



**PENGARUH PERBEDAAN METODE EKSTRAKSI TERHADAP KADAR  
GENISTEIN DAN AKTIVITAS HAMBATAN TIROSINASE EDAMAME  
(*Glycine max*) *IN VITRO***

**SKRIPSI**

**Oleh**

**Elisa Nur Afrida Dewi  
NIM 112210101020**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**PENGARUH PERBEDAAN METODE EKSTRAKSI TERHADAP KADAR  
GENISTEIN DAN AKTIVITAS HAMBATAN TIROSINASE EDAMAME**

*(Glycine max) IN VITRO*

**SKRIPSI**

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

**Oleh**

**Elisa Nur Afrida Dewi  
NIM 112210101020**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk;

1. Allah SWT yang Maha segala-galanya;
2. Ibu Dwi Hariyati dan Bapak Nur Kholiq untuk doa, usaha, kasih sayang, kepercayaan, semangat dan motivasi yang tidak ada hentinya selalu mengiringi perjalanan hidup saya;
3. Adik Berta Yuda Sisilia Putri dan Kakak Mohammad Choliq yang saya sayangi selalu memberi semangat dan motivasi;
4. Ibu Siti Muslichah, S.Si., M.Sc., Apt. dan Ibu Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing utama dan dosen pembimbing anggota terimakasih telah memberikan bantuan serta bimbingan dengan segala perhatian sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.
5. Bapak Moch. Amrun Hidayat, S.Si., M.Farm., Apt. yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan masukan, perhatian dan bimbingannya.
6. Ibu Budipratiwi W., S.Farm., M.Sc., Apt. dan Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Penguji yang dengan sabar memberikan masukan untuk saya;
7. Pahlawan "tanpa tanda jasa" ku di SDN Sukosari 2, SMPN 1 Kandangan, SMAN 2 Pare, Fakultas Farmasi Universitas Jember, atas kesabarannya dalam membimbing dan menyalurkan ilmunya, menjadikanku sebagai sosok yang berpendidikan;
8. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

**MOTTO**

Sesungguhnya sesudah kesulitan ada kemudahan, maka apabila kamu selesai (dari satu urusan) kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Allahlah hendaknya kamu berharap.

(Q.S. Al-Insyiraah Ayat 6-8)

Tidak ada pengorbanan dan usaha yang sia-sia, kesuksesan dan kebahagiaan yang akan datang pada waktunya. Semua hal tersebut bergantung pada keikhlasan, kesabaran, serta doa disetiap langkah.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini ;

Nama : Elisa Nur Afrida Dewi

NIM : 112210101020

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul : *Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Edamame (Glycine max) In Vitro* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta 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, 28 Mei 2015

Yang Menyatakan,

Elisa Nur Afrida Dewi

NIM : 112210101020

**SKRIPSI**

**PENGARUH PERBEDAAN METODE EKSTRAKSI TERHADAP KADAR  
GENISTEIN DAN AKTIVITAS HAMBATAN TIROSINASE EDAMAME  
(*Glycine max*) *IN VITRO***

Oleh

Elisa Nur Afrida Dewi

NIM 112210101020

Pembimbing :

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

Dosen Pembimbing Anggota : Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt.



**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul *Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Edamame (Glycine max) In Vitro* telah diuji dan disahkan oleh fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

Hari : Kamis  
Tanggal : 28 Mei 2015  
Tempat : Fakultas Farmasi

Tim Pembimbing,

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Siti Muslichah, S.Si., M.Sc., Apt.  
NIP. 197305132005012001

Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt.  
NIP. 197807282005012001

Tim Penguji,

Penguji I,

Penguji II,

Budipratiwi W., S.Farm., M.Sc., Apt.  
NIP. 198112272006042003

Prof. Drs. Bambang Kuswandi, MSc., Ph.D.  
NIP. 196902011994031002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember

Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt.  
NIP 197604142002122001

**RINGKASAN**

**Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Edamame (*Glycine max*) In Vitro;** Elisa Nur Afrida Dewi, 112210101020; 2015; 105 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kondisi kulit yang terlihat lebih gelap dan timbulnya beberapa noda hitam di bagian tertentu pada wajah terjadi karena distribusi melanin yang tidak merata atau produksi melanin yang berlebihan dan sering disebut hiperpigmentasi. Enzim yang berperan dalam pembentukan melanin adalah tirosinase. Salah satu cara menghambat pembentukan melanin adalah dengan menghambat aktivitas enzim tirosinase. Isoflavon dalam biji kedelai seperti daidzein, glisitein, genistein, dan bentuk isoflavon lainnya memiliki aktivitas hambatan terhadap enzim tirosinase. Edamame atau disebut sebagai kedelai sayur termasuk dalam spesies *Glycine max* dengan varietas yang berbeda. Banyak penelitian aktivitas hambatan tirosinase pada kedelai, tetapi penelitian hambatan tirosinase pada edamame belum pernah dilakukan.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan melihat pengaruh perbedaan metode ekstraksi terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase ekstrak edamame. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah mengekstraksi biji edamame, penetapan kadar genistein dan penentuan aktivitas hambatan tirosinase pada masing-masing ekstrak. Penetapan kadar genistein dalam ekstrak menggunakan metode KLT Densitometri dan penentuan aktivitas hambatan tirosinase menggunakan metode spektrofotometri menggunakan *multi-well plate reader*.

Penetapan kadar genistein menggunakan KLT Densitometri dengan fase diam silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fase gerak toluen : etil asetat : aseton : asam format (15:3:1,5:0,75). Hasil menunjukkan kadar genistein yang tertinggi adalah edamame



yang diekstraksi menggunakan metode soxhletasi dengan kadar  $0,0436 \pm 1,012$  % b/b, selanjutnya sonikasi  $0,0252 \pm 2,066$  % b/b dan terakhir adalah maserasi kinetik  $0,0167 \pm 1,931$  % b/b. Metode soxhletasi memberikan hasil kadar genistein paling tinggi karena adanya pemanasan pada saat proses ekstraksi, sedangkan dua metode lainnya menggunakan suhu ruang saat proses ekstraksi. Pemanasan saat ekstraksi mampu mengubah bentuk isoflavon malonil, asetil, dan glikosida isoflavon menjadi bentuk aglikon.

Hasil uji aktivitas hambatan pada masing-masing ekstrak, metode soxhletasi memberikan aktivitas hambatan paling tinggi dengan nilai  $IC_{50} 77,112 \pm 2,626$  ng/ $\mu$ L, selanjutnya adalah metode sonikasi  $92,795 \pm 1,994$  ng/ $\mu$ L, dan yang terakhir adalah metode maserasi kinetik  $98,794 \pm 2,919$  ng/ $\mu$ L. Hasil aktivitas hambatan tirosinase yang diperoleh linier dengan hasil penetapan kadar genistein pada masing-masing metode. Semakin tinggi kadar genistein dalam ekstrak maka nilai hambatan tirosinase juga semakin tinggi yang ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  semakin kecil. Tidak hanya kandungan genistein saja dalam ekstrak edamame yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase, tetapi bentuk aglikon yang lain seperti daidzein, glisitein dan isoflavon bentuk glukosida juga memberikan aktivitas hambatan tirosinase.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, atas segala limpahan rahmat, kenikmatan, petunjuk dan hidayah sehingga proses penyusunan skripsi yang berjudul “Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Edamame (*Glycine max*) *In Vitro*”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

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

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt., selaku Dosen Pembimbing Akademik;
3. Bapak Moch. Amrun Hidayat, S.Si., M.Farm., Apt., yang pernah menjadi Dosen Pembimbing akademik, terimakasih telah sabar membimbing, memberi masukan, saran dan motivasi untuk semangat belajar;
4. Ibu Siti Muslichah, S.Si., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, perhatiannya dengan penuh kesabaran memberi ilmu, pengalaman berharga, pengarahan, bimbingan dan saran dalam penulisan skripsi ini;
5. Ibu Budipratiwi W., S.Farm., M.Sc., Apt. dan Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Penguji yang dengan sabar memberikan masukan;
6. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, berbagi pengalaman dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan; staf dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;

7. Orang tua tercinta Ibu Dwi Hariyati, Bapak Nur Kholiq, dan adik Berta Yuda Sisilia Putri yang senantiasa memberi doa, kasih sayang, semangat dan motivasi yang tidak terhingga untuk mengiringi perjalanan hidup penulis;
8. Mohammad Choliq yang selalu sabar memberi semangat, motivasi, saran dan telah menjadi kakak, sahabat serta teman terbaik untuk penulis;
9. Rekan kerja sekaligus sahabatku Fitria Dwi K., Liliana A. I. K., dan Oktavia C. X. terimakasih atas kerjasamanya saat penelitian dan kebersamaannya selama masa perkuliahan;
10. Teman-teman *happy family* (nyis, mamia, oo, dan ncung) yang mengisi hari-hari, sedih, susah kita tetap bersama dan berbagi segala sesuatu yang kita miliki.
11. Teman seperjuangan Angkatan 2011 Fakultas Farmasi Universitas Jember (ASMEF) yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu;
12. Anak-anak kos Mastrip I No. 57B (Yeni, Zul, Catur, Berta, Tiwi, Willi, Orin, Fitria, Mbak Frinda dan Mbak Ken) yang selalu bersama selama beberapa tahun terakhir ini dalam suka maupun duka.

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

Jember, 28 Mei 2015

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN SKRIPSI</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	4
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>1.5 Batasan Masalah</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
<b>2.1 Tanaman Kedelai Edamame</b> .....	6
2.1.1 Uraian Tumbuhan .....	6
2.1.2 Kedelai Edamame .....	6
2.1.3 Morfologi Tumbuhan .....	7
2.1.4 Kandungan Kedelai Edamame.....	8
2.1.5 Aktivitas Farmakologi yang Sudah Diteliti .....	8

2.2 Isoflavon.....	9
2.3 Genistein .....	11
2.4 Enzim .....	11
2.5 Enzim Tirosinase.....	13
2.6 Hambatan Tirosinase .....	14
2.7 Melanogenesis.....	15
2.8 Ekstrak .....	17
2.9 Metode Ekstraksi .....	18
2.10 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri .....	20
2.11 Spektrofotometri.....	22
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>25</b>
3.1 Jenis Penelitian.....	25
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	25
3.3 Variabel Penelitian .....	25
3.4 Rancangan Penelitian .....	26
3.4.1 Rancangan Operasional .....	26
3.4.2 Definisi Operasional.....	26
3.4.3 Prosedur Penelitian.....	26
3.4.4 Skema Prosedur Penelitian .....	28
3.5 Alat dan Bahan Penelitian .....	29
3.6 Prosedur Pembuatan Ekstrak .....	29
3.6.1 Preparasi Simplisia .....	29
3.6.2 Penghilangan Lemak .....	30
3.6.3 Ekstraksi .....	30
3.6.4 Pemekatan .....	31
3.7 Penetapan Kadar Genistein .....	31
3.8 Analisis Hambatan Enzim Tirosinase.....	32
3.9 Analisis Data.....	34
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>36</b>



<b>4.1 Ekstraksi Sampel</b> .....	36
<b>4.2 Penetapan Kadar Genistein</b> .....	37
4.2.1 Optimasi Panjang Gelombang Genistein .....	38
4.2.2 Penetapan Kadar Genistein Ekstrak Edamame .....	39
<b>4.3 Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase</b> .....	45
4.3.1 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Dopakrom ....	45
4.3.2 Penentuan Waktu Inkubasi dan Konsentrasi Substrat L- tirosin.....	46
4.3.3 Pengukuran Hambatan Tirosinase Standar Genistein.....	47
4.3.4 Pengukuran Aktivitas Hambatan Tirosinase Ekstrak Edamame .....	48
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	52
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	52
<b>5.2 Saran</b> .....	52
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	53
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	59



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
4.1 Rendemen ekstrak etanol edamame masing-masing metode.....	37
4.2 Hasil uji kemurnian kadar genistein.....	41
4.3 Hasil uji identitas kadar genistein .....	41

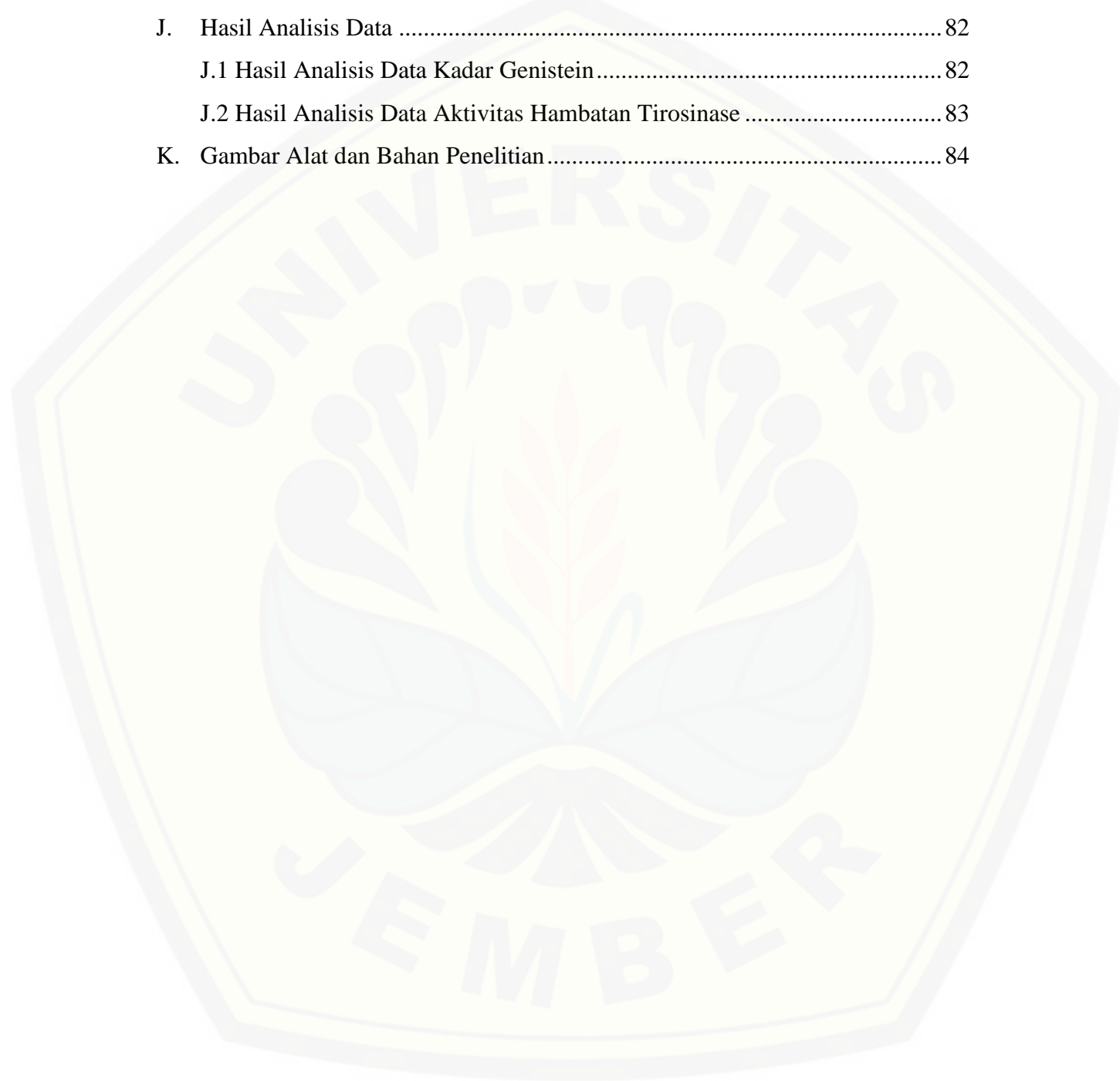
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 (a) Biji kedelai edamame .....	7
2.1 (b) Tanaman kedelai edamame .....	7
2.2 Struktur kimia 12 isoflavon dalam kedelai .....	10
2.3 Struktur molekul isoflavon genistein .....	11
2.4 Model Kunci dan Anak Kunci .....	12
2.5 Model <i>Induced Fit</i> .....	13
2.6 Jalur biosintesis melanin .....	16
2.7 Densitometer CAMAG .....	21
2.8 ELISA <i>reader</i> .....	23
3.1 Diagram alir penelitian.....	28
4.1 Optimasi panjang gelombang maksimum genistein .....	38
4.2 Hasil eluasi Lempeng KLT dibawah sinar UV 254 nm untuk noda standar (s) dan noda sampel yang diekstraksi dengan metode (a) maserasi kinetik (1,2,3) dan (b) sonikasi (4,5,6) dan soxhletasi (7,8,9) .....	39
4.3 Spektra uji identitas dan kemurnian genistein dalam standar dan sampel ..	40
4.4 Grafik kadar genistein dalam ekstrak (% b/b).....	44
4.5 Optimasi waktu inkubasi dan konsentrasi substrat L-Tirosin .....	47
4.6 Grafik nilai IC <sub>50</sub> hambatan tirosinase pada masing-masing metode .....	49
4.7 Hubungan antara kadar genistein dan nilai IC <sub>50</sub> .....	51

