantai panjang dalam air yang dapat dicuci dengan air dan lebih ditujukan untuk pemakaian kosmetika dan estetika (Anief, 2004). Ada dua tipe krim, yaitu:

1. Krim air dalam minyak (A/M) yaitu air terdispersi dalam minyak.

Krim tipe air dalam minyak (A/M) disebut juga krim basis hidrofobik, dibuat dari basis berminyak yang mempunyai kemampuan mengabsorpsi air. Krim A/M tidak tercampur dan tidak dapat diencerkan dengan air (Agoes, 2008). Contoh krim A/M yaitu *cold cream* yang merupakan sediaan kosmetik yang digunakan di kulit wajah sebagai krim pembersih, berwarna putih dan bebas dari butiran dan mengandung *mineral oil* dalam jumlah besar sehingga akan memberikan rasa dingin dan nyaman pada kulit (Anief, 2004).

2. Krim minyak dalam air (M/A) yaitu minyak terdispersi dalam air

Krim tipe minyak dalam air (M/A) disebut sebagai krim basis hidrofilik dan merupakan krim dengan jumlah fase air lebih besar daripada fase minyaknya sehingga dapat diencerkan dengan air. Krim dibuat dengan menambahkan zat

pengemulsi yang umumnya berupa surfaktan anionik, kationik dan nonionik (Agoes, 2008). Contoh krim M/A yaitu *vanishing cream* yang merupakan sediaan kosmetik yang digunakan untuk membersihkan, melembabkan dan sebagai alas bedak (Anief, 2004).

Dalam pemilihan basis krim, faktor-faktor yang harus dipertimbangkan adalah (Kreps dan Goldemberg, 1972):

1) Stabilitas bahan obat

Bahan obat harus cukup stabil dalam basis yang digunakan. Stabilitasnya meliputi stabilitas fisik, kimia, mikrobiologi, terapeutik dan toksikologi.

2) Kelarutan bahan obat

Bahan obat yang dapat larut dalam basis akan mudah diserap terutama bila diinginkan bahan obat untuk menembus kulit. Jika bahan obat tidak larut dalam basis maka bahan obat tersebut harus mempunyai ukuran partikel yang kecil dan didispersikan merata dalam basis.

3) Tidak mengiritasi

Bahan obat harus inert, tidak menimbulkan iritasi pada tempat pemakaian, dapat tersebar secara halus dan merata.

2.8 Tinjauan Tentang Bahan Penelitian

1) Vaseline album

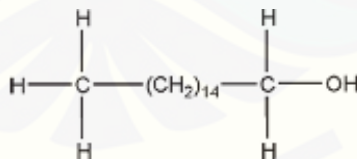
Vaseline album berupa massa lunak, lengket, bening, putih dan sifat ini tetap setelah zat dileburkan dan dibiarkan hingga dingin tanpa diaduk. Vaseline berfluoresensi lemah, jika dicairkan tidak berbau, hampir tidak berasa. Vaseline praktis tidak larut dalam air dan etanol (95%) p, larut dalam kloroform p, dalam eter p dan dalam eter minyak tanah p. Vaseline memiliki titik lebur 38 - 60 °C. Vaseline dalam formulasi topikal digunakan sebagai emolient krim topikal 10 - 30% (Depkes, 1979).

2) Adeps lanae

Adeps lanae adalah cholestolester yang dibersihkan dari bulu domba mentah yang berwarna kuning muda, setengah bening dengan bentuk menyerupai salep, dan berbau khas. Adeps lanae mengandung air tidak lebih dari 0,25% b/b dan antioksidan hingga 0,02% b/b, tidak larut air, dapat bercampur dengan air kurang lebih 2 kali beratnya, agak sukar larut dalam etanol dingin (95%), lebih larut dalam etanol panas (95%), larut dalam benzena, kloroform dan petroleum (Rowe *et al.*, 2009). Kegunaan adeps lanae dalam formulasi topikal dan kosmetik sebagai basis hidrofobik, krim air dalam minyak (A/M) dan salep. Bila adeps lanae dicampur dengan minyak sayur atau parafin cair akan berfungsi sebagai emolien krim yang dapat terpenetrasi dalam kulit dan meningkatkan absorpsi obat (Rowe *et al.*, 2009).

3) Setil Alkohol

Setil alkohol memiliki rumus empiris $C_{16}H_{34}O$, berbentuk seperti lilin dan berupa serpihan putih, granul atau kubus. Setil alkohol bersifat tidak larut dalam air, tetapi larut dalam etanol dan eter. Kelarutan setil alkohol bertambah dengan adanya peningkatan temperatur. Titik lebur setil alkohol adalah sekitar 45 - 52 °C dan 49 °C untuk material murni. Setil alkohol berfungsi sebagai *emulsifying agent*, dan *stiffening agent* dalam formulasi krim. Adapun konsentrasi setil alkohol yang digunakan sebagai *emulsifying agent* 2 - 5%, *stiffening agent* 2 - 10% (Rowe *et al.*, 2009). Struktur kimia setil alkohol ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Struktur setil alkohol (Rowe *et al.*, 2009)

4) Asam Stearat

Asam stearat memiliki rumus empiris $C_{18}H_{36}O_2$. Asam stearat merupakan kristal padat atau serbuk, berwarna putih atau sedikit kuning, keras, berbau lemah dan

rasanya memberikan kesan berlemak. Pada sediaan topikal asam stearat digunakan sebagai bahan pelembut (emolien), pengemulsi (*emulsifying agent*) dan pelarut (*solubilizing agent*). Asam stearat biasanya digunakan dalam pembuatan krim dengan netralisasi menggunakan bahan alkalis atau trietanolamin. Penggunaan asam stearat pada formulasi krim adalah 1 - 20% (Rowe *et al.*, 2009). Struktur kimia asam stearat ditunjukkan pada Gambar 2.6.



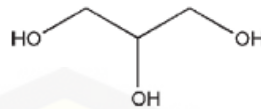
Gambar 2.6 Struktur asam stearat (Rowe *et al.*, 2009)

5) Parafin Cair

Parafin cair berupa cairan transparan, tidak berwarna, kental, tidak berfluoresensi, tidak berasa dan tidak berbau ketika dingin dan berbau ketika dipanaskan. Parafin cair praktis tidak larut etanol 95%, gliserin dan air, namun larut dalam jenis minyak lemak hangat, larut dalam aseton, benzen, kloroform, karbon disulfida, eter, dan petroleum eter. Parafin cair digunakan sebagai emolient dalam emulsi minyak dalam air (M/A). Konsentrasi parafin cair yang digunakan dalam emulsi secara topikal 1 - 32% (Rowe *et al.*, 2009).

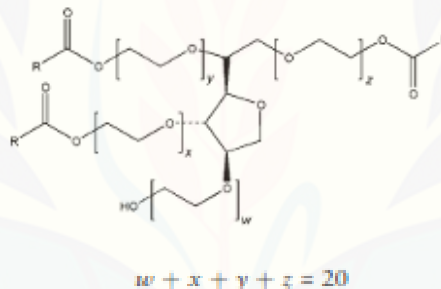
6) Gliserin

Gliserin memiliki rumus empiris $C_3H_8O_3$. Gliserin adalah cairan jernih, tidak berwarna, kental, higroskopis, memiliki rasa yang manis. Gliserin bersifat sedikit larut dalam aseton, larut dalam etanol (95%) dan metanol, larut 1 : 500 dalam eter, larut 1 : 11 dalam etil asetat serta praktis tidak larut dalam benzena, kloroform dan minyak. Gliserin digunakan secara luas pada formulasi farmasetika termasuk pada sediaan oral, telinga, mata, topikal dan parenteral. Gliserin sering digunakan pada formulasi topikal atau kosmetik seperti krim dan emulsi sebagai humektan dan emolien dengan konsentrasi $\leq 30\%$ (Rowe *et al.*, 2009). Struktur kimia gliserin ditunjukkan pada Gambar 2.7.

Gambar 2.7 Struktur kimia gliserin (Rowe *et al.*, 2009)

7) Tween 80

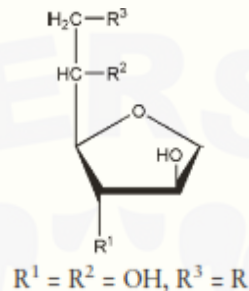
Tween 80 memiliki rumus empiris $C_{64}H_{124}O_{26}$. Tween 80 berupa cairan seperti minyak, jernih berwarna kuning mudah hingga coklat muda, bau khas lemah, rasa pahit dan hangat. Tween 80 sangat mudah larut dalam air, larutan tidak berbau dan praktis tidak berwarna, larut dalam etanol, dalam etil asetat, tidak larut dalam minyak mineral dan minyak sayur. Tween 80 merupakan surfaktan nonionik hidrofilik dengan nilai HLB 15. Konsentrasi tween sebagai *emulsifying agent* dikombinasi dengan emulsifier hidrofilik dalam emulsi atau krim minyak dalam air 1 - 10% (Depkes, 1995; Rowe *et al.*, 2009). Struktur kimia tween 80 ditunjukkan pada Gambar 2.8.

Gambar 2.8 Struktur kimia tween 80 (Rowe *et al.*, 2009)

8) Span 80

Span 80 merupakan sorbitan ester yang memiliki rumus empiris $C_{24}H_{44}O_6$. Span 80 berupa cairan kental seperti minyak berwarna kuning. Span 80 praktis tidak larut tetapi terdispersi dalam air dan propilen glikol, tercampur dalam alcohol dan methanol, 1 bagian larut dalam 100 bagian minyak biji kapas, sedikit larut dalam etil asetat (Rowe *et al.*, 2009; Reynolds, 1982) Span 80 merupakan surfaktan nonionik lipofilik dengan HLB 4,3 digunakan dalam formulasi sebagai *emulsifying agent* dalam pembuatan krim, emulsi, dan salep untuk aplikasi topikal. Biasanya sorbitan ester dikombinasi dengan polisorbat untuk menghasilkan emulsi atau krim air dalam

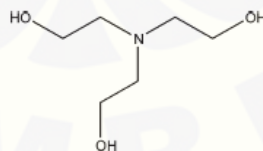
minyak (A/M) atau minyak dalam air (M/A) dengan berbagai konsistensi. Konsentrasi span 80 sebagai *emulsifying agent* dikombinasi dengan emulsifier hidrofilik dalam emulsi atau krim minyak dalam air (M/A) 1 - 10% (Rowe *et al.*, 2009). Struktur kimia span 80 ditunjukkan pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9 Struktur kimia span 80 (Rowe *et al.*, 2009)

9) Trietanolamin (TEA)

Trietanolamin (TEA) memiliki rumus empiris $C_6H_{15}NO_3$ dan merupakan campuran basa yang tersusun atas 2,2',2''-nitrilotrietanol, 2,2'-iminobisetanol (dietanolamin) dan sejumlah kecil 2-aminoetanol (monoetanolamin). TEA berupa cairan kental yang sangat higroskopis dengan bau amoniak ringan, jernih, tidak berwarna sampai kuning pucat. Kelarutan TEA pada suhu 20 °C yakni larut dalam etil eter 1 : 63, larut dalam benzena 1 : 24 dan dapat bercampur dengan air, aseton dan metanol. TEA telah digunakan secara luas dalam sediaan topikal sebagai *alkalizing agent* dan *emulsifying agent* dengan konsentrasi 2 - 4% (Rowe *et al.*, 2009). Struktur kimia trietanolamin ditunjukkan pada Gambar 2.10.

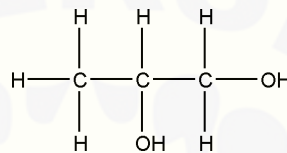


Gambar 2.10 Struktur kimia trietanolamin (Rowe *et al.*, 2009)

10) Propilen glikol

Propilen glikol memiliki rumus empiris $C_3H_8O_2$. Propilen glikol memiliki pemerian tidak berwarna, kental, praktis tidak berbau, rasa manis, rasa sedikit tajam

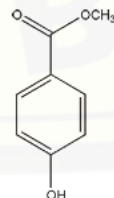
menyerupai gliserin. Kelarutan propilen glikol yaitu mudah larut dalam air, aseton, alkohol, gliserin, dan kloroform, larut dalam eter dengan perbandingan 1 : 6, tidak larut dengan minyak mineral, dengan *fixed oil*, tetapi dapat bercampur dengan beberapa minyak essensial. Penggunaan propilenglikol humektan untuk sediaan topikal 15%, sebagai kosolven 5 - 80%, dan persevatif untuk sediaan semisolid 15% - 30% (Rowe *et al.*, 2009). Struktur kimia propilen glikol ditunjukkan pada Gambar 2.11.



Gambar 2.11 Struktur kimia propilen glikol (Rowe *et al.*, 2009)

11) Metil Paraben

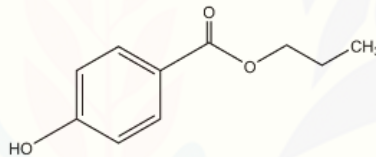
Metil paraben memiliki rumus empiris $C_8H_8O_3$. Metil paraben berupa kristal hablur atau serbuk tidak berwarna, atau kristal putih, tidak berbau atau hampir tidak berbau, dan mempunyai rasa sedikit panas seperti terbakar. Metil paraben memiliki titik didih 125 - 128 °C. Metil paraben mudah larut dalam 2 bagian etanol, larut dalam 3 bagian etanol (95%), larut dalam 6 bagian etanol (50%), larut dalam 10 bagian eter, larut dalam 60 bagian gliserin, larut dalam 5 bagian propilen glikol, larut dalam 200 bagian minyak kacang, praktis tidak larut dalam minyak mineral, larut dalam 400 bagian air. Metil paraben digunakan sebagai pengawet dalam kosmetik dan dapat dikombinasi dengan senyawa paraben lainnya atau zat antimikroba lainnya untuk melawan jamur, kapang dan bakteri gram positif daripada gram negatif. Konsentrasi metil paraben sebagai antimikroba pada sediaan topikal 0,02 - 0,3% (Rowe *et al.*, 2009). Struktur kimia metil paraben ditunjukkan pada Gambar 2.12.



Gambar 2.12 Struktur kimia metil paraben (Rowe *et al.*, 2009)

12) Propil Paraben

Propil paraben memiliki rumus empiris $C_{10}H_{12}O_3$. Propil paraben berupa kristal putih, tidak berbau dan tidak berasa. Propil paraben larut dengan bebas dalam aseton dan eter, larut dalam 1,1 bagian etanol (95%), larut dalam 5,6 bagian etanol (50%), larut dalam 250 bagian gliserin, larut dalam minyak mineral, larut dalam 70 bagian minyak kacang, larut dalam 3,9 bagian propilen glikol, larut dalam 110 bagian propilen glikol (50%) dan larut dalam 4350 bagian air pada suhu $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, larut dalam 225 bagian air pada suhu $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Rowe *et al.*, 2009). Propil paraben digunakan secara luas sebagai pengawet dalam kosmetik dan dapat dikombinasi dengan senyawa paraben lainnya atau zat antimikroba lainnya untuk melawan jamur, kapang, bakteri gram positif daripada gram negatif. Konsentrasi propil paraben sebagai antimikroba pada sediaan topikal 0,01 - 0,6% (Rowe *et al.*, 2009). Struktur kimia propil paraben ditunjukkan pada Gambar 2.13.



Gambar 2.13 Struktur kimia propil paraben (Rowe *et al.*, 2009)

13) Oleum Rosae

Oleum rosae merupakan larutan berwarna kuning pucat, bau menyerupai bunga mawar, rasa khas, kental pada suhu $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, jika didinginkan perlahan-lahan berubah menjadi massa hablur bening yang jika dipanaskan mudah melebur. Oleum rosae sangat tidak larut air, sedikit larut dalam alkohol, larut dalam minyak lemak dan kloroform. Oleum rosae banyak digunakan dalam produk farmasetika sebagai pewangi dengan konsentrasi 0,01 - 0,05% (Depkes, 1979; Reynolds, 1982).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian *experimental laboratories* yang bertujuan untuk mengidentifikasi aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh ekstrak etanol tempe kedelai (*Glycine max*) dan memformulasi ekstrak etanol tempe kedelai dalam bentuk sediaan krim air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) sebagai sediaan pemutih kulit alami.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi dan Laboratorium Teknologi Farmasi Bagian Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember pada bulan September 2014 sampai selesai.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perbedaan tipe krim air dalam minyak (A/M) dan krim minyak dalam air (M/A)

3.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas hambatan tirosinase ekstrak etanol tempe kedelai, kadar genistein dalam krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A, serta akseptabilitas krim oleh masyarakat.

3.4 Rancangan Penelitian

3.4.1 Rancangan Operasional

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut:

- a. Pembuatan simplisia tempe kedelai
- b. Penghilangan lemak (*defatting*) dalam simplisia tempe kedelai menggunakan *n*-heksana
- c. Ekstraksi simplisia tempe kedelai dengan pelarut etanol 70 %
- d. Penetapan kadar isoflavon dalam ekstrak etanol tempe kedelai dengan standar genistein menggunakan metode KLT Densitometri
- e. Pengukuran aktivitas hambatan enzim tirosinase ekstrak etanol tempe kedelai secara *in - vitro*
- f. Formulasi ekstrak etanol tempe kedelai dalam bentuk sediaan krim tipe A/M dan M/A
- g. Penetapan kadar isoflavon dalam krim ekstrak etanol tempe kedelai dengan standar genistein menggunakan metode KLT Densitometri
- h. Pengamatan sifat fisika kimia sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai
- i. Pengujian tingkat kesukaan tipe krim A/M dan M/A menggunakan metode kuisisioner.
- j. Analisis data

3.4.2 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini sebagai berikut:

- a. Tempe kedelai yang telah difermentasi selama 24 jam merek “Dua Putri” yang diproduksi di Pagah, Jember, Jawa Timur. Simplisia tempe kedelai dibuat dengan cara mengiris tipis-tipis tempe, lalu di angin-anginkan selama 24 jam hingga kering, kemudian di blender hingga halus.
- b. *Defatting* merupakan proses menghilangkan lemak yang terkandung dalam tempe kedelai menggunakan pelarut *n*-heksana dengan proses soxhletasi.

- c. Ekstraksi merupakan proses pengambilan senyawa isoflavon dalam tempe kedelai menggunakan pelarut etanol 70%, menggunakan metode ekstraksi maserasi.
- d. Penetapan kadar isoflavon dalam ekstrak etanol tempe kedelai menggunakan metode KLT Densitometri dengan genistein sebagai standar.
- e. Pengukuran aktivitas hambatan tirosinase ekstrak etanol tempe kedelai secara *in-vitro* menggunakan *microplate reader*.
- f. Formulasi sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A.
- g. Penetapan kadar isoflavon dalam krim ekstrak etanol tempe kedelai menggunakan metode KLT Densitometri dengan genistein sebagai standar.
- h. Pengamatan sifat fisika kimia sediaan krim A/M dan M/A meliputi organoleptis, pH, viskositas, tipe krim, daya sebar.
- i. Pengujian tingkat kesukaan responden terhadap tipe krim A/M dan M/A menggunakan metode kuisisioner.
- j. Analisis data menggunakan SPSS versi 18.

Adapun skema langkah kerja penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.

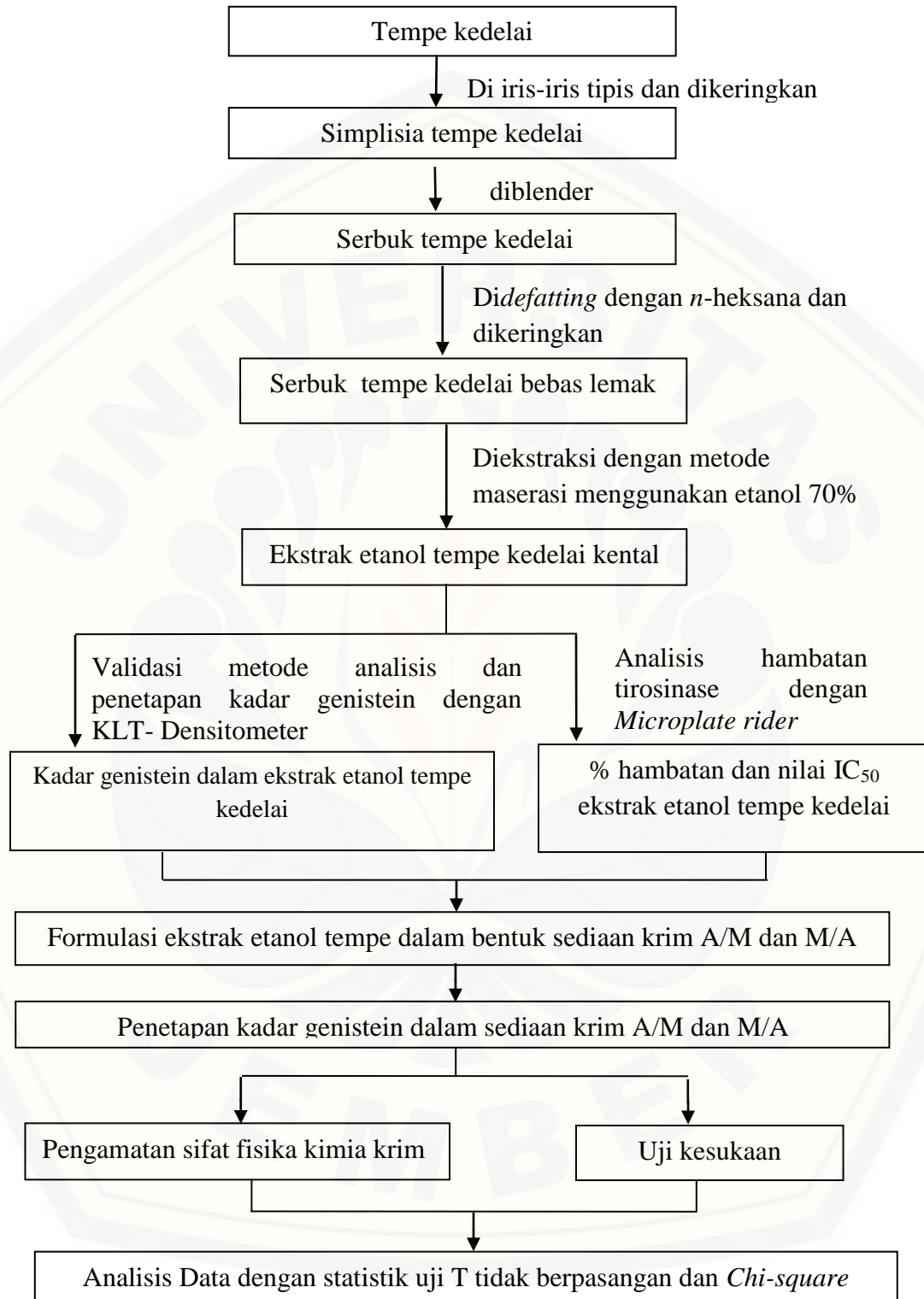
3.5 Populasi dan Sampel

3.5.1 Populasi

Mahasiswa dan masyarakat berjenis kelamin perempuan yang dipilih secara acak usia 17 - 25 tahun sebagai responden yang ada di wilayah kampus Universitas Jember.

3.5.2 Besar Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai dengan tipe krim air dalam minyak (A/M) dan krim minyak dalam air (M/A).



Gambar 3.1 Skema langkah kerja penelitian

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microplate reader* (EL x800), *microwell plate* (*Bio One Jerman*), KLT - Densitometer (*TLC-Scanner 3 Camag*), perangkat komputer dengan program winCATS (Intel), *sentrifuge* (*Hermle*), *rotary evaporator* (Heildoph), lempeng KLT silika Gel 60 F₂₅₄, *chamber* (Camag), mikropipet (Soccorex), *blue tip*, *white tip*, oven (Mettler), *blender*, timbangan analitik digital (Fujitsu), pipet volum (Pyrex), labu ukur (Herma), pipet ukur (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), pipa kapiler, viskometer (*Rion VT 04*), pH meter (Denver), ultrasonik (*Elmasonic E 30H*), mikroskop (Olympus DP 12), eppendorf, *hot plate magnetic stirrer* (IKA C-MAG HS7), *waterbath* (Mettler), mortir, stamper, alat penguji daya sebar, dan alat - alat gelas (Pyrex).

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah Tempe kedelai yang telah difermentasi selama 24 jam merek “Dua Putri” yang diproduksi di Jalan PB. Sudirman gang 8 nomor 113 RT 18, Pagah, Jember., metanol p.a. (Fluka), *n*-hexana p.a., toluen p.a. (Smart Lab Indonesia), etil asetat p.a. (Fluka), aseton p.a. (Fluka), asam format p.a. (Merck), etanol p.a. 70% (Fluka), standar genistein (Tocris Bioscience), substrat L-tirosin (Sigma Aldrich), enzim tirosinase (Sigma Aldrich), aquades (Brataco chemika), buffer fosfat pH 6,5, vaselin (Brataco chemika), adeps lanae (Brataco chemika), setil alkohol (Brataco chemika), asam stearat (Brataco chemika), gliserol (Brataco chemika), metil paraben (Brataco chemika), propil paraben (Brataco chemika), propilen glikol (Brataco chemika), tween 80 (Brataco chemika), span 80 (Brataco chemika), parafin cair (Brataco chemika), trietanolamin (Brataco chemika), metilen biru.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Preparasi Sampel

Tempe kedelai yang telah difermentasi dengan ragi *Rhizopus sp.* merek “Raprima” selama 24 jam diiris - iris, dikeringkan di bawah sinar matahari dengan diangin-anginkan selama 24 jam, kemudian digiling dengan blender sehingga berbentuk serbuk halus. Selanjutnya serbuk ditimbang untuk mengetahui berat setelah dikeringkan.

3.7.2 Pemisahan Lemak (*defatting*) dari Serbuk Tempe Kedelai

Proses *defatting* dilakukan menggunakan metode soxhlet. Sebanyak 40 gram serbuk tempe kedelai ditimbang dan dibungkus dengan kertas saring, kemudian dimasukkan kedalam tabung ekstraktor soxhlet dan ditambahkan pelarut *n*-heksana dengan perbandingan 1 : 5, sebanyak 200 ml. Proses *defatting* dilakukan selama 4 jam. Serbuk tempe kedelai yang telah selesai *didefatting* dikeringkan dengan cara diangin-anginkan hingga *n*-heksana menguap dengan sempurna (Hui *et al.*, 2005).

3.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

Serbuk tempe kedelai bebas lemak diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% perbandingan 1 : 7 selama 24 jam (Nurrahman *et al.*, 2013; Ling *et al.*, 2007). Serbuk tempe kedelai ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam maserator dan ditambahkan pelarut etanol 70%. Filtrat yang dihasilkan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga di peroleh ekstrak kental pada suhu 60 °C.

3.7.4 Optimasi Kondisi Analisis

Kondisi analisis yang perlu dioptimasi pada metode ini meliputi optimasi panjang gelombang dan konsentrasi uji analit.

1) Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan *scanning* noda analit pada *TLC-Scanner 3 Camag* (densitometer) dan *software* program winCATS. Penilaian panjang gelombang maksimal dilakukan pada area panjang gelombang antara 200 - 400 nm, karena *discanning* pada panjang gelombang pada daerah sinar UV. Penilaian panjang gelombang optimum dipilih berdasarkan pada panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum yang paling tinggi.

2) Optimasi Konsentrasi Uji

Optimasi konsentrasi uji dilakukan pemilihan konsentrasi uji 20 µg/ml, 40 µg/ml, 75 µg/ml, dan 100 µg/ml. Pemilihan ini didasarkan pada hasil optimasi yang menunjukkan perkiraan kandungan isoflavon genistein pada tempe yang terbilang kecil sehingga untuk mempermudah preparasi sampel, konsentrasi uji yang digunakan untuk optimasi adalah tingkat konsentrasi yang rendah.

Prosedur optimasi :

a) Pembuatan Sampel Uji

Larutan sampel dipreparasi dengan menimbang 50 mg sampel ekstrak etanol tempe kedelai yang mengandung genistein dengan konsentrasi sesuai dengan yang akan dioptimasi. Kemudian sampel dilarutkan dalam 10 ml metanol p.a. hingga didapatkan konsentrasi 5000 µg/ml.

b) Pembuatan Standar Uji

Larutan induk standar genistein dibuat dengan cara menimbang 5 mg dan 4 mg standar genistein kemudian dilarutkan dalam 10 ml metanol p.a. hingga didapatkan konsentrasi 500 µg/ml dan 400 µg/ml. Larutan induk tersebut diencerkan hingga didapatkan konsentrasi uji 20 µg/ml, 40 µg/ml, 75 µg/ml, dan 100 µg/ml.

c) Kondisi Analisis

Analisis isoflavon genistein dengan metode KLT dilakukan dengan menggunakan fase diam lempeng KLT silika Gel 60 F₂₅₄ dan sebagai fase gerak digunakan toluen - etil asetat - aseton - asam format (20 : 4 : 2 : 1) (Yuan *et al.*, 2006). Volum sampel ditotolkan sebanyak 6 µL dan standar genistein ditotolkan

sebanyak 2 μL dengan pipa kapiler. Lempeng KLT yang telah ditotol dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh dan ditunggu hingga eluasi mencapai tanda batas. Kemudian lempeng diangin-anginkan sampai kering lalu noda yang terbentuk diamati dengan lampu UV 254 nm. Selanjutnya *discanning* dengan densitometer pada panjang gelombang hasil optimasi. Penilaian konsentrasi analit yang paling optimum berdasarkan parameter efisiensi kromatogram yaitu nilai N (*Theoretical Plate*) yang paling besar, nilai H (*Height Equivalent of Theoretical Plate*) yang terkecil dan nilai Rs (resolusi) $> 1,5$ serta kemudahan dalam preparasi sampel (Wulandari, 2011).

3.7.5 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis penentuan isoflavon genistein dalam ekstrak etanol tempe kedelai dengan KLT - Densitometri meliputi beberapa parameter yaitu linieritas, batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK), selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.

1) Linieritas

Membuat larutan standar genistein dalam metanol p.a. dengan 8 tingkat konsentrasi dalam rentang 25-200% dari konsentrasi uji hasil optimasi. Larutan standar dibuat dengan menimbang 4 mg dan 5 mg standar genistein kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. di dalam labu ukur hingga konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$ dan 500 $\mu\text{g/ml}$, lalu diencerkan sejumlah tertentu sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi yang diinginkan. Larutan standar yang telah dibuat dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT Silika Gel 60 F₂₅₄ masing-masing 2 μL dengan pipa kapiler. Setelah penotolan selesai, lempeng diangin-anginkan untuk menguapkan pelarut.

Eluen dipreparasi dengan komposisi toluen - etil asetat - aseton - asam format (20:4:2:1) (Yuan *et al.*, 2006), kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah berisi kertas saring lalu *chamber* ditutup dan dibiarkan hingga jenuh (kertas saring terbasahi semua). Lempeng KLT yang telah ditotol dimasukkan ke dalam *chamber*

yang telah jenuh dan ditunggu hingga eluasi mencapai tanda batas. Kemudian lempeng diangin-anginkan sampai kering. Noda yang terbentuk *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai parameter linieritas dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis*. Kriteria penerimaan (*Acceptance Criteria*) suatu metode dikatakan linier jika koefisien korelasi ($r \geq 0,99$); koefisien variasi fungsi ($Vx0$) $< 5\%$ serta nilai X_p lebih kecil dari konsentrasi terkecil yang digunakan (Indrayanto & Yuwono, 2003).

2) Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Penentuan BD dan BK dilakukan dengan membuat larutan standar asam klorogenat dalam metanol dengan 8 tingkat konsentrasi dibawah konsentrasi linieritas. Preparasi dan penotolan larutan standar genistein, preparasi eluen, penjenuhan chamber, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada uji linieritas. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis* (Indrayanto & Yuwono, 2003).

3) Selektifitas/Spesifisitas

Larutan standar dibuat dengan konsentrasi yang didapatkan dari hasil optimasi konsentrasi uji. Kemudian membuat larutan sampel dengan konsentrasi sesuai hasil optimasi konsentrasi uji. Preparasi dan penotolan larutan sampel ekstrak etanol tempe kedelai dan standar genistein, preparasi eluen, penjenuhan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada uji linieritas. Selanjutnya kromatogram genistein yang terbentuk diamati dan di cek spektra *purity* dan *identity* puncak standar dan sampelnya. Pada kromatogram sampel dihitung resolusi puncak genistein terhadap puncak yang lain (*unknown*). Syaratnya yaitu nilai resolusi (R_s) $> 1,5$ (Harmita, 2004).

4) Presisi

Parameter presisi yang dilakukan yaitu *repeatability*. Uji presisi dilakukan dalam beberapa tahap yaitu pembuatan kurva baku pada 6 tingkat konsentrasi antara 80% - 180% dari konsentrasi uji hasil optimasi. Kemudian dilakukan preparasi

sampel untuk *repeatability* dengan menimbang sejumlah sampel ekstrak ekstrak etanol tempe kedelai (6 replikasi) dan dilarutkan dalam metanol p.a. Preparasi dan penotolan larutan sampel ekstrak etanol tempe kedelai dan standar genistein, preparasi eluen, penjuhan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada uji linieritas. Setelah itu, dihitung nilai SD dan RSD. Nilai RSD tidak boleh lebih dari kriteria penerimaan studi kepresisian pada konsentrasi yang digunakan (Huber, 2007).

5) Akurasi

Pengujian parameter akurasi pada penelitian ini menggunakan metode standar adisi. Pengujian akurasi dilakukan dengan dua tahap yaitu pembuatan sampel adisi dengan penambahan standar sebanyak 30%, 45% dan 60% dari konsentrasi analit dalam sampel sesuai dengan hasil uji presisi dan pembuatan kurva baku dengan rentang sesuai dengan konsentrasi linieritas. Pembuatan sampel akurasi dilakukan dengan menimbang sejumlah tertentu sampel, dimasukkan ke dalam labu ukur, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. (tidak sampai tanda batas). Selanjutnya dilakukan adisi dengan larutan standar dengan konsentrasi 30%, 45% dan 60% dari konsentrasi analit yang terkandung dalam sejumlah sampel yang ditimbang. Kemudian ditambahkan metanol p.a. sampai tanda dan kocok sampai homogen. Masing-masing sampel adisi dibuat sebanyak 3 replikasi. Preparasi dan penotolan larutan sampel ekstrak etanol tempe kedelai dan standar genistein, preparasi eluen, penjuhan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada uji linieritas. Selanjutnya dilakukan perhitungan persen perolehan kembali dimana nilai hasil perhitungan seharusnya tidak melebihi nilai presisi RSD dan berada pada rentang yang sesuai dengan konsentrasi yang digunakan (Huber, 2007).

3.7.6 Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

Penetapan kadar genistein dalam ekstrak etanol tempe kedelai diawali dengan pembuatan kurva baku dengan rentang konsentrasi standar genistein sesuai dengan uji linieritas. Selanjutnya larutan sampel dipreparasi dengan menimbang 50 mg sampel ekstrak etanol tempe kedelai (replikasi 3 kali) kemudian dilarutkan dalam metanol p.a. dalam labu ukur ad 10 ml sehingga didapatkan konsentrasi 5000 µg/ml.

Larutan sampel sebanyak 6 µL dan standar genistein sebanyak 2 µL ditotolkan dengan pipa kapiler pada lempeng KLT Silika Gel 60 F₂₅₄ dan dianalisis dengan kondisi analisis fase gerak toluen - etil asetat - aseton - asam format (20 : 4 : 2 : 1) (Yuan *et al.*, 2006). Noda yang terbentuk diamati dengan lampu UV 254 nm. Selanjutnya noda yang terbentuk *discanning* dengan densitometer pada panjang gelombang hasil optimasi, kemudian dilakukan perhitungan kadar % b/b.

3.7.7 Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase

Uji aktivitas hambatan tirosinase berdasarkan metode yang dilakukan oleh Batubara *et al.* (2010) dengan sedikit modifikasi dari hasil optimasi yang telah dilakukan oleh Dewi (2015).

a. Pembuatan Larutan 1 mM L-Tirosin

L-tirosin sebanyak 4,53 mg dilarutkan dalam dapar fosfat pH 6,5 sampai volume 25 ml.

b. Pembuatan Larutan Dapar Fosfat 50 mM pH 6,5

Berdasarkan Farmakope Indonesia IV (1995), KH₂PO₄ ditimbang sebanyak 1,701125 gram dilarutkan dalam aquades sampai volume 250 ml, diperoleh larutan KH₂PO₄ 50 mM. NaOH ditimbang sebanyak 100 mg dilarutkan dalam aquades hingga volume 50 ml, diperoleh larutan NaOH 50 mM. Larutan dapar fosfat pH 6,5 dibuat dengan menambahkan 75 ml KH₂PO₄ 50 mM dengan 18,9 ml NaOH 50 mM, lalu diencerkan dengan aquades hingga 300 ml. Cek pH dengan pH meter sampai diperoleh pH 6,5, jika perlu ditambahkan NaOH untuk menaikkan pH larutan.

c. Penyiapan Larutan Tirosinase 250 U/ml

Mushroom tyrosinase 50 KU dilarutkan dengan larutan dapar fosfat pH 6,5 hingga 10 ml. Larutan dibagi menjadi 2 vial masing-masing 5 ml mengandung *mushroom tyrosinase* 25 KU. Satu vial *mushroom tyrosinase* 25 KU dilarutkan lagi dengan larutan dapar fosfat pH 6,5 hingga 10 ml. Larutan dibagi menjadi 10 vial masing-masing 1 ml mengandung *mushroom tyrosinase* 2,5 KU dan dilarutkan dengan larutan dapar fosfat pH 6,5 hingga 10 ml, kemudian disimpan di dalam freezer suhu -20°C .

d. Preparasi Sampel Uji

Ekstrak etanol tempe kedelai ditimbang secara seksama sebanyak 20 mg dan 30 mg (replikasi 3 kali), lalu dilarutkan dalam aquades 2 ml dan ditambah dapar fosfat pH 6,5 hingga volume 10 ml, diperoleh konsentrasi 2000 $\mu\text{g/ml}$ dan 3000 $\mu\text{g/ml}$. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga didapatkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 10 - 100 $\mu\text{g/ml}$ sebagai variasi konsentrasi pada pengujian untuk mendapatkan nilai IC_{50} .

e. Preparasi Standar Uji Genistein

Larutan standar genistein digunakan sebagai kontrol positif dibuat dengan cara menimbang 5 mg dan 4 mg (replikasi 3 kali) dan dilarutkan dalam 10 ml metanol p.a. sehingga diperoleh larutan induk 500 $\mu\text{g/ml}$ dan 400 $\mu\text{g/ml}$. Larutan induk diencerkan dengan larutan dapar fosfat 50 mM pH 6,5 hingga konsentrasi 10 - 200 $\mu\text{g/ml}$.

f. Pengujian Aktivitas Hambatan Tirosinase

Sebanyak 70 μl dari dapar fosfat pH 6,5 sebagai kontrol negatif, sampel uji ekstrak etanol tempe kedelai, standar genistein yang telah dipreparasi ditambah dengan 30 μl enzim tirosinase (250 unit/ml dalam buffer fosfat pH 6,5), lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 110 μl substrat (1 mM L-tirosin) ke dalam tiap lubang *microwell plate*, campuran diinkubasi selama 80 menit pada suhu kamar. Campuran diukur dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 478 nm, hal ini bertujuan untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambat 50% (IC_{50}). Persentase inhibisi dihitung dengan

cara membandingkan serapan sampel tanpa penambahan ekstrak dan sampel dengan penambahan ekstrak. Nilai IC_{50} dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier $y = a + bx$. Variabel x merupakan konsentrasi sampel dan variabel y merupakan persen inhibisi (Batubara *et al.*, 2010). Adapun rumus perhitungan persen hambatan tirosinase menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ hambatan tirosinase} = \frac{A-B}{A} \times 100\% \dots \dots \dots (3.1)$$

Keterangan:

A = absorbansi tanpa ekstrak atau standar

B = absorbansi dengan ekstrak atau standar (Chang, 2009).

3.7.8 Rancangan Formula Krim Ekstrak Etanol Tempe

Penelitian ini menggunakan dua formula yaitu krim ekstrak etanol tempe tipe air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) yang akan dibuat dapat dilihat pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2.

Tabel 3.1 Formula krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M)

Bahan	Fungsi	Jumlah (%)
Ekstrak etanol tempe kedelai	Bahan aktif	$5,542 \times 10^{-1} \% *$
Vaselin album	Emolien	25%
Adeps lanae	Emolien	20%
Setil alkohol	<i>Stiffening agent</i>	5%
Asam stearat	Emolien	13%
Gliserin	Humektan	10%
Span 80	<i>emulsifying agent</i>	2 %
Tween 80	<i>emulsifying agent</i>	1,4%
Metil paraben	Pengawet	0,05%
Propil paraben	Pengawet	0,1%
Propilen glikol	Pelarut	5 %
Oleum rosae	Parfum	0,05%
Aquades	Pelarut	Ad 100%

Keterangan: * , dosis bahan aktif yang digunakan dalam formula berdasarkan nilai IC_{50} ekstrak etanol tempe kedelai.

Tabel 3.2 Formula krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe minyak dalam air (M/A)

Bahan	Fungsi	Jumlah (%)
Ekstrak etanol tempe kedelai	Bahan aktif	$5,542 \times 10^{-1} \% ^*$
Parafin cair	Emolien	25 %
Asam stearat	<i>Emulsifying agent</i>	14,5%
Setil alkohol	<i>Stiffening agent</i>	2%
TEA	<i>Alkalizing agent</i>	1,5%
Adeps lanae	Emolien	1,5%
Metil paraben	Pengawet	0,1%
Propil paraben	Pengawet	0,05%
Propilen glikol	Pelarut	5%
Oleum rosae	Parfum	0,05%
Aquades	Pelarut	Ad 100%

Keterangan: * , dosis bahan aktif yang digunakan dalam formula berdasarkan nilai IC_{50} ekstrak etanol tempe kedelai.

3.7.9 Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

a. Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai Tipe Air dalam Minyak (A/M)

Fase minyak dibuat dengan melebur vaselin, adeps lanae, setil alkohol, asam stearat, dan span 80 di atas *waterbath* pada suhu 70 °C, sedangkan fase air dibuat dengan melarutkan ekstrak etanol tempe kedelai ke dalam aquades yang telah dipanaskan. Propil paraben dan metil paraben yang telah dilarutkan dalam propilen glikol, gliserin dan tween 80 ditambahkan ke dalam fase air dan dipanaskan di atas *waterbath* pada suhu 70 °C. Fase air dan fase minyak kemudian dicampur dalam mortir panas, gerus sampai dingin dan terbentuk masa krim yang homogen. Oleum rosae kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga krim A/M homogen dan harum mawar. Pembuatan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M sebanyak 3 replikasi.

b. Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai Tipe Minyak dalam Air (M/A)

Fase minyak dibuat dengan melebur parafin cair, asam stearat, setil alkohol, dan adeps lanae di atas *waterbath* pada suhu 70 °C, sedangkan fase air dibuat dengan melarutkan ekstrak etanol tempe kedelai ke dalam aquades yang telah dipanaskan. TEA, metil paraben dan propil paraben yang telah dilarutkan dalam propilen glikol ditambahkan dalam fase air, lalu dipanaskan di atas *waterbath* pada suhu 70 °C. Fase air dan fase minyak kemudian dicampur dalam mortir panas, gerus sampai dingin dan terbentuk masa krim yang homogen. Oleum rosae kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga krim M/A homogen dan harum mawar. Pembuatan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe M/A sebanyak 3 replikasi.

3.7.10 Penetapan Kadar Isoflavon Genistein Dalam Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

Penetapan kadar isoflavon genistein yang terdapat dalam krim ekstrak etanol tempe kedelai dapat diketahui dengan menggunakan metode KLT - densitometri. Masing-masing sampel krim air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) ditimbang sebanyak 0,3 gram (replikasi 3 kali), kemudian diekstraksi dengan penambahan 10 ml metanol p.a. Sampel krim di *sentrifuge* kecepatan 3000 rpm selama 30 menit sehingga terbentuk 3 lapisan yaitu fase minyak, fase metanol-air dan endapan. Supernatan yang berupa fase minyak dibuang, sedangkan fase metanol-airnya dianalisis dengan KLT-densitometer (Luthria *et al.*, 2007; Sugihartini *et al.*, 2012). Penetapan kadar genistein dalam sediaan krim meliputi uji presisi repeatabilitas dan uji akurasi sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai dengan metode adisi 30%. Kondisi analisis sesuai dengan penetapan kadar ekstrak etanol tempe pada subbab 3.7.6.

3.7.11 Evaluasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

Evaluasi sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai sebagai agen pemutih alami meliputi pengujian sifat fisika kimia dan uji kesukaan. Pengujian sifat fisika kimia terdiri atas pengujian organoleptis, pH, tipe krim, viskositas, dan daya sebar. Uji kesukaan krim ekstrak etanol tempe kedelai dilakukan menggunakan metode kuisioner meliputi data personal dan data produk untuk mengetahui kesukaan konsumen.

a. Pengujian Sifat Fisika Kimia Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

1) Pengujian Organoleptis Sediaan Krim

Uji organoleptis terdiri atas pengamatan visual terhadap warna, bentuk, tekstur, dan bau sediaan. Bentuk sediaan krim air dalam minyak (A/M) yang diharapkan berupa massa krim, berwarna putih kekuningan, bertekstur lembut, dan berbau harum mawar, sedangkan untuk sediaan krim minyak dalam air (M/A) yang diharapkan berupa massa krim, berwarna putih susu, bertekstur lembut, dan berbau harum mawar. Pengujian organoleptis dilakukan sebanyak 3 replikasi.

2) Pengujian pH Sediaan Krim

Pemeriksaan pH dilakukan dengan mengukur pH masing-masing formula sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai. Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan menggunakan alat pH meter digital. Langkah pertama elektroda pH meter dicuci terlebih dahulu menggunakan aquades, dikeringkan, dan distandarisasi dengan larutan standar pH 7, pH 4, dan pH 10, kemudian elektroda dicuci dan dikeringkan kembali. Sebanyak 1 gram krim ditimbang dan diencerkan dengan aquades bebas CO₂ hingga 10 ml, selanjutnya dilakukan pengukuran pH dengan pH meter (Akhtar *et al.*, 2011). Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan cara memasukkan elektroda ke dalam sediaan dan mencatat angka yang ditunjukkan oleh alat pH meter. Pengukuran pH sediaan dilakukan sebanyak 3 replikasi. Rentang pH fisiologis kulit yaitu 4 - 7 (Anief, 2007). pH krim yang diharapkan dalam rentang 6 - 7.

3) Pengujian Viskositas Sediaan Krim

Pada pengujian viskositas digunakan alat *viscotester* VT - 04. Langkah pertama yaitu merangkai alat *viscotester* VT - 04, kemudian dipilih spindel yang sesuai dan dicelupkan ke dalam krim yang telah dibuat dan akan diuji viskositasnya. Alat *viscotester* VT - 04 dinyalakan sampai terlihat angka yang ditunjukkan oleh alat *viscotester* VT - 04, kemudian alat dimatikan setelah diperoleh angka viskositas krim yang diuji. Pengujian viskositas sediaan dilakukan sebanyak 3 replikasi. Indeks angka yang dilihat disesuaikan dengan spindel yang dipakai. Krim diharapkan memiliki viskositas dengan rentang 50 - 120 dPa.s (Lachman *et al.*, 2008).

4) Pengujian Tipe Krim

Pengujian tipe krim dilakukan dengan cara memberikan satu tetes larutan metilen biru pada 0,1 gram krim, kemudian diamati penyebaran warna metilen biru dalam sediaan di bawah mikroskop. Pengujian tipe krim dilakukan sebanyak 3 replikasi. Jika warna menyebar secara merata pada sediaan krim berarti krim ini adalah minyak dalam air (M/A), tetapi jika warna hanya berupa bintik-bintik berarti tipe krim adalah air dalam minyak (A/M) (Ansel, 2005).

5) Pengujian Daya Sebar Sediaan Krim

Pengujian daya sebar krim dilakukan dengan menggunakan alat penguji daya sebar. Krim yang telah ditimbang dengan berat 1 gram diletakkan di pusat antara dua lempeng kaca bulat, selanjutnya diberi beban seberat 5 gram dan didiamkan selama 1 menit. Tiap 1 menit beban ditambah dengan interval 5 gram, hal ini dilakukan hingga diperoleh diameter sebar krim yang konstan. Pengujian daya sebar sediaan dilakukan sebanyak 3 replikasi. Hasil yang didapatkan dikatakan baik apabila daya sebar krim berdiameter 5 - 7 cm (Garg *et al.*, 2002).

b. Uji Kesukaan Sediaan Krim

Uji kesukaan sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai dilakukan dengan menggunakan metode kuisioner yang terdiri dari data personal dan data produk. Personal data dimulai dengan pertanyaan meliputi nama dan usia (17 - 25 tahun) responden, sedangkan data produk dengan melakukan evaluasi sensorik terhadap

krim meliputi tekstur, warna, bau dan konsistensi krim (lembar kuisisioner dapat dilihat pada lampiran). Uji kesukaan dilakukan dengan menggunakan 50 responden (Rimawi *et al.*, 2014). Tiap parameter dinilai dengan cara:

- 5: sangat suka
- 4: suka
- 3: agak suka
- 2: agak tidak suka
- 1: sangat tidak suka

3.7.12 Analisis Data

Data yang diperoleh akan diolah menggunakan program SPSS. Data yang pertama yaitu data nilai *Inhibitor Concentration* (IC_{50}) dari hasil uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase sampel ekstrak etanol tempe kedelai dan kontrol positif standar genistein. Data yang kedua yaitu data hasil penetapan kadar genistein dalam krim A/M dan M/A berupa % b/b. Masing - masing data diolah menggunakan uji T tidak berpasangan. Syarat uji T tidak berpasangan adalah sebaran data harus normal melalui uji normalitas (*Shapiro - Wilk*). Jika sebaran data tidak normal maka dilakukan transformasi data terlebih dulu sehingga diperoleh variabel baru hasil transformasi dengan sebaran data normal, kemudian dilakukan uji T tidak berpasangan. Hasil uji T tidak berpasangan signifikan bila didapatkan harga $p < 0,05$ dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$), namun jika variabel baru hasil transformasi mempunyai sebaran data yang tidak normal, maka dipilih uji *Mann-Whitney* (Dahlan, 2006).

Hubungan respon kesukaan konsumen terhadap sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) diperoleh dari hasil pengisian kuisisioner berupa data frekuensi yang berbentuk nominal. Data frekuensi diolah menggunakan program SPSS dengan uji statistik *Chi - square* (X^2). Jika hasil uji *Chi - square* memberikan nilai $p < 0,05$ maka ada hubungan bermakna,

tetapi jika nilai $p > 0,05$ maka tidak ada hubungan yang bermakna. Bila syarat uji *Chi-square* tidak terpenuhi, dapat digunakan uji alternatif yaitu uji *Fisher* dan uji *Kolmogorov - Smirnov* (Dahlan, 2006).



BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan formulasi sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai (*Glycine max* L.) tipe air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) sebagai agen pemutih kulit alami. Tempe kedelai yang digunakan dalam penelitian ini adalah tempe kedelai merek “Dua Putri” yang terbuat dari kedelai merek “Bola” yang diimpor dari Amerika Serikat. Kedelai lalu difermentasi dengan menggunakan ragi merek “Raprima” yang merupakan biakan murni *Rhizopus sp.* Produsen tempe kedelai merek “Dua Putri” berada di Jalan PB. Sudirman gang 8 nomor 113 RT 18, Pagah Jember, Jawa Timur. Tahap pertama yang dilakukan adalah preparasi serbuk tempe kedelai, pemisahan lemak (*defatting*) dari serbuk simplisia tempe kedelai. Pada tahap kedua serbuk tempe kedelai bebas lemak diekstraksi dengan pelarut etanol 70% sehingga didapatkan ekstrak etanol tempe kedelai. Kemudian dilakukan penetapan kadar isoflavon genistein dalam ekstrak etanol tempe kedelai dengan metode KLT-Densitometri. Tahap ketiga ekstrak etanol tempe kedelai di uji aktivitas hambatan tirosinase secara *in-vitro* dengan *microplate reader*. Ekstrak etanol tempe kedelai selanjutnya di formulasi menjadi sediaan krim air dalam minyak (A/M) dan krim minyak dalam air (M/A), dan dilakukan juga penetapan kadar isoflavon genistein dalam krim. Tahapan terakhir yang dilakukan adalah evaluasi fisika kimia krim dan uji kesukaan konsumen terhadap krim ekstrak tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) dengan metode kuisioner.

4.1 Hasil Ekstraksi Isoflavon Tempe Kedelai

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah tempe kedelai di iris tipis - tipis kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 24 jam. Simplisia tempe kedelai yang telah kering diblender hingga menjadi serbuk tempe kedelai yang halus, hal ini dilakukan untuk memperkecil ukuran sel pada simplisia dan memiliki luas permukaan yang lebih besar sehingga dapat mengoptimalkan pemisahan lemak (*defatting*) dan proses ekstraksi karena pelarut akan menembus ke dalam sel - sel dan menarik semua senyawa - senyawa yang terkandung di dalam serbuk tempe kedelai. Pemisahan lemak (*defatting*) merupakan proses ekstraksi lemak atau minyak dari serbuk tempe kedelai yang bertujuan untuk menghilangkan lemak dan minyak dari serbuk tempe kedelai agar tidak mengganggu selama proses analisis. Proses *defatting* dilakukan dengan metode soxhletasi menggunakan pelarut *n*-heksana perbandingan 1 : 5 selama 4 jam (Hui *et al.*, 2005).

Serbuk tempe kedelai bebas lemak diekstraksi dengan cara maserasi. Maserasi merupakan proses ekstraksi senyawa organik yang mudah dan sederhana sehingga simplisia yang sudah halus memungkinkan untuk direndam selama waktu tertentu sampai meresap dan melunakkan susunan sel sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut (Depkes RI, 2000). Maserasi serbuk tempe kedelai bebas lemak menggunakan pelarut etanol 70% 1 : 7 selama 24 jam (Nurrahman *et al.*, 2013; Ling *et al.*, 2007). Etanol 70% merupakan pelarut yang mampu mengekstraksi seluruh isoflavon secara optimal meliputi isoflavon glikosida dan isoflavon aglikon (Kudou *et al.*, 1991). Etanol merupakan salah satu pelarut yang sesuai untuk mengisolasi senyawa - senyawa organik polar dan memiliki kepolaran mendekati metanol. Kelebihan etanol 70% dibandingkan metanol yaitu tidak toksik, aman, relatif tidak beracun, dan ekonomis (Rostagno *et al.*, 2004). Hasil proses maserasi dengan pelarut etanol 70% diperoleh filtrat berwarna kuning jernih yang selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C hingga semua etanol teruapkan dan diperoleh ekstrak etanol tempe kedelai yang kental. Ekstrak etanol tempe kedelai kemudian diletakkan dalam cawan diatas *hot plate* untuk menguapkan pelarut yang

masih tersisa, kemudian ekstrak kental ditimbang sehingga diperoleh massa hasil ekstraksi dengan hasil rendemen ekstrak etanol tempe kedelai sebesar 7,440 % b/b dengan ekstrak berwarna coklat tua dan berbau khas tempe. Data perhitungan rendemen ekstrak etanol tempe kedelai dapat dilihat pada Lampiran A.

4.2 Hasil Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

Tempe kedelai mengandung isoflavon aglikon yang lebih tinggi daripada kedelai karena dalam proses fermentasi kedelai terdapat enzim β -glukosidase yang dapat mengkonversi senyawa isoflavon glikosida (daidzin, genistin dan glisitin) menjadi bentuk isoflavon aglikon (genistein, daidzein, dan glisitein) melalui reaksi deglikosilasi (Pratt dan Hudson,1985; Pawiroharsono, 2001; Chang, 2014). Menurut Song *et al* (1998), jumlah isoflavon genistein dalam tempe kedelai lebih banyak dibanding isoflavon lainnya sehingga genistein digunakan sebagai *marker* dalam penetapan kadar ekstrak etanol tempe kedelai dengan metode KLT - Densitometri. KLT adalah metode pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan sifat fisika kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel menyebabkan perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen sehingga menyebabkan perbedaan kecepatan migrasi (Wulandari, 2011). Densitometer / KLT *scanner* adalah alat yang digunakan untuk mengukur densitas dari spot atau konsentrasi zona kromatografi pada pelat KLT tanpa mengganggu pemisahan analit yang dikendalikan oleh komputer yang memberikan hasil reproduibel dan akurat (Wall, 2005). Metode KLT-Densitometri dapat digunakan untuk analisis instrumental penentuan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT (Wulandari, 2011).

Tahapan awal penetapan kadar genistein adalah dilakukan preparasi standar genistein dan sampel ekstrak etanol tempe kedelai, kemudian dilakukan optimasi kondisi analisis dan dilanjutkan dengan validasi metode analisis penetapan kadar

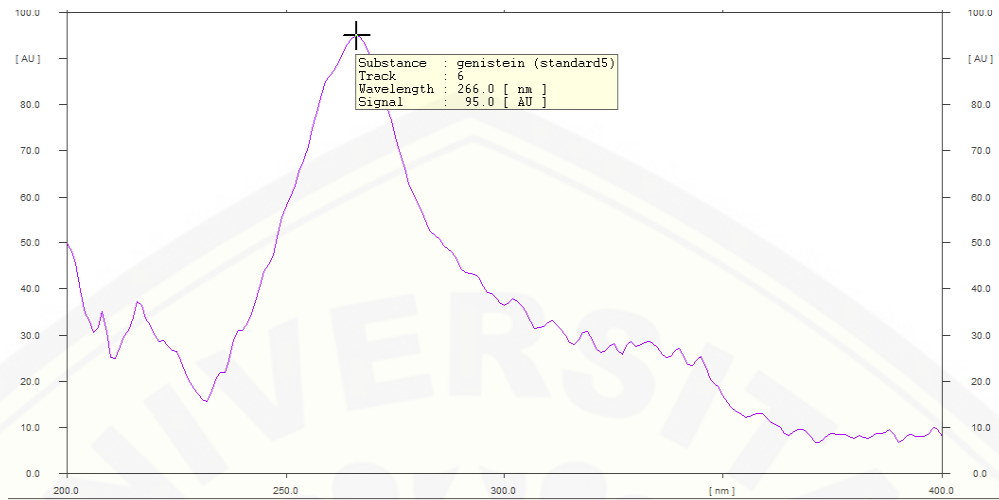
ekstrak etanol tempe kedelai. Tahapan akhir dilakukan penetapan kadar ekstrak etanol tempe kedelai.

4.2.1 Optimasi Kondisi Analisis

Optimasi kondisi analisis adalah suatu optimasi untuk mendapatkan pemisahan yang baik pada metode kromatografi dan diharapkan mendapatkan kondisi analisis yang optimum. Pemilihan kondisi analisis yang akan digunakan dapat dilihat berdasarkan penilaian parameter efisiensi sistem kromatografi meliputi: nilai R_s (resolusi), nilai N (*Theoretical Plate* atau lempeng teori), dan H (*Height Equivalent of Theoretical Plate*) (Wulandari, 2011). Optimasi kondisi analisis yang dilakukan dalam penelitian ini adalah optimasi panjang gelombang dan optimasi konsentrasi uji.

a). Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan menotolkan standar genistein yang dilarutkan dalam metanol p.a. pada lempeng KLT silika Gel 60 F₂₅₄ dan dieluasi dengan fase gerak toluen: etil asetat: aseton: asam format (v/v/v/v) = 20 : 4 : 2 : 1 (Yuan *et al.*, 2006). Noda yang dihasilkan *discanning* pada panjang gelombang 200 – 400 nm. Panjang gelombang yang dipilih adalah panjang gelombang yang memberikan intensitas spektrum paling tinggi. Hasil *scanning* spektra standar genistein dapat dilihat pada Gambar 4.1. Berdasarkan spektra yang didapatkan dari hasil *scanning*, dapat diketahui intensitas spektrum yang paling tinggi pada panjang gelombang 266 nm sehingga menjadi panjang gelombang terpilih dan digunakan untuk pengukuran selanjutnya.



Gambar 4.1 Spektra standar genistein pada panjang gelombang 200 – 400 nm

b). Optimasi konsentrasi uji

Optimasi konsentrasi uji dilakukan untuk memperoleh kromatogram yang efisien didasarkan pada nilai N (*Theoretical Plate*) yang paling besar, nilai H (*Height Equivalent of Theoretical Plate*) paling kecil dan kemudahan dalam preparasi sampel. Kemudahan preparasi dilihat berdasarkan jumlah sampel dan pelarut yang digunakan. Data hasil optimasi konsentrasi uji dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Perbandingan nilai parameter efisiensi kromatogram pada konsentrasi analit yang berbeda

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	N (<i>Theoretical Plate</i>)	H (<i>Height Equivalent of Theoretical Plate</i>)
20	40	1024	0,078
40	80	2025	0,040
75	150	900	0,088
100	200	900	0,088

Berdasarkan data nilai parameter efisiensi kromatogram yang ditampilkan pada Tabel 4.1, konsentrasi uji yang memenuhi parameter efisiensi kromatogram adalah konsentrasi uji 40 ppm karena memiliki nilai N paling tinggi dan nilai H paling kecil sehingga dapat menghasilkan kromatogram yang efisien serta preparasi

sampel lebih mudah dilakukan. Berdasarkan hasil optimasi tersebut dapat disimpulkan bahwa kondisi analisis yang digunakan optimum untuk analisis isoflavon genistein. Kondisi optimum analisis genistein dapat dilihat pada Tabel 4.2 berikut.

Tabel 4.2 Kondisi optimum analisis genistein dengan 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 : aseton : asam format (v/v/v/v) = 20: 4: 2: 1 (Yuan <i>et al.</i> , 2006).
4	Panjang gelombang	266 nm
5	Konsentrasi uji	40 ppm

4.2.2 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis dilakukan sebelum dilakukan penetapan kadar, adapun validasi metode analisis meliputi pengujian parameter linieritas, batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK), selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.

a). Linieritas

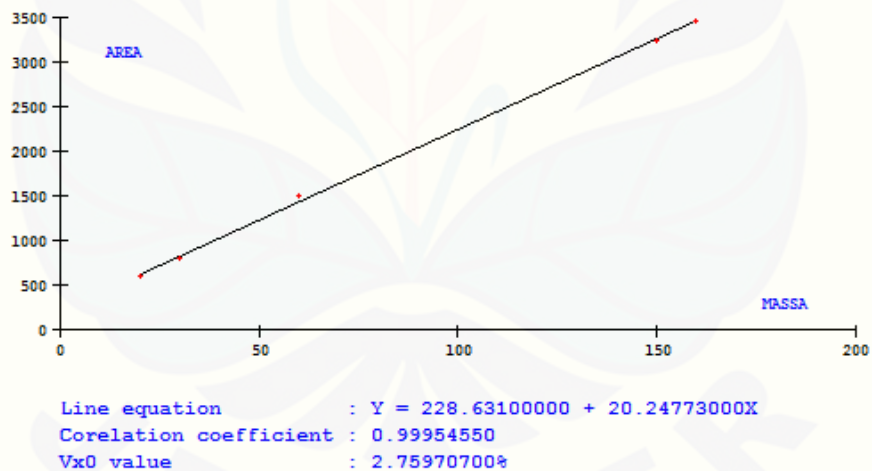
Linearitas adalah kemampuan metode analisis untuk memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita, 2004). Penentuan linieritas minimal menggunakan 5 - 10 konsentrasi standar dengan rentang berkisar antara 80 - 120%, 25 - 200% atau 50 - 150% dari konsentrasi uji atau kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Konsentrasi standar genistein yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 8 konsentrasi standar genistein dengan rentang 25 - 200% dari konsentrasi uji. Larutan standar genistein dieluasi dan *discanning* dengan densitometer sehingga dihasilkan data area standar genistein. Data yang diperoleh dari hasil *scanning* dihitung menggunakan *software Validation Method of Analysis*. Parameter linieritas memenuhi jika koefisien korelasi (r) $\geq 0,990$; koefisien variasi fungsi ($Vx0$) $< 5\%$ serta nilai Xp lebih kecil dari konsentrasi terkecil yang

digunakan. Hasil uji linieritas pada penelitian ini diambil 5 konsentrasi standar genistein ditunjukkan pada Tabel 4.3 dan Gambar 4.2. Data linieritas selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran B.1.

Tabel 4.3 Hasil uji linieritas genistein

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
10	20	610,65
15	30	808,67
30	60	1513,34
75	150	3244,54
80	160	3470

Persamaan regresi = $Y = 228,6 + 20,25X$
 $r = 0,999$
 $Vx0 = 2,759\%$
 $Xp = 13,518 \text{ ng}$



Gambar 4.2 Kurva linieritas massa vs area genistein

Berdasarkan Tabel 4.3 dan Gambar 4.2 dapat diketahui bahwa hasil uji linieritas genistein menunjukkan hubungan yang proporsional antara massa dan area dengan persamaan regresi $Y = 228,6 + 20,25X$; nilai $r = 0,999$; nilai $Vx0$ sebesar

2,759 % dan nilai X_p sebesar 13,518 ng sehingga dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan telah memenuhi persyaratan linieritas.

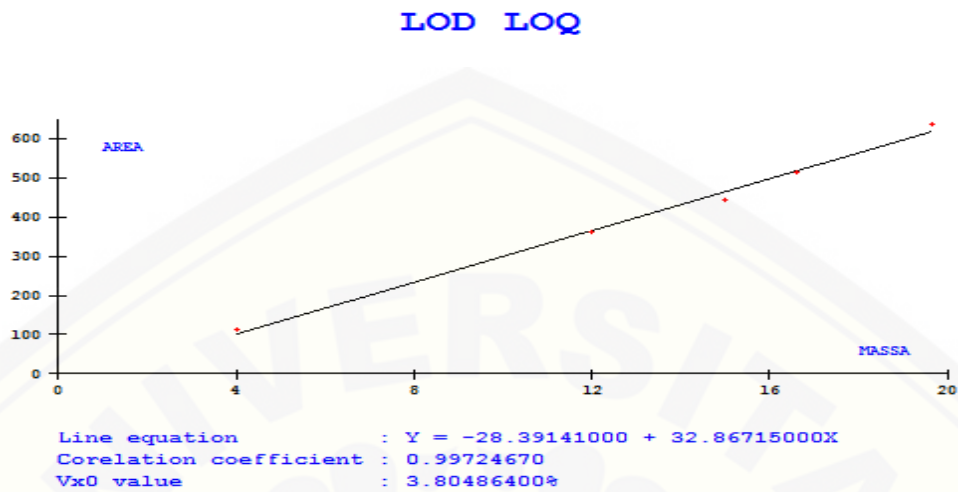
b). Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004). Penentuan batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) dalam penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi standar dibawah konsentrasi linieritas. Dalam pengujian ini, parameter linieritas seperti r , V_{x0} , dan X_p harus terpenuhi dahulu melalui *software Validation Method of Analysis*, kemudian ditentukan nilai batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) menggunakan *software* yang sama. Hasil uji batas deteksi (BD) dan batas kuantitas (BK) ditunjukkan pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.3. Data batas deteksi (BD) dan batas kuantitas (BK) selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran B.2.

Tabel 4.4 Hasil uji batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) genistein

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
2	4	111,61
6	12	361,94
7,5	15	444,57
8,3	16,6	514,14
9,82	19,64	635,77

Persamaan regresi = $Y = -28,4 + 32,87X$
 $r = 0,997$
 $V_{x0} = 3,805\%$
 $X_p = 3,523 \text{ ng}$



Gambar 4.3 Kurva linieritas massa vs area genistein pada uji batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK)

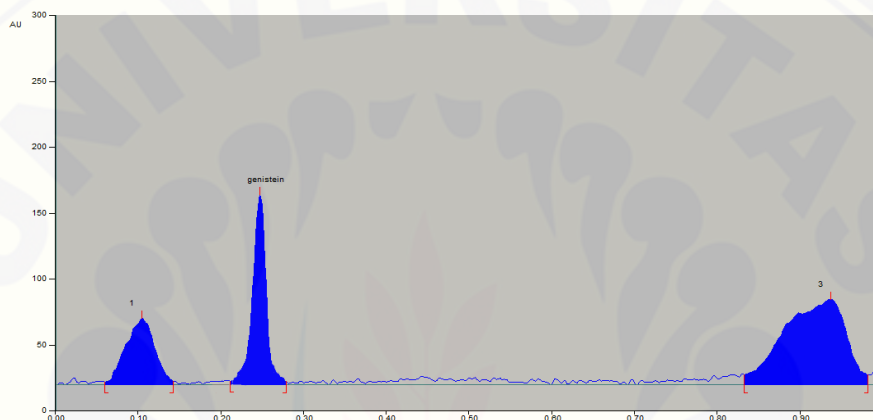
Berdasarkan Tabel 4.4 dan Gambar 4.3 diatas dapat diketahui bahwa parameter linieritas terpenuhi pada rentang konsentrasi 2 – 9,82 ppm. Nilai batas deteksi (BD) sama dengan nilai X_p yaitu sebesar 3,523 ng dan nilai batas kuantitasi (BK) 10,567 ng.

c). Selektivitas dan Spesifisitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuan metode untuk mengukur zat tertentu secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas dapat ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s). Nilai R_s yang baik adalah lebih dari 1,5, sedangkan parameter untuk mengetahui spesifisitas metode dapat ditentukan berdasarkan pengamatan kemurnian (*purity*) dan identitas (*identity*) analit dalam sampel (Harmita, 2004).

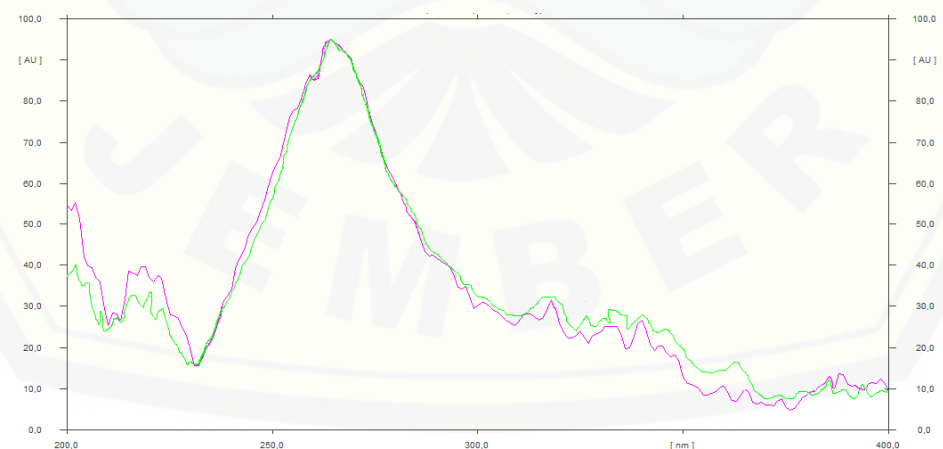
Uji selektivitas dilakukan dengan menghitung nilai R_s puncak genistein terhadap puncak yang lain (*unknown*) pada kromatogram sampel. Kromatogram sampel memiliki 2 puncak *unknown* yang dekat dengan puncak genistein. Pemisahan puncak genistein terhadap puncak *unknown* dapat dilihat pada Gambar 4.4. Hasil

perhitungan nilai R_s puncak genistein dengan puncak *unknown* 1 sebesar 1,75 dan nilai R_s puncak genistein dengan puncak *unknown* 3 sebesar 6. Data perhitungan R_s dapat dilihat pada Lampiran B.3b. Berdasarkan hasil perhitungan, menunjukkan bahwa telah terjadi pemisahan yang baik antara puncak genistein terhadap puncak yang lain (*unknown*) dan dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan selektif.

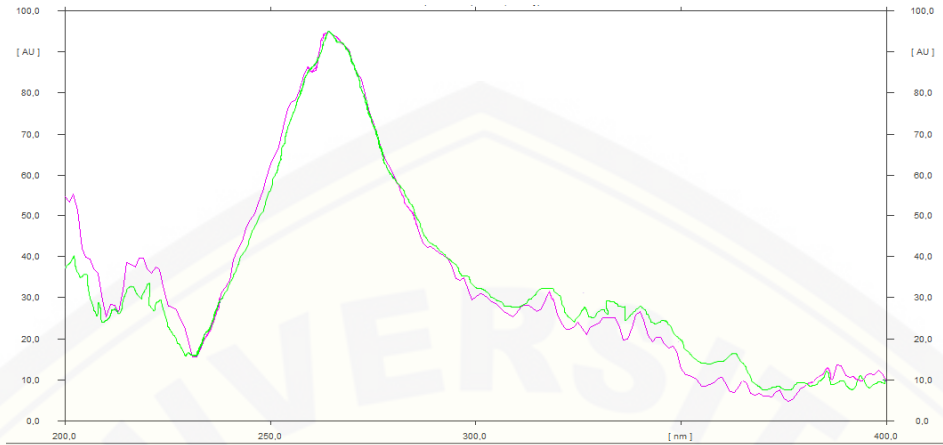


Gambar 4.4 Kromatogram pemisahan pada ekstrak etanol tempe kedelai

Uji spesifisitas dilakukan dengan cara menilai kemurnian (*purity*) dan identitas (*identity*) analit dalam sampel yang dapat dilihat pada Gambar 4.5 dan data korelasi spektra pada uji kemurnian dan identitas dapat dilihat pada Tabel 4.5 dan Tabel 4.6 berikut.



(a) Spektra uji kemurnian genistein dalam standar dan sampel



(b) Spektra uji identitas genistein dalam standar dan sampel

- = spektra standar genistein
 = spektra genistein dalam sampel

Gambar 4.5 Spektra kemurnian dan identitas genistein pada ekstrak etanol tempe kedelai

Tabel 4.5 Hasil uji kemurnian genistein

Uji	Track	Rf	r(s,m)	r(m,e)	Purity
Kemurnian	Standar	0,25	0,998240	0,999648	OK
	Sampel	0,25	0,998716	0,999785	OK

Tabel 4.6 Hasil uji identitas genistein

Uji	Track	Rf	r(s,s)	r(s,a)	Identity
Identitas	Standar	0,25	0,998462	0,998601	OK
	Sampel	0,25	0,998462	0,999708	OK

Uji kemurnian (*purity*) dilakukan dengan cara membandingkan spektra pada tiga posisi *peak*, yaitu posisi awal/ *start* (s), posisi *maximum* (m), dan posisi akhir/ *end* (e). Kemurnian analit dalam sampel dapat dilihat berdasarkan nilai r (s,m) dan r (m,e). Nilai r (s,m) menunjukkan korelasi antara spektra yang diambil pada posisi awal/ *start* (s) *peak* dengan spektra pada *maximum* (m) *peak*, sedangkan nilai r (m,e) menunjukkan korelasi antara spektra yang diambil pada posisi *maximum* (m) *peak*

dengan spektra pada posisi akhir/ *end (e) peak*. Suatu analit dikatakan murni jika nilai $r(s,m)$ dan $r(m,e)$ menghasilkan nilai lebih dari 0,990 (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Berdasarkan hasil uji kemurnian (*purity*) pada Tabel 4.5 dapat diketahui bahwa nilai korelasi spektra genistein dalam standar dan sampel lebih dari 0,990 yang berarti analit telah memenuhi parameter kemurnian.

Uji identitas (*identity*) analit ditentukan dengan cara membandingkan nilai $r(s,s)$ dengan nilai $r(s,a)$. Nilai $r(s,s)$ menunjukkan korelasi spektra antara dua *track* standar, sedangkan $r(s,a)$ menunjukkan korelasi antara *track* standar dan *track* analit dalam sampel. Analit dalam sampel dikatakan identik dengan standar jika nilai korelasinya lebih dari 0,990 (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Berdasarkan uji identitas (*identity*) pada Tabel 4.6 dapat diketahui bahwa nilai korelasi spektra genistein yang diperoleh pada penelitian lebih dari 0,990 sehingga dapat disimpulkan bahwa analit dalam sampel identik dengan standar genistein. Berdasarkan penilaian parameter selektivitas dan spesifisitas diatas dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan bersifat selektif dan spesifik.

d). Presisi

Presisi atau keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata - rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen (Harmita, 2004). Presisi dibagi menjadi tiga kategori yaitu repeatabilitas, presisi antara, dan reproduibilitas. Penelitian ini menggunakan uji presisi repeatabilitas yang dilakukan dalam satu hari dengan kondisi percobaan yang sama meliputi laboratorium, analisis serta peralatan yang dilakukan pada waktu yang singkat (ICH, 1994). Uji repeatabilitas dilakukan dengan pengukuran sampel sebanyak 6 replikasi pada 100% konsentrasi uji, kemudian dari data yang diperoleh dihitung nilai RSD-nya. Syarat penerimaan uji presisi adalah nilai RSD tidak boleh lebih dari kriteria penerimaan studi kepresisian pada konsentrasi yang digunakan.

Data hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.7 dan selengkapnya pada Lampiran B.4.

Tabel 4.7 Hasil uji presisi repeatabilitas genistein

Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	RSD (%)
50,4	0,124	0,250	2,687
50,2	0,119	0,240	
50,2	0,120	0,240	
50,0	0,117	0,234	
50,1	0,117	0,234	
50,1	0,117	0,234	
	Rata-rata	0,240	

Berdasarkan Tabel 4.7 dapat diketahui bahwa kadar isoflavon genistein pada sampel ekstrak etanol tempe kedelai adalah 0,240% lebih dari 0,1% sehingga kriteria penerimaan uji presisi berdasarkan Huber (2007) yaitu harus kurang dari 3,7%. Nilai RSD hasil penelitian uji presisi adalah 2,687% yang menunjukkan bahwa nilai RSD yang didapatkan telah memenuhi kriteria penerimaan uji presisi sehingga dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan dapat memberikan hasil yang presis.

e). Akurasi

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya, dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Uji akurasi dapat dilakukan dengan dua metode yaitu metode simulasi dan penambahan standar (standar adisi). Penelitian ini menggunakan metode penambahan standar (standar adisi) karena metode simulasi tidak bisa dilakukan disebabkan memerlukan pembuatan plasebo (ekstrak etanol tempe kedelai tanpa genistein) sebagai matriksnya. Uji akurasi dengan metode penambahan standar dilakukan dengan menghitung % *recovery* yang dihasilkan dari penambahan standar sebanyak 30%, 45%, dan 60% dari kadar analit dalam sampel yang diperoleh dari hasil uji presisi

(Indrayanto dan Yuwono, 2003). Data perhitungan akurasi dapat dilihat pada Lampiran B.5 dan hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Hasil uji akurasi genistein dalam ekstrak etanol tempe kedelai

Adisi	<i>Mean recovery (%)</i> *	RSD (%)
30%	99,972	0,067
45%	102,172	2,637
60%	104,133	0,892
Rata - rata	102,092	1,199

*Data disajikan sebagai rerata (n=3)

Kriteria penerimaan untuk uji akurasi kadar analit lebih dari 0,1% adalah *mean recovery* yang diperoleh berada pada rentang antara 95 - 105% dengan RSD harus kurang dari 3,7% (Huber, 2007). Berdasarkan Tabel 4.8, *mean recovery* 102,092% dengan RSD 1,199%. Hasil yang diperoleh telah memenuhi kriteria penerimaan uji akurasi yang digunakan sehingga dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan dapat menghasilkan hasil yang akurat.

Berdasarkan hasil pengujian parameter validasi yang telah dilakukan yaitu linieritas, batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK), selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi diketahui bahwa metode analisis genistein dengan KLT-Densitometri menghasilkan hasil analisis yang valid.

4.2.3 Penetapan Kadar Isoflavon Genistein pada Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

Penetapan kadar isoflavon genistein pada ekstrak etanol tempe kedelai dilakukan setelah metode analisis yang digunakan valid. Data perhitungan penetapan kadar genistein dapat dilihat pada Lampiran B.6 dan hasil penetapan kadar genistein pada ekstrak etanol tempe kedelai dapat dilihat pada Tabel 4.9 berikut.