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Rendemen Ekstrak yang Diperoleh .....	59
B. Perhitungan Penimbangan Bahan .....	59
B.1.Perhitungan Pembuatan Standar Genistein Analisis KLT Densitometri.....	59
B.2.Perhitungan Pembuatan Standar Genistein Analisis Hambatan Tirosinase.....	60
B.3 Perhitungan Pembuatan Dapar Fosfat .....	61
B.4 Perhitungan Preparasi Substrat.....	62
B.5 Perhitungan Preparasi Enzim .....	62
B.6 Perhitungan Preparasi Ekstrak untuk Analisis Aktivitas Hambatan Tirosinase.....	63
C. Persamaan Regresi Standar Genistein.....	65
C.1 Sampel Sonikasi dan Soxhletasi.....	65
C.2 Sampel Maserasi Kinetik .....	66
D. Hasil Perhitungan Kadar Genistein dalam Sampel .....	67
E. Contoh Perhitungan Kadar Genistein dalam Sampel.....	68
F. Hasil Optimasi Panjang Gelombang Maksimum Dopakrom.....	70
G. Hasil Optimasi Waktu dan Konsentrasi Substrat L-Tirosin .....	71
H. Nilai Persen Hambatan Tirosinase Standar Genistein .....	72
I. Nilai Persen Hambatan Tirosinase Ekstrak.....	74
I.1 Perhitungan Sampel Sonikasi .....	74
I.2 Perhitungan IC <sub>50</sub> Metode Maserasi Kinetik .....	76
I.3 Perhitungan Sampel Maserasi Kinetik .....	77
I.4 Perhitungan IC <sub>50</sub> Metode Sonikasi.....	78

I.5 Perhitungan Sampel Sonikasi .....	79
I.6 Perhitungan IC <sub>50</sub> Metode Soxhletasi.....	80
J. Hasil Analisis Data .....	82
J.1 Hasil Analisis Data Kadar Genistein.....	82
J.2 Hasil Analisis Data Aktivitas Hambatan Tirosinase .....	83
K. Gambar Alat dan Bahan Penelitian.....	84



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Permintaan produk pemutih kulit di pasaran global akhir-akhir ini semakin meningkat. Hal ini disebabkan oleh banyaknya masyarakat yang mayoritas memiliki kulit gelap di banyak negara dan adanya ras yang lebih menyukai kulit cerah. Salah satu benua yang merupakan pasar terbesar untuk produk pemutih kulit jika dibandingkan dengan kawasan lainnya di dunia adalah Asia, karena sebagian besar penduduknya memiliki warna kulit yang gelap (Su, 2003).

Warna kulit umumnya ditentukan oleh jumlah melanin yang ada di kulit. Melanin merupakan pigmen yang memiliki peran penting dalam melindungi tubuh dari pengaruh buruk radiasi *ultraviolet* (UV) dan penentuan warna kulit yang disintesis di melanosom. Melanosom adalah organela khusus pada melanosit yang terletak pada bagian basal epidermis (Su, 2003). Kondisi kulit yang terlihat lebih gelap dan timbulnya beberapa noda hitam di bagian tertentu pada wajah terjadi karena distribusi melanin yang tidak merata. Gangguan pigmen pada kulit terutama kulit wajah karena produksi melanin yang berlebihan atau distribusi melanin yang tidak merata disebut dengan hiperpigmentasi.

Enzim yang berperan dalam pembentukan melanin adalah tirosinase. Dua reaksi utama biosintesis melanin yaitu hidroksilasi L-tirosin menjadi L-dopa dan oksidasi L-dopa menjadi dopakuinon, dikatalisis oleh enzim tirosinase. Senyawa dopakuinon secara spontan akan membentuk dopakrom yang kemudian menjadi melanin. Melanin yang terbentuk kemudian ditransfer dan didistribusikan ke keratinosit epidermal di sekitar melanosit, maka akan terjadi pigmentasi kulit (Gillbro dan Olsson, 2011).



Salah satu cara menghambat pembentukan melanin adalah dengan menghambat aktivitas enzim tirosinase. Flavonoid merupakan bahan aktif yang dapat menghambat aktivitas enzim tirosinase. Beberapa contoh golongan senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas penghambatan tirosinase adalah kuersetin dari golongan flavonol, streptogenin dari golongan flavanon, taxifolin dari golongan flavanol, dan daidzein serta genistein dari golongan isoflavon (Chang, 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Chang *et al.* (2005) menunjukkan bahwa isoflavon yang ada di dalam kedelai seperti daidzein, glisitein, dan genistein memiliki aktivitas hambatan terhadap enzim tirosinase. Selain senyawa isoflavon tersebut, mereka juga menemukan turunan isoflavon akibat fermentasi kedelai dengan *Aspergillus oryzae* yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase kuat seperti 6-hidroksidaidzein (6,7,4'-trihidroksiisoflavon) dan 8-hidroksidaidzein (5,7,8,4'-tetrahidroksiisoflavon) (Chang, 2009).

Edamame atau disebut sebagai kedelai sayur termasuk dalam spesies *Glycine max* dengan varietas yang berbeda. Sesuai dengan namanya kedelai sayur, edamame adalah jenis kedelai yang dipanen ketika polongnya masih muda dan hijau (Konovsky *et al.*, 1994). Meskipun dipanen saat bijinya muda, edamame juga memiliki kandungan yang sama dengan kedelai yang dipanen saat bijinya tua, salah satunya adalah kandungan isoflavon dalam biji kedelai edamame. Kandungan rata-rata genistein dalam edamame sebesar 19,79 µg/g dan rata-rata total isoflavon sebesar 92,81 µg/g (Mebrahtu *et al.*, 2004). Banyak penelitian aktivitas hambatan tirosinase pada kedelai, tetapi penelitian hambatan tirosinase pada edamame belum pernah dilakukan.

Jumlah senyawa yang terambil dalam proses ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu metode ekstraksi, pelarut, dan lamanya waktu ekstraksi. Penelitian ini dilakukan dengan mengekstraksi biji kedelai edamame menggunakan tiga metode ekstraksi yang berbeda yaitu sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pelarut etanol 70% dipilih karena pada penelitian yang dilakukan



oleh Rostagno *et al.* (2004) ekstraksi isoflavon yang optimum menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode *Pressurized liquid extraction*.

Pemilihan ketiga metode ekstraksi untuk uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase didasarkan pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Luthria *et al.* (2007). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa metode ekstraksi yang menghasilkan total isoflavon tertinggi dalam kedelai berturut-turut adalah metode cairan bertekanan (*Pressurized Liquid Extraction*), metode sonikasi, metode soxhletasi, dan metode *shaker*. Maka penggunaan tiga metode ekstraksi tersebut diharapkan mampu memberikan informasi metode ekstraksi manakah yang lebih efektif untuk mengekstraksi isoflavon genistein dalam biji kedelai edamame dan mendapatkan aktivitas penghambatan enzim tirosinase yang lebih tinggi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang dapat dirumuskan beberapa rumusan masalah sebagai berikut :

1. Berapakah kadar genistein ekstrak edamame yang diekstraksi menggunakan metode ekstraksi sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi?
2. Apakah terdapat perbedaan bermakna kadar genistein ekstrak edamame yang diekstraksi menggunakan metode ekstraksi sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi?
3. Berapakah aktivitas hambatan tirosinase ( $IC_{50}$ ) ekstrak edamame yang diekstraksi menggunakan metode ekstraksi sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi?
4. Apakah terdapat perbedaan bermakna aktivitas hambatan tirosinase ( $IC_{50}$ ) edamame yang diekstraksi menggunakan metode ekstraksi sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui kadar genistein ekstrak edamame yang diekstraksi menggunakan metode ekstraksi sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi.
2. Menentukan ada atau tidaknya perbedaan bermakna kadar genistein ekstrak edamame yang diekstraksi menggunakan metode ekstraksi sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi.
3. Mengetahui aktivitas hambatan tirosinase ( $IC_{50}$ ) ekstrak edamame yang diekstraksi menggunakan metode ekstraksi sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi.
4. Menentukan ada atau tidaknya perbedaan bermakna aktivitas hambatan tirosinase ( $IC_{50}$ ) ekstrak edamame yang diekstraksi menggunakan metode ekstraksi sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan bukti ilmiah yang berkaitan dengan ekstrak etanol biji kedelai edamame (*Glycine max*) diantaranya adalah :

1. Memberikan informasi ilmiah para akademisi tentang pemutih kulit alami yang berasal dari tumbuhan.
2. Memacu penelitian tentang penemuan dan pengembangan pemutih kulit alami dari bahan alam sebagai pemanfaatan keanekaragaman hayati yang ada di Indonesia.
3. Secara aplikatif penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi kepada masyarakat dan kepada Departemen Kesehatan tentang ekstrak etanol edamame yang dapat digunakan sebagai alternatif bahan pemutih kulit alami.

### 1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bagian dari tanaman yang digunakan adalah biji kedelai edamame.
2. Biji kedelai edamame diperoleh dari PT. Mitra Tani Dua Tujuh Jember.

3. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 70%.
4. Metode yang digunakan untuk ekstraksi kedelai edamame adalah metode sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi.
5. Penetapan kadar genistein dalam ekstrak etanol edamame menggunakan KLT Densitometri dengan genistein sebagai standar.
6. Penentuan aktivitas penghambatan enzim tirosinase secara *in vitro* menggunakan metode spektrofotometri tanpa mengidentifikasi jenis hambatannya.
7. Standar genistein digunakan sebagai pembanding untuk melihat aktivitas hambatan tirosinase.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Kedelai Edamame

#### 2.1.1 Uraian Tumbuhan

Kedelai edamame merupakan makanan yang populer di Asia. Edamame sering disebut kedelai sayur (*vegetable soybean*), banyak dijumpai di Jepang dan Cina. Edamame merupakan salah satu varietas kedelai yang termasuk dalam famili Fabaceae. Tanaman ini sering disebut sebagai kedelai sayur karena tanaman ini dipanen saat polongnya masih muda dan hijau yakni pada stadia tumbuh R-6 atau R-7 atau ketika pengisian biji sudah hampir penuh (80-90% pengisian) saat ukuran polongnya besar. Sedangkan kedelai (*grain soybean*) pada umumnya dipanen pada stadia R-8 (Konovsky *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2002).

Varietas edamame yang pernah dikembangkan di Indonesia seperti Ocumani, Tsurunoko, Tsurumidori, Taiso, dan Ryokkoh adalah tipe determinit. Varietas edamame yang pernah ditanam di Indonesia tersebut mempunyai bobot biji yang relatif sangat besar. Biji tanaman kedelai (*grain soybean*) dikatakan berbiji sedang bila bobot berat 100 biji antara 11-13 gram dan dikatakan besar bila bobot 100 biji lebih dari 13 gram. Saat ini varietas yang dikembangkan untuk produk edamame beku adalah varietas Ryokkoh yang mempunyai bobot berat per 100 biji antara 40-60 gram (Samsu, 2001).

#### 2.1.2 Klasifikasi Kedelai Edamame

Klasifikasi kedelai dalam taksonomi dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Subkingdom : Tracheobionta  
Superdivisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta  
Kelas : Magnoliopsida  
Subkelas : Rosidae  
Ordo : Fabales  
Familia : Fabaceae  
Genus : *Glycine* Wild  
Spesies : *Glycine max* (L) Merril  
(USDA, 2010).

### 2.1.3 Morfologi Tumbuhan

Edamame merupakan tanaman semusim berupa semak rendah, tumbuh tegak, dan berdaun lebat. Tinggi tanaman berkisar antara 30 sampai lebih dari 50 cm, berdaun lebat dan dapat bercabang sedikit atau banyak bergantung varietas. Tanaman ini dapat bercabang sedikit atau banyak tergantung varietas lingkungan hidupnya. Daun pertama yang keluar dari buku sebelah atas kotiledon berupa daun tunggal berbentuk sederhana dan letaknya berseberangan (unifoliolat). Daun-daun yang terbentuk kemudian adalah daun-daun trifoliolat (daun bertiga) dan seterusnya (Samsu, 2001).



(a)



(b)

Gambar 2.1 (a) Biji kedelai edamame; (b) Tanaman kedelai edamame  
(Dokumentasi pribadi).



Batang kedelai berbentuk bulat berwarna hijau kekuningan. Kedelai edamame memiliki ukuran biji jauh lebih besar dari kedelai biasa (Gambar 2.1), bobot 100 biji mencapai 30 g, jumlah biji per polong lebih dari 2, warna bulu abu (lebih disukai), tekstur biji dan polong lembut, rasa agak manis, aroma bagus, daya hasil polong muda 7-10 t/ha (Shanmugasundaram *et al.*, 1991).

#### 2.1.4 Kandungan Kedelai Edamame

Edamame memiliki kandungan protein yang tinggi, mineral, vitamin, dan asam lemak omega 3. Kandungan utama di dalam kedelai edamame adalah isoflavon, genistein dan daidzein merupakan dua komponen utama isoflavon dalam kedelai. Genistein dan daidzein merupakan antioksidan yang kuat (Mebrahtu *et al.*, 2004).

Menurut Tsukamoto *et al.* (1995) dalam penelitiannya melaporkan bahwa hampir 90% kandungan total isoflavon terdapat di kotiledon dan sebagian kecil terdapat di hipokotil. Selain itu kandungan total isoflavon paling tinggi saat dipanen pada awal kematangan biji, maka bila ingin mendapatkan kandungan genistein dan daidzein yang tinggi bisa diperoleh saat biji mengalami pematangan di awal. Seratus gram edamame mengandung daidzien 20,43 mg, genistein 22,57 mg, glisitein 7,57 mg, dan total isoflavon sebanyak 48,95 mg (Bhagwat *et al.*, 2008). Menurut hasil penelitian Mebrahtu *et al.* (2010) varietas Ryokoh memiliki kandungan genistein rata-rata 19,79 µg/g, daidzein 46,98 µg/g, glisitein 27,04 µg/g, dan total isoflavon 92,81 µg/g.

#### 2.1.5 Aktivitas Farmakologi yang Sudah Diteliti

Edamame merupakan salah satu jenis kedelai yang memiliki kandungan utama isoflavon. Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk menganalisis aktivitas dari isoflavon utamanya adalah genistein. Penelitian yang dilakukan Chae dan Ha (2011) menunjukkan bahwa ekstrak etanol kedelai terfermentasi dan non-fermentasi memiliki aktivitas antioksidan dan *whitening* (pemutih kulit). Uji aktivitas

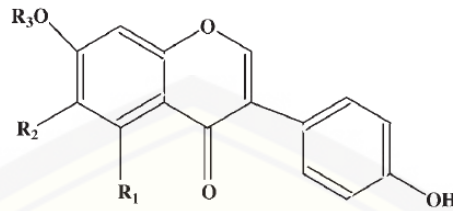


antioksidan yang dilakukan oleh Georgetti *et al.* (2006) menunjukkan bahwa  $IC_{50}$  untuk hambatan peroksida lipid sebesar 21,03  $\mu\text{g/mL}$  dan 161,8  $\mu\text{g/mL}$  untuk DPPH. Selain itu genistein, daidzein, dan glisitein merupakan komponen yang dapat digunakan sebagai perlindungan kulit terhadap radiasi UVB (Huang *et al.*, 2008).