Tabel 4.9 Kadar genistein pada ekstrak etanol tempe kedelai

Replikasi	Kadar b/b (%)	RSD (%)
1	0,244	2,054
2	0,240	
3	0,250	
Rata-rata	0,245	

Berdasarkan Tabel 4.9 dapat diketahui bahwa kadar rata-rata genistein dalam ekstrak etanol tempe kedelai sebesar 0,245% b/b dengan RSD 2,054%. RSD yang dihasilkan pada penetapan kadar ekstrak etanol tempe kedelai telah memenuhi persyaratan yaitu kurang dari 3,7% (Huber, 2007).

4.3 Pengujian Aktivitas Hambatan Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

Pada penelitian ini pengujian aktivitas hambatan enzim tirosinase ekstrak etanol tempe kedelai diukur menggunakan *microplate reader* (EL x 800) yang merupakan spektrofotometer khusus yang disusun untuk membaca lempeng mikro (*microplate*) (Heredia *et al.*, 2006). Metode spektrofotometri merupakan salah satu cara untuk uji aktivitas hambatan tirosinase secara *in - vitro*. Prinsip kerja metode uji hambatan enzim tirosinase secara *in - vitro* berdasarkan adanya penurunan jumlah dopakrom yang merupakan hasil oksidasi DOPA oleh enzim tirosinase. Dopakrom yang terbentuk akan berwarna jingga tua hingga merah. Jika aktivitas enzim tirosinase dihambat maka intensitas warna dopakrom akan menurun sehingga dapat diukur serapannya (absorbansi) dengan cara kolorimetri menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang maksimum (Lintner dan Sederma, 2010). Serapan (absorbansi) yang diperoleh digunakan untuk mengetahui seberapa besar aktivitas ekstrak etanol tempe kedelai dalam menghambat reaksi DOPA - enzim tirosinase.

Metode pengujian aktivitas hambatan tirosinase merujuk pada metode yang dilakukan oleh Batubara *et al.* (2010) dengan sedikit modifikasi dari hasil optimasi yang telah dilakukan oleh Dewi (2015). Hasil optimasi yang digunakan dalam

pengujian aktivitas hambatan tirosinase meliputi konsentrasi substrat sebesar 1 mM, waktu inkubasi selama 80 menit, dan *scanning* serapan (absorbansi) menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 478 nm. Proses pengujian dilakukan sesuai kondisi laboratorium dengan suhu inkubasi $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Majidi dan Aksoz (2013), telah meneliti bahwa aktivitas enzim tirosinase optimum pada suhu $25\text{ }^{\circ}\text{C} - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Larutan dapar yang digunakan adalah dapar fosfat pH 6,5. pH optimum untuk aktivitas enzim tirosinase antara 6-7 (Paranjpe *et al.*, 2003). pH larutan dapar fosfat yang akan digunakan diamati menggunakan pH meter. Pengujian aktivitas hambatan enzim tirosinase dilakukan dengan pengukuran serapan (absorbansi) ekstrak etanol tempe kedelai dan standar genistein sebagai kontrol positif sebanyak 3 replikasi.

Hasil pengujian aktivitas hambatan enzim tirosinase ekstrak etanol tempe kedelai dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat 50% aktivitas enzim tirosinase. Adanya nilai IC_{50} dapat diketahui seberapa besar potensi ekstrak etanol tempe kedelai dalam menghambat reaksi enzimatik. Nilai rata – rata IC_{50} ekstrak etanol tempe kedelai yang diperoleh pada penelitian ini adalah $55,420\text{ ppm} \pm 0,169\text{ ppm}$, sedangkan nilai rata - rata IC_{50} standar genistein sebagai kontrol positif adalah $130,139\text{ ppm} \pm 0,251\text{ ppm}$. Data perhitungan % hambatan enzim tirosinase dan nilai IC_{50} dapat dilihat pada Lampiran F.1 sampai Lampiran F.5.

Berdasarkan hasil analisis statistika menggunakan uji T tidak berpasangan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas hambatan tirosinase yang bermakna antara ekstrak etanol tempe kedelai dan standar genistein dengan nilai $p < 0,05$. Hal ini ditunjukkan dengan nilai IC_{50} ekstrak etanol tempe kedelai yang lebih kecil dibanding standar genistein yang menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan enzim tirosinase ekstrak etanol tempe kedelai lebih tinggi jika dibandingkan dengan standar genistein. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin besar aktivitas hambatan enzim tirosinase sehingga menyebabkan produksi melanin akan berkurang dan kulit akan menjadi lebih putih.

Ekstrak etanol tempe kedelai memiliki aktivitas hambatan enzim tirosinase yang lebih tinggi dibanding standar genistein karena ekstrak etanol tempe kedelai merupakan *crude extract* yang tidak hanya mengandung genistein, tetapi juga mengandung isoflavon aglikon lainnya yaitu daidzein dan glisitein yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase (Chang *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007). Isoflavon aglikon memiliki aktivitas hambatan tirosinase yang lebih tinggi dibanding isoflavon glikosida karena memiliki gugus hidroksil (OH) pada cincin benzen. Isoflavon aglikon menghambat aktivitas enzim tirosinase dengan mengkhelat logam tembaga (Cu) yang merupakan *active site* enzim tirosinase akibat adanya gugus hidroksil (OH) pada pada cincin A dan B isoflavon aglikon (Chang, 2009). Posisi gugus hidroksil dan jumlah gugus hidroksil memiliki peranan penting dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase. Semakin banyak jumlah gugus OH pada cincin benzen, maka semakin kuat isoflavon aglikon dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase, sedangkan adanya gugus metil dan konjugat gula pada cincin benzen, dapat menurunkan aktivitas penghambatan enzim tirosinase (Kim *et al.*, 2006).

4.4 Hasil Formulasi dan Penetapan Kadar Isoflavon Genistein dalam Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

4.4.1 Hasil Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas hambatan tirosinase ekstrak etanol tempe kedelai, dilakukan formulasi sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) sebagai agen pemutih kulit alami. Sediaan krim dipilih karena memiliki banyak kelebihan dibandingkan bentuk sediaan lainnya yaitu penyebarannya merata di permukaan kulit, nyaman digunakan di kulit wajah, dan tidak lengket di kulit sehingga lebih disukai oleh masyarakat (Mitsui, 1997; Ansel, 2005). Sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai ditujukan untuk penggunaan pada malam hari. Dosis ekstrak etanol tempe kedelai yang digunakan sebagai bahan aktif dalam kedua formula diperoleh dari konversi nilai IC_{50} yaitu

$5,542 \times 10^{-1}$ % b/b (100 kali dari nilai IC_{50}). Data perhitungan dosis ekstrak dapat dilihat di Lampiran G.

Pembuatan sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A dilakukan dengan metode peleburan. Proses peleburan dilakukan menggunakan *waterbath* pada suhu 70 °C. Semua bahan dalam fase minyak meleleh sempurna pada saat proses peleburan di atas *waterbath*. Ekstrak etanol tempe kedelai dan semua bahan dalam fase air larut sempurna dan dipanaskan diatas *waterbath*. Fase minyak dan fase air kemudian dicampur dan gerus dalam mortir panas sampai terbentuk massa krim yang homogen. Tahap akhir oleum rosae ditambahkan sedikit demi sedikit di akhir pembuatan krim hingga terbentuk sediaan krim yang homogen dan harum bau mawar. Pencampuran fase minyak dan fase air pada krim tipe A/M menghasilkan massa krim berwarna putih kekuningan, sedangkan pada krim tipe M/A menghasilkan massa krim berwarna putih susu. Hasil pembuatan sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A dapat dilihat pada Gambar 4.6.



(a)



(b)

Gambar 4.6 Hasil pembuatan sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai (a) krim tipe air dalam minyak (A/M) ; (b) krim tipe minyak dalam air (M/A)

4.4.2 Hasil Penetapan Kadar Isoflavon Genistein dalam Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

Sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A yang telah dibuat kemudian ditetapkan kadar isoflavon genistein dengan metode KLT-

Densitometri. Penetapan kadar genistein dalam sediaan krim dilakukan dengan uji presisi dan uji akurasi untuk mengetahui keseragaman kandungan genistein pada tiap tipe krim dan untuk mengetahui pengaruh formulasi terhadap kadar genistein dalam sediaan krim A/M dan M/A. Sediaan krim diekstraksi dengan metanol p.a. menggunakan *sentrifuge* kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Metanol p.a. digunakan sebagai pelarut karena isoflavon genistein dapat larut dengan baik dalam metanol p.a. (Luthria *et al.*, 2007). Proses *sentrifuge* menyebabkan sampel membentuk 3 lapisan yaitu fase minyak, fase metanol-air dan endapan. Fase minyak dan endapan dibuang, sedangkan fase metanol-air dianalisis dengan metode KLT-Densitometer. Kondisi analisis yang digunakan sama dengan kondisi analisis penetapan kadar isoflavon genistein dalam ekstrak etanol tempe kedelai.

Pada penelitian ini uji presisi krim ekstrak etanol tempe kedelai yaitu uji presisi repeatabilitas. Pengukuran sampel krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A (3 replikasi) di ukur sebanyak 3 kali dan menghasilkan 9 data untuk uji presisi repeatabilitas dan penetapan kadar. Data perhitungan uji presisi kadar isoflavon pada krim dapat dilihat pada Lampiran I dan hasil uji presisi dan penetapan kadar isoflavon genistein pada krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A dapat dilihat pada Tabel 4.10 dan Tabel 4.11.

Tabel 4.10 Hasil uji presisi dan penetapan kadar isoflavon genistein pada krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M)

Replikasi	Rata - rata (%)*	RSD (%)
Replikasi 1	$0,454 \times 10^{-2} \pm 0,004 \times 10^{-2}$	0,774
Replikasi 2	$0,456 \times 10^{-2} \pm 0,252 \times 10^{-4}$	0,553
Replikasi 3	$0,456 \times 10^{-2} \pm 1,732 \times 10^{-5}$	0,379
Rata - rata	$0,460 \times 10^{-2} \pm 2,751 \times 10^{-6}$	0,569

*Data disajikan sebagai rerata \pm simpangan baku (n=3)

Tabel 4.11 Hasil uji presisi dan penetapan kadar isoflavon genistein pada krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe minyak dalam air (M/A)

Replikasi	Rata - rata (%)*	RSD (%)
Replikasi 1	$0,456 \times 10^{-2} \pm 0,058 \times 10^{-4}$	0,127
Replikasi 2	$0,456 \times 10^{-2} \pm 0,058 \times 10^{-4}$	0,127
Replikasi 3	$0,456 \times 10^{-2} \pm 0,173 \times 10^{-4}$	0,379
Rata - rata	$0,460 \times 10^{-2} \pm 0,963 \times 10^{-5}$	0,211

*Data disajikan sebagai rerata \pm simpangan baku (n=3)

Berdasarkan Tabel 4.10 dan Tabel 4.11 dapat diketahui bahwa kadar rata-rata genistein pada sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) adalah lebih dari 0,001%, sehingga kriteria penerimaan untuk uji presisi, RSD harus kurang dari 7,3% (Huber, 2007). Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kadar genistein dalam sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M) sebesar $0,460 \times 10^{-2}$ % b/b dengan RSD 0,569%, sedangkan kadar rata-rata genistein pada sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe minyak dalam air (M/A) juga sebesar $0,460 \times 10^{-2}$ % b/b dengan RSD 0,211%. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai RSD yang diperoleh telah memenuhi kriteria penerimaan uji presisi dan dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan dapat memberikan hasil yang presisi.

Berdasarkan hasil analisis statistika menggunakan uji T tidak berpasangan menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna terhadap kadar genistein dalam sampel krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A dengan nilai $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa formula krim yang berbeda tidak mempengaruhi kadar genistein sehingga dapat disimpulkan bahwa kandungan genistein dalam krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A seragam dan homogen.

Uji akurasi sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A juga dilakukan untuk mengukur derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya. Akurasi atau kecermatan dinyatakan dengan persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Uji akurasi yang dilakukan pada penelitian ini yaitu uji akurasi dengan metode penambahan standar (standar adisi)

sebanyak 30% dari kadar analit dalam sampel yang didapat dari hasil uji presisi. Data perhitungan akurasi dapat dilihat pada Lampiran J dan hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.12.

Tabel 4.12 Hasil uji akurasi genistein dalam sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A

Adisi 30 %	<i>Mean Recovery (%)</i> *	RSD (%)
Krim A/M	100,463	0,909
Krim M/A	100,897	0,743

*Data disajikan sebagai rerata (n=3)

Kriteria penerimaan untuk uji akurasi dengan kadar analit 0,001% adalah *mean recovery* yang diperoleh berada pada rentang 80 - 110% dengan RSD harus kurang dari 7,3% (Huber, 2007). Berdasarkan tabel 4.12 *mean recovery* yang diperoleh dari krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M adalah 100,463% dengan RSD 0,909%, sedangkan *mean recovery* yang diperoleh dari krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe M/A adalah 100,897% dengan RSD 0,743%. Hasil yang diperoleh telah memenuhi kriteria penerimaan uji akurasi yang digunakan dan dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan dapat menghasilkan hasil yang akurat.

Hasil *mean recovery* genistein dalam sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A melebihi 100% kemungkinan karena adanya peningkatan jumlah genistein saat proses pemanasan ekstrak etanol tempe kedelai dalam fase air pada saat pembuatan krim suhu 70 °C. Tempe kedelai selain mengandung isoflavon aglikon yang tinggi, juga masih mengandung isoflavon glikosida dan malonil glikosida dengan jumlah yang sedikit (Song *et al.*, 1998). Peningkatan jumlah genistein dalam sediaan krim kemungkinan disebabkan oleh adanya genistin yang belum terkonversi menjadi genistein saat proses fermentasi sehingga dengan pemanasan suhu 50 °C - 80 °C dapat mengkonversi genistin menjadi genistein, selain itu juga dapat disebabkan oleh adanya konversi isoflavon 6'-O - malonilgenistin

yang tidak stabil terhadap panas menjadi genistin, kemudian genistin akan terkonversi menjadi genistein (Matsuraa *et al.*, 1989; Kudou *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 2002). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa adanya proses pemanasan ekstrak etanol tempe kedelai dalam fase air pada saat pembuatan krim menyebabkan peningkatan jumlah genistein sehingga nilai % *recovery* melebihi 100%.

4.5 Hasil Evaluasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

4.5.1 Hasil Pengujian Sifat Fisika Kimia Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

a). Hasil pengujian organoleptis

Pengujian organoleptis sediaan krim dilakukan untuk mengetahui karakteristik fisik yang meliputi bentuk, bau, warna dan tekstur krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A yang telah dibuat. Pengujian ini diperlukan terkait dengan penerimaan konsumen terhadap sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A sebagai agen pemutih kulit secara estetika. Hasil pengujian organoleptis dapat dilihat pada Gambar 4.6 dan Tabel 4.13.

Tabel 4.13 Hasil pengujian organoleptis krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A

Pengamatan visual	Krim air dalam minyak (A/M)*	Krim minyak dalam air (M/A)*
Warna	Putih kekuningan	Putih susu
Bentuk	Massa krim	Massa krim
Tekstur	Lembut	Lembut
Bau	Bau harum mawar	Bau harum mawar

*Data disajikan sebagai kesimpulan hasil pengujian organoleptis (n=3)

b). Hasil pengujian pH sediaan krim

Pengujian pH sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A dilakukan untuk mengetahui nilai pH dari sediaan yang telah dibuat. Menurut Anief (2007), rentang pH fisiologis kulit yaitu 4 - 7. Spesifikasi pH krim yang diharapkan yaitu 6 - 7. Apabila sediaan krim bersifat basa dengan rentang pH lebih dari rentang

pH kulit akan mengakibatkan kulit terasa licin, cepat kering, dan dikhawatirkan akan mempengaruhi elastisitas kulit, namun apabila sediaan krim bersifat asam dengan rentang pH di bawah rentang pH kulit akan menyebabkan kulit mudah teriritasi (Tranggono dan Latifah, 2007). Sediaan krim diencerkan dengan aquades bebas CO₂ lalu diukur pH sediaan dengan pH meter. Aquades bebas CO₂ digunakan sebagai pelarut dalam pengujian pH karena jika ada CO₂ dalam aquades menyebabkan terbentuk asam karbonat (H₂CO₃) yang merupakan asam lemah sehingga dapat menyebabkan nilai pH sediaan semakin turun dan sediaan menjadi bersifat asam. Hasil uji pH dari sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A dapat dilihat pada Tabel 4.14 dan selengkapnya pada Lampiran K.1.

Tabel 4.14 Hasil pengujian pH krim ekstrak etanol tempe kedelai

Tipe krim	pH*
Krim tipe A/M	6,58 ± 0,02
Krim tipe M/A	6,95 ± 0,02

*Data disajikan sebagai rerata ± simpangan baku (n=3)

Berdasarkan hasil pengujian yang ditampilkan pada Tabel 4.14 dapat diketahui bahwa krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A memiliki nilai pH rata-rata 6,58 dan 6,95 yang telah sesuai dengan spesifikasi yang diharapkan dan masih dapat diterima oleh kulit sehingga tidak menimbulkan iritasi kulit ketika sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai digunakan. pH krim tipe M/A lebih tinggi daripada krim A/M karena dalam formula krim M/A terdapat TEA yang mengandung gugus basa sehingga semakin banyak TEA dalam formula menyebabkan pH sediaan menjadi lebih tinggi dan dapat menetralkan asam stearat (Ng, 2013), sedangkan formula krim tipe A/M mengandung asam stearat tanpa adanya TEA. Asam stearat mengandung gugus asam (Ng, 2013), semakin banyak asam stearat yang digunakan dalam formula krim tipe A/M menyebabkan pH krim tipe A/M menjadi lebih rendah dibanding krim tipe M/A.

c). Hasil pengujian viskositas sediaan krim

Pengujian viskositas sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A diperlukan untuk mengetahui nilai viskositas kedua tipe krim yang telah dibuat. Menurut Langenbucher dan Lange (2007) viskositas sediaan semisolid yang dapat diterima dan mudah dalam aplikasi pemakaiannya adalah pada rentang 50 hingga 1000 dPa.s. Viskositas krim yang diharapkan dalam penelitian ini adalah 50 - 120 dPa.s (Lachman *et al.*, 2008). Apabila viskositas krim terlalu besar menyebabkan krim menjadi kental sehingga akan sulit menyebar jika diaplikasikan di kulit wajah, namun jika krim terlalu encer maka akan mempersulit dalam aplikasi krim di kulit wajah karena krim akan meluber di area sekitar kulit wajah sehingga tidak nyaman dalam penggunaannya. Hasil pengujian viskositas krim ekstrak etanol tempe kedelai dapat dilihat pada Tabel 4.15 dan selengkapnya pada Lampiran K.2.

Tabel 4.15 Hasil pengujian viskositas krim ekstrak etanol tempe kedelai

Tipe Krim	Viskositas (dPa.s)*
Krim tipe A/M	104,70 ± 0,58
Krim tipe M/A	94,30 ± 0,58

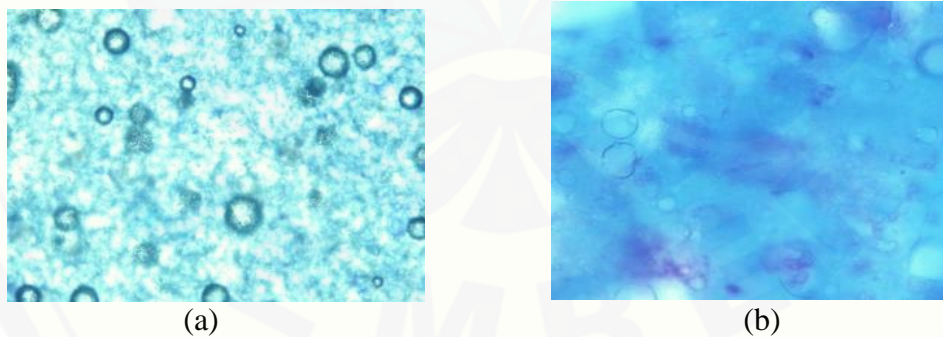
* Data disajikan sebagai rerata ± simpangan baku (n=3)

Berdasarkan hasil pengujian yang ditampilkan pada Tabel 4.15 dapat diketahui bahwa sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A memiliki viskositas sesuai spesifikasi yang diharapkan yaitu 104,70 dPa.s dan 94,30 dPa.s. Viskositas sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M lebih besar dibanding sediaan krim tipe M/A. Hal ini disebabkan oleh jumlah setil alkohol yang digunakan dalam krim tipe A/M lebih banyak yaitu sebesar 5%, sedangkan formula sediaan krim M/A memiliki jumlah setil alkohol sebesar 2%. Konsentrasi penggunaan setil alkohol sebagai peningkat viskositas (*stiffening agent*) sebesar 2 - 10% (Rowe *et al.*, 2009). Semakin besar konsentrasi setil alkohol yang digunakan maka viskositas krim akan semakin besar pula. Formula krim tipe M/A selain memiliki setil alkohol, juga memiliki TEA sebesar 1,5%. Menurut Arifin dan

Suyono (2008), penggunaan TEA dapat menurunkan viskositas sediaan krim sehingga krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe M/A memiliki viskositas yang lebih rendah dibanding krim tipe A/M.

d). Hasil pengujian tipe krim

Pengujian tipe krim ini dilakukan untuk mengetahui tipe krim pada sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai yang dibuat. Tipe krim yang diinginkan pada kedua formula krim ekstrak etanol tempe kedelai yang telah dibuat dalam penelitian ini adalah krim tipe A/M dan M/A. Pengujian tipe krim dilakukan untuk memprediksi ada atau tidak adanya inversi fase atau perubahan tipe krim yang disebabkan oleh penguapan air dalam jumlah besar dan banyaknya jumlah minyak pada fase minyak. Metode uji yang digunakan pada penelitian ini adalah metode pewarnaan menggunakan metilen biru dengan bantuan pengamatan di bawah mikroskop. Metilen biru merupakan zat warna yang dapat larut dalam air. Zat warna padat yang larut air dapat mewarnai fase eksternal krim tipe M/A, sedangkan pada krim tipe A/M zat warna hanya dapat mewarnai fase internal atau fase terdispersi (Lachman *et al.*, 2008). Hasil pengamatan mikroskop dapat terlihat pada Gambar 4.7 dan selengkapnya pada Lampiran K.3.



Gambar 4.7. Hasil pengamatan mikroskop (a) krim air dalam minyak (A/M); (b) krim minyak dalam air (M/A)

Berdasarkan hasil pengamatan tipe krim dengan metilen biru secara mikroskopis dengan perbesaran 400X dapat diketahui bahwa tipe kedua formula krim

tidak mengalami inversi. Gambar 4.7(a) menunjukkan gambaran mikroskopis sediaan krim A/M berupa bintik - bintik berwarna biru dalam fase internal yaitu fase air. Hal ini karena metilen biru bersifat polar sehingga tidak dapat terdistribusi secara merata dalam fase eksternal yang berupa minyak. Gambar 4.7(b) menunjukkan gambaran mikroskopis sediaan krim M/A berwarna biru pada fase eksternal yaitu fase air sehingga metilen biru yang bersifat polar dapat terdistribusi merata dalam fase eksternal dan fase internal yang berupa minyak hanya terdistribusi dalam bentuk butiran - butiran kecil tidak berwarna dalam fase eksternal.

e). Hasil pengujian daya sebar sediaan krim

Pengujian daya sebar krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A yang telah dibuat dilakukan untuk mengetahui kemampuan krim untuk menyebar. Sediaan krim dikatakan memenuhi sifat mekanik yang optimal, jika sediaan mudah dikeluarkan dari wadah dan memiliki daya sebar yang baik pada kulit ketika sediaan diaplikasikan sehingga dapat memberikan jaminan penerimaan dan kenyamanan sediaan pada saat digunakan oleh konsumen (Garg *et al.*, 2002). Daya sebar krim diperlihatkan oleh diameter sebar krim terhadap beban yang ditambahkan secara berkala. Spesifikasi diameter daya sebar yang diharapkan yaitu antara 5 - 7 cm (Garg *et al.*, 2002).

Daya sebar berhubungan erat dengan viskositas sediaan. Pengujian daya sebar berbanding terbalik dengan viskositas sediaan. Semakin tinggi viskositas maka daya sebar semakin rendah dan sebaliknya semakin rendah viskositas maka semakin tinggi daya sebar. Hasil pengujian daya sebar krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A dapat dilihat pada Tabel 4.16 dan selengkapnya pada Lampiran K.4.

Tabel 4.16 Hasil pengujian daya sebar sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai

Tipe krim	Beban akhir yang diberikan (g)	Daya sebar (cm)*
Krim tipe A/M	40	6,57 ± 0,058
Krim tipe M/A	45	6,67 ± 0,058

*Data disajikan sebagai rerata ± simpangan baku (n=3)

Berdasarkan hasil pengujian daya sebar krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A pada Tabel 4.16 dapat diketahui bahwa krim tipe A/M dan M/A memiliki daya sebar sesuai rentang spesifikasi yang diharapkan yaitu 6,57 cm dan 6,67 cm. Daya sebar krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M lebih rendah dibanding sediaan krim tipe M/A karena viskositas sediaan krim tipe A/M lebih besar daripada sediaan krim tipe M/A. Hal ini dapat dilihat dari pemberian beban, krim tipe A/M pada pemberian beban 40 gram telah memberikan hasil penyebaran yang konstan, sedangkan pada krim tipe M/A masih mengalami peningkatan penyebaran krim. Pada saat krim M/A diberi beban 45 gram telah memberikan hasil penyebaran yang konstan. Berdasarkan hasil pengujian daya sebar krim ekstrak etanol tempe kedelai dapat disimpulkan bahwa sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai dapat menyebar dengan baik sehingga dapat secara efektif memutihkan kulit secara merata.

4.5.2 Hasil Uji Kesukaan Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

Uji kesukaan sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A sebagai agen pemutih alami dilakukan menggunakan metode kuisisioner untuk mengetahui respon kesukaan konsumen terhadap kedua tipe krim. Penilaian kesukaan krim dengan evaluasi sensorik organoleptis krim yaitu tekstur, warna, bau, dan konsistensi. Uji kesukaan dilakukan menggunakan 50 responden berjenis kelamin perempuan dengan usia 17-25 tahun. Kriteria penilaian adalah sangat tidak suka (nilai 1) sampai dengan sangat suka (nilai 5). Hasil uji kesukaan sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A dapat dilihat pada Tabel 4.17 dan selengkapnya pada Lampiran L dan Lampiran M.3.