Senyawa 7,8,4'-trihidroksiisoflavon dan 7,3',4'-trihidroksiisoflavon memiliki aktivitas hambatan tirosinase dengan  $IC_{50}$  sebesar  $11,21 \pm 0,8 \mu\text{M}$  dan  $5,23 \pm 0,6 \mu\text{M}$ . Kedua senyawa tersebut merupakan senyawa turunan isoflavon dengan gugus hidroksil pada cincin aromatis (Park *et al.*, 2010). Senyawa turunan isoflavon 6,7,4'-trihidroksiisoflavon yang merupakan metabolit dari 6-metoksi-7,4'-dihidroksiisoflavon (glisitein) dan 7,4'-dihidroksiisoflavon (daidzein) merupakan komponen utama antioksidan dalam tempe. Senyawa tersebut memiliki aktivitas hambatan tirosinase dengan nilai  $IC_{50}$  0,009 mM (Chang *et al.*, 2005).

## 2.2 Isoflavon

Isoflavon merupakan oksigen heterosiklik yang mengandung 3-fenilkroman skeleton yang terhidroksilasi pada posisi 4' dan 7. Isoflavon yang disintesis dari jalur fenilpropanoid yang menghasilkan semua senyawa flavonoid pada tumbuhan tingkat tinggi (Luthria *et al.*, 2007). Isoflavon banyak terdapat pada biji kedelai. Isoflavon kedelai merupakan flavonoid yang umumnya dapat diperoleh dari biji kedelai atau banyak terdapat pada famili Fabaceae. Biasanya isoflavon di alam dalam bentuk bebas (aglikon) dan bentuk terkonjugasi (glukosa, asetil glukosa, dan malonil glukosa) (Luthria dan Natarajan, 2009).



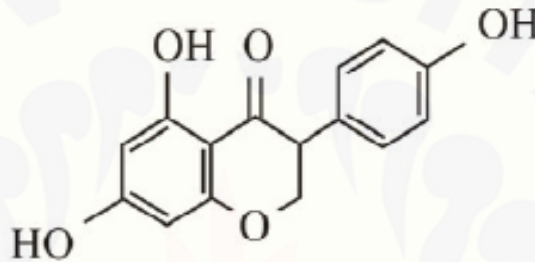
Nama	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Daidzein	H	H	H
Glisitein	H	OCH <sub>3</sub>	H
Genistein	OH	H	H
Daidzin	H	H	Glu
Glisitin	H	OCH <sub>3</sub>	Glu
Genistin	OH	H	Glu
Asetildaidzin	H	H	Glu-COCH <sub>3</sub>
Asetilglisitin	H	OCH <sub>3</sub>	Glu-COCH <sub>3</sub>
Asetilgenistin	OH	H	Glu-COCH <sub>3</sub>
Malonildaizidin	H	H	Glu-COCH <sub>3</sub> COOH
Malonilglisitin	H	OCH <sub>3</sub>	Glu-COCH <sub>3</sub> COOH
Malonilgenistin	OH	H	Glu-COCH <sub>3</sub> COOH

Gambar 2.2 Struktur kimia 12 isoflavon dalam kedelai (Luthria *et al.*, 2007).

Berdasarkan substituen yang berikatan pada karbon posisi 5 dan 6, ada tiga aglikon dari isoflavon yang ditemukan dalam kedelai yaitu daidzein, genistein, dan glisitein. Terdapat juga tiga jenis isoflavon dalam bentuk terkonjugasi dengan glukosa (daidzin, geinstin, dan glisitin), malonilglukosa (malonildaizidin, malonilgeinstin, dan malonilglisitin), dan asetilglukosa (asetildaizidin, asetilgeinstin, dan asetilglisitin) seperti yang terlihat pada Gambar 2.2 (Luthria *et al.*, 2007). Jumlah isoflavon bergantung pada beberapa faktor yakni kondisi tanah, iklim, dan tingkat maturitas atau prosesnya. Isoflavon di alam banyak terdapat pada lebih dari 300 macam tanaman, yang pada umumnya yaitu akar dan biji. Isoflavon dapat juga dihasilkan oleh beberapa jenis bakteri dan jamur (Pilsakova *et al.*, 2010).

### 2.3 Genistein

Genistein merupakan salah satu isoflavon dalam kedelai yang utama dan merupakan salah satu flavonoid alami yang paling aktif, hal ini bisa dilihat dari berbagai efek biologis seperti antioksidan, antiproliferasi, dan antikanker (Yang *et al.*, 2012). Genistein merupakan difenol heterosiklik dengan tiga gugus hidroksil dan nama kimianya 4',5,7-trihidroksiisoflavon atau 5,7-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-one (Yang *et al.*, 2012).



Gambar 2.3 Struktur molekul isoflavon genistein (Pilsakova *et al.*, 2010).

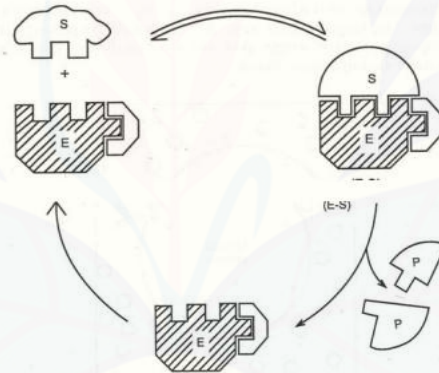
Genistein memiliki rumus molekul  $C_{15}H_{10}O_5$  (Gambar 2.3), dengan berat molekul 270 g/mol, berbentuk kristal, memiliki titik leleh sebesar  $296\text{--}298^\circ\text{C}$ . Menjadi berwarna kuning ketika dilarutkan dalam alkali, dan menjadi berwarna merah tua ketika dilarutkan dalam larutan etanolik besi klorida (III) (Food Safety Commission, 2006). Seratus gram edamame mengandung genistein sebanyak 22,57 mg (Bhagwat *et al.*, 2008).

### 2.4 Enzim

Enzim merupakan polimer biologis yang mengkatalis terjadinya reaksi kimia. Enzim yang mengkatalis perubahan satu atau lebih senyawa (substrat) menjadi satu atau lebih senyawa lain (produk) dapat meningkatkan laju reaksinya  $10^6$  kali jika dibandingkan dengan tidak menggunakan katalis. Enzim tidak berubah secara permanen atau dikonsumsi sebagai konsekuensi dari keikutsertaannya dalam reaksi yang bersangkutan (Murray *et al.*, 2006). Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa

faktor yaitu suhu, konsentrasi ion hidrogen (pH), konsentrasi enzim, dan konsentrasi substrat.

Terdapat dua mekanisme yang dapat menjelaskan proses pengikatan substrat terhadap enzim, yaitu mekanisme kunci dan anak kunci dan mekanisme *Induced-Fit*. Mekanisme yang pertama yaitu kunci dan anak kunci dikemukakan oleh Emil Fischer pada akhir abad ke-19, enzim dan substrat memiliki struktur geometrik tertentu yang saling berkomplemen satu sama lainnya. Model ini mampu menjelaskan sifat spesifik dari suatu enzim namun tidak dapat menjelaskan tingkat kestabilan yang mampu dicapai oleh kompleks teraktifkan enzim-substrat. Model kunci dan anak kunci (Gambar 2.4), substrat atau bagian substrat harus mempunyai bentuk yang sangat tepat dengan sisi katalitik enzim. Substrat ditarik oleh sisi katalitik enzim yang cocok untuk substrat tersebut sehingga terbentuk kompleks enzim substrat (Santoso, 2010).

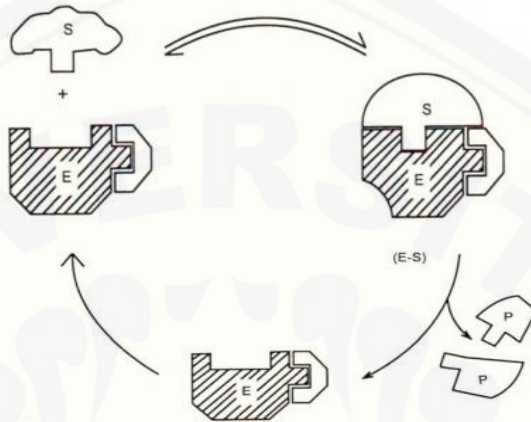


Gambar 2.4 Model Kunci dan Anak Kunci (Santoso, 2010)

Mekanisme kedua yakni *Induced-fit* yang dikemukakan oleh Daniel Koshland pada tahun 1958 yang merupakan modifikasi dari mekanisme kunci dan anak kunci. Mekanisme *Induced-fit* ikut dipertimbangkan struktur enzim yang relatif fleksibel, bagian sisi aktif enzim dapat terus mengalami perubahan ketika mulai terjadi interaksi. Enzim akan menyesuaikan diri dengan geometri substrat sehingga akhirnya kedua geometri molekul yang terlibat saling berkomplemen (Murray *et al.*, 2006). Model *induced-fit* (Gambar 2.5), lokasi aktif beberapa enzim mempunyai



konfigurasi yang tidak kaku. Enzim berubah bentuk menyesuaikan diri dengan bentuk substrat setelah terjadi pengikatan. Sehingga tautan yang cocok pada keduanya dapat diinduksi ketika terbentuk kompleks enzim substrat.



Gambar 2.5 Model Induced Fit (Santoso, 2010)

## 2.5 Enzim Tirosinase

Tirosinase (EC.1.14.18.1) yang disebut juga polifenol oksidase merupakan enzim monooksigenase yang memiliki gugus ion logam tembaga (Cu). Tirosinase merupakan suatu enzim yang terdistribusi secara luas dalam mikroorganisme, hewan, dan tanaman (Likhitwitayawuid, 2008). Tirosinase memiliki berat molekul sebesar 113.000 dalton (Warrington dan Saville, 1999).

Tirosinase (EC 1.14.18.1) mengkatalisasi dua reaksi yang berbeda dengan menggunakan oksigen molekuler, orto hidroksilasi tirosinase (mono-fenol) menjadi 3,4-dihidrofenilalanin atau DOPA (*o*-difenol) yang ditetapkan sebagai aktivitas monofenolase dan oksidasi DOPA menjadi dopakuinon (*o*-kuinon) ditetapkan sebagai aktivitas difenolase, sebelum menjadi eumelanin atau feomelanin (Chang, 2009). Enzim tirosinase yang terdapat pada mamalia memiliki peran dalam proses pigmentasi pada kulit, pemberi warna pada mata dan rambut. Enzim tirosinase yang ada pada tanaman menyebabkan terjadinya proses *browning* (pencoklatan) sebagai akibat dari proses oksidasi oleh tirosinase ketika jaringan pada tanaman mengalami luka. Sedangkan pada serangga, enzim tersebut merupakan bahan *sceritization* pada



eksoskeleton, penyembuh luka dan enkapsulasi terhadap parasit (Likhitwitayawuid, 2008).

## 2.6 Hambatan Tirosinase

Penghambatan tirosinase disebut juga penghambatan melanogenesis karena menghambat pembentukan melanin baik secara langsung atau hanya bereaksi dengan enzim (Chang, 2009). Penghambatan aktivitas tirosinase merupakan mekanisme depigmentasi yang paling sering digunakan karena bersifat spesifik dengan target melanogenesis di sel tanpa menimbulkan efek samping. Selain penghambatan secara langsung pada aktivitas katalitik tirosinase yang sering digunakan, pendekatan lain untuk penghambatan melanogenesis adalah percepatan degradasi tirosinase dan penghambatan transkripsi mRNA tirosinase melalui pengurangan aktivitas MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) (Chang, 2012).

Agen penghambat tirosinase dikelompokkan menjadi lima golongan yaitu senyawa polifenol, turunan benzaldehid dan benzoat, steroid dan lipid rantai panjang, agen penghambatan alami atau sintetik, dan agen inaktivator ireversibel. Polifenol merupakan senyawa yang termasuk kelompok paling besar sebagai penghambat tirosinase. Flavonoid yang termasuk dalam golongan polifenol banyak tersebar di daun, biji, kayu, dan bunga pada tanaman. Isoflavon yang termasuk dalam flavonoid memiliki mekanisme menghambat dan mengkhelat logam tembaga (Cu) pada ezim tirosinase akibat adanya gugus hidroksil pada cincin A dan B (gugus OH pada C6-C8 dan C2'-C4') (Chang, 2009). Adanya gugus hidroksil pada cincin benzen memiliki peran penting dalam aktivitas hambatan enzim tirosinase, sedangkan adanya gugus metil dan konjugat gula pada cincin benzen dapat menurunkan aktivitas penghambatan (Kim *et al.*, 2006).

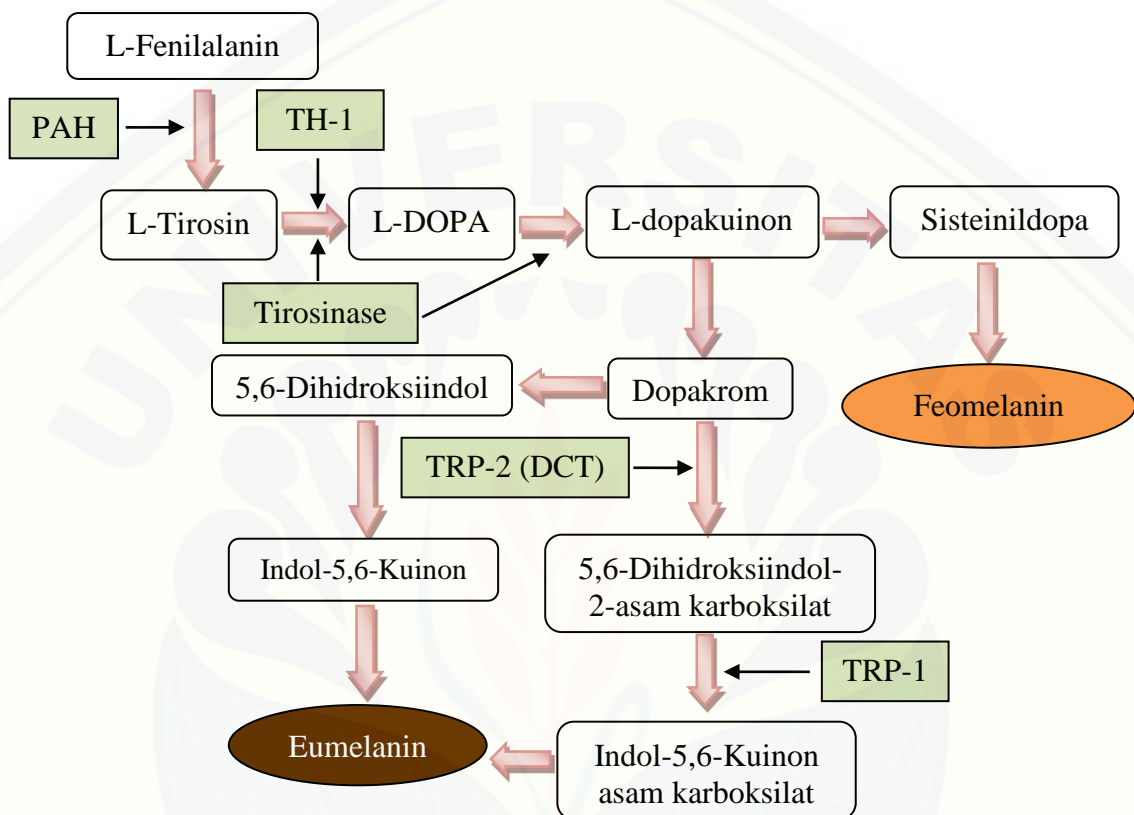
Inhibitor tirosinase menarik banyak perhatian karena dapat mencegah melanogenesis akibat terpapar langsung dengan radiasi ultraviolet sinar matahari. Banyak inhibitor tirosinase yang sudah dimanfaatkan sebagai bahan kosmetik karena

dapat memutihkan kulit diantaranya adalah hidrokuinon, asam azelat, merkuri, asam kojat, arbutin, magnesium askorbil fosfat, aloesin, dan niasinamid (Chang, 2012). Selain senyawa kimia, penelitian tentang aktivitas hambatan tirosinase dari bahan alam juga sudah banyak dilaporkan diantaranya ekstrak kedelai, ekstrak *licorice*, dan ekstrak metanol *Instia palembanica* yang memiliki  $IC_{50}$  hambatan tirosinase 10,4  $\mu\text{g/mL}$  (Batubara *et al.*, 2010; Chang, 2012). Chang *et al.* (2005) telah mengisolasi senyawa yang mempunyai aktivitas hambatan tirosinase dari kedelai koji hasil fermentasi dengan *Aspergillus oryzae* yaitu 6,7,4'-trihidroksiisoflavon, hasil penelitiannya menunjukkan pengaruh gugus hidroksil pada posisi C6 dan C7 pada struktur isoflavon memberikan pengaruh besar pada aktivitas hambatan. Contoh senyawa lain yaitu biokanin A (4'-metoksi-5,7-dihydroxyisoflavone) dari *Trifolium pretense* sebagai inhibitor melanogenesis baru yang bertindak dengan langsung menghambat aktivitas tirosinase tanpa mempengaruhi ekspresi gen (Lin *et al.*, 2011). Isoflavon lainnya seperti kalikosin (4'-methoxy-3',7-dihydroxyisoflavone) memiliki struktur yang mirip dengan biokanin A yang juga telah diteliti menunjukkan aktivitas sebagai hambatan melanogenesis dan hambatan tirosinase pada sel melanoma. Selain menghambat aktivitas hambatan tirosinase, kalkosin juga mampu mengurangi ekspresi gen tirosinase. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa jumlah dan posisi dari gugus fungsional pada kerangka isoflavon sangat mempengaruhi bioaktivitas mereka (Kim *et al.*, 2009).