Tabel 4.17 Hasil uji kesukaan krim ekstrak etanol tempe kedelai

Tipe krim	Tekstur*	Warna*	Bau*	Konsistensi*
Krim tipe A/M	3,14	2,92	2,64	3,20
Krim tipe M/A	3,88	4,16	3,48	3,52

*Data yang disajikan berupa rerata (n = 50)

Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan uji *Chi-square* dapat diketahui bahwa ada hubungan yang bermakna antara kesukaan konsumen dengan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe M/A dan M/A. Hal ini ditunjukkan dengan nilai $p < 0,05$ untuk parameter tekstur, warna dan bau pada kedua tipe krim. Hubungan bermakna antara kesukaan konsumen dengan krim ekstrak etanol tempe kedelai menunjukkan bahwa konsumen memiliki kesukaan yang berbeda terhadap tekstur, warna, dan bau kedua krim. Hasil analisis statistik untuk parameter konsistensi krim memberikan nilai $p > 0,05$ yang menunjukkan bahwa tidak ada hubungan bermakna antara kesukaan konsumen dengan konsistensi kedua tipe krim. Hal ini menunjukkan bahwa konsumen memiliki kesukaan yang sama terhadap konsistensi kedua krim. Hasil uji kesukaan krim ekstrak etanol tempe kedelai dapat dilihat dari Tabel 4.17 yang menunjukkan bahwa krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe M/A lebih sukai oleh konsumen dibanding krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dengan nilai rata-rata tiap parameter lebih tinggi yaitu tekstur 3,88, warna 4,16, bau 3,48 dan konsistensi 3,52.

Krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe M/A lebih disukai oleh konsumen karena memiliki tekstur yang lembut, tidak berminyak seperti krim tipe A/M dan tidak lengket sehingga lebih nyaman ketika dioleskan di permukaan kulit. Warna krim tipe M/A putih susu dan bau krim lebih harum mawar dibanding krim tipe A/M karena krim tipe A/M mengandung *adepts lanae* pada fase minyak sehingga krim A/M berwarna putih kekuningan dan agak bau lemak menyebabkan menurunnya kesukaan konsumen terhadap warna dan bau krim tipe A/M.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini, dapat ditulis beberapa kesimpulan sebagai berikut.

1. Hasil uji aktivitas hambatan enzim tirosinase ekstrak etanol tempe kedelai menunjukkan nilai IC_{50} yang lebih baik ($55,420 \text{ ppm} \pm 0,169 \text{ ppm}$) dibandingkan dengan nilai IC_{50} genistein sebagai kontrol positif ($130,139 \text{ ppm} \pm 0,251 \text{ ppm}$).
2. Formulasi krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) tidak mempengaruhi kadar isoflavon genistein dalam sediaan krim. Kedua tipe krim mengandung kadar isoflavon genistein yang seragam dan homogen yaitu sebesar $0,046 \times 10^{-1} \% \text{ b/b}$.
3. Hasil uji kesukaan konsumen terhadap sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai sebagai agen pemutih alami menunjukkan bahwa krim tipe minyak dalam air (M/A) lebih disukai dibanding krim tipe air dalam minyak (A/M) berdasarkan parameter tekstur, warna, dan bau.

5.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan berdasarkan penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan uji hambatan enzim tirosinase sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai secara *in-vitro* agar dapat diketahui besarnya kemampuan sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai menghambat enzim tirosinase.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji stabilitas sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai untuk menjamin mutu sediaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, G. 2008. *Pengembangan Sediaan Farmasi*. Edisi Revisi dan Perluasan. Bandung: ITB.
- Akhtar, N., Khan, B. A., Khan, M. S., Mahmood, T., Khan, H. M. S., Iqbal, M., dan Bashir, S. 2011. Formulation Development and Moisturising Effects of a Topical Cream of Aloe vera Extract. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2011 March; Vol. 5.
- Anief, M. 2004. *Ilmu Meracik Obat, Teori dan Praktik*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Anief, M. 2007. *Farmasetika*, Cetakan Keempat. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Hal. 156-181.
- Ansel, H. C. 2005. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, edisi keempat. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Ariani, S. R. D. 2001. Identifikasi Senyawa Faktor-2 (Suatu Senyawa Isoflavon) dari Tempe Selama Proses Fermentasi Hari ke-0,1,2,3,4, dan 5. *Paedagogia*, Jilid 4 No.1, 2001.
- Ariani, S. R. D. 2003. Pembuatan Keju Kedelai yang Mengandung Senyawa Faktor-2 Hasil Biokonversi Isoflavon Pada Tahu oleh *Rhizopus oligosporus* (L.41), *BioSMART*. Vol. 5(1) : 8-12.
- Arifin, M. F., dan Suyono, A. H. 2008. *Pengaruh Trietanolamin - Stearat pada Sediaan Krim Pembersih Wajah Getah Pepaya (Carica papaya L.)*. [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2007. *Kosmetik Mengandung Bahan Berbahaya dan Zat Warna yang Dilarang : Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No.HK.00.01.432.6081*, 1 Agustus 2007.
- Batubara, I., Darusma, I. K., Mitsunaga, T., Rahminiwati, M., dan Djauhari, E. 2010. Potency of Indonesian Medicinal Plants as Tyrosinase Inhibitor and Antioxidant Agent. *Journal of Biological Sciences*. Vol. 10(2): 138-144.

- Cayce, K.A., Amy, J. M., dan Steven, R.F. 2004. Hyperpigmentation : An Overview of the Common Afflictions. *Dermatol Nurs.* Vol. 16(5): 401-416.
- Chae, G. Y., dan Ha, B. J. 2011. The comparative Evaluation of Fermented and Non-fermented Soybean Extract on Antioxidation and Whitening. *Toxicology Research.* Vol. 27(40): 205-209.
- Chang, T. S., Ding, H. Y., dan Lin, H. C. 2005. Identifying 6,7,4'-Trihydroxyisoflavone as a Potent Tyrosinase Inhibitor. *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry.* Vol. 69 (10): 1999-2001.
- Chang, T. S., Ding, H. Y., Tai, S.S.K., dan Wu, C. Y. 2007. Mushroom Tyrosinase Inhibitors Isolated from Soygerm Koji Fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. *Food Chem.* Vol. 105: 1430-1438.
- Chang, T. S. 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 10: 2440-2475.
- Chang, T. S. 2012. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. *Materials.* Vol. 5: 1661-1685.
- Chang, T. S. 2014. Isolation, Bioactivity, and Production of ortho-Hydroxydaidzein and ortho-Hydroxygenistein. *Molecular Sciences.* ISSN 1422-0067. Vol. 15: 5699-5716; doi: 10.3380/ijms15045699.www.mdpi.com/journal/ijms.
- Dahlan, S. 2006. *Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan.* Garut : PT.Arkans.
- Depkes. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi III.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat.* Jakarta: Direktorat Pengawasan Obat Tradisional.
- 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.
- Ebanks, J. P., Wickett, R. R., dan Boissy, R. E. 2009. Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: the Rise and Fall of Complexion Coloration. *International Journal of Molecular Sciences.* Vol. 10: 4066-4087.

- Ferreira, M. P., Oliveira, M. C. N., Mandarino, J. M. G., Silva, J. B., Ida, E. L., dan Panizzi, M. C. C. 2011. Changes in the Isoflavone Profile and in the Chemical Composition of Tempeh during Processing and Refrigeration. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília. Vol. 46(11): 1555-1561.
- Frias, J., Miranda, M. L., Doblado, R. dan Vidal-Valverde, C. 2005. Effect Of Germination And Fermentation On The Antioxidant Vitamin Content And Antioxidant Capacity Of *Lupinus Albus* L.var. Multolupa. *J.Food Chem.* Vol. 92: 211-220.
- Garg, A., Aggarwal, D., Garg, S., dan Sigla, A. K. 2002. Spreading of Semisolid Formulation : An Update. *Pharmaceutical Tecnology*. <http://pharmtech.com>. September.
- Gupta, S. 2001. Formulation of Plant-based Skin Whitening Cosmetics. *Household & Personal Products Industry*.
- Harborne, J. B. 1973. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. London: Chapman & Hall.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol. 1(3): 117-135.
- Haron, H., Ismail, A., Azlan, A., Shahar, S., dan Peng, L. S. 2009. Daidzein and Genestein Contents in Tempeh and Selected Soy Products. *Food Chemistry*. Vol. 115: 1350-1356.
- Heredia, T., Adams, D., Field, K., Held, P., dan Harbertson, J. 2006. Evaluation of a Comprehensive Red Wine Phenolics Assay Using a Microplate Reader. *Am. J.Enol.Vit.* Vol. 57(4): 497-502.
- Huber, L. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. 2nd Ed. New York: Informa Healthcare USA.
- Hui, M., Qi T., dan Zhao H. 2005. Methods For Extracting, Separating, Identifying and Quantifying Daidzein and Genistein. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*. 2005. Vol. 3.
- Huynh, N. T., Camp, J. V., Smagghe, G., dan Raes, K. 2014. Improved Release and Metabolism of Flavonoids by Steered Fermentation Processes : A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 15: 19369-19388.

- ICH (*International Conference On Harmonisation*). 1994. *Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1)*. European Union, Japan, and USA : ICH Expert Working Group.
- Indrayanto, G. dan Yuwono, M. 2003. *Validation of TLC Analyses in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Indonesia.
- Jha, H. C. 1985. Novel Isoflavonoids and It's Derivates, New Antioxydant Derived from Fermented Soybean (Tempeh). *Asian Symposium Non-salted Soybean Fermentation*. Japan: Tsukaba.
- Juwita, N. K., Djajadisastra, J., dan Azizahwati. 2011. Uji Penghambatan Tirosinase dan Stabilitas Fisik Sediaan Krim Pemutih yang Mengandung Ekstrak Kulit Batang Nangka (*Artocarpus heterophyllus*). *Majalah Ilmu Kefarmasian*. ISSN: 1693-9883. Vol. 2(2): 57 - 124
- Kamakshi, R. 2011. Fairness via Formulation: A Review of Cosmetic Skin-Lightening Ingredients. *J. Cosmet. Sci.* Vol. 63: 43-54.
- Kang, S., Chung, J. H., Lee, J. H., Fisher, G. J., Wan, Y. S., Duell, E. A., dan Voorheess, J. J. 2003. Topical N-Acetyl Cysteine and Genistein Prevent Ultraviolet-light-induced Signaling that Leads to Photoaging in Human Skin in Vivo. *J Invest Dermatol*. Vol. 120(5): 835-841.
- Kasmidjo, R. B. 1990. *Tempe: Mikrobiologi dan Biokimia, Pengolahan Serta Pemanfaatannya*. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. UGM.
- Khan, I., dan Akhtar, M. W. 2010. The Biotechnological Perspective of Beta-glukosidases. *Nature precedings*. Vol. 4945(1): 1-8.
- Kim, D., Park, J., Kim, J., Han, C., Yoon, J., Kim, N., Seo, J., dan Lee, C. 2006. Flavonoids as Mushroom Tyrosinase Inhibitors: a Fluorescence Quenching Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 54(3): 935-941.
- Kreps, S. I., dan Goldemberg. 1972. "Suntan Preparation" in : Balsam, MS., Sangarin, E (Eds). *Cosmetic and Science Technology*. 2nd ed, Vol. 1, New York : John Wiley and Sons, Inc.
- Kudou, S., Fleury, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T., Kitamura, K., dan Okubo, K. 1991. Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seeds (*Glycine max* MERRILL). *Agric. Biol. Chem*. Vol. 55(9): 2227-2233.

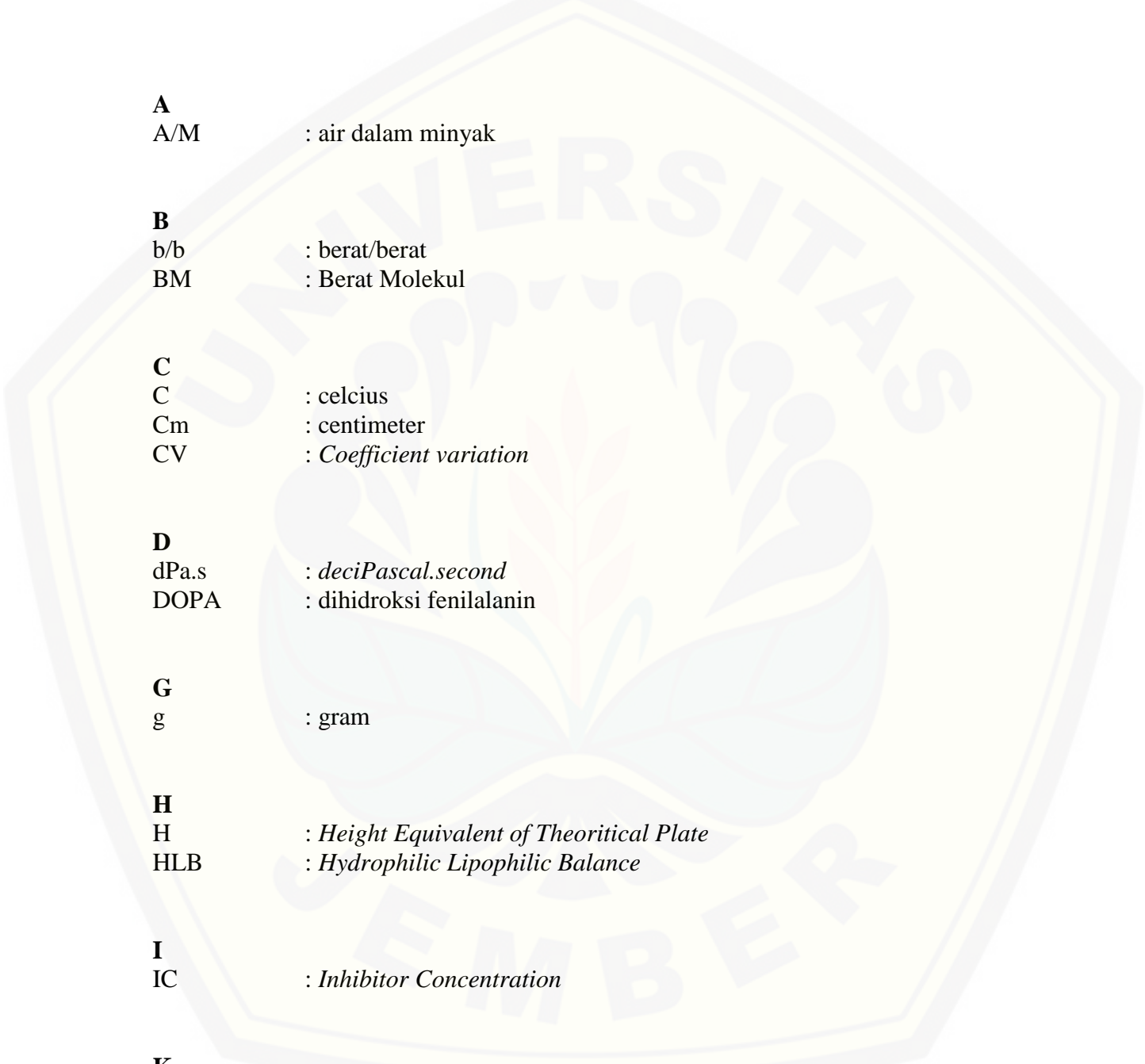
- Kuo, L. C., dan Lee, K. T. 2008. Cloning, Expression, and Characterization of Two β -glukosidases from Isoflavone Glycoside-Hydrolyzing *Bacillus subtilis* natto. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 56: 119-125.
- Lachman, L., Lieberman, H.A., dan Kanig, J.L. 2008. *Teori dan Praktek Farmasi Industri II*. Edisi ketiga. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Langenbucher dan Lange. 2007. "Reologi Farmasetik". In : Lachman, L., Lieberman, H.A., dan Kanig, J.L. *Toeri dan Praktek Farmasi Industri II*. Edisi Ketiga. No 1. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Lei, V., Awua, W. K. A. A., dan Brimer, L. 1999. Degradation of Cyanogenic Glycosides by *Lactobacillus plantarum* Strains from Spontaneous Cassava Fermentation and Other Microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 53(2-3): 169-184.
- Lintner, K. Dan Sederma F. 2010. *Substantions of Skin Whitening Claims*. www.incosmeticsasia.com/files/pres_wkshp1_substantion_of_skin_whitening_claims.pdf [20 Mei 2015].
- Ling, M.H., Juan, P., Shao-fa, S., Juan, H., dan Lian, O. 2007. Study on The Technology of Extracting Soybean Isoflavone. *Journal of Anhui Agricultural University*. 2007 - 02.
- Luthria, D. L., Biswas, R., dan Natarajan, S. 2007. Comparison of Extraction Solvents and Techniques Used for the Assay of Isolavones from Soybean. *Food Chemistry*. Vol. 105: 325-333.
- Majidi, D. Dan Aksoz, N. 2013. Stability of Tyrosinase Enzyme from *Funalia Trogii*. *American Journal of Microbiological Research*. Vol. 1(1): 1-3.
- Marotti, I., Bonetti, A., Biavati, B., Catizone, P., dan Dinelli, G. 2007. Biotransformation of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Flavonoid Glycosides by *Bifidobacterium* Species from Human Intestinal Origin. *Journal Agriculture of Food Chemistry*. Vol 55(10): 9-13.
- Matsuura, M., Obata, A., & Fukushima, D. 1989. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. *Journal Food Science*. Vol. 54: 602-605.
- Mazur, W.M., Duke, J.A., Wahata, K., Rasku, S., dan Adlercreutz, H. 1998. Isoflavonoids and Lignans in Legume : Nutritional and Healt Aspects in Humans. *J Nutr Biochem*. Vol. 9: 193-200.

- Mitsui, T. 1997. *New Cosmetic Science*. Elsevier Science B.V.
- Murphy, P.A., Barua, K., dan Hauck, C.C. 2002. Solvent Extraction Selection in The Determination of Isoflavones in Soy Foods. *J Chromatography B*. Vol. 777: 129-138.
- Murray, R.K., Granner, D.K., dan Rodwell, V.W. 2006. *Biokimia Harper*. Edisi 27. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Nakajima, N., Nozaki, N., Ishihara, K., Ishikawa, A., dan Tsuji, H. 2005. Analysis of Isoflavone Content in Tempeh, a Fermented Soybean, and Preparation of a New Isoflavone-Enriched Tempeh. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 100: 685-687.
- Ng, Engelina. 2013. *Optimasi Krim Sarang Burung Walet Putih (Aerodramus fuciphagus) Tipe M/A dengan Variasi Emulgator sebagai Pencerah Kulit Menggunakan Simplex Lattice Design*. [Skripsi]. Pontianak : Program Studi Farmasi Universitas Tanjungpura.
- Nurrahman, Astuti, M., Suparmo dan Soesatyo, M.H.N.E. 2013. The Role of Black Soybean Tempe in Increasing Antioxidant Enzyme Activity and Human Lymphocyte Proliferation in Vivo. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. Vol. 2(9):. 316-327. <http://www.ijcmas.com>.
- Pandit, N. T., dan Patravale, V.B. 2011. Design and Optimization of a Novel Method for Extraction of Genistein. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 73(2): 184-192.
- Park, J.S., Kim, D.H., Lee, J.K., Lee, J.Y., Kim, D.H., Kim, H.K., Lee, H.J., dan Kim, H.C. 2010. Natural Ortho-dihydroxyisoflavone Derivates from Aged Korean Fermented Soybean Paste as Potent Tyrosinase and Melanin Formation Inhibitors. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* . Vol. 20: 1162-1164.
- Pawiroharsono, S. 2001. *Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan*. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Perdanakusuma, D.S. 2007. Anatomi Fisiologi dan Penyembuhan Kulit. *Plastic Surgery Departement*. 5-7.
- Pratt, D.E dan Hudson B.J. 1985. Natural Antioxidants Not Exploited Commercially. *Antioxidants*. 1971-1989.

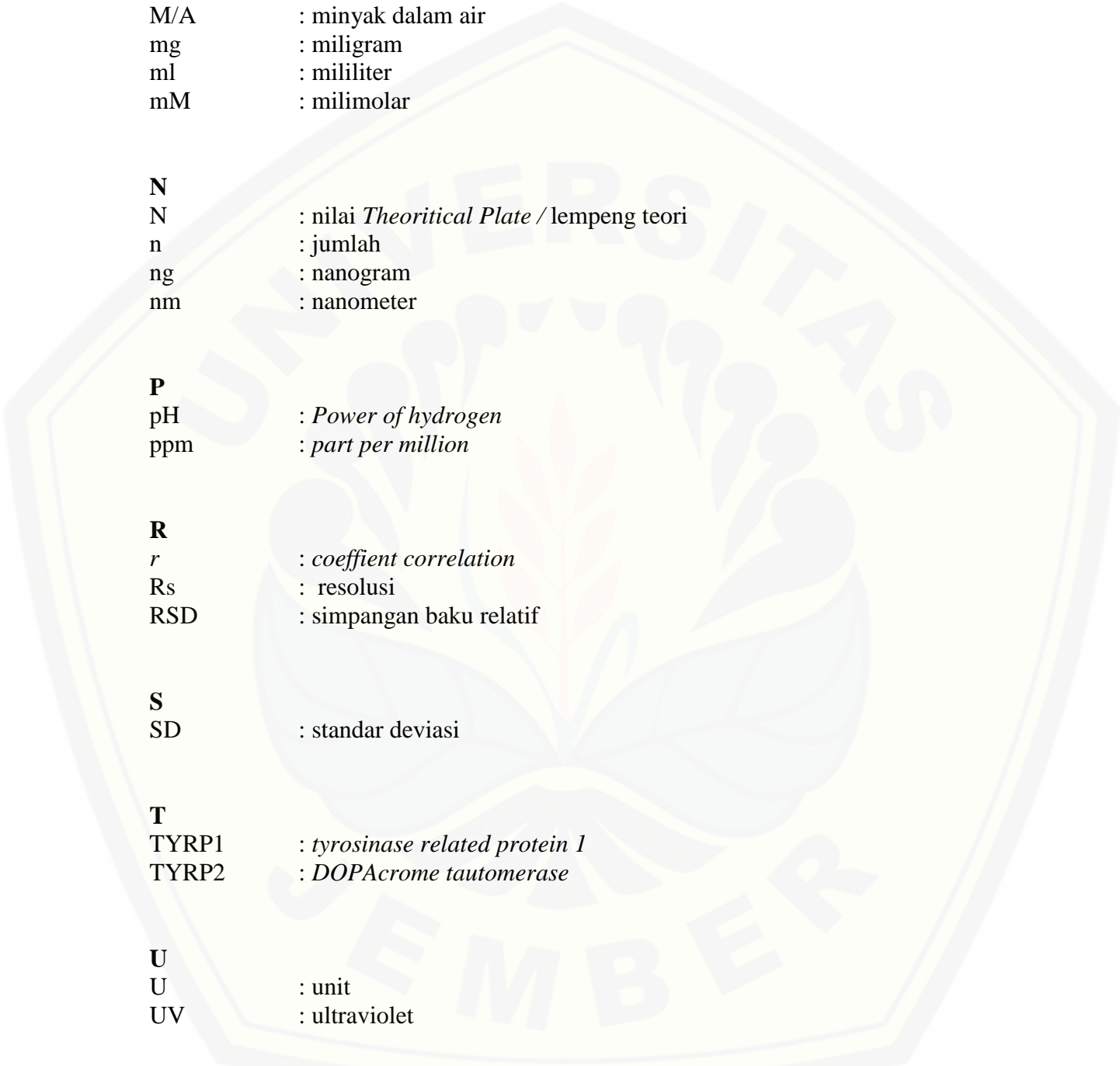
- Paranjpe, P.S., Karve, M.S., dan Padhye, S.B. 2003. Characterization of Tyrosinase and Accompanying Laccase form *Amorphophallus campanulatus*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. Vol. 40: 40-45.
- Rimawi, F., Yateem, H., dan Afaneh, I. 2014. Formulation And Evaluation of a Moisturizing Day Cream Containing Olive Leaves Extract. *International Journal of Development Research*. Vol. 4(10): 1996-2000.
- Ramsden, C.A dan Patrick, A.R. 2010. Mechanistic Studies of Tyrosinase Suicide Inactivation. *Special Issue Reviews and Accounts* : 260-274.
- Reynolds, J.E.F. 1982. *Martindale the Extra Pharmacopoeia 28th Edition*. London: The Pharmaceutical Press.
- Rostagno, M.A., Palma, M., dan Barroso, C.G. 2004. Pressurized Liquid Extraction of Isoflavones from Soybeans. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 522: 169-177. www.elsevier.com/locate/aca.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., dan Owen, S.C. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipient*. Online Database. London: Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association.
- Song. T., Barua, K., Buseman, G., dan Murphy, P.A. 1998. Soy Isoflavone Analysis: Quality Control and a New Internal Standard. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 68: 1474S-9S.
- Sugihartini, N., Fudholi, A., Pramono, S., dan Sismindari. 2012. Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Epigalokatekin Galat dengan KLT-Densitometri. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. Vol. 2(1): 81-87.
- Sukiadi, T.K. 2014. Mogok Jualan, Pedagang Tahu Tempe Sweeping Pasar. http://narotama.ac.id/index.php/detil_artikel//740/Mogok_Jualan,_Pedagang_Tahu_Tempe_Sweeping_Pasar.html [14 November 2014].
- Suparmo dan Markakis, P. 1987. Tempeh Prepared from Germinated Soybeans. *J. Food Sci*. Vol. 52(6): 1736-1737.
- Tai, S.S.K., Lin, C.G., Wu, M.H., dan Chang, T.S. 2009. Evaluation of Depigmenting Activity by 8-Hydroxydaidzein in Mouse B16 Melanoma Cells and Human Volunteers. *Int. J. Mol. Sci*. Vol. 10 : 4257-4266; doi:10.3390/ijms10104257.
- Tranggono, R.I., dan Latifah, F. 2007. *Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.

- Wall, P.E. 2005. *Thin-Layer Chromatography :A Modern Practical Approach*. United Kingdom: RSC.
- Wang, H.L., Ruttle, D.I. dan Hesseltine, C.W. 2011. Protein Quality of Wheat and Soybeans After *Rhizopus oligosporus* Fermentation. *J. Nutrition*. Vol. 96: 109-114.
- Warrington, J.C., dan Saville, B.A. 1999. Tyrosinase Inactivation in Organic Solvent. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 65(3): 325-333.
- Wasitaatmadja, S.M. 1997. *Penuntun Ilmu Kosmetik Medik*. Jakarta: UI Press.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Yuan, D., Chen, Y., Bai, X., Pan, Y., dan Kano, Y. 2006. TLC and HPLC Analysis of Soy Isoflavones in Semen *Sojae praeparatum*. *Asian Journal of Traditional Medicines*. Vol. 1: 3-4.

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN



A	
A/M	: air dalam minyak
B	
b/b	: berat/berat
BM	: Berat Molekul
C	
C	: celcius
Cm	: centimeter
CV	: <i>Coefficient variation</i>
D	
dPa.s	: <i>deciPascal.second</i>
DOPA	: dihidroksi fenilalanin
G	
g	: gram
H	
H	: <i>Height Equivalent of Theoretical Plate</i>
HLB	: <i>Hydrophilic Lipophilic Balance</i>
I	
IC	: <i>Inhibitor Concentration</i>
K	
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
KU	: Kilo Unit



M	
M	: molar
M/A	: minyak dalam air
mg	: miligram
ml	: mililiter
mM	: milimolar
N	
N	: nilai <i>Theoretical Plate</i> / lempeng teori
n	: jumlah
ng	: nanogram
nm	: nanometer
P	
pH	: <i>Power of hydrogen</i>
ppm	: <i>part per million</i>
R	
<i>r</i>	: <i>coeffient correlation</i>
Rs	: resolusi
RSD	: simpangan baku relatif
S	
SD	: standar deviasi
T	
TYRP1	: <i>tyrosinase related protein 1</i>
TYRP2	: <i>DOPAcrome tautomerase</i>
U	
U	: unit
UV	: ultraviolet
V	
v/v	: volume/volume
<i>V_{xo}</i>	: koefisien variasi fungsi

LAMPIRAN

Lampiran A. Rendemen Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

Serbuk tempe kedelai kering = 444,880 gram

Ekstrak etanol tempe kedelai kental = 33,100 gram

Rendemen ekstrak etanol tempe kedelai = $\frac{33,100 \text{ gram}}{444,880 \text{ gram}} \times 100 \% = 7,440 \% \text{ b/b}$

Lampiran B. Data Validasi Ekstrak Etanol Tempe Kedelai dengan metode KLT-Densitometer

B.1 Data linieiritas

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
10	20	610,65
15	30	808,67
30	60	1513,34
75	150	3244,54
80	160	3470

Persamaan regresi = $Y = 228,6 + 20,25 x$

$r = 0,99955$

$V_{x0} = 2,75970700\%$

$X_p = 13,51821000\text{ng}$

Method : Linearity

Probability : 95%

Number of data : 5

Line equation : $Y = 228,63100000 + 20,24773000X$

Corelation coefficient : 0,99954550

Sy value : 46,93735000

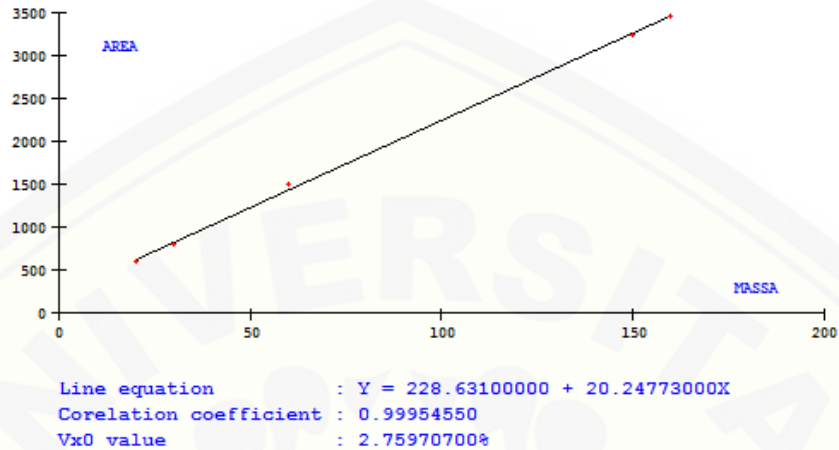
Vx0 value : 2,75970700%

Xp value : 13,51821000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

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

The Xp value is OK (< 20.00000000)



B.2 Data batas deteksi dan batas kuantitasi

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
2	4	111,61
6	12	361,94
7,5	15	444,57
8,3	16,6	514,14
9,82	19,64	635,77

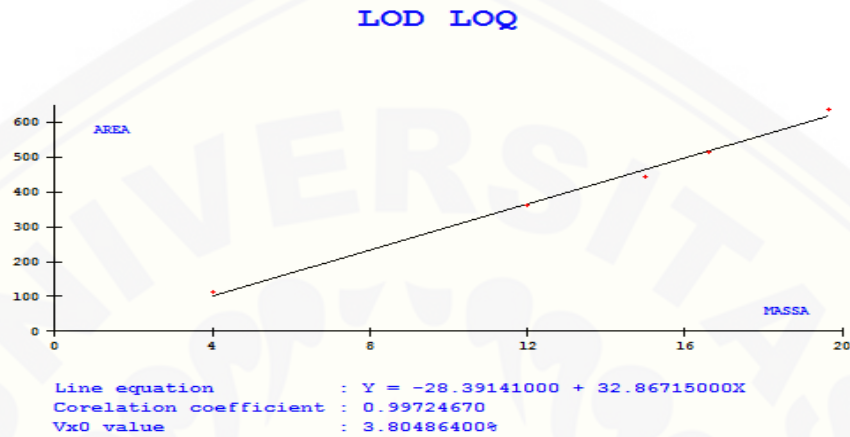
Persamaan regresi = $Y = -28,4 + 32,87X$
 $r = 0,99725$
 $Vx0 = 3,80486400\%$
 $Xp = 3,52245100$ ng

- Method : Linearity
- Probability : 95%
- Number of data : 5
- Line equation : $Y = -28,39141000 + 32,86715000X$
- Corelation coefficient : 0,99724670
- Sy value : 16,81740000
- Vx0 value : 3,80486400%
- Xp value : 3,52245100

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

The V_{x0} value is fulfilled the requirement (0% to 5%)

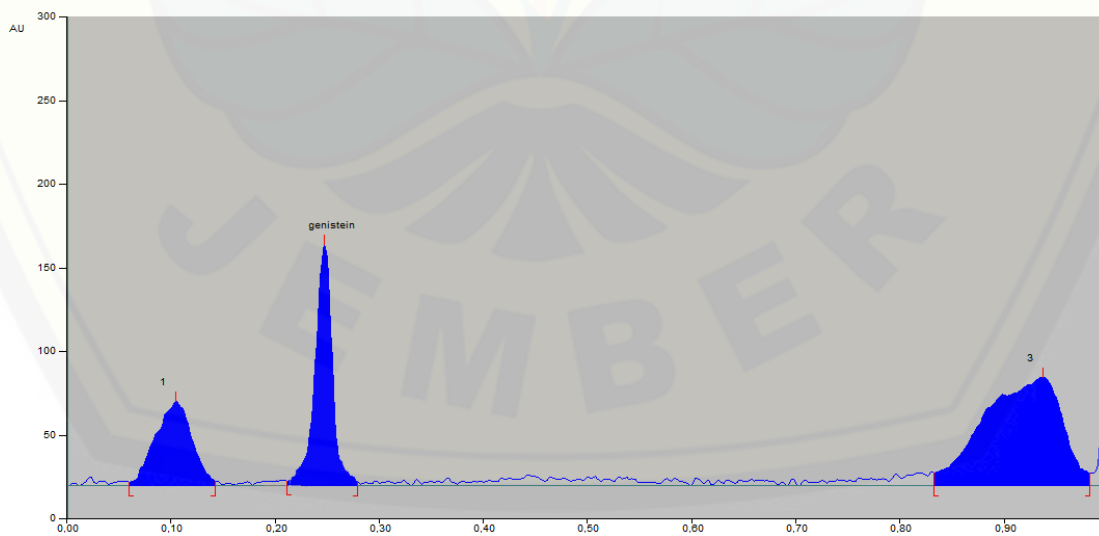
The X_p value is OK (< 4.00000000)



Method : DL - QL
Number of data : 5
DL value : 3,52245100 ng
QL value : 10,56735000 ng

B.3 Data selektivitas/spesifisitas

a). Kromatogram pemisahan pada ekstrak etanol tempe kedelai



Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0,06Rf	1,7 AU	0,11Rf	50,2AU	19,43%	0,14Rf	2,7 AU	1635,6AU	19,46%	Unknown*
2	0,20Rf	4,9AU	0,25Rf	143,8AU	55,64%	0,28Rf	2,3AU	2264,4AU	26,94%	Genistein
3	0,83Rf	7,7AU	0,94Rf	64,4AU	24,93%	0,98Rf	7,5AU	4504,0AU	53,59%	Unknown*

b). Perhitungan Rs puncak genistein dengan puncak *unknown* 1

$$\begin{aligned}
 R_s &= \frac{2[(Z)_A - (Z)_B]}{W_A + W_B} \\
 &= \frac{2[0,25 - 0,11]}{(0,28 - 0,20) + (0,14 - 0,06)} \\
 &= 1,75
 \end{aligned}$$

Perhitungan Rs puncak genistein dengan puncak *unknown* 3

$$\begin{aligned}
 R_s &= \frac{2[(Z)_A - (Z)_B]}{W_A + W_B} \\
 &= \frac{2[0,94 - 0,25]}{(0,98 - 0,83) + (0,28 - 0,20)} \\
 &= 6
 \end{aligned}$$

B.4 Data presisi

Hasil uji presisi senyawa genistein

Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	RSD (%)
50,4	0,124	0,250	2,687
50,2	0,119	0,240	
50,2	0,120	0,240	
50,0	0,117	0,234	
50,1	0,117	0,234	
50,1	0,117	0,234	
Rata-rata		0,240	

Contoh perhitungan kadar genistein dari uji presisi yaitu sebagai berikut:

Misal pada replikasi 1 :

$$\text{Konsentrasi analit} = \frac{74,50 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} = 12,42 \text{ ppm}$$

Jumlah analit dalam larutan sampel 10 ml

$$\frac{12,42 \text{ mg}}{\text{L}} \times 0,01 \text{ L} = 0,124 \text{ mg}$$

Kadar genistein dalam sampel yang ditimbang:

$$\frac{0,124 \text{ mg}}{50,4 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,25 \% \text{ b/b}$$

B.5 Data akurasi

Adisi	Penimbangan Sampel (mg)	Penambahan Standar Adisi (mg)	Massa Teoritis (ng)	Massa Hasil Percobaan (ng)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	RSD (%)
30%	50,6	$3,613 \times 10^{-1}$	94,542	94,540	99,998	99,972	0,067
	50,5	$3,613 \times 10^{-1}$	94,398	94,300	99,896		
	50,5	$3,613 \times 10^{-1}$	94,398	94,420	100,023		
45%	50,1	$0,554 \times 10^{-1}$	105,384	104,490	99,152	102,172	2,637
	50,6	$0,554 \times 10^{-1}$	106,200	109,420	103,032		
	50,6	$0,554 \times 10^{-1}$	106,200	110,800	104,331		
60%	50,6	$0,723 \times 10^{-1}$	116,244	120,970	104,066	104,133	0,892
	50,9	$0,723 \times 10^{-1}$	116,676	122,620	105,094		
	50,6	$0,723 \times 10^{-1}$	116,244	120,010	103,239		
Rata-rata						102,092	1,199

Contoh perhitungan sampel uji akurasi dengan metode standar adisi:

Kadar genistein pada sampel ekstrak etanol tempe kedelai yang dipakai pada perhitungan uji akurasi adalah 0,24% (rata-rata kadar genistein dari hasil uji presisi).

❖ Adisi 30%

➤ Pembuatan sampel adisi 30%

Jika sampel ditimbang 50 mg, maka standar genistein yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

$$\frac{50,6 \text{ mg sampel} \times 0,24 \text{ gram} \times 0,3}{100 \text{ gram}} = 0,036432 \text{ mg standar genistein}$$

Menimbang standar genistein 0,3613 mg, dimasukkan labu ukur 10 ml dan ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas.

$$\frac{0,3613 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ mg/ml} = 36,13 \text{ ppm}$$

Cara kerja :

- Menimbang 50 mg sampel ekstrak etanol tempe kedelai dan dilarutkan dengan metanol p.a, kemudian dimasukkan labu ukur 10 ml
- Pipet 1 ml larutan standar 36,13 ppm, dimasukkan ke labu ukur 10 ml yang berisi larutan sampel, sehingga telah dilakukan adisi sebanyak 0,03613 mg ke dalam 50 mg sampel.

$$1 \text{ ml dari } 36,13 \text{ ppm} = \frac{36,13 \text{ ppm}}{1000 \text{ ml}} \times 1 \text{ ml} = 0,03613 \text{ mg}$$

- Menambahkan metanol sampai tanda batas

➤ Perhitungan % *recovery*

Misal: pada replikasi 1 dengan penimbangan 50,6 mg

Konsentrasi teoritis

$$\frac{0,24 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 50,6 \text{ mg sampel} = 0,12144 \text{ mg} + 0,03613 \text{ mg} = 0,15757 \text{ mg}$$

(jumlah genistein dalam sampel adisi 30%)

$$\frac{0,15757 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 15,757 \mu\text{g/ml} \times 6 \mu\text{l} = 94,542 \text{ ng genistein}$$

Hasil percobaan: 94,540 ng

$$\% \text{ recovery} = \frac{94,540 \text{ ng}}{94,542 \text{ ng}} \times 100\% = 99,998 \%$$

B.6 Data penetapan kadar genistein pada ekstrak etanol tempe kedelai

Replikasi	Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	RSD (%)
1	50,1	0,122	0,244	2,054
2	50,2	0,120	0,240	
3	50,2	0,126	0,250	
Rata-rata			0,245	

Contoh perhitungan penetapan kadar genistein pada ekstrak etanol tempe kedelai:

Misal pada replikasi 1;

$$1915,32 = 21,77 X + 324$$

$$X = 73,10 \text{ ng}/6 \mu\text{l}$$

$$\frac{73,10 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} = 121833,333 \text{ ng}$$

$$= 0,122 \text{ mg}$$

$$\% \frac{b}{b} = \frac{0,122 \text{ mg}}{50,1 \text{ mg}} \times 100\% = 0,244\% \frac{b}{b}$$

Lampiran C. Perhitungan Pembuatan Dapar Fosfat 50 mM pH 6,5

Berdasarkan farmakope indonesia IV (1995), dapar fosfat pH 6,4 dibuat dengan kalium fosfat monobasa 0,2 M dengan melarutkan 27,22 gram kalium fosfat monobasa dengan air ad 1000 ml. Ambil 50 ml kalium fosfat monobasa 0,2 M, masukkan labu ukur 200 ml, tambahkan 12,6 ml NaOH 0,2 N dan tambah aquades ad tanda 200 ml lalu *adjust* pH ad 6,4. Untuk membuat dapar fosfat pH 6,5 50 mM sebanyak 300 ml, maka KH_2PO_4 dan NaOH yang dibutuhkan sebagai berikut:

a). KH_2PO_4

$$\text{BM } \text{KH}_2\text{PO}_4 = 136,09$$

$$M = \frac{\text{massa}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{V(\text{ml})}$$

$$50 \text{ mM} = \frac{X}{136,09} \times \frac{1000}{250 \text{ ml}}$$

$$6804,5 \text{ mg} = 4 X \rightarrow X = 1,701125 \text{ gram}$$

$$\text{Untuk } 300 \text{ ml, maka } \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ yang diambil} = \frac{50 \text{ ml } \text{KH}_2\text{PO}_4}{X} = \frac{200 \text{ ml}}{300 \text{ ml}} = 75 \text{ ml diambil}$$

b). NaOH

$$\text{BM NaOH} = 40$$

$$M = \frac{\text{massa}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{V(\text{ml})}$$

$$50 \text{ mM} = \frac{X}{40} \times \frac{1000}{50 \text{ ml}}$$

$$2000 = 20 X \rightarrow X = 100\text{mg NaOH}$$

$$\text{Untuk 300ml, maka NaOH yang diambil} = \frac{12,6 \text{ ml NaOH}}{X} = \frac{200 \text{ ml}}{300 \text{ ml}} \\ = 18,9 \text{ ml diambil}$$

Lampiran D. Perhitungan Larutan Substrat L-Tirosin 1mM

BM L-tirosin = 181,19

$$M = \frac{\text{Massa}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{V \text{ (ml)}}$$

$$0,001 \text{ M} = \frac{X}{181,19} \times \frac{1000}{25\text{ml}}$$

$$X = 0,0045298 \text{ gram} = 0,00453 \text{ gram}$$

$$= 4,53 \text{ mg dilarutkan dalam 25 ml buffer fosfat 50mM pH 6,5}$$

Lampiran E. Contoh Perhitungan Preparasi Standar Genistein dan Sampel

a). Contoh perhitungan preparasi standar genistein

Standar genistein 5,785 mg dilarutkan dalam 10 ml metanol p.a

$$\text{Standar genistein} = \frac{5,785 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \mu \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 578,500 \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran larutan standar genistein dengan dapar fosfat pH 6,5 ad 10 ml

$$\frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 578,500 \mu\text{g/ml} = 173,550\mu\text{g/ml}$$

b). Contoh perhitungan preparasi sampel ekstrak etanol tempe kedelai

Ekstrak etanol tempe ditimbang 20 mg dilarutkan dalam 2 ml aquades, lalu di *adjust* dengan dapar fosfat pH 6,5 ad 10 ml.

$$\frac{20 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 2000 \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran sampel dan dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,5 ad 5 ml

$$\frac{0,5\text{ml}}{5 \text{ ml}} \times 2000 \mu\text{g/ml} = 200 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Dipipet} = \frac{0,5 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 200 \mu\text{g/ml} = 20 \mu\text{g/ml}$$

Lampiran F. Data % Hambatan Enzim Tirosinase dan IC₅₀**F.1 Plate kosong**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,053	0,054	0,051	0,051	0,061	0,053	0,043	0,061	0,066
B	0,053	0,044	0,049	0,049	0,048	0,053	0,053	0,059	0,068
C	0,052	0,051	0,05	0,049	0,05	0,051	0,052	0,057	0,067
D	0,046	0,05	0,05	0,057	0,054	0,048	0,05	0,061	0,052
E	0,056	0,057	0,059	0,054	0,057	0,068	0,059	0,055	0,052
F	0,056	0,051	0,057	0,055	0,047	0,058	0,065	0,057	0,051

F.2 Plate isi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,203	0,194	0,179	0,167	0,169	0,147	0,121	0,126	0,121
B	0,205	0,183	0,175	0,165	0,154	0,143	0,131	0,126	0,124
C	0,204	0,191	0,177	0,164	0,156	0,142	0,128	0,123	0,124
D	0,248	0,25	0,257	0,207	0,188	0,163	0,146	0,133	0,107
E	0,257	0,259	0,263	0,2	0,193	0,185	0,156	0,129	0,105
F	0,257	0,251	0,258	0,203	0,183	0,174	0,159	0,13	0,105

Keterangan:

1 = standar genistein 80,990 ppm dan dapar fosfat pH 6,5;

2 = standar genistein 92,560 ppm dan dapar fosfat pH 6,5;

3 = standar genistein 104,130 ppm dan sampel ekstrak etanol tempe kedelai 10 ppm;

4 = standar genistein 115,700 ppm dan sampel ekstrak etanol tempe kedelai 15 ppm;

5 = standar genistein 127,270 ppm dan sampel ekstrak etanol tempe kedelai 20 ppm;

6 = standar genistein 138,840 ppm dan sampel ekstrak etanol tempe kedelai 40 ppm;

7 = standar genistein 150,410 ppm dan sampel ekstrak etanol tempe kedelai 60 ppm;

8 = standar genistein 161,980 ppm dan sampel ekstrak etanol tempe kedelai 80 ppm;

9 = standar genistein 173,550 ppm dan sampel ekstrak etanol tempe kedelai 100 ppm.

F.3 Hasil pengurangan isi-kosongan**a) Standar genistein**

	80,990 ppm	92,560 ppm	104,130 ppm	115,700 ppm	127,270 ppm	138,840 ppm	150,410 ppm	161,980 ppm	173,550 ppm
A	0,150	0,140	0,128	0,116	0,108	0,094	0,078	0,065	0,055
B	0,152	0,139	0,126	0,116	0,106	0,09	0,078	0,067	0,056
C	0,152	0,14	0,127	0,115	0,106	0,091	0,076	0,066	0,057

b) Sampel ekstrak etanol tempe kedelai

	dapar	dapar	10 ppm	15 ppm	20 ppm	40 ppm	60 ppm	80 ppm	100 ppm
D	0,202	0,200	0,207	0,147	0,134	0,115	0,096	0,072	0,055
E	0,201	0,202	0,204	0,146	0,136	0,117	0,097	0,074	0,053
F	0,201	0,200	0,201	0,148	0,136	0,116	0,094	0,073	0,054

Masing-masing replikasi dihitung % hambatan tirosinase

$$\% \text{ hambatan tirosinase} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A = absorbansi pada 478 nm tanpa ekstrak atau standar

B = absorbansi pada 478 nm dengan ekstrak atau standar

Rata-rata dapar fosfat pH 6,5

$$\frac{0,202 + 0,201 + 0,201 + 0,200 + 0,202 + 0,200}{6} = 0,201$$

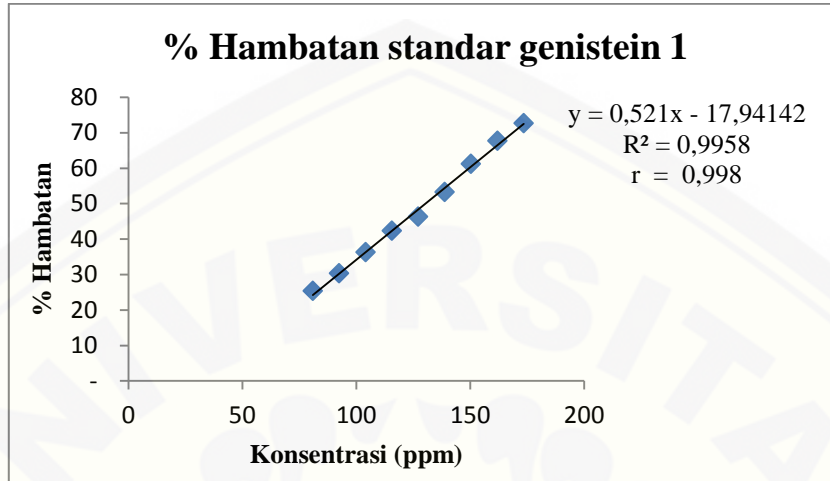
$$SD = 0,00089443, RSD = \frac{0,00089443}{0,201} \times 100\% = 0,445\%$$

F.4 % Hambatan standar genistein

a) Replikasi 1

Konsentrasi (ppm)	% Hambatan
80,990	$\frac{0,201-0,150}{0,201} \times 100\% = 25,373\%$
92,560	$\frac{0,201-0,14}{0,201} \times 100\% = 30,348\%$
104,130	$\frac{0,201-0,128}{0,201} \times 100\% = 36,318\%$
115,700	$\frac{0,201-0,116}{0,201} \times 100\% = 42,289\%$
127,270	$\frac{0,201-0,108}{0,201} \times 100\% = 46,269\%$
138,840	$\frac{0,201-0,094}{0,201} \times 100\% = 53,234\%$
150,410	$\frac{0,201-0,078}{0,201} \times 100\% = 61,194\%$
161,980	$\frac{0,201-0,065}{0,201} \times 100\% = 67,662\%$
173,550	$\frac{0,201-0,055}{0,201} \times 100\% = 72,637\%$

$Y = 0,521x - 17,94142$
 $r = 0,998$
 $50 = 0,521x - 17,94142$
 $= 130,406 \text{ ppm}$



b) Replikasi 2

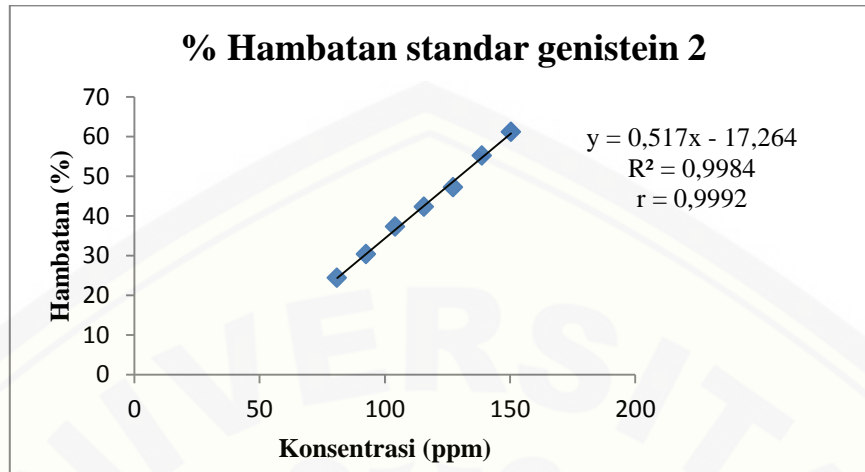
Konsentrasi (ppm)	% Hambatan
80,990	$\frac{0,201-0,152}{0,201} \times 100 \% = 24,378\%$
92,560	$\frac{0,201-0,139}{0,201} \times 100 \% = 30,846\%$
104,130	$\frac{0,201-0,126}{0,201} \times 100 \% = 37,313\%$
115,700	$\frac{0,201-0,116}{0,201} \times 100 \% = 42,289\%$
127,270	$\frac{0,201-0,106}{0,201} \times 100 \% = 47,264\%$
138,840	$\frac{0,201-0,09}{0,201} \times 100 \% = 55,224\%$
150,410	$\frac{0,201-0,078}{0,201} \times 100 \% = 61,194\%$
161,980	$\frac{0,201-0,067}{0,201} \times 100 \% = 66,667\%$
173,550	$\frac{0,201-0,056}{0,201} \times 100 \% = 72,139\%$

$$Y = 0,517x - 17,264$$

$$r = 0,9992$$

$$50 = 0,517x - 17,264$$

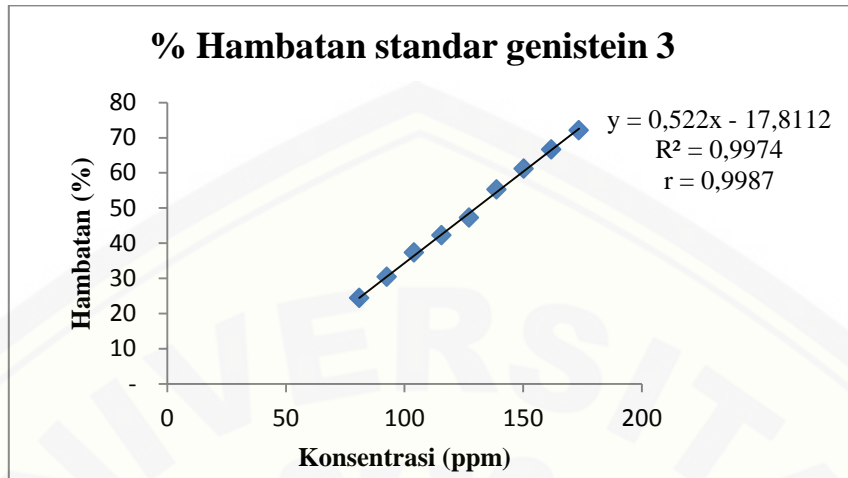
$$= 130,104 \text{ ppm}$$



c) Replikasi 3

Konsentrasi (ppm)	% Hambatan
80,990	$\frac{0,201-0,152}{0,201} \times 100 \% = 24,378 \%$
92,560	$\frac{0,201-0,14}{0,201} \times 100 \% = 30,348 \%$
104,130	$\frac{0,201-0,127}{0,201} \times 100 \% = 36,816 \%$
115,700	$\frac{0,201-0,115}{0,201} \times 100 \% = 42,786 \%$
127,270	$\frac{0,201-0,106}{0,201} \times 100 \% = 47,264 \%$
138,840	$\frac{0,201-0,091}{0,201} \times 100 \% = 54,726 \%$
150,410	$\frac{0,201-0,076}{0,201} \times 100 \% = 62,189 \%$
161,980	$\frac{0,201-0,066}{0,201} \times 100 \% = 67,164 \%$
173,550	$\frac{0,201-0,057}{0,201} \times 100 \% = 71,642 \%$