## 2.7 Melanogenesis

Melanin adalah suatu senyawa yang dihasilkan oleh sel melanosit yang terdapat pada lapisan epidermis. Proses pembentukan melanin disebut melanogenesis yang terjadi di melanosom. Proses ini bertujuan untuk melindungi kulit dari paparan radiasi *ultraviolet* (UV) seperti yang terlihat pada Gambar 2.6 (Park *et al.*, 2010). Melanin yang disintesis dibagi menjadi dua macam, yaitu feomelanin dan eumelanin. Feomelanin berwarna merah-kuning atau polimer terlarut yang dibentuk oleh

konjugasi sistein atau glutation, sedangkan eumelanin berwarna coklat-hitam atau polimer tidak larut yang berwarna gelap (Videira *et al.*, 2013).



Gambar 2.6 Jalur biosintesis melanin (Gillbro dan Olsson, 2011)

Aktivasi enzim tirosinase adalah kunci awal dari proses melanogenesis. Tirosinase merupakan suatu glikoprotein yang terdapat di membran melanosom sel melanosit yang terdapat di stratum basal epidermis. Tirosinase berperan sebagai katalis reaksi hidrosilasi L-Tirosin menjadi L-DOPA dan reaksi oksidasi L-DOPA menjadi L-dopakuinon (Gillbro dan Olsson, 2011). Melanogenesis diawali dengan perubahan asam amino essensial L-Fenilalanin oleh fenilalanin hidrosilase (PAH) menjadi L-Tirosin. L-Tirosin akan mengalami hidrosilasi oleh enzim tirosinase atau

*tyrosinase hydroxylase isoenzym 1* (TH1) menjadi L-DOPA. Selanjutnya L-DOPA akan dioksidasi oleh enzim tirosinase menjadi L-dopakuinon. Pembentukan feomelanin sangat bergantung pada keberadaan asam amino sistein yang ditransport secara aktif melalui membran melanosomal. Sistein akan bereaksi dengan L-dopakuinon membentuk sisteinil-dopa. Sisteinil-dopa selanjutnya akan diubah menjadi kuinoleimin, alanin-hidroksil dihidrobenzotazin dan polimernya yang akan membentuk feomelanin (Gillbro dan Olsson, 2011).

Pembentukan eumelanin, L-dopakuinon akan diubah menjadi dopakrom yang selanjutnya akan diubah secara spontan menjadi 5,6-dihidroksiindol atau dikonversi secara enzimatik oleh dopakrom tautomerase (DCT) menjadi *5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid*. Dua senyawa tersebut akan diubah menjadi suatu polimer indol dengan kuinon yang selanjutnya akan membentuk eumelanin (Gillbro dan Olsson, 2011).

## **2.8 Ekstrak**

Ekstrak merupakan bentuk sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, tahap selanjutnya hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang terisi diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Voight, 1995).

Proses ekstraksi dapat melalui tahap pembuatan serbuk, pembasahan, penyarian, dan pemekatan. Sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan yang seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000).



## 2.9 Metode Ekstraksi

Ekstraksi atau penyarian merupakan peristiwa perpindahan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstraksi mengandung berbagai senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa aktif yang tidak larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000). Selama ekstraksi pelarut berdifusi ke dalam bahan tanaman yang padat, karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan cairan ekstraksi yang berada di luar sel. Bahan pelarut yang mengalir ke dalam ruang sel akan menyebabkan protoplasma membengkak dan bahan kandungan sel akan terlarut sesuai kelarutannya (Ncube *et al.*, 2008).

Metode ekstraksi berdasarkan tingkat kesulitannya dikelompokkan menjadi dua cara yaitu ekstraksi sederhana dan ekstraksi khusus (Harborne, 1987). Ekstraksi sederhana terdiri atas:

### 1) Maserasi

Maserasi yaitu metode ekstraksi dengan cara merendam sampel dalam pelarut dengan atau tanpa pengadukan pada temperatur kamar, metode ini merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tidak tahan pemanasan. Dasar dari maserasi adalah melarutnya bahan kandungan simplisia dari sel yang rusak, yang terbentuk saat penghalusan, ekstraksi (difusi) bahan kandungan dari sel yang masih utuh. Selama proses perendaman dilakukan pengocokan secara berulang, hal ini dilakukan untuk menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat di dalam cairan. Sedangkan dalam keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadi ekstraksi secara absolut (Voight, 1994). Kerugian maserasi adalah pengerjaan lama dan penyarian kurang sempurna.

Maserasi kinetik sama halnya dengan proses maserasi biasa yang dilakukan pada suhu ruang, yang membedakannya adalah sampel yang diekstraksi diletakkan dalam wadah yang bergerak dengan pengadukan berulang pada kecepatan konstan



(secara terus menerus). Pengadukan pada proses maserasi dapat dilakukan secara manual dengan beberapa kali pengadukan tiap waktu yang ditentukan, namun ada juga alat maserasi yang sudah dilengkapi dengan pengaduk mekanik (List dan Schimdt, 2000).

## 2) Perkolasi

Perkolasi merupakan metode ekstraksi secara berkesinambungan, yang artinya pelarut yang digunakan selalu baru dan sempurna (*exhaustiva extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Prinsip perkolasi adalah dengan menempatkan serbuk simplisia pada suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Proses terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Departemen Kesehatan RI, 2000).

## 3) Reperkolasi

Reperkolasi yaitu perkolasi di mana hasil perkolasi digunakan untuk melarutkan sampel di dalam perkolator sampai senyawa kimianya terlarutkan (Departemen Kesehatan RI, 2000).

## 4) Diakolasi,

Diakolasi yaitu perkolasi dengan penambahan tekanan udara pada saat proses ekstraksi sampel.

Sedangkan jenis ekstraksi khusus terdiri atas:

### 1) Soxhletasi

Soxhletasi merupakan metode ekstraksi yang menggunakan pelarut selalu baru, umumnya dilakukan menggunakan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi secara *continue* dengan jumlah pelarut yang relatif konstan karena adanya pendingin balik.

Biomassa ditempatkan dalam wadah soxhlet yang dibuat dengan kertas saring, melalui alat ini pelarut akan terus direfluks. Alat soxhlet akan mengosongkan isinya ke dalam labu dasar bulat setelah pelarut mencapai kadar tertentu. Setelah pelarut segar melewati alat ini melalui pendingin refluks, ekstraksi berlangsung sangat efisien dan senyawa dari biomassa secara efektif ditarik kedalam pelarut karena konsentrasi awalnya rendah dalam pelarut (Departemen Kesehatan RI, 2000).

## 2) Arus balik

Arus balik yaitu metode ekstraksi secara berkesinambungan, sampel dan pelarut saling bertemu melalui gerakan aliran yang berlawanan (Departemen Kesehatan RI, 2000).

## 3) Ultrasonik

Getaran ultrasonik (>20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstraksi dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (*cavitation*) sebagai stres dinamis serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi bergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat, dan lama proses ultrasonikasi (Departemen Kesehatan RI, 2000).

Pemilihan metode ekstraksi dan cairan yang tepat untuk mengekstraksi bergantung pada sumber bahan alam, kelarutan bahan kandungan serta stabilitas dari senyawanya (Voight R., 1994). Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengamati pengaruh metode ekstraksi terhadap kadar genistein pada kedelai. Penelitian yang dilakukan oleh Luthria *et al.* (2007) menunjukkan bahwa metode ekstraksi yang berbeda memberikan hasil kadar total isoflavon yang berbeda.

### **2.10 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri**

Kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase, salah

satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dengan arah tertentu dan di dalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam absorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul, atau kerapatan muatan ion (Departemen Kesehatan RI, 2009).

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



Gambar 2.7 Densitometer CAMAG (Satiadarma *et al.*, 2004)

Densitometri merupakan merupakan metode analisis instrumental dalam penentuan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dan analit merupakan noda pada KLT. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada KLT yang ditentukan adalah absorpsi, transmisi, pantulan (refleksi), dan fluoresensi dari radiasi semula (Mulja dan Suharman, 1995). Analisis secara kuantitatif dapat dilakukan dengan cara membandingkan densitas noda standar yang kadarnya telah diketahui dengan noda sampel yang akan ditentukan kadarnya. Analisis secara kualitatif dapat dilakukan dengan cara membandingkan nilai  $R_f$  sampel dengan nilai  $R_f$  senyawa acuan standar, biasanya dilakukan pada kondisi kromatografi yang sama dan pelat lapis tipis yang sama.

Selain itu dapat ditentukan dengan membandingkan spektrum panjang gelombang kromatogram sampel dengan spektrum panjang gelombang senyawa standar, apabila panjang gelombang kromatogram maksimum sampel sama dengan panjang gelombang maksimum standar maka kemungkinan zat tersebut sama (Mulja dan Suharman, 1995). Penelitian kali ini digunakan Densitometer CAMAG TLC *scanner* 3 yang bisa dilihat pada Gambar 2.7.

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

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

### **2.11 Spektrofotometri**

Ketersediaan metode dengan pengukuran yang cepat dan dapat dipercaya dalam melihat aktivitas enzimatis tirosinase merupakan kepentingan utama (Molina *et al.*, 2007). Metode menggunakan prinsip spektrofotometri merupakan metode yang sering digunakan dalam beberapa uji aktivitas hambatan tirosinase secara *in vitro*. Penelitian yang dilakukan oleh Batubara *et al.* (2010) dan Chang *et al.* (2005) dalam mengidentifikasi hambatan tirosinase menggunakan metode spektrofotometri dengan alat *microplate reader* (ELISA Reader) seperti Gambar 2.8. *Microplate reader* merupakan suatu spektrofotometer khusus yang disusun untuk membaca lempeng mikro (*microplate*). Prinsip yang digunakan pada alat tersebut adalah spektrofotometri



sama seperti metode konvensional, tetapi dapat menghasilkan peningkatan jumlah sampel yang dianalisis. Prinsip kerjanya adalah sumber cahaya menyinari sampel yang akan diukur dengan panjang gelombang tertentu (diatur dengan filter cahaya atau sebuah monokromator) dan selanjutnya detektor menghitung banyaknya cahaya awal yang ditransmisikan oleh sampel. Banyaknya cahaya yang ditransmisikan berhubungan dengan konsentrasi molekul yang akan dicari (Heredia *et al.*, 2006). Format *microplate* yang umum digunakan yaitu dengan jumlah sumuran 96 yang terdiri dari 12 kolom dan 8 baris.



Gambar 2.8 *ELISA reader* (Dokumentasi pribadi)

Perbedaan dengan spektrofotometer konvensional yang memfasilitasi pembacaan pada berbagai panjang gelombang, *microplate reader* memiliki filter atau kisi-kisi difraksi yang membatasi rentang panjang gelombang yang digunakan dalam ELISA, umumnya berkisar antara 400-750 nm. Sistem optik yang digunakan dimanfaatkan oleh banyak produsen menggunakan serat optik untuk menyuplai cahaya sumur lempeng mikro yang berisi sampel. Berkas cahaya yang melewati sampel memiliki diameter yang berkisar antara 1 sampai 3 mm. Suatu sistem deteksi mendeteksi cahaya yang berasal dari sampel, menguatkan sinyal dan menentukan absorbansi sampel. Selanjutnya suatu sistem pembacaan mengubah menjadi data yang memungkinkan interpretasi hasil pengujian (World Health Organization, 2008).



Analisis hambatan tirosinase menggunakan spektrofotometer perlu memperhatikan beberapa hal untuk mendapatkan kondisi analisis yang optimal, berdasarkan metode Boyer (1993) yakni;

1. Konsentrasi substrat L-Tirosin dan konsentrasi enzim yang akan digunakan dalam pengujian;
2. pH dapar yang digunakan untuk analisis hambatan berkisar antara 6,5-7,0;
3. Suhu inkubasi optimum yang digunakan adalah 25 - 30 °C;
4. Panjang gelombang maksimum dopakrom yang digunakan untuk analisis hambatan tirosinase.
5. Waktu inkubasi untuk pembentukan kompleks antara substrat dan enzim.

## **BAB 3. METODE PENELITIAN**

### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah penelitian *experimental laboratories* yang bertujuan untuk mengidentifikasi perbedaan metode ekstraksi terhadap kadar genistein dan aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh ekstrak etanol biji kedelai edamame (*Glycyne max*) karena kandungan isoflavon yang terdapat dalam biji kedelai edamame.

### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember mulai bulan September 2014 sampai April 2015.

### **3.3 Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Variabel bebas pada penelitian ini adalah metode ekstraksi dan waktu ekstraksi yaitu sonikasi selama 1 jam, maserasi kinetik 24 jam, dan soxhletasi 3 jam.
- b. Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar genistein dan aktivitas hambatan enzim tirosinase.
- c. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah biji kedelai edamame, pelarut, prosedur penetapan kadar genistein, dan prosedur pengujian hambatan tirosinase.

### 3.4 Rancangan Penelitian

#### 3.4.1 Rancangan Operasional

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut :

- a. Pembuatan simplisia biji kedelai edamame.
- b. Penghilangan lemak (*defatting*) dalam biji kedelai edamame.
- c. Ekstraksi biji kedelai.
- d. Penetapan kadar genistein ekstrak etanol edamame.
- e. Pengukuran hambatan enzim tirosinase ekstrak etanol edamame secara *in vitro*.