$Y = 0,522x - 17,8112$
 $r = 0,9987$
 $50 = 0,522x - 17,8112$
 $= 129,907 \text{ ppm}$



d) Rata-rata % hambatan per replikasi

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata (%)	SD	RSD (%)
80,990	24,710	0,574	2,325
92,560	30,514	0,288	0,942
104,130	36,816	0,498	1,351
115,700	42,455	0,287	0,676
127,270	46,932	0,574	1,224
138,840	54,395	1,036	1,904
150,410	61,526	0,574	0,934
161,980	67,164	0,498	0,741
173,550	72,139	0,498	0,689

e) IC₅₀ standar genistein

Replikasi	IC ₅₀	SD	RSD(%)
1	130,406 ppm	0,251	0,193
2	130,104 ppm		
3	129,907 ppm		
Rata-rata	130,139 ppm		

F.5 % Hambatan ekstrak Etanol Tempe Kedelai

a) Replikasi 1

Konsentrasi (ppm)	dapar	dapar	10,05 ppm	15,1 ppm	20,1 ppm	40,2 ppm	60,3 ppm	80,4 ppm	100,5 ppm
Absorbansi	0,202	0,200	0,207	0,147	0,134	0,115	0,096	0,072	0,055

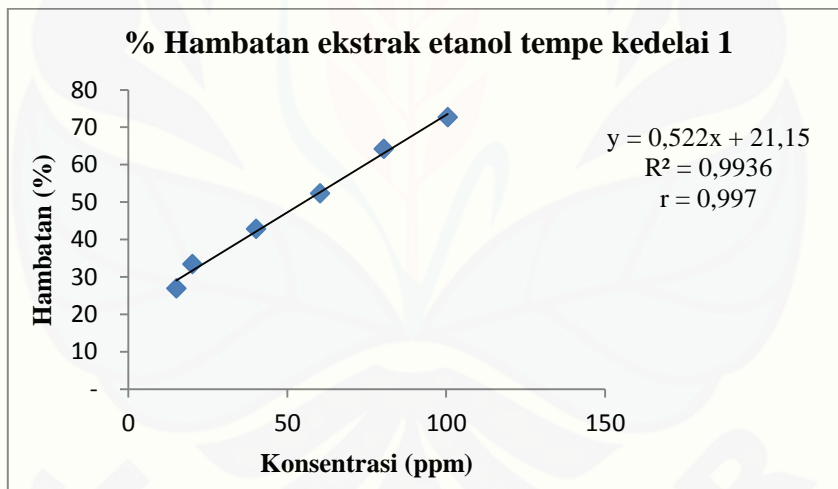
Konsentrasi (ppm)	% Hambatan
15,1	$\frac{0,201-0,147}{0,201} \times 100 \% = 26,866\%$
20,1	$\frac{0,201-0,134}{0,201} \times 100 \% = 33,333\%$
40,2	$\frac{0,201-0,115}{0,201} \times 100 \% = 42,786\%$
60,3	$\frac{0,201-0,096}{0,201} \times 100 \% = 52,239\%$
80,4	$\frac{0,201-0,072}{0,201} \times 100 \% = 64,179\%$
100,5	$\frac{0,201-0,055}{0,201} \times 100 \% = 72,637\%$

$$Y = 0,522 x + 21,15$$

$$r = 0,997$$

$$50 = 0,522 x + 21,15$$

$$=55,268 \text{ ppm}$$

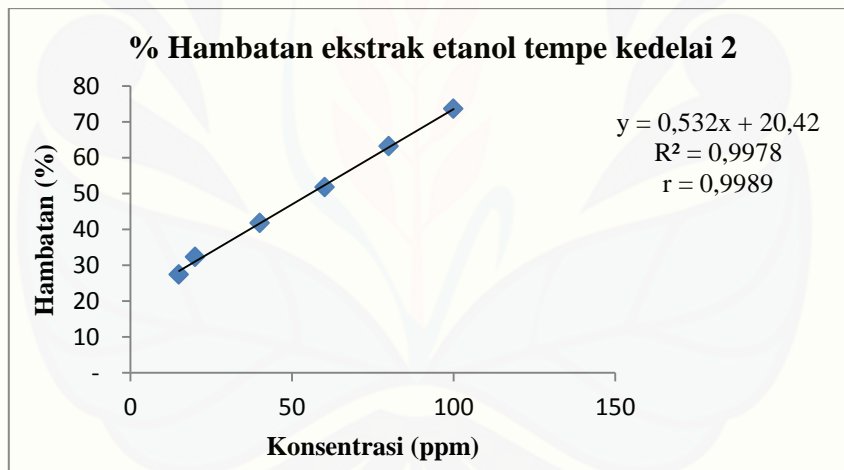


b) Replikasi 2

Konsentrasi (ppm)	dapar	dapar	10 ppm	15,03 ppm	20 ppm	40 ppm	60,12 ppm	80 ppm	100 ppm
Absorbansi	0,201	0,202	0,204	0,146	0,136	0,117	0,097	0,074	0,053

Konsentrasi (ppm)	% Hambatan
15,03	$\frac{0,201-0,146}{0,201} \times 100 \% = 27,363\%$
20	$\frac{0,201-0,136}{0,201} \times 100 \% = 32,338\%$
40	$\frac{0,201-0,117}{0,201} \times 100 \% = 41,791\%$
60,12	$\frac{0,201-0,097}{0,201} \times 100 \% = 51,741\%$
80	$\frac{0,201-0,074}{0,201} \times 100 \% = 63,184\%$
100	$\frac{0,201-0,053}{0,201} \times 100 \% = 73,632\%$

$Y = 0,532x + 20,42$
 $r = 0,9989$
 $50 = 0,532x + 20,42$
 $=55,602\text{ppm}$

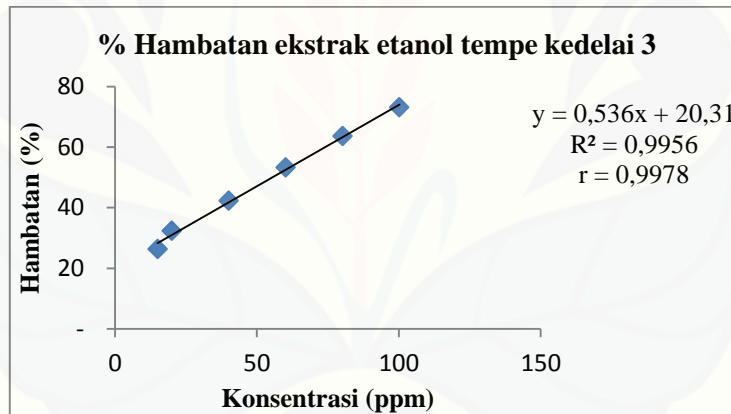


c) Replikasi 3

Konsentrasi (ppm)	dapar	dapar	10,025 ppm	15 ppm	20,05 ppm	40,1 ppm	60,15 ppm	80,2 ppm	100,25 ppm
Absorbansi	0,201	0,200	0,201	0,148	0,136	0,116	0,094	0,073	0,054

Konsentrasi (ppm)	% Hambatan
15	$\frac{0,201-0,148}{0,201} \times 100 \% = 26,368\%$
20,05	$\frac{0,201-0,136}{0,201} \times 100 \% = 32,338\%$
40,1	$\frac{0,201-0,116}{0,201} \times 100 \% = 42,289\%$
60,15	$\frac{0,201-0,094}{0,201} \times 100 \% = 53,234\%$
80,2	$\frac{0,201-0,073}{0,201} \times 100 \% = 63,681\%$
100,25	$\frac{0,201-0,054}{0,201} \times 100 \% = 73,134\%$

$Y = 0,536x + 20,31$
 $r = 0,9978$
 $50 = 0,536x + 20,31$
 $= 55,392 \text{ ppm}$



d) Rata-rata % hambatan per replikasi

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata (%)	SD	RSD (%)
15	26,866	0,498	1,852
20	32,669	0,574	1,758
40	42,289	0,498	1,176
60	52,405	0,760	1,451
80	63,681	0,498	0,781
100	73,134	0,498	0,680

e) IC_{50} ekstrak etanol tempe kedelai

Replikasi	IC_{50}	SD	RSD(%)
1	55,268 ppm	0,169	0,305
2	55,602 ppm		
3	55,392 ppm		
Rata-rata	55,420 ppm		

Lampiran G. Perhitungan Dosis Ekstrak Etanol Tempe Kedelai untuk Formula Krim

IC_{50} ekstrak etanol tempe = 55,420 $\mu\text{g/ml}$ = 55,420 mg/L

Berat jenis sediaan dianggap 1 gram/ml, sehingga dalam 1 gram sediaan mengandung $5,542 \times 10^{-5}$ gram ekstrak.

Untuk 100 gram sediaan maka butuh ekstrak $5,542 \times 10^{-3}$.

% b/b = $0,005542 \text{ g}/100\text{gram} \times 100\%$ = $5,542 \times 10^{-3}$ % b/b

Dosis ekstrak etanol tempe kedelai $5,542 \times 10^{-3}$ % b/b terlalu kecil sehingga dikalikan 100 $\rightarrow (5,542 \cdot 10^{-3}) \times 100 = 5,542 \times 10^{-1}$ % b/b (100 kali dari nilai IC_{50}).

Lampiran H. Perhitungan % tween 80 dan % Span 80 dalam Formula Krim Air dalam Minyak (A/M)

a) Perhitungan HLB butuh campuran bahan

➤ HLB bahan :

- Vaseline = 4
- Adeps lanae = 8
- Setil alkohol = 13
- Asam stearat = 17

Jumlah fase minyak:

Vaseline + adeps lanae + setil alkohol + asam stearat =

$25\% + 20\% + 5\% + 13\% = 63\%$

➤ HLB butuh campuran bahan

$$\text{Vaselin} = \frac{25\%}{63\%} \times 100\% = 39,68\% \rightarrow \frac{39,68}{100} \times 4 = 1,5872$$

$$\text{Adeps lanae} = \frac{20\%}{63\%} \times 100\% = 31,75\% \rightarrow \frac{31,75}{100} \times 8 = 2,54$$

$$\text{Setil alkohol} = \frac{5\%}{63\%} \times 100\% = 7,94\% \rightarrow \frac{7,94}{100} \times 13 = 1,032$$

$$\text{Asam stearat} = \frac{13\%}{63\%} \times 100\% = 20,63\% \rightarrow \frac{20,63}{100} \times 17 = 3,5079$$

$$\text{Total HLB campuran} = 1,5872 + 2,54 + 1,032 + 3,5079 = 8,7$$

b) Perhitungan % tween 80 dan % span 80

$$\begin{aligned} \text{\% tween 80} &= \frac{\text{HLB campuran} - \text{HLB span 80}}{\text{HLB tween 80} - \text{HLB span 80}} \times 100\% \\ &= \frac{8,7 - 4,3}{15 - 4,3} = 0,4112 \times 100\% = 41,12\% \end{aligned}$$

$$\text{\% span 80} = 100 - 41,12\% = 58,88\%$$

Jika jumlah bahan dalam 100 gram yang dibutuhkan 78,2 gram dan aquades yang dibutuhkan 18,4 gram, maka sisa 100 gram - 99,6 gram = 3,4 gram

Tween 80 dan span 80 yang dibutuhkan:

$$\text{Tween 80} = \frac{41,12}{100} \times 3,4 \text{ gram} = 1,4 \text{ gram} \rightarrow \text{untuk sediaan 100 gram butuh } 1,4\%$$

$$\text{Span 80} = \frac{58,88}{100} \times 3,4 \text{ gram} = 2 \text{ gram} \rightarrow \text{untuk sediaan 100 gram butuh } 2\%$$

c) Formula krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M)

Ekstrak etanol tempe kedelai	$5,542 \times 10^{-1} \%$ (Dosis diperoleh dari nilai IC ₅₀).
Vaselin	25%
Adeps lanae	20%
Setil alkohol	5%
Asam stearat	13%
Gliserol	10%
Tween 80	1,4%
Span 80	2%
Metil paraben	0,05%
Propil paraben	0,1%
Propilen glikol	5%
Oleum rosae	0,05%
Aquades	ad 100%

Lampiran I. Data Hasil Uji Presisi dan Penetapan Kadar Isoflavon Genistein pada Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

I.1 Data hasil uji presisi dan kadar genistein pada sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M)

Replikasi	Penimbangan (mg)	Area	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	Rata-rata (%)	SD	RSD (%)	
Krim A/M 1	Rep 1 Rep 2 Rep 3	300 305 303	322,12 322,54 322,37	$1,374 \times 10^{-2}$ $1,376 \times 10^{-2}$ $1,376 \times 10^{-2}$	$0,458 \times 10^{-2}$ $0,451 \times 10^{-2}$ $0,454 \times 10^{-2}$	$0,454 \times 10^{-2}$	$0,004 \times 10^{-2}$	0,774
Krim A/M 2	Rep 1 Rep 2 Rep 3	300 302 305	321,98 322,47 323,71	$1,374 \times 10^{-2}$ $1,378 \times 10^{-2}$ $1,382 \times 10^{-2}$	$0,458 \times 10^{-2}$ $0,456 \times 10^{-2}$ $0,453 \times 10^{-2}$	$0,456 \times 10^{-2}$	$0,252 \times 10^{-4}$	0,553
Krim A/M 3	Rep 1 Rep 2 Rep 3	301 303 302	321,29 322,87 323,99	$1,370 \times 10^{-2}$ $1,378 \times 10^{-2}$ $1,384 \times 10^{-2}$	$0,455 \times 10^{-2}$ $0,455 \times 10^{-2}$ $0,458 \times 10^{-2}$	$0,456 \times 10^{-2}$	$1,732 \times 10^{-5}$	0,379
Rata -rata					$0,460 \times 10^{-2}$	$2,751 \times 10^{-6}$	0,569	

I.2 Data hasil uji presisi dan kadar genistein pada sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe minyak dalam air (M/A)

Replikasi	Penimbangan (mg)	Area	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	Rata - rata (%)	SD	RSD (%)	
Krim M/A 1	Rep 1 Rep 2 Rep 3	300 301 303	367,48 367,92 369,34	$1,370 \times 10^{-2}$ $1,373 \times 10^{-2}$ $1,380 \times 10^{-2}$	$0,457 \times 10^{-2}$ $0,456 \times 10^{-2}$ $0,456 \times 10^{-2}$	$0,456 \times 10^{-2}$	$0,058 \times 10^{-4}$	0,127
Krim M/A 2	Rep 1 Rep 2 Rep 3	300 300 302	367,47 366,79 368,67	$1,370 \times 10^{-2}$ $1,366 \times 10^{-2}$ $1,377 \times 10^{-2}$	$0,456 \times 10^{-2}$ $0,455 \times 10^{-2}$ $0,456 \times 10^{-2}$	$0,456 \times 10^{-2}$	$0,058 \times 10^{-4}$	0,127
Krim M/A 3	Rep 1 Rep 2 Rep 3	301 300 300	368,67 367,56 366,06	$1,377 \times 10^{-2}$ $1,371 \times 10^{-2}$ $1,363 \times 10^{-2}$	$0,457 \times 10^{-2}$ $0,457 \times 10^{-2}$ $0,454 \times 10^{-2}$	$0,456 \times 10^{-2}$	$0,173 \times 10^{-4}$	0,379
Rata -rata					$0,460 \times 10^{-2}$	$0,963 \times 10^{-5}$	0,211	

Contoh perhitungan penetapan kadar genistein pada krim ekstrak etanol tempe kedelai:

Krim A/M 1

Persamaan regresi = $Y = 32,7X + 52,5$

➤ Replikasi 1

$$322,12 = 32,7X + 52,5$$

$$X = 8,245 \text{ ng}/6 \mu\text{l}$$

$$\frac{8,245 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} = 13741,67 \text{ ng} = 1,374 \times 10^{-2} \text{ mg}$$

$$\% \frac{b}{b} = \frac{1,374 \cdot 10^{-2} \text{mg}}{300 \text{mg}} \times 100\% = 0,458 \times 10^{-2} \% \frac{b}{b}$$

➤ Rep 2 (track 11)

$$322,54 = 32,7X + 52,5$$

$$X = 8,258 \text{ ng}/6 \mu\text{l}$$

$$\begin{aligned} \frac{8,258 \text{ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} &= 13763,33 \text{ng} \\ &= 1,376 \times 10^{-2} \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\% \frac{b}{b} = \frac{1,376 \cdot 10^{-2} \text{ mg}}{305 \text{mg}} \times 100\% = 0,451 \times 10^{-2} \% \frac{b}{b}$$

➤ Rep 3 (track 12)

$$322,37 = 32,7X + 52,5$$

$$X = 8,253 \text{ ng}/6 \mu\text{l}$$

$$\begin{aligned} \frac{8,253 \text{ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} &= 13755 \text{ng} \\ &= 1,376 \times 10^{-2} \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\% \frac{b}{b} = \frac{1,376 \cdot 10^{-2} \text{ mg}}{303 \text{mg}} \times 100\% = 0,454 \times 10^{-2} \% \frac{b}{b}$$

Rata-rata kadar genistein dalam krim ekstrak etanol tempe air dalam minyak (A/M) replikasi 1

Rata-rata % genistein =

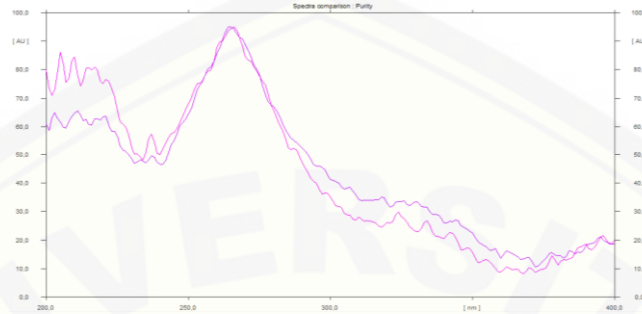
$$\frac{0,458 \cdot 10^{-2} \% + 0,451 \cdot 10^{-2} \% + 0,454 \cdot 10^{-2} \%}{3} = 0,454 \times 10^{-2} \% \frac{b}{b}$$

$$SD = \sqrt{\frac{(0,00458 - 0,00454)^2 + (0,00451 - 0,00454)^2 + (0,00454 - 0,00454)^2}{3-1}} = 0,00004$$

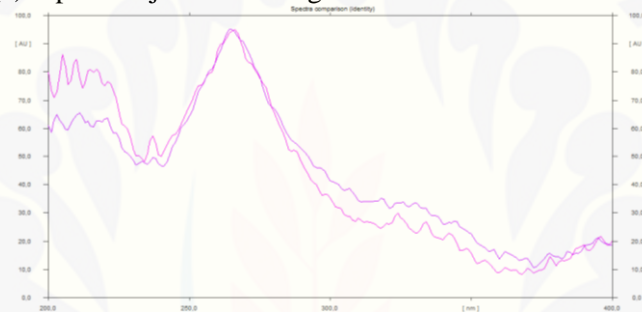
$$RSD = \frac{SD}{\text{Rata-rata genistein}} \times 100\% = \frac{0,00004}{0,00454} \times 100\% = 0,774\%$$

I.3 Kemurnian dan identitas genistein dalam sediaan krim

a). Kemurnian dan identitas genistein dalam sediaan krim air dalam minyak (A/M)



(a) Spektra uji kemurnian genistein dalam standar dan sampel



(b) Spektra uji identitas genistein dalam standar dan sampel

= spektra standar genistein
 = spektra genistein dalam sampel

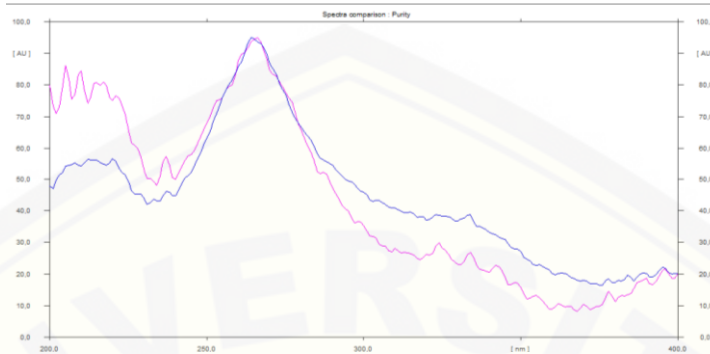
Hasil uji kemurnian genistein

Uji	Track	Rf	r(s.m)	r(m,e)	Purity
Kemurnian	Standar	0,40	0,997697	0,992750	OK
	Sampel	0,40	0,997926	0,992582	OK

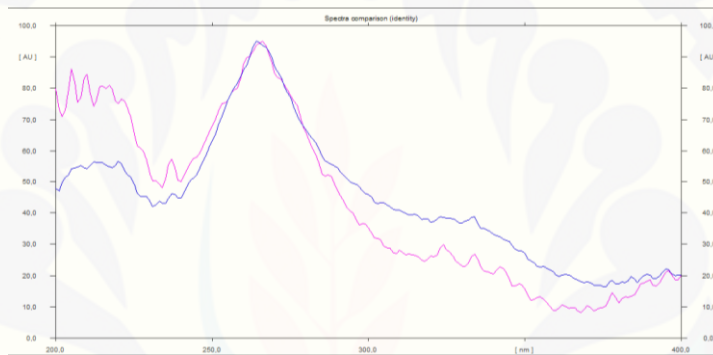
Hasil uji Identitas genistein

Uji	Track	Rf	r(s.s)	r(s.a)	Identity
Identitas	Standar	0,40	0,994020	0,994736	OK
	Sampel	0,40	0,994020	0,990899	OK

b). Kemurnian dan identitas genistein dalam sediaan krim minyak dalam air (M/A)



(a) Spektra uji kemurnian genistein dalam standar dan sampel



(b) Spektra uji identitas genistein dalam standar dan sampel



= spektra standar genistein



= spektra genistein dalam sampel

Hasil uji kemurnian genistein

Uji	Track	Rf	r(s,m)	r(m,e)	Purity
Kemurnian	Standar	0,40	0,997697	0,992750	OK
	Sampel	0,40	0,998838	0,991041	OK

Hasil uji Identitas genistein

Uji	Track	Rf	r(s,s)	r(s,a)	Identity
Identitas	Standar	0,40	0,994020	0,994736	OK
	Sampel	0,40	0,994020	0,992322	OK

Lampiran J. Data Akurasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe kedelai

Adisi 30 %	Penimbangan Sampel (mg)	Penambahan Standar Adisi (mg)	Massa Teoritis (ng)	Massa Hasil Percobaan (ng)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	RSD (%)
Krim	300	$0,415 \times 10^{-2}$	10,770	10,710	99,443		
A/M	301	$0,415 \times 10^{-2}$	10,800	10,880	100,741	100,463	0,909
	301	$0,415 \times 10^{-2}$	10,800	10,930	101,204		
Krim	301	$0,415 \times 10^{-2}$	10,800	10,910	101,019		
M/A	300	$0,415 \times 10^{-2}$	10,770	10,940	101,578	100,897	0,743
	300	$0,415 \times 10^{-2}$	10,770	10,780	100,093		

Contoh perhitungan sampel krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M dan M/A pada uji akurasi dengan metode standar adisi:

Kadar genistein pada sampel krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A) yang dipakai pada perhitungan uji akurasi adalah 0,0046% (rata-rata kadar genistein dari hasil uji penetapan kadar sediaan krim).