#### 3.4.2 Definisi Operasional

Definisi operasional yang dilakukan dalam penelitian kali ini adalah sebagai berikut :

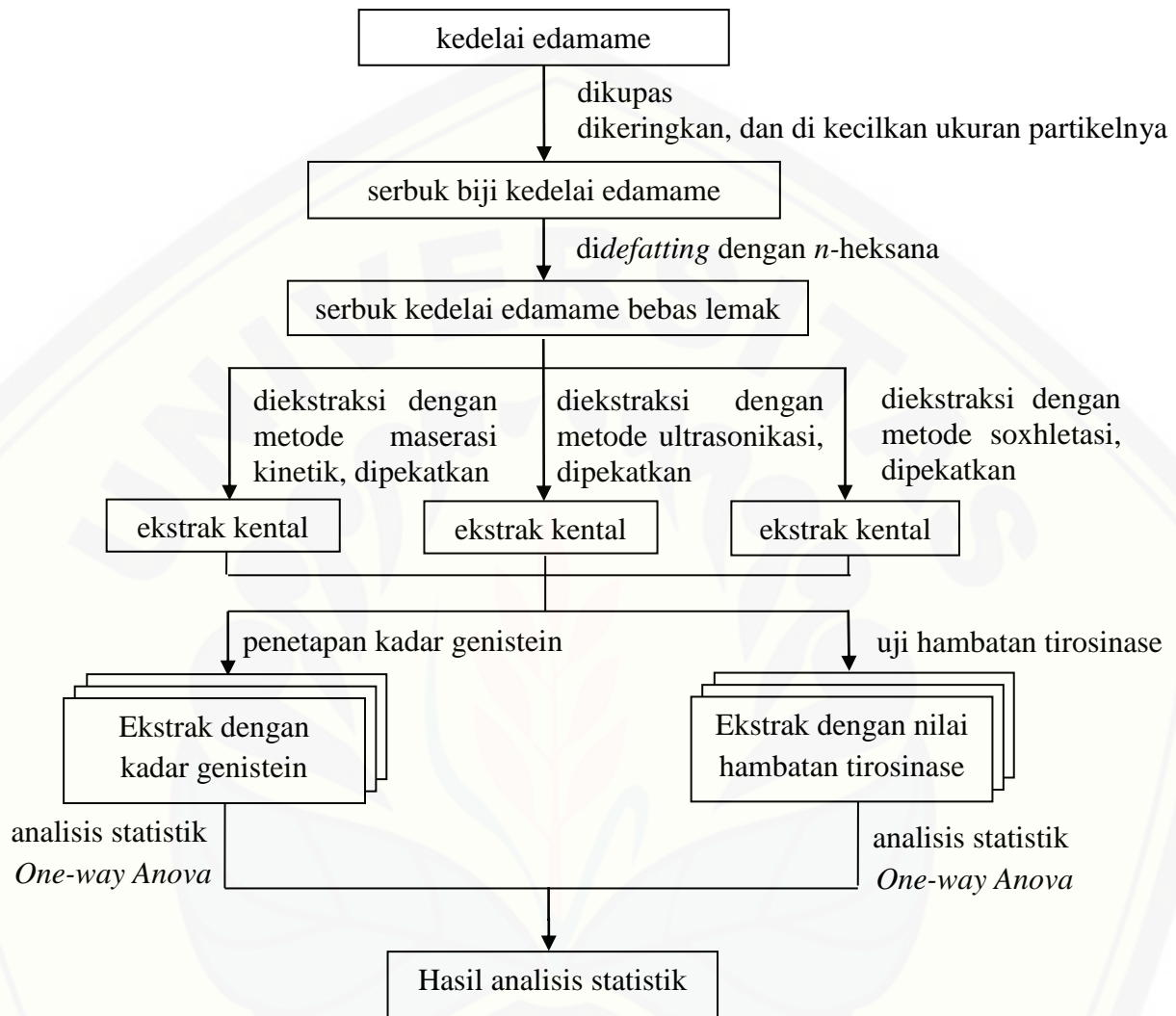
- a. Simplisia dibuat dengan cara mengeringkan biji kedelai edamame, sehingga kadar air dalam edamame berkurang.
- b. *Defatting*, merupakan proses menghilangkan lemak yang terkandung dalam kedelai edamame menggunakan pelarut *n*-heksana dengan metode soxhletasi.
- c. Ekstraksi merupakan proses pengambilan senyawa isoflavon dalam edamame menggunakan pelarut etanol 70%, menggunakan tiga metode ekstraksi yang berbeda yaitu sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi.
- d. Penetapan kadar genistein dengan standar genistein menggunakan metode KLT Densitometri.
- e. Pengukuran aktivitas penghambatan tirosinase dilakukan menggunakan *ELISA reader*.

#### 3.4.3 Prosedur Penelitian

Simplisia dibuat dengan cara merajang kedelai edamame dan dikeringkan dalam oven sehingga diperoleh biji kering. Biji edamame yang telah kering diserbuk untuk memperkecil ukuran partikel dan diayak menggunakan ayakan nomer 80

sehingga diperoleh serbuk dengan ukuran yang seragam. Serbuk *didefatted* untuk menghilangkan kandungan lemak dalam biji. Serbuk bebas lemak diekstraksi menggunakan etanol 70% menggunakan tiga metode yang berbeda yaitu sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi. Ekstrak etanol edamame yang diperoleh dari ketiga metode ekstraksi dilakukan penetapan kadar genistein dalam ekstrak edamame menggunakan KLT Densitometri dengan genistein sebagai standar. Uji aktivitas hambatan tirosinase dilakukan dengan mengukur serapan perubahan warna yang terbentuk dari reaksi substrat dan enzim menggunakan ELISA *reader*. Semua percobaan dilakukan replikasi tiga kali. Skema prosedur penelitian secara singkat dapat dilihat pada Gambar 3.1.

## 3.4.4 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian



### 3.5 Alat dan Bahan Penelitian

#### a. Alat

ELISA *reader* (Dialab Elx800), *Densitometer* (CAMAG TLC 3), *ultrasonicator* (Elmasonic), *shaker incubator* (MaxQ 6000 Stackable), *rotavapour* (Strike 2000), timbangan analitik digital, timbangan sartorius ME 36 S, blender, oven, serangkaian soxhlet, pipa kapiler, chamber, *beaker glass*, gelas ukur, erlenmeyer, batang pengaduk, botol vial, sendok ekstrak, gelas ekstrak, *multi-well plate reader*, pipet volum, pipet ukur, labu ukur, mikro pipet, mikro tip warna kuning dan warna biru, kertas saring, kapas, dan pisau.

#### b. Bahan

Biji kedelai edamame yang dibeli dari tempat pembudidayaan kedelai edamame “PT. Mitra Tani Dua Tujuh” di Kecamatan Mangli Kabupaten Jember, enzim tirosinase (Sigma-aldrich), L-tirosin (Sigma-aldrich), standar genistein (Tocris), lempeng KLT Silika Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), toluen (Smart Lab Indonesia), etil asetat (Smart Lab Indonesia), aseton (Smart Lab Indonesia), asam formiat (Smart Lab Indonesia), *n*-heksana (Smart Lab Indonesia), etanol 70%, metanol p.a. (Smart Lab Indonesia), kalium fosfat mono basa (Brataco Chemika), natrium hidroksida (Brataco Chemika), alumunium foil, dan aquadest.

### 3.6 Prosedur Pembuatan Ekstrak

#### 3.6.1 Preparasi Simplisia

Biji kedelai edamame yang telah dikupas ditimbang, kemudian dirajang untuk mempercepat pengeringan. Biji kedelai yang telah dirajang diangin-anginkan, selanjutnya dioven agar biji kedelai edamame kering dan ditimbang untuk mengetahui berat setelah dikeringkan. Biji kedelai edamame yang sudah kering diblender hingga halus dan dilakukan pengayakan dengan ayakan nomer 80 untuk mendapatkan ukuran serbuk yang seragam.

### 3.6.2 Penghilangan Lemak

Proses penghilangan lemak atau *defatting* dilakukan menggunakan metode soxhletasi. Serbuk kedelai edamame ditimbang sebanyak 30 gram, serbuk yang telah ditimbang dibungkus dengan menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam tabung serangkaian alat soxhlet (tabung ekstraktor). Pelarut yang digunakan untuk *defatting* adalah *n*-heksana sebanyak 180 mL untuk setiap 30 gram serbuk. Proses *defatting* dilakukan selama 3 jam. Serbuk kedelai edamame yang telah selesai *didefatting* diangin-anginkan untuk menguapkan residu *n*-heksana (Hui *et al.*, 2005).

### 3.6.3 Ekstraksi

Ekstrak didapat melalui tiga metode ekstraksi yaitu sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi. Masing-masing serbuk bebas lemak yang telah ditimbang diekstraksi dengan metode yang berbeda-beda sebagai berikut;

#### a. Ekstraksi dengan ultrasonikasi

Serbuk kedelai edamame ditimbang sebanyak 120 g diletakkan di dalam beaker glass. Serbuk dibagi menjadi 2 bagian sehingga masing-masing *beaker glass* berisi 60 gram serbuk. Etanol 70% sebanyak 360 mL ditambahkan ke dalam masing-masing *beaker glass*. Ultrasonikator dijalankan selama 1 jam untuk proses ekstraksi.

#### b. Ekstraksi dengan Maserasi kinetik

Serbuk kedelai edamame ditimbang sebanyak 120 g diletakkan di dalam erlenmeyer. Serbuk dibagi menjadi 2 bagian sehingga masing-masing erlenmeyer berisi 60 gram serbuk. Sebanyak 360 mL etanol 70% ditambahkan ke dalam masing-masing erlenmeyer. Erlenmeyer dimasukkan ke dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 140 rpm pada suhu kamar selama 24 jam (Panizzi *et al.*, 2002).

### c. Ekstraksi dengan Soxhlet

Serbuk kedelai edamame ditimbang sebanyak 120 gram, dibungkus masing-masing 30 gram menggunakan kertas saring, selanjutnya serbuk dimasukkan kedalam tabung soxhlet (ekstraktor). Sebanyak 180 mL etanol 70% dimasukkan ke dalam soxhlet. Pemanasan dijalankan selama 3 jam untuk proses ekstraksi (Luthria *et al.*, 2007).

#### 3.6.4 Pemekatan

Hasil ekstraksi dengan tiga metode tersebut disaring dan diukur volume yang didapat. Selanjutnya filtrat yang didapat dipekatkan menggunakan *rotavapour* hingga pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi terpisah. Suhu *rotavapour* yang digunakan untuk memekatkan ekstrak adalah 50 °C. Ekstrak hasil *rotavapour* dipekatkan menggunakan oven dengan suhu 50 °C hingga diperoleh bobot konstan untuk mendapatkan ekstrak kental.

### 3.7 Penetapan Kadar Genistein

Penetapan kadar genistein dalam kedelai edamame menggunakan metode KLT Densitometer dengan tahap sebagai berikut;

#### a. Pembuatan Sampel Uji

Masing-masing ekstrak yang telah dipekatkan ditimbang sebanyak 500 mg dilarutkan dalam metanol p.a hingga 10 mL, dan dilakukan replikasi 3 kali.

#### b. Pembuatan Standar Uji

Standar genistein dibuat dengan menimbang genistein sebanyak 5 mg dan dilarutkan dalam metanol p.a hingga didapat konsentrasi larutan induk 500 ng/μL. Larutan induk yang didapat diencerkan menggunakan metanol p.a hingga didapatkan konsentrasi standar genistein 20, 30, 50, 70, dan 90 ng/μL (Yuan *et al.*, 2006).

c. Analisis Genistein dengan Metode Densitometri

Analisis genistein dalam ekstrak dilakukan menggunakan metode densitometri dengan fase gerak toluen-etil asetat-aseton-asam formiat (15:3:1,5:0,75) dan fase diam lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) silika gel 60 F<sub>254</sub> (Yuan *et al.*, 2006). Standar ditotolkan sebanyak 2 µL dan sampel ditotol sebanyak 6 µL. Noda yang terbentuk diamati dengan lampu UV 254 nm selanjutnya dipayar (*scanning*) dengan TLC *scanner* pada panjang gelombang maksimum genistein yaitu 266 nm.

### 3.8 Analisis Hambatan Enzim Tirosinase

Uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase dilakukan dengan tahap sebagai berikut;

a. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Dopakrom

Optimasi panjang gelombang maksimum dopakrom dilakukan dengan cara mengukur serapan dopakrom pada panjang gelombang 400-600 nm. Inkubasi substrat L-tirosin 2 mM sebanyak 110 µL direaksikan dengan enzim tirosinase dengan konsentrasi 250 unit/mL sebanyak 40 µL diinkubasi selama 30 menit sesuai penelitian yang dilakukan oleh Batubara *et al.* (2010). Perhitungan preparasi enzim dapat dilihat pada Lampiran B.5. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis untuk memperoleh serapan maksimum, serapan maksimum yang diperoleh merupakan panjang gelombang maksimum dan menurut pustaka panjang gelombang maksimum 475 nm (Boyer, 1993).

b. Optimasi waktu inkubasi dan konsentrasi substrat

Waktu inkubasi optimum ditentukan dengan menggunakan prosedur kerja secara umum. Kemudian dilanjutkan dengan pengamatan waktu inkubasi setiap 5 menit sampai 100 menit untuk melihat profil tingkat kejenuhan enzim. Optimasi konsentrasi substrat dilakukan dengan cara membuat 4 konsentrasi substrat L-tirosin yaitu 0,5 mM, 1mM, 1,5 mM, dan 2 mM. Dilakukan pengujian dengan mereaksikan



sebanyak 110  $\mu\text{L}$  masing-masing substrat dengan 40  $\mu\text{L}$  enzim tirosinase 250 unit/mL. Nilai absorbansi dopakrom yang terbentuk diamati setiap 5 menit hingga 100 menit. Konsentrasi substrat yang dipilih dalam uji aktivitas hambatan adalah konsentrasi substrat yang dalam jumlah enzim yang sama dan waktu inkubasi yang sama memberikan absorbansi yang terbesar.

c. Preparasi sampel uji

Ekstrak yang telah dipekatkan ditimbang 25 mg dan 30 mg. Masing-masing ekstrak di larutkan dalam 10 mL dapar fosfat pH 6,5 sehingga diperoleh larutan induk 2500 ng/ $\mu\text{L}$  dan 3000 ng/ $\mu\text{L}$ . Larutan induk diencerkan hingga diperoleh konsentrasi uji 40, 50, 60, 80, 90, 110, 130, dan 160 ng/ $\mu\text{L}$ . Perhitungan pembuatan dapar fosfat dapat dilihat pada lampiran B.3.

d. Pembuatan Standar Uji

Standar genistein sebagai kontrol positif dibuat dengan cara menimbang 5 mg di larutkan dalam 10 mL metanol pa sehingga diperoleh larutan induk 500 ng/ $\mu\text{L}$ . Larutan induk diencerkan hingga diperoleh konsentrasi uji 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, dan 170 ng/ $\mu\text{L}$  menggunakan dapar fosfat pH 6,5. Perhitungan pembuatan substrat L-tirosin dapat dilihat pada lampiran B.2.

e. Pembuatan Substrat

Substrat dibuat dengan cara menimbang L-Tirosin sebanyak 4,529 mg dilarutkan dalam buffer fosfat pH 6,5 sebanyak 25 mL sehingga didapat konsentrasi 1 mM.

f. Analisis Aktivitas Hambatan Tirosinase

Ekstrak kedelai edamame diuji mulai konsentrasi 40-160  $\mu\text{g/mL}$  dan genistein sebagai kontrol positif yang juga diuji pada konsentrasi 80-170  $\mu\text{g/mL}$  dalam pelat tetes (sumuran). Sebanyak 70  $\mu\text{L}$  dari masing-masing ekstrak



pengenceran ini ditambahkan dengan 40  $\mu$ L enzim tirosinase (Sigma 250 unit/mL dalam dapar fosfat pH 6,5), setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Tahap selanjutnya ditambahkan 110  $\mu$ L substrat (1 mM L-tirosin) ke dalam tiap lubang *multi-well plate*, campuran diinkubasi selama waktu terpilih hasil optimasi yaitu 80 menit pada suhu  $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Campuran diukur dengan menggunakan *multi-well plate reader* pada panjang gelombang terpilih hasil optimasi yaitu 478 nm, hal ini bertujuan untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambat 50% ( $\text{IC}_{50}$ ). Persentase inhibisi dihitung dengan cara membandingkan serapan sampel tanpa penambahan ekstrak dan sampel dengan penambahan ekstrak. Nilai  $\text{IC}_{50}$  diperoleh dari persamaan kurva regresi linier antara konsentrasi ekstrak (sebagai sumbu  $x$ ) dan % inhibisi (sebagai sumbu  $y$ ). Perhitungan persen hambatan tirosinase dapat dihitung menggunakan persamaan 1.

$$\% \text{ Hambatan} = [(A-B)/A] \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan:

A = nilai absorbansi tanpa sampel

B = nilai absorbansi dengan sampel (Batubara *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2005).

### 3.9 Analisis Data

Data diambil dari hasil pengukuran kadar genistein berupa massa dan aktivitas hambatan tirosinase berupa  $\text{IC}_{50}$  sehingga data yang dihasilkan adalah data numerik. Semua analisis dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dari masing-masing sampel yang diekstraksi menggunakan metode ekstraksi yang berbeda. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *one-way ANOVA* jika data yang diperoleh homogen dan terdistribusi normal. Uji dilanjutkan dengan uji LSD (*least significant difference*) jika diperoleh hasil yang berbeda signifikan. Hasil uji Anova dan LSD signifikan bila didapat harga  $p < 0,05$  dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Namun jika diperoleh hasil yang tidak homogen dan tidak terdistribusi secara normal

digunakan uji Kruskal–Wallis, bila didapatkan hasil yang berbeda signifikan maka dapat dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney (Santjaka, 2011).

Analisis data pada penelitian kali ini dilakukan untuk menguji ada atau tidak perbedaan yang bermakna antara kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase pada ekstrak etanol edamame yang diekstraksi menggunakan 3 metode ekstraksi yang berbeda yaitu sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi.



## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian kali ini melihat pengaruh perbedaan metode ekstraksi terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase pada ekstrak etanol edamame (*Glycine max*). Tahap penelitian yang dilakukan meliputi: ekstraksi biji kedelai edamame menggunakan tiga metode yang berbeda, penetapan kadar genistein pada masing-masing ekstrak, penentuan aktivitas hambatan tirosinase pada masing-masing ekstrak, dan uji *one way* ANOVA untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan bermakna kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase masing-masing ekstrak edamame menggunakan *software* SPSS *Statistic* 18.0.

### 4.1 Ekstraksi Sampel

Ukuran serbuk biji kedelai edamame dikontrol dengan mengayak serbuk edamame menggunakan alat *sieve shaker* dengan ukuran mesh 80. Ukuran partikel serbuk kedelai akan mempengaruhi hasil ekstraksi isoflavon dalam biji kedelai. Semakin kecil ukuran partikel akan meningkatkan hasil ekstraksi isoflavon (Lee dan Lin, 2007). Kandungan lemak dalam serbuk edamame dihilangkan (*defatting*) sebelum diekstraksi dengan tujuan agar tidak mengganggu saat analisis kadar genistein menggunakan metode KLT Densitometri (Hui *et al.*, 2005). Serbuk edamame yang bebas lemak diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan tiga metode ekstraksi yang berbeda yaitu sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi.

Tabel 4.1 Rendemen ekstrak etanol edamame masing-masing metode

Metode Ekstraksi	Replikasi	Rendemen (%)	Rata-rata (%)	RSD (%)
Sonikasi	1	11,452	11,569	0,911
	2	11,599		
	3	11,657		
Maserasi kinetik	1	12,659	12,634	0,285
	2	12,651		
	3	13,593		
Soxhletasi	1	8,100	8,251	1,589
	2	8,331		
	3	8,323		

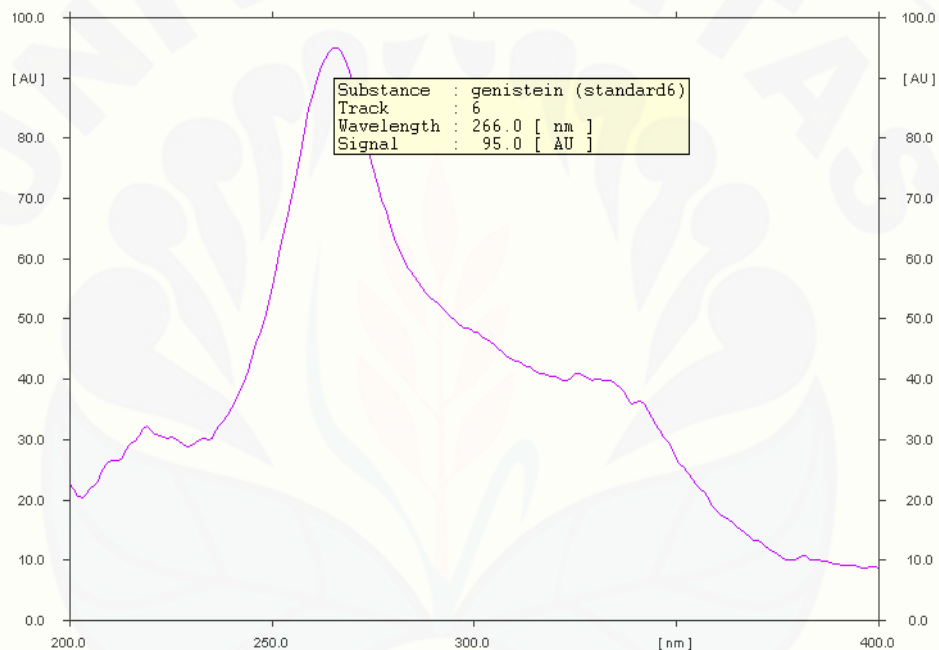
Ekstrak cair yang diperoleh pada masing-masing metode dipisahkan dan dihitung rendemennya, rendemen ekstrak dari masing-masing metode dapat dilihat pada Tabel 4.1. Perhitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Lampiran A. Perbedaan metode ekstraksi akan menghasilkan rendemen yang berbeda-beda, hal ini disebabkan karena efektifitas dari masing-masing metode ekstraksi juga berbeda. Rendemen terkecil hingga terbesar secara berturut-turut adalah metode soxhletasi, sonikasi, dan maserasi kinetik.

#### 4.2 Penetapan Kadar Genistein

Penetapan kadar genistein dalam sampel ekstrak edamame dilakukan dengan beberapa tahap yaitu preparasi sampel dan standar genistein. Sebelum dilakukan analisis kadar genistein dalam sampel dilakukan optimasi panjang gelombang maksimum genistein yang nantinya panjang gelombang maksimum terpilih digunakan untuk penetapan kadar genistein dalam sampel.

#### 4.2.1 Optimasi Panjang Gelombang Genistein

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan menotolkan standar genistein yang dilarutkan dalam metanol p.a. pada lempeng KLT kemudian dieluasi. Noda yang dihasilkan dipayar (*scanning*) pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang yang dipilih adalah panjang gelombang yang memberikan intensitas spektrum paling tinggi. Hasil *scanning* spektra genistein dapat dilihat pada Gambar 4.1.



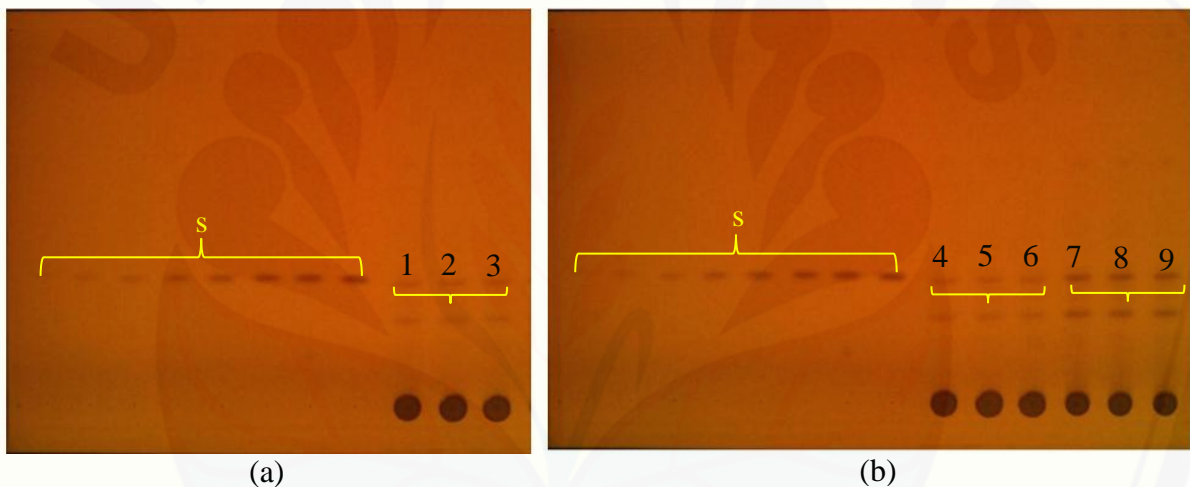
Gambar 4.1 Optimasi panjang gelombang maksimum genistein

Berdasarkan spektra yang didapatkan dari hasil *scanning*, dapat diketahui panjang gelombang yang memberikan intensitas spektra tertinggi yaitu 266 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh ini selanjutnya digunakan untuk penetapan kadar genistein dalam ekstrak etanol edamame.



#### 4.2.2 Penetapan Kadar Genistein Ekstrak Edamame

Penetapan kadar genistein pada sampel edamame menggunakan 5 tingkat konsentrasi standar genistein yaitu 20,852  $\mu\text{g/mL}$ , 31,278  $\mu\text{g/mL}$ , 52,13  $\mu\text{g/mL}$ , 72,982  $\mu\text{g/mL}$ , dan 93,834  $\mu\text{g/mL}$ . Perhitungan preparasi standar genistein dapat dilihat pada Lampiran B1. Nilai area standar yang diperoleh dari pengukuran densitometer diplotkan dengan massa genistein yang ditotolkan sehingga diperoleh persamaan regresi. Digunakan dua persamaan regresi untuk menghitung kadar genistein dalam sampel, metode sonikasi dan soxhletasi dalam satu lempeng sedangkan metode maserasi kinetik pada lempeng yang berbeda. Persamaan regresi standar dapat dilihat pada lampiran C.1 dan C.2.

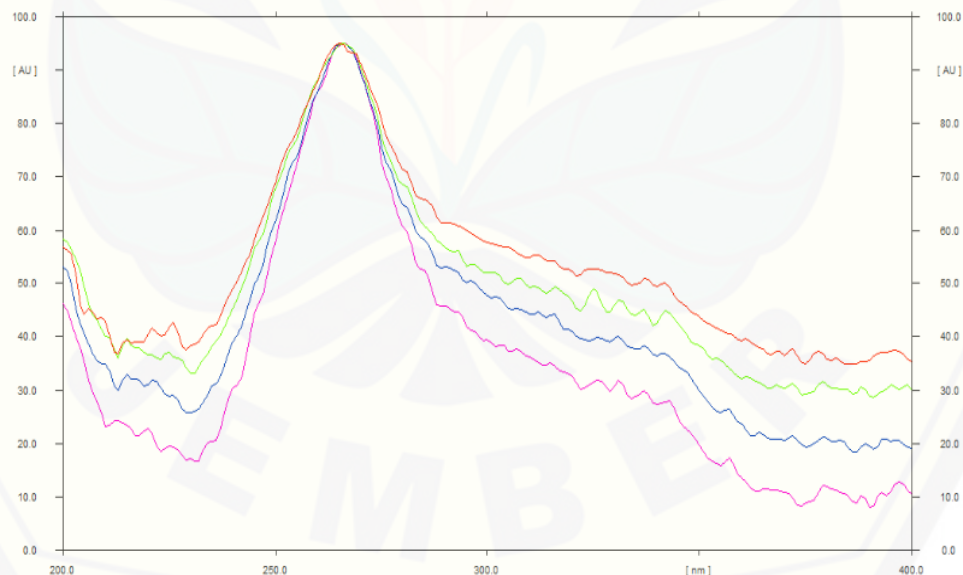


Gambar 4.2 Hasil eluasi Lempeng KLT dibawah sinar UV 254 nm untuk noda standar (s) dan noda sampel yang diekstraksi dengan metode (a) maserasi kinetik (1,2,3) dan (b) sonikasi (4,5,6) dan soxhletasi (7,8,9).

Noda yang telah tereluasi pada lempeng KLT dilihat di bawah sinar UV 254 nm (Gambar 4.2). Noda genistein pada sampel memiliki nilai Rf yang hampir sama dengan standar genistein. Noda yang ditandai huruf s merupakan noda standar genistein, sedangkan noda genistein pada sampel ditandai dengan angka 1 sampai 9. Nilai Rf standar genistein pada lempeng a adalah 0,34, sedangkan noda sampel nomor 1 dan 2 memiliki nilai Rf 0,32 dan noda nomor 3 memiliki nilai Rf 0,33. Nilai Rf standar genistein pada lempeng b adalah 0,33 sedangkan noda sampel nomor 4

sampai 9 memiliki nilai Rf 0,34. Nilai Rf genistein yang diperoleh pada penelitian ini hampir sama dengan nilai Rf genistein yang disebutkan dalam penelitian Yuan *et al.* (2006).

Selain dilihat dari parameter nilai Rf, uji identitas dan kemurnian genistein juga perlu dilakukan untuk mengetahui spesifisitas dari metode yang digunakan. Uji identitas adalah uji yang perlu dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya genistein dalam masing-masing ekstrak dan uji kemurnian untuk mengetahui kemurnian genistein yang terdapat pada standar maupun sampel. Uji kemurnian spektra diambil dari lereng puncak pertama berkorelasi dengan puncak maksimum spektra. Korelasi ini diidentifikasi sebagai r (s,m) pada winCATS, dengan s menunjukkan mulai puncak dan m puncak maksimum. Korelasi dari spektra diambil pada puncak maksimum dengan salah satu lereng bawah atau akhir puncak, di winCATS bernama r (m,e), dengan m menunjukkan puncak maksimum dan e merupakan akhir puncak (Indrayanto & Yuwono, 2003). Spektra uji identitas dan kemurnian dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Spektra uji identitas dan kemurnian genistein dalam standar dan sampel



Data mengenai korelasi spektra pada uji kemurnian dapat dilihat pada tabel 4.2, sedangkan data mengenai korelasi spektra pada uji identitas dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.2 Hasil uji kemurnian kadar genistein

Uji	Track	Rf	r (s,m)	r (m,e)	Purity
Kemurnian	Standar Genistein	0,36	0,9979	0,9964	OK
	Sampel sonikasi	0,35	0,9988	0,9985	OK
	Sampel MK	0,34	0,9983	0,9950	OK
	Sampel Soxhlet	0,36	0,9984	0,9957	OK

Tabel 4.3 Hasil uji identitas kadar genistein

Uji	Track	Rf	r (s,s)	r (s,a)	Identity
Identitas	Standar Genistein	0,36	0,9942	0,9955	OK
	Sampel sonikasi	0,35	0,9942	0,9933	OK
	Sampel MK	0,34	0,9942	0,9957	OK
	Sampel Soxhlet	0,36	0,9942	0,9929	OK

Kemurnian genistein dalam sampel dilihat berdasarkan nilai  $r (s,m)$  dan  $r (m,e)$  pada tabel 4.2. Nilai  $r (s,m)$  menunjukkan korelasi antara spektra yang diambil pada posisi awal/*start* ( $s$ ) puncak dengan spektra pada puncak/*maximum* ( $m$ ) *peak*. Sedangkan nilai  $r (m,e)$  menunjukkan korelasi antara spektra yang diambil pada posisi puncak *peak* dengan spektra pada posisi akhir/*end* ( $e$ ) puncak. Suatu analit dikatakan murni jika nilai  $r (s,m)$  dan nilai  $r (m,e)$  pada uji menghasilkan nilai lebih dari 0,99 (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Berdasarkan hasil pada Tabel 4.2 dapat diketahui nilai korelasi spektra genistein pada sampel lebih dari 0,99. Ini menunjukkan bahwa analit dalam standar dan sampel adalah murni. Uji identitas 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* standard dan *track* analit dalam sampel. Analit dalam sampel dikatakan identik dengan standar jika nilai korelasinya lebih dari 0,99 (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Tabel 4.3 dapat dilihat bahwa nilai korelasi spektra

yang didapatkan pada penelitian ini lebih dari 0,99. Sehingga analit dalam sampel identik dengan standar genistein. Berdasarkan penilaian parameter selektivitas dan spesifisitas yang telah dijabarkan di atas, dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan bersifat selektif dan spesifik.