➤ Pembuatan sampel adisi 30%

Jika sampel ditimbang 300 mg, maka standar genistein yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

$$\frac{300\text{mg sampel sediaan} \times 0,0046 \text{ gram} \times 0,3}{100 \text{ gram}} = 0,00414\text{mg standar genistein}$$

Menimbang standar genistein 4,15 mg, dimasukkan labu ukur 10 ml dan ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas.

$$\frac{4,15 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 415 \text{ ppm}$$

$$\text{Lalu standar genistein diencerkan, } \frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 415 \mu\text{g/ml} = 41,5 \text{ ppm}$$

$$\text{Diencerkan, } \frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 41,5 \mu\text{g/ml} = 4,15 \text{ ppm}$$

Cara kerja :

- Menimbang 300 mg sampel ekstrak etanol tempe kedelai dan dilarutkan dengan metanol p.a, kemudian dimasukkan labu ukur 10 ml

- b) Pipet 1 ml larutan standar 4,15 ppm, dimasukkan ke labu ukur 10 ml yang berisi larutan sampel, sehingga telah dilakukan adisi sebanyak 0,00415 mg ke dalam 300 mg sampel.

$$1\text{ml dari } 4,15 \text{ ppm, } \frac{4,15 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times 1 \text{ ml} = 0,415 \times 10^{-2} \text{ mg}$$

- c) Menambahkan metanol sampai tanda batas

➤ Perhitungan % *recovery*

Misal: pada replikasi 1 dari sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M) dengan penimbangan 300 mg

Konsentrasi teoritis

$$\frac{0,0046 \text{ gram}}{100\text{gram}} \times 300 \text{ mg sampel} = 0,0138 \text{ mg} + 0,00415 \text{ mg} = 0,01795 \text{ mg}$$

(jumlah genistein dalam sampel adisi 30%)

$$\frac{0,01795\text{mg}}{10\text{ml}} \times 1000\mu\text{l} = 1,795\mu\text{g/ml} \times 6\mu\text{l} = 10,770 \text{ ng genistein}$$

Hasil percobaan: 10,710 ng;

$$\% \text{ recovery} = \frac{10,710 \text{ ng}}{10,770 \text{ ng}} \times 100\% = 99,443 \%$$

Lampiran K. Data Evaluasi Fisik Dan Kimia Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai

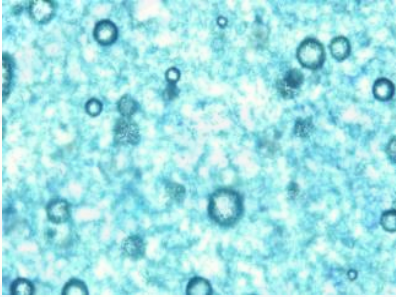
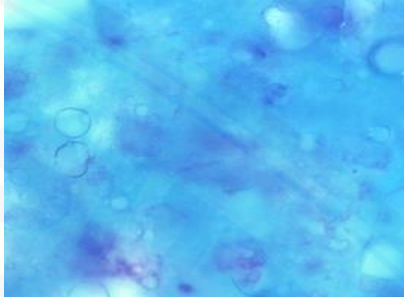
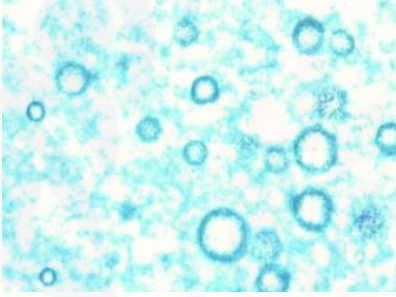

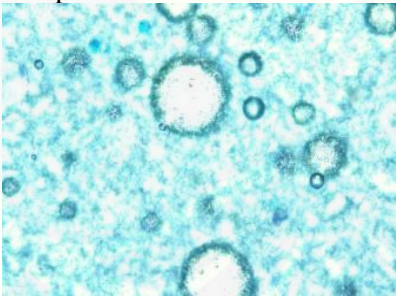
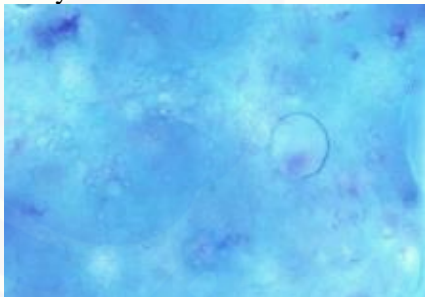
K.1 Data hasil pengujian pH sediaan krim

Replikasi	Krim air dalam minyak (A/M)	Krim minyak dalam air (M/A)
1	6,60	6,95
2	6,57	6,93
3	6,58	6,97
Rata-rata ± SD	6,58 ± 0,02	6,95 ± 0,02

K.2 Data hasil pengujian viskositas sediaan krim

Replikasi	Krim air dalam minyak (A/M)	Krim minyak dalam air (M/A)
1	105 dPa.s	94 dPa.s
2	104 dPa.s	94 dPa.s
3	105 dPa.s	95 dPa.s
Rata-rata ± SD	104,70 ± 0,58 dPa.s	94,30 ± 0,58 dPa.s

K.3 Data hasil pengujian tipe krim

Replikasi	Krim air dalam minyak (A/M)	Krim minyak dalam air (M/A)
1	<p>Warna biru dari metilen biru berupa bintik-bintik</p> 	<p>Warna biru dari metilen biru menyebar secara merata</p> 
2	<p>Warna biru dari metilen biru berupa bintik-bintik</p> 	<p>Warna biru dari metilen biru menyebar secara merata</p> 
3	<p>Warna biru dari metilen biru berupa bintik-bintik</p> 	<p>Warna biru dari metilen biru menyebar secara merata</p> 

K.4 Data uji daya sebar sediaan krim

a) Tabulasi hasil diameter sebar krim pada pengujian daya sebar krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M)

Beban yang diberikan (g)	Daya sebar (cm)		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
0	3,46	3,2	3,32
5	4,34	4,24	4,28
10	4,72	4,74	4,70
15	5,12	4,28	5,40
20	5,44	5,80	5,90
25	5,88	6,20	6,20
30	6,40	6,54	6,56
35	6,50	6,60	6,60
40	6,50	6,60	6,60

$$\text{Rata-rata} \pm \text{SD} = \frac{6,50+6,60+6,60}{3} = 6,57 \text{ cm} \pm 0,058$$

b) Tabulasi hasil diameter sebar krim pada pengujian daya sebar krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe minyak dalam air (M/A)

Beban yang diberikan (g)	Daya sebar (cm)		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
0	3,38	3,42	3,36
5	4,10	4,20	4,16
10	4,74	4,68	4,56
15	5,16	4,94	5,16
20	5,62	5,32	5,62
25	6,12	5,88	6,12
30	6,52	6,40	6,52
35	6,60	6,66	6,66
40	6,60	6,70	6,70
45	6,60	6,70	6,70

$$\text{Rata-rata} \pm \text{SD} = \frac{6,60+6,70+6,70}{3} = 6,67 \text{ cm} \pm 0,058$$

Lampiran L. Data Hasil Uji Kesukaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai Tipe A/M dan M/A

a) Data hasil uji kesukaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe A/M

Nomor responden	Tekstur	Warna	Bau	Konsistensi
1	2	2	1	1
2	2	3	2	3
3	2	2	1	3
4	2	2	2	3
5	3	3	2	2
6	2	2	2	3
7	5	4	4	4
8	5	4	2	2
9	4	2	2	4
10	3	2	4	3
11	4	3	2	2
12	5	3	3	5
13	5	3	3	5
14	4	3	4	3
15	4	3	3	4
16	3	3	3	4
17	4	4	2	3
18	2	3	2	3
19	1	2	1	2
20	4	4	3	3
21	3	4	3	3
22	3	3	3	3
23	3	3	2	4
24	4	4	2	5
25	2	2	3	3
26	2	3	3	4
27	3	2	2	3
28	2	2	3	2
29	2	2	1	3
30	4	4	4	4
31	3	3	2	5
32	3	4	3	4
33	2	3	3	2
34	3	2	2	2

Nomor responden	Tekstur	Warna	Bau	Konsistensi
35	4	4	2	4
36	3	3	2	3
37	3	4	2	3
38	4	4	5	4
39	2	2	4	3
40	5	2	5	2
41	3	2	2	2
42	2	4	1	2
43	3	2	2	4
44	2	1	1	1
45	3	2	2	4
46	3	3	4	5
47	5	5	5	3
48	4	2	3	4
49	3	3	3	4
50	3	5	5	3
Rata-rata	3,14	2,92	2,64	3,20

b). Data hasil uji kesukaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe M/A

Nomor responden	Tekstur	Warna	Bau	Konsistensi
1	4	5	4	4
2	4	4	5	4
3	4	3	3	2
4	4	5	3	3
5	4	5	4	4
6	4	3	3	2
7	3	3	2	2
8	4	3	3	4
9	3	4	4	3
10	3	5	4	4
11	3	5	4	4
12	5	3	2	3
13	5	4	2	3
14	5	5	4	4
15	5	5	3	4
16	4	4	3	3

Nomor responden	Tekstur	Warna	Bau	Konsistensi
17	5	4	3	3
18	4	4	3	4
19	4	4	4	5
20	5	5	4	5
21	4	5	4	4
22	4	4	4	4
23	4	4	3	3
24	3	3	2	4
25	4	4	3	4
26	3	4	4	3
27	4	4	3	4
28	4	4	3	2
29	3	4	3	3
30	4	4	4	3
31	4	4	5	4
32	4	5	4	5
33	4	4	3	4
34	4	5	5	4
35	3	3	2	3
36	3	4	3	4
37	4	4	3	4
38	4	4	4	5
39	4	4	4	4
40	4	5	4	5
41	4	4	4	3
42	4	5	5	4
43	2	4	3	2
44	5	5	4	4
45	3	5	4	2
46	5	5	4	3
47	3	3	3	2
48	3	5	4	3
49	3	4	3	3
50	5	3	3	4
Rata-rata	3,88	4,16	3,48	3,52

Lampiran M. Data Hasil Analisis dengan Uji SPSS

M.1 Data hasil analisis IC₅₀ ekstrak etanol tempe kedelai dan standar genistein

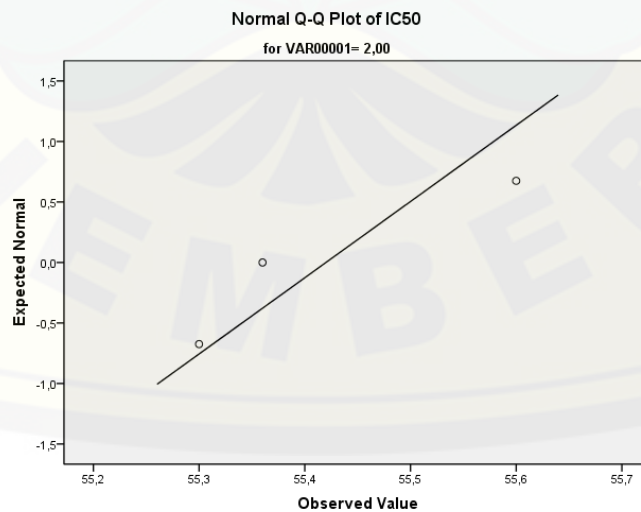
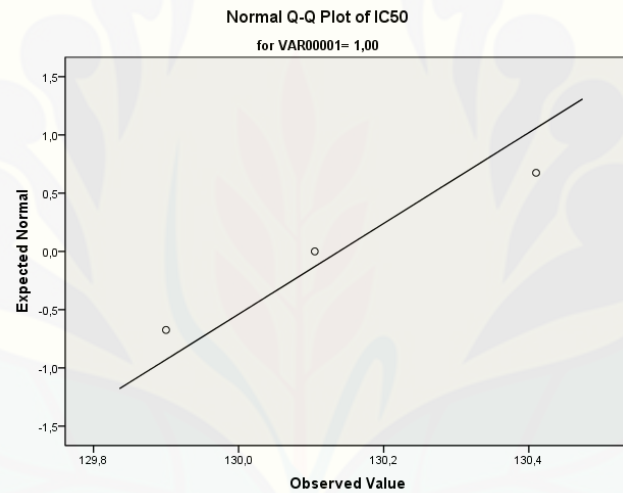
a) Uji normalitas

Tests of Normality							
VAR00001		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IC50	1,00	,218	3	.	,987	3	,785
	2,00	,314	3	.	,893	3	,363

a. Lilliefors Significance Correction

Data memiliki sebaran yang normal ($p > 0,05$)

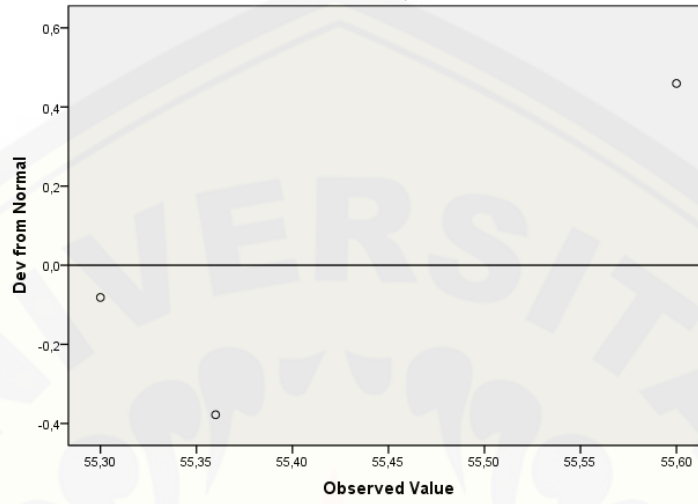
Normal Q-Q Plots



Detrended Normal Q-Q Plots

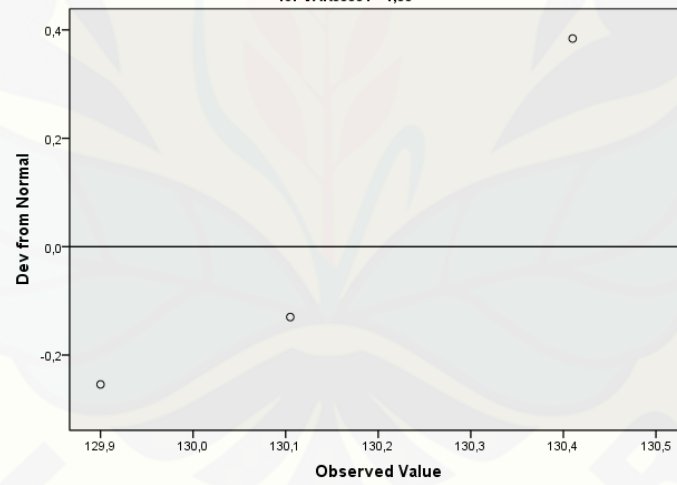
Detrended Normal Q-Q Plot of IC50

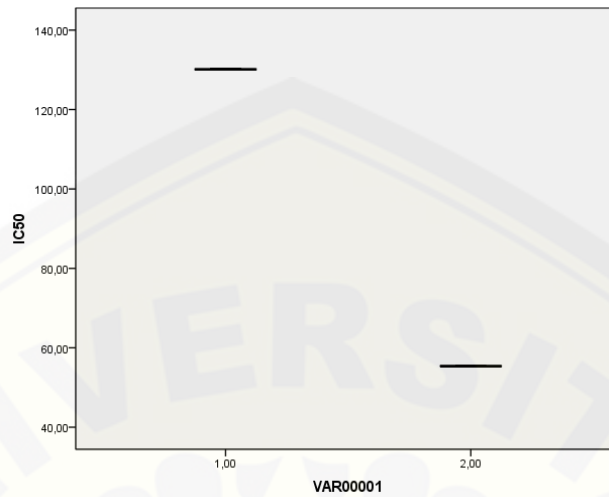
for VAR00001= 2,00



Detrended Normal Q-Q Plot of IC50

for VAR00001= 1,00





b) Uji T-tidak berpasangan

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
IC50	Equal variances assumed	,553	,498	428,872	4	,000	74,71833	,17422	74,23462	75,20205
	Equal variances not assumed			428,872	3,335	,000	74,71833	,17422	74,19411	75,24256

Hasil nilai IC₅₀ ekstrak etanol tempe kedelai dan standar genistein memiliki perbedaan aktivitas hambatan tirosinase yang signifikan (p < 0,05).

M.2 Data hasil analisis pengaruh formulasi sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai terhadap kadar genistein

a). Uji normalitas

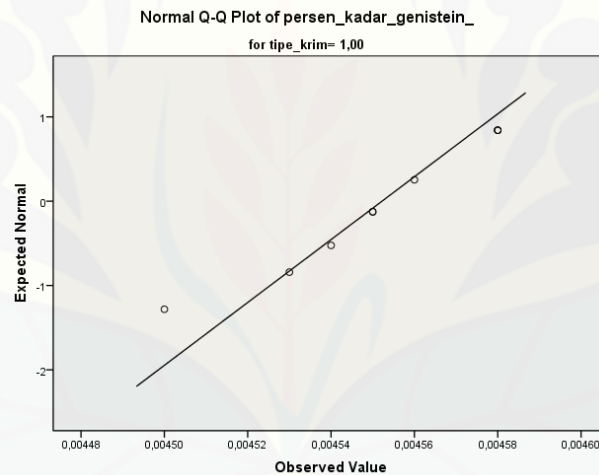
tipe_krim		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
persen_kadar_	1,00	,183	9	,200*	,905	9	,285
genistein_	2,00	,278	9	,044	,853	9	,081

a. Lilliefors Significance Correction

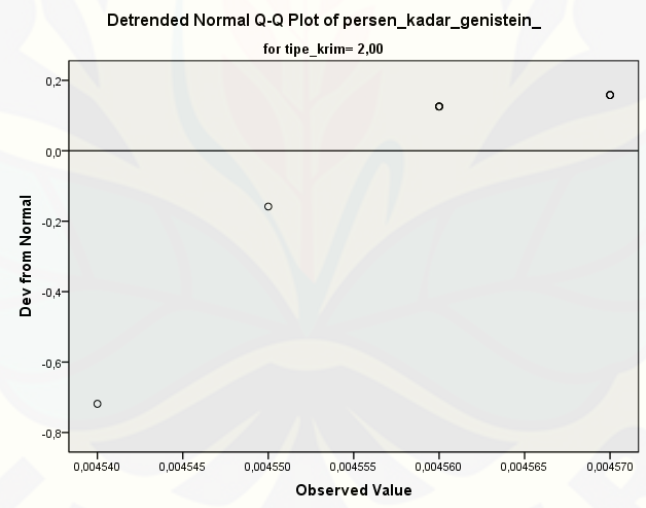
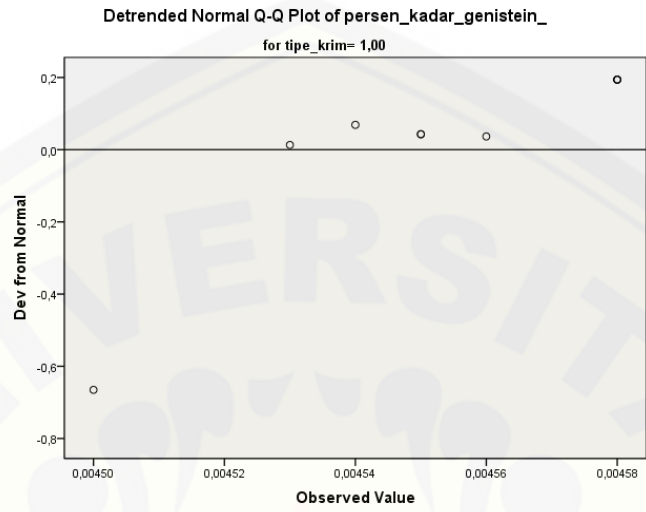
*. This is a lower bound of the true significance.

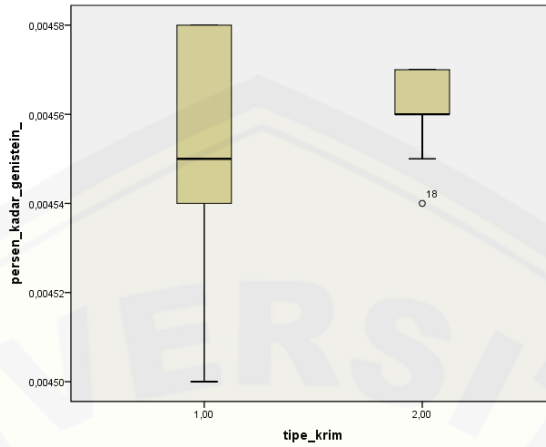
Data memiliki sebaran yang normal ($p > 0,05$)

Normal Q-Q Plots



Detrended Normal Q-Q Plots





b). Uji T-tidak berpasangan

		Independent Samples Test								
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
persen_kadar_genistein_	Equal variances assumed	5,384	,034	-,815	16	,427	-,00000778	,00000954	-,00002801	,00001245
	Equal variances not assumed			-,815	10,182	,434	-,00000778	,00000954	-,00002899	,00001343

Krim A/M dan krim M/A menunjukkan tidak ada perbedaan kadar genistein dalam yang signifikan ($p > 0,05$)

M.3 Data hasil analisis kesukaan konsumen terhadap sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai

a). Tekstur krim

tipe_krim * tekstur_krim Crosstabulation

			tekstur_krim					Total
			sangat_tidak_suka	agak_tidak_suka	agak_suka	suka	sangat_suka	
tipe_krim	krim_air	Count	1	14	18	11	6	50
	_minyak	Expected Count	,5	7,5	15,5	19,0	7,5	50,0
krim_minyak	air	Count	0	1	13	27	9	50
		Expected Count	,5	7,5	15,5	19,0	7,5	50,0
Total		Count	1	15	31	38	15	100
		Expected Count	1,0	15,0	31,0	38,0	15,0	100,0

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	20,410 ^a	4	,000
Likelihood Ratio	23,198	4	,000
Linear-by-Linear Association	14,895	1	,000
N of Valid Cases	100		

a. 2 cells (20,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,50.

Respon kesukaan konsumen terhadap tekstur krim A/M dan M/A menunjukkan nilai *significancy* sebesar 0,000 berarti nilai $p < 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa ada hubungan bermakna antara tipe krim dengan tekstur.

b). Warna Krim

tipe_krim * warna_krim Crosstabulation

		warna_krim					Total	
		sangat_tidak_suka	agak_tidak_suka	agak_suka	suka	sangat_suka		
tipe_krim	air	Count	1	18	17	12	2	50
	minyak	Expected	,5	9,0	13,0	18,0	9,5	50,0
		Count						
	minyak	Count	0	0	9	24	17	50
	air	Expected	,5	9,0	13,0	18,0	9,5	50,0
		Count						
Total		Count	1	18	26	36	19	100
		Expected	1,0	18,0	26,0	36,0	19,0	100,0
		Count						

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	37,304 ^a	4	,000
Likelihood Ratio	46,472	4	,000
Linear-by-Linear Association	36,299	1	,000
N of Valid Cases	100		

a. 2 cells (20,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,50.

Respon kesukaan konsumen terhadap warna krim A/M dan M/A menunjukkan nilai *significancy* sebesar 0,000 berarti nilai $p < 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa ada hubungan bermakna antara tipe krim dengan warna.

c). Bau Krim

tipe_krim * Bau_krim Crosstabulation

		Bau_krim					Total	
		sangat_tidak_suka	agak_tidak_suka	agak_suka	suka	sangat_suka		
tipe_krim	krim_minyak	Count	6	20	14	6	4	50
	Expected Count	3,0	12,5	17,0	13,5	4,0	50,0	
krim_minyak	ak_air	Count	0	5	20	21	4	50
	Expected Count	3,0	12,5	17,0	13,5	4,0	50,0	
Total	Count	6	25	34	27	8	100	
	Expected Count	6,0	25,0	34,0	27,0	8,0	100,0	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	24,392 ^a	4	,000
Likelihood Ratio	27,845	4	,000
Linear-by-Linear Association	16,224	1	,000
N of Valid Cases	100		

a. 4 cells (40,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,00.

Tabel 2×5 ini tidak layak untuk di uji dengan uji *chi-square* karena terdapat 4 sel yang memiliki nilai *expected* kurang dari 5 ada 40% jumlah sel.

Uji Kolmogorov-Smirnov

Test Statistics^a

		Bau_krim
Most Extreme Differences	Absolute	,420
	Positive	,420
	Negative	,000
Kolmogorov-Smirnov Z		2,100
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000

a. Grouping Variable: tipe_krim

Respon kesukaan konsumen terhadap bau krim A/M dan krim M/A menunjukkan nilai *significancy* sebesar 0,000 berarti nilai $p < 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa ada hubungan bermakna antara tipe krim dengan bau.

d). Konsistensi krim

tipe_krim * konsistensi_krim Crosstabulation

		konsistensi_krim					Total
		sangat_tidak_s uka	agak_tidak_ suka	agak_s uka	suka	sangat _suka	
tipe_	Count	2	10	19	14	5	50
krim_	Expected	1,0	8,5	17,0	18,5	5,0	50,0
krim_min	Count	0	7	15	23	5	50
yak_	Expected	1,0	8,5	17,0	18,5	5,0	50,0
Total	Count	2	17	34	37	10	100
	Expected	2,0	17,0	34,0	37,0	10,0	100,0
	Count						
	Expected						

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5,189 ^a	4	,268
Likelihood Ratio	5,988	4	,200
Linear-by-Linear Association	2,846	1	,092
N of Valid Cases	100		

a. 2 cells (20,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,00.

Respon kesukaan konsumen terhadap konsistensi krim A/M dan M/A menunjukkan nilai *significancy* sebesar 0,268 berarti nilai $p > 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa tidak ada hubungan bermakna antara tipe krim dengan konsistensi.

Lampiran N. Gambar Hasil Penelitian



Tempe Kedelai Cap "Dua Putri"



Tempe Kedelai di Iris –Iris Tipis



Simplisia Tempe Kedelai di Blender hingga Halus



Serbuk Tempe Kedelai



Proses *Defatting* Serbuk Tempe Kedelai



Proses Maserasi



Proses Penguapan Ekstrak Cair dengan *Rotary Evaporator*



Proses Pemekatan Ekstrak diatas *Hot Plate*



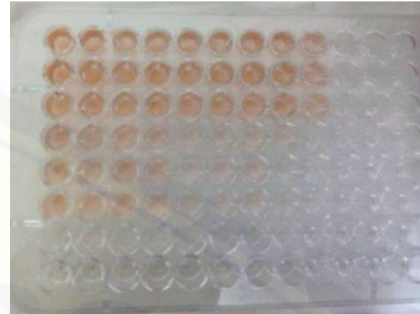
Ekstrak Etanol Tempe Kedelai Kental



Proses Eluasi



Proses *Scanning* dengan Densitometer



Proses Pengujian Aktivitas Hambatan
Tirosinase



Proses Pengukuran Absorbansi Aktivitas
Hambatan Tirosinase dengan *Microplate
Reader*



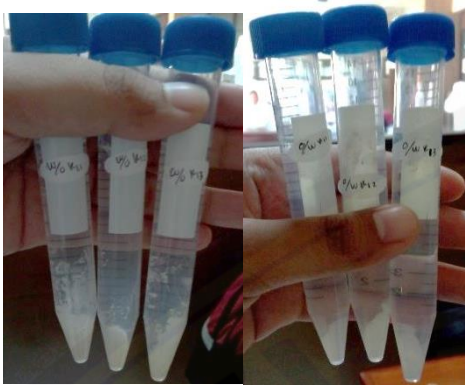
Proses Peleburan Fase Minyak dan Fase
diatas *Waterbath*



Proses Pecampuran Fase Minyak dan Fase
Air dalam Mortir Panas hingga Terbentuk
Massa Krim



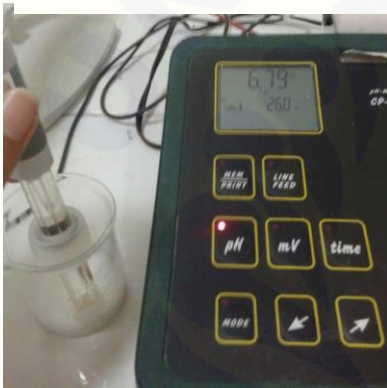
Sampel Krim A/M dan M/A di
Sentrifuge



Pemisahan Fase minyak, Supernatan dan Fase Metanol-Air pada Krim A/M dan M/A



Proses Eluasi



Pengujian pH Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai



Pengujian Viskositas Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai



Pengujian Tipe Krim pada Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai dengan Mikroskop



Pengujian Daya Sebar Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai



Uji Kesukaan Krim Ekstrak Etanol
Tempe Kedelai



Uji Kesukaan Krim Ekstrak Etanol
Tempe Kedelai



Lampiran O. Kuisisioner Uji Kesukaan

No.Responden



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS FARMASI

Jl. Kalimantan 37 Kampus Tegal Boto Kotak Pos 159 (68121)
JEMBER

Telp. (0331)-330224, 333147, 334267 Fax. (0331)-339029

Kuisisioner Penelitian

**Hubungan Kesukaan Konsumen Terhadap Sediaan Krim Ekstrak Etanol
Tempe Kedelai Tipe Air dalam Minyak (A/M) dan Minyak dalam Air (M/A)**

Penilaian tingkat kesukaan responden terhadap sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe air dalam minyak (A/M) dan minyak dalam air (M/A)

Nama Responden :
Usia :
Tanda tangan :

Petunjuk pengisian, berilah penilaian pada tabel yang telah tersedia untuk memberikan nilai tentang kesukaan responden terhadap sediaan krim ekstrak etanol tempe kedelai tipe (A/M) dan (M/A), dengan ketentuan sebagai berikut :

Penilaian	Kriteria
5	Sangat suka
4	Suka
3	Agak suka
2	Agak tidak suka
1	Sangat tidak suka

Sediaan	Sediaan A	Sediaan B
Kriteria		
Tekstur		
Warna		
Bau		
Konsistensi		