Persamaan regresi yang diperoleh dari standar genistein digunakan untuk menghitung kadar genistein pada masing-masing ekstrak. Metode soxhletasi memberikan hasil kadar genistein yang paling tinggi, sedangkan metode maserasi kinetik memberikan kadar genistein yang paling rendah. Kondisi ekstraksi yang berbeda seperti komposisi pelarut, perbandingan pelarut dengan jumlah serbuk yang diekstraksi, waktu ekstraksi, ukuran partikel, dan suhu pada saat proses ekstraksi akan mempengaruhi kadar genistein yang terekstraksi (Luthria dan Natarajan, 2009). Kondisi yang dikontrol dalam masing-masing proses ekstraksi penelitian ini adalah jenis pelarut yaitu etanol 70%, ukuran partikel yang sama, jumlah serbuk yang diekstraksi yaitu 120 gram, dan perbandingan antara jumlah serbuk dengan pelarut adalah 1:6. Kadar genistein (% b/b) yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 4.4. Kadar genistein yang diperoleh pada metode sonikasi  $0,0252 \pm 2,066$  % b/b, metode maserasi kinetik  $0,0167 \pm 1,931$  % b/b, dan metode soxhletasi  $0,0436 \pm 1,012$  % b/b. Perhitungan kadar genistein dalam sampel pada masing-masing metode dapat dilihat pada lampiran D dan Lampiran E.

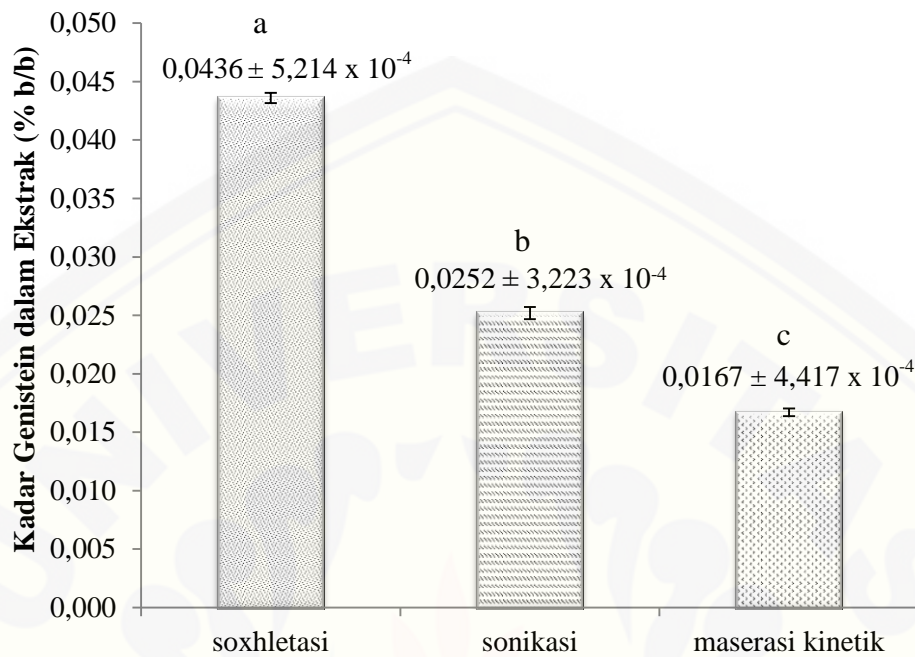
Kadar genistein yang diperoleh pada masing-masing metode dilakukan analisis statistik menggunakan *one way* ANOVA. Tahap pertama dalam menganalisa data adalah uji normalitas sebaran data yang diperoleh dari hasil percobaan menggunakan uji Shapiro-Wilk, sebab jumlah sampel yang digunakan kurang dari sama dengan 50. Hasil uji normalitas data kadar genistein diperoleh nilai signifikansi lebih dari 0,05, hal ini menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Uji homogenitas memiliki nilai signifikansi lebih dari 0,05 yang menunjukkan varian data homogen. Syarat untuk melakukan uji *one way* ANOVA adalah data terdistribusi normal dan varian data homogen, sehingga dari hasil yang diperoleh dapat dilanjutkan uji menggunakan *one way* ANOVA. Berdasarkan hasil uji *one way*



ANOVA diketahui bahwa nilai signifikansi perbedaan kadar genistein dalam ekstrak antar metode adalah kurang dari 0,05. Sehingga dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat dua kelompok yang mempunyai varian data yang berbeda secara bermakna. Tahap terakhir dalam analisis data adalah uji *post-hoc*. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kebermaknaan atau signifikansi perbedaan kadar genistein antar sampel yang diekstraksi menggunakan metode yang berbeda secara statistik. Hasil uji *post-hoc* diketahui bahwa nilai signifikansi perbedaan kadar genistein antara ekstrak edamame kurang dari 0,05. Kesimpulannya adalah terdapat perbedaan bermakna kadar genistein pada ekstrak edamame yang diekstraksi menggunakan metode sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi dan dinotasikan dengan huruf berbeda pada grafik. Hasil analisis statistik kadar genistein pada masing-masing metode dapat dilihat pada Lampiran J.1.

Metode soxhletasi memberikan kadar genistein tertinggi bila dibandingkan dengan kedua metode lainnya, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Luthria *et al.* (2007) bahwa metode soxhletasi menghasilkan kadar genistein yang tertinggi dibandingkan sonikasi dan *shaker*. Adanya pemanasan saat proses ekstraksi menyebabkan kadar genistein pada metode soxhletasi lebih tinggi dari pada metode sonikasi dan maserasi kinetik, hal ini diduga bahwa proses pemanasan mampu merubah bentuk isoflavon glukosida, isoflavon asetil glukosida, dan isoflavon malonil glukosida menjadi bentuk aglikon dan jenis turunan lainnya (Yue *et al.*, 2010). Pembentukan isoflavon aglikon dari bentuk isoflavon asetil dan malonil glukosida selama pemanasan telah banyak dilaporkan dalam penelitian sebelumnya (Chien *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2002).





Gambar 4.4 Grafik kadar genistein dalam ekstrak % b/b (n=3). Data disajikan dalam rata-rata  $\pm$  SD, notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna antar sampel ( $p < 0,05$ ).

Metode sonikasi menggunakan energi ultrasonik hingga 20.000 Hz dalam proses ekstraksinya. Metode ini merupakan metode yang sering digunakan dalam penelitian untuk mengekstraksi isoflavon dalam kedelai, karena membutuhkan waktu yang lebih singkat dan tidak membutuhkan biaya besar. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi isoflavon menggunakan metode sonikasi memberikan hasil yang optimum karena timbulnya fenomena kavitasi akibat pecahnya gelembung dalam pelarut dengan adanya gelombang ultrasonik. Transduser yang menghasilkan energi listrik mampu mengubah energi mekanik menjadi energi frekuensi tinggi, adanya frekuensi yang tinggi mampu membentuk gelembung yang akhirnya gelembung akan pecah atau sering disebut sebagai fenomena kavitasi. Fenomena kavitasi ini menghasilkan energi yang kuat dan mampu memutus ikatan pada dinding sel. Adanya kontak dengan pelarut akan meningkatkan efektifitas ekstraksi sehingga kandungan interseluler mampu terekstraksi dengan maksimal (Rostagno *et al.*, 2003). Metode sonikasi pada penelitian yang dilakukan oleh Luthria *et al.* (2007) menempati urutan

ketiga setelah soxhletasi dan *shaker*, sedangkan penelitian ini metode sonikasi menempati urutan kedua setelah soxhlet. Perbedaan ini dimungkinkan karena perbedaan waktu ekstraksi yang digunakan. Penelitian ini dilakukan selama 1 jam pada suhu ruang dengan energi 60 Hz. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Luthria *et al.* (2007) dilakukan selama 15 menit.

Metode maserasi kinetik dipilih dalam penelitian ini karena adanya gerakan yang konstan menghasilkan kontak antara pelarut dengan sampel lebih baik jika dibandingkan dengan metode maserasi biasa. Kadar genistein yang diperoleh pada proses ekstraksi maserasi kinetik lebih rendah jika dibandingkan dengan metode lainnya dalam penelitian ini, karena efektifitas ekstraksinya lebih rendah jika dibandingkan dengan metode soxhletasi dan sonikasi. Perbedaan hasil yang diperoleh dengan penelitian yang dilakukan oleh Luthria *et al.* (2007) karena kecepatan shaker yang digunakan saat proses ekstraksi berbeda. Penelitian yang dilakukan oleh Luthria *et al.* (2007) menggunakan kecepatan yang tinggi, sedangkan dalam penelitian ini menggunakan kecepatan 140 rpm.

### **4.3 Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase**

Sebelum uji penghambatan aktivitas tirosinase dilakukan, uji pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk mencari kondisi yang optimum untuk uji penghambatan aktivitas tirosinase. Variabel yang dioptimasi pada uji pendahuluan pada penelitian ini meliputi optimasi panjang gelombang maksimum dopakrom, optimasi waktu inkubasi, dan konsentrasi substrat L-tirosin. Unit aktivitas tirosinase yang digunakan sebesar 250 unit/mL. Unit aktivitas ini ditentukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Batubara *et al.* (2010).

#### **4.3.1 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Dopakrom**

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk menentukan panjang gelombang pada pengukuran serapan untuk pengujian selanjutnya, termasuk

penentuan kondisi optimum dan uji sampel terhadap penghambatan aktivitas tirosinase. Panjang gelombang maksimum dopakrom ditentukan dengan mengamati nilai absorbansi dopakrom pada panjang gelombang antara 400-600 nm. Aktivitas katalitik tirosinase ditentukan dengan mengamati produk hasil reaksi enzimatik yaitu dopakrom. Berdasarkan pustaka panjang gelombang maksimum dopakrom adalah 475 nm (Boyer, 1993).

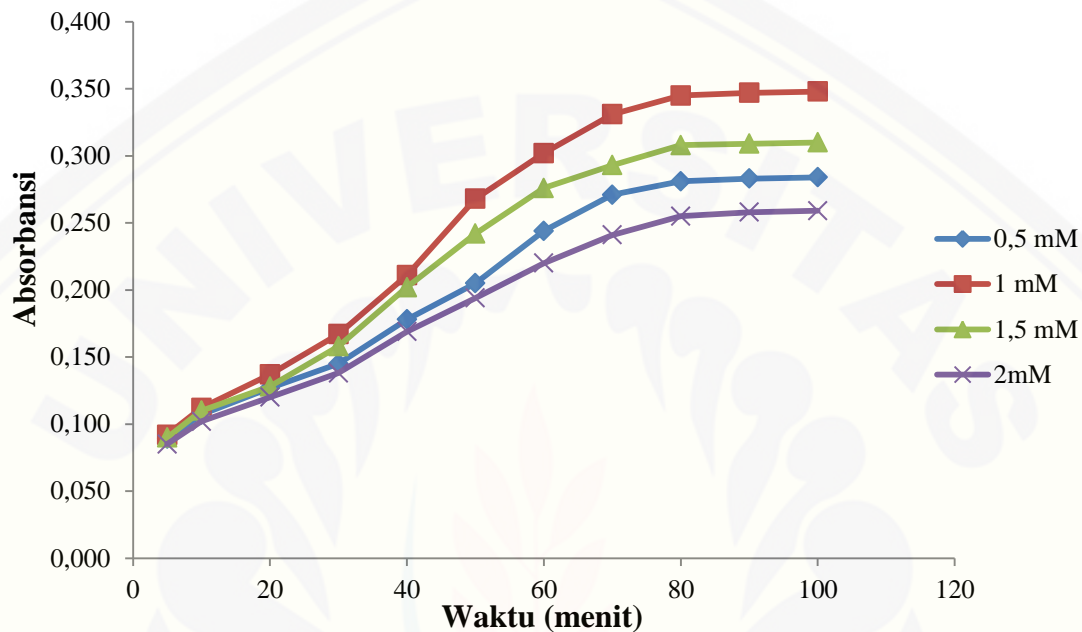
Hasil yang diperoleh berdasarkan pengukuran kali ini menunjukkan panjang gelombang maksimum dopakrom adalah 478 nm. Data hasil pengukuran panjang gelombang maksimum dopakrom dapat dilihat pada Lampiran F. Puncak serapan tertinggi didapatkan pada panjang gelombang 478 nm.

#### 4.3.2 Penentuan Waktu Inkubasi dan Konsentrasi Substrat L-Tirosin

Optimasi waktu inkubasi dan konsentrasi substrat L-tirosin perlu dilakukan sebelum pengujian aktivitas hambatan tirosinase. Larutan campuran enzim dan substrat diukur nilai absorbansinya setiap 10 menit selama 100 menit. Optimasi waktu inkubasi dilakukan bersamaan dengan penentuan konsentrasi substrat. Waktu inkubasi yang optimal diperoleh adalah 80 menit dapat dilihat pada Gambar 4.5. Selama rentang waktu tersebut, terjadi kenaikan nilai absorbansi yang proporsional dengan perubahan waktu dan selisih kenaikan tersebut semakin tidak berbeda jauh setelah melewati menit ke-80. Sehingga untuk pengujian selanjutnya digunakan waktu inkubasi selama 80 menit.

Konsentrasi substrat yang digunakan diharapkan mampu memenuhi sisi aktif enzim. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan untuk optimasi adalah 0,5 mM, 1mM, 1,5 mM, dan 2 mM. Hasil optimasi konsentrasi substrat dapat dilihat pada Gambar 4.5 dan lampiran G. Data absorbansi yang diperoleh terlihat adanya peningkatan mulai dari konsentrasi 0,5 mM dan 1mM, sedangkan pada konsentrasi 1,5 mM dan 2 mM terjadi penurunan data absorbansi. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1 mM sisi aktif enzim telah terisi penuh oleh substrat. Namun, pada

konsentrasi tertentu, ketika jumlah enzim-substrat sudah jenuh dan tidak ada lagi sisi aktif enzim bebas yang tersedia, peningkatan laju konsentrasi substrat tidak lagi meningkatkan laju pembentukan kompleks enzim-substrat (Murray *et al.*, 2006).



Gambar 4.5 Optimasi waktu inkubasi dan konsentrasi substrat L-Tirosin

Penurunan nilai absorbansi pada konsentrasi 1,5 mM dan selanjutnya 2 mM disebabkan karena adanya penghambatan aktivitas enzim oleh dopakrom sebagai produk. Penghambatan yang dilakukan produk dikarenakan produk memiliki struktur yang sama dengan struktur substrat. Penghambatan oleh produk tidak selalu konstan, tetapi penghambatannya dapat meningkat seiring dengan meningkatnya pembentukan produk, hal ini sesuai dengan teori *feed back inhibition* (Bisswanger, 2002).

#### 4.3.3 Pengukuran Aktivitas Hambatan Tirosinase Standar Genistein

Reaksi enzimatik terdiri dari dua tahap yaitu terbentuknya kompleks antara enzim dan substrat dan terurainya kompleks menjadi produk. Tujuan pengujian aktivitas hambatan tirosinase standar genistein adalah sebagai pembanding antara



aktivitas hambatan tirosinase oleh ekstrak edamame dengan standar genistein. Uji aktivitas hambatan tirosinase dilakukan dengan preparasi standar genistein hingga diperoleh beberapa seri konsentrasi yaitu 80,990 ng/ $\mu$ L; 92,56 ng/ $\mu$ L; 104,130 ng/ $\mu$ L; 115,700 ng/ $\mu$ L; 127,270 ng/ $\mu$ L; 138,840 ng/ $\mu$ L; 150,410 ng/ $\mu$ L; 161,980 ng/ $\mu$ L; 173,55 ng/ $\mu$ L. Penimbangan dan perhitungan standar genistein untuk uji hambatan tirosinase dapat dilihat pada Lampiran B2. Seri konsentrasi genistein direaksikan dengan enzim tirosinase dan diinkubasi selama 5 menit selanjutnya ditambahkan dengan substrat L-tirosin. Inkubasi dilakukan selama 80 menit sesuai dengan hasil optimasi waktu yang telah diperoleh. Hasil uji aktivitas hambatan tirosinase standar genistein dapat dilihat pada Lampiran H.

Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai % hambatan. Perhitungan % hambatan genistein dapat dilihat pada lampiran H. Nilai % hambatan genistein yang diperoleh dibuat kurva dengan sumbu x adalah konsentrasi standar genistein (ng/ $\mu$ L) dan sumbu y adalah % hambatan, sehingga diperoleh persamaan regresi  $y = 0,522x - 17,931$ . Persamaan regresi yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  standar genistein. Nilai  $IC_{50}$  standar genistein berdasarkan hasil perhitungan adalah 130,136 ng/ $\mu$ L.

#### 4.3.4 Pengukuran Aktivitas Hambatan Tirosinase Ekstrak Edamame

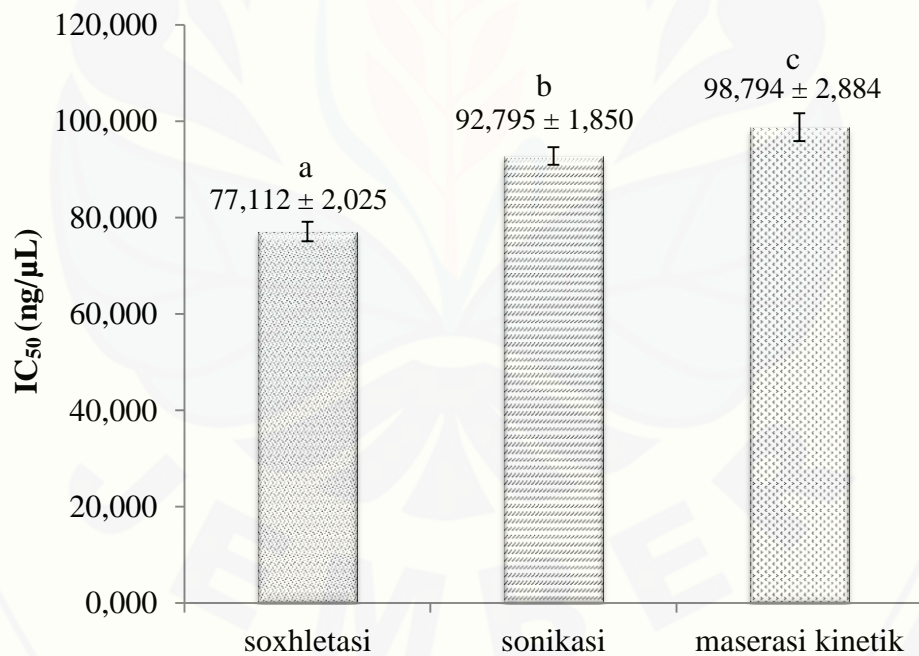
Uji aktivitas hambatan tirosinase dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya daya hambat senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak etanol edamame. Sampel yang akan dianalisis aktivitas hambatan tirosinase dilakukan preparasi sehingga diperoleh beberapa seri konsentrasi yang dapat dilihat pada Lampiran B.6 dan Lampiran I. Preparasi sampel untuk uji aktivitas hambatan tirosinase dilakukan dengan melarutkan ekstrak menggunakan dapar fosfat pH 6,5 dan konsentrasinya divariasikan dari 40 – 160  $\mu$ g/mL.

Seluruh tahapan saat pengujian dilakukan pada kondisi yang dikontrol. Suhu ruangan yang digunakan untuk inkubasi dikendalikan pada suhu  $26^{\circ} \pm 2^{\circ}C$ . Suhu



yang dianjurkan berdasarkan metode analisis tirosinase menggunakan spektrofotometri yang dilakukan Boyer (1993) adalah 25 °C – 30 °C. Larutan dapar yang digunakan adalah larutan dapar fosfat pH 6,5. Sebelum dilakukan analisis hambatan tirosinase, pH dapar dilakukan pengecekan menggunakan pH meter. pH optimum reaksi katalisis tirosinase menurut Boyer (1993) berada dikisaran 6,5-7,0 sehingga pada penelitian kali ini reaksi katalisis tirosinase berlangsung pada kondisi suhu dan pH yang telah sesuai dengan pustaka.

Sampel yang akan dianalisis ditimbang sebanyak 3 kali (replikasi 3 kali) pada masing-masing ekstrak (perhitungan % hambatan ekstrak dapat dilihat pada Lampiran I). Data hasil pengujian aktivitas hambatan tirosinase ekstrak etanol edamame dapat dilihat pada Gambar 4.6. Gambar 4.6 menunjukkan bahwa ekstrak etanol edamame memiliki aktivitas hambatan tirosinase.



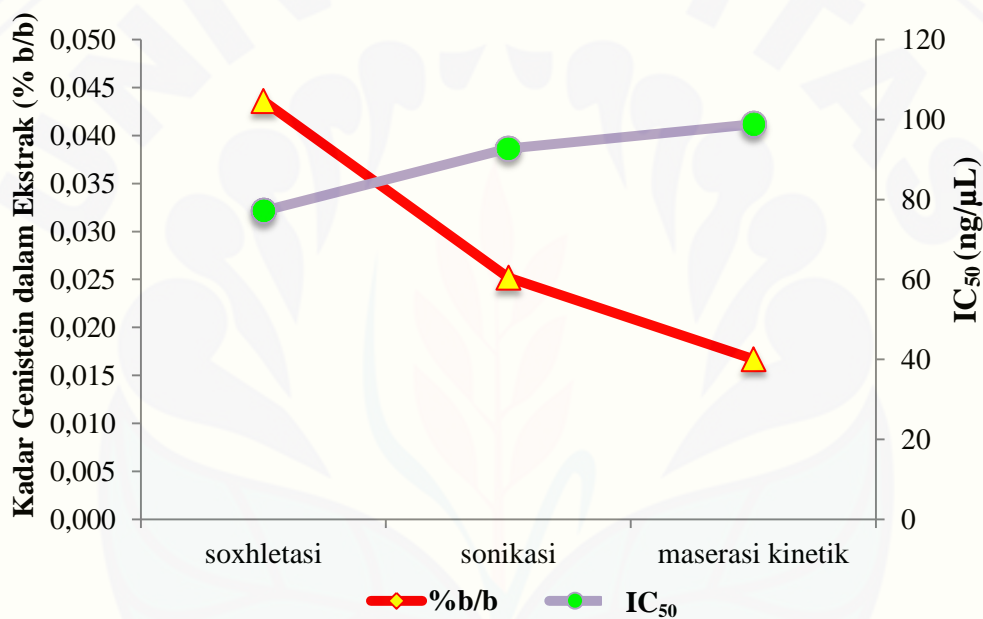
Gambar 4.6 Grafik nilai IC<sub>50</sub> hambatan tirosinase pada masing-masing metode (n=3). Data disajikan dalam rata-rata ± RSD, notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna antar sampel (p<0,05).

Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai aktivitas hambatan tirosinase ( $IC_{50}$ ) pada masing-masing ekstrak berbeda-beda, metode sonikasi memiliki nilai  $IC_{50}$   $92,795 \pm 1,994$  ng/ $\mu$ L, maserasi kinetik  $98,794 \pm 2,919$  ng/ $\mu$ L, dan soxhletasi  $77,112 \pm 2,626$  ng/ $\mu$ L. Nilai aktivitas hambatan tirosinase ( $IC_{50}$ ) yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan *one way* ANOVA. Hasil uji normalitas dan homogenitas diperoleh nilai signifikansi lebih dari 0,05, hal ini menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya dilakukan uji *one way* ANOVA dan diperoleh nilai signifikansi kurang dari 0,05. Sehingga dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat dua kelompok yang mempunyai varian data yang berbeda bermakna. Tahap terakhir dalam analisis data adalah uji *post-hoc*, hasil uji *post-hoc* diketahui bahwa nilai signifikansi kurang dari 0,05. Kesimpulannya adalah terdapat perbedaan bermakna nilai aktivitas hambatan tirosinase ( $IC_{50}$ ) pada ekstrak edamame yang diekstraksi menggunakan metode sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi dan dinotasikan dengan huruf berbeda pada grafik. Hasil analisis statistik kadar genistein pada masing-masing metode dapat dilihat pada Lampiran J.2.

Ditinjau dari kadar genistein dari masing-masing metode, peningkatan kadar genistein diikuti dengan peningkatan aktivitas hambatan tirosinase. Gambar 4.7 menjelaskan hubungan antara kadar genistein edamame yang diekstraksi menggunakan tiga metode yang berbeda dengan nilai hambatan tirosinase dinyatakan dalam  $IC_{50}$ . Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa kadar genistein berpengaruh terhadap aktivitas hambatan tirosinase. Semakin tinggi kadar genistein maka semakin tinggi aktivitas hambatannya yang ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  semakin rendah.

Aktivitas hambatan tirosinase ekstrak edamame yang diperoleh dibandingkan dengan standar genistein untuk melihat efektifitas ekstrak edamame dalam menghambat aktivitas tirosinase. Berdasarkan hasil yang diperoleh ekstrak edamame memiliki aktivitas hambatan dengan nilai  $IC_{50}$  lebih rendah yaitu sonikasi  $92,795 \pm 1,994$  ng/ $\mu$ L, maserasi kinetik  $98,794 \pm 2,919$  ng/ $\mu$ L, dan soxhletasi  $77,112 \pm 2,626$  ng/ $\mu$ L, sedangkan standar genistein memiliki nilai  $IC_{50}$  130,136 ng/ $\mu$ L. Hal

ini menunjukkan bahwa di dalam ekstrak etanol edamame tidak hanya genistein saja yang mampu menghambat aktivitas enzim tirosinase, tetapi isoflavon lain yang ada di dalam ekstrak juga memiliki aktivitas hambatan tirosinase. Chang *et al.* (2005) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa isoflavon aglikon seperti genistein, daidzein, dan glisitein memiliki aktivitas hambatan tirosinase. Selain bentuk isoflavon aglikon, isoflavon glukosida seperti daidzin dan genistin juga memiliki aktivitas hambatan terhadap tirosinase (Chang *et al.*,2007).



Gambar 4.7 Hubungan antara kadar genistein dan nilai IC<sub>50</sub>.

Metode soxhletasi memiliki aktivitas hambatan tertinggi karena mampu mengekstraksi bentuk aglikon lebih besar dan diduga mampu mengkonversi isoflavon bentuk malonil ke bentuk glikosida atau aglikonnya karena adanya pemanasan saat ekstraksi. Data penelitian yang dilakukan oleh Chang *et al.* (2007) menunjukkan bentuk isoflavon aglikon memiliki aktivitas hambatan lebih tinggi dari pada bentuk yang berikatan dengan gula, hal inilah yang menyebabkan metode soxhletasi memiliki nilai IC<sub>50</sub> lebih kecil atau hambatan tirosinase paling besar daripada kedua metode ekstraksi lainnya.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa:

1. Kadar genistein ekstrak etanol edamame pada metode sonikasi adalah  $0,0252 \pm 2,066$  % b/b, maserasi kinetik  $0,0167 \pm 1,931$  % b/b, dan soxhletasi  $0,0436 \pm 1,012$  % b/b.
2. Terdapat perbedaan bermakna kadar genistein ekstrak etanol edamame yang diekstraksi menggunakan metode sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi.
3. Aktivitas hambatan tirosinase ekstrak etanol edamame pada metode sonikasi memiliki nilai  $IC_{50}$   $92,795 \pm 1,994$  ng/ $\mu$ L, maserasi kinetik  $98,794 \pm 2,919$  ng/ $\mu$ L, dan soxhletasi  $77,112 \pm 2,626$  ng/ $\mu$ L.
4. Terdapat perbedaan bermakna aktivitas hambatan tirosinase ekstrak etanol edamame yang diekstraksi menggunakan metode sonikasi, maserasi kinetik, dan soxhletasi.

### 5.2 Saran

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

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menganalisis jenis dan jumlah masing-masing isoflavon yang ada di dalam biji kedelai edamame pada metode yang digunakan dalam penelitian ini.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh perbedaan suhu saat proses ekstraksi isoflavon dalam biji edamame.



**DAFTAR PUSTAKA**

- Batubara, I., Darusman L. K., Mitsunaga T., Rahminiwati M., and Djauhari E. 2010. Potency of Indonesian Medicinal Plants as Tyrosinase Inhibitor and Antioxodant Agent. *Journal of Biological Sciences*, 10 (2): 138-144.
- Bhagwat S., Haytowitz, D. B., and Holden, J. M. 2008. *USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods*, Release 2.0. U.S. Beltsville: Department of Agriculture.
- Bisswanger, H. 2002. *Enzyme Kinetic: Principles and Methods*. German: Wiley VCH Inc.
- Boyer, R. F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed. California: The Benjamin/ Cumming Publish Co.
- Chae, G. Y. and Ha, B. J. 2011. The comparative Evaluation of Fermented and Non-Fermented Soybean Extract on Antioxidantion and Whitening. *Toxicology Research*, 27 (40): 205–209.
- Chang, T. S., Ding, H. Y., and Lin, H. C. 2005. Identifying 6,7,4'-Trihydroxyisoflavone as a Potent Tyrosinase Inhibitor. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 69 (10) : 1999–2001.
- Chang, T. S, Ding, H. Y, Tai S. S. K, and Wu, C. Y. 2007. Mushroom Tyrosinase Inhibitory Effects of Isoflavones Isolated from Soygerm Koji Fermented with *Aspergillus Oryzae* BCRC 32288. *Food Chemistry*, 105 : 1430-1438.
- Chang, T. S. 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 2440–75.
- Chang, T. S. 2012. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. *Materials*, 5 :1661-1685.
- Chien, J. T., Hsieh, H. C., Kao, T. H., and Chen, B. H. 2005. Kinetic Model for Studying the Conversion and Degradation of Isoflavones During Heating. *Food Chemistry*, 91: 425–434.



- Deinstrop, E. H. 2007. *Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes, 2<sup>nd</sup> ed.* Germany: Wiley-VCH.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Acuan Sediaan Herbal.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan RI. 2009. *Farmakope Herbal Indonesia.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Food Safety Commission. 2006. *Fundamental Concepts in the Safety Assesment of Foods Containing Soy Isoflavones for the purpose of Specified Health Use.* Japan : Food Safety Commission Novel Foods Expert Committee.
- Georgetti, S. R., Casagranade, R., Vicentini, F. T. M. C., Waldiceu A., Verri J., and Fonseca, M. J. V. 2006. Evaluation of The Antioxidant Activity of Soybean Extract by Different In Vitro Methods and Investigation of This Activity after Its Incorporation in Topical Formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64: 99–106.
- Gillbro, J. M. and Olsson, M. J. 2011. The Melanogenesis and Mechanisms of Skin-lightening Agents-Existing and New Approaches: Melanogenesis and Skin-lightening Agents. *International Journal of Cosmetic Science*, 33 (3): 210–221.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan.* Cetakan II. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB-Press.
- Heredia, T. M., Adams, D. O., Fields, K. C., Held, P. G., and Harbertson. 2006. Evaluation of A Comprehensive Red Wine Phenolic Assay Using A Microplate Reader. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (4) : 497-502.
- Huang, H., Liang, H., and Kwok, K. C. 2006. Effect of Thermal Processing on Genistein, Daidzein and Glycitein Content in Soymilk. *Journal of the Science of Agriculture*, 86: 1110-1114.
- Huang, Z-R., Hung, C. F. Lin, Y. K, and Fang, J. Y. 2008. In Vitro and In Vivo Evaluation of Topical Delivery and Potential Dermal Use of Soy Isoflavones Genistein And Daidzein. *International Journal Pharmacy*, 364: 36–44.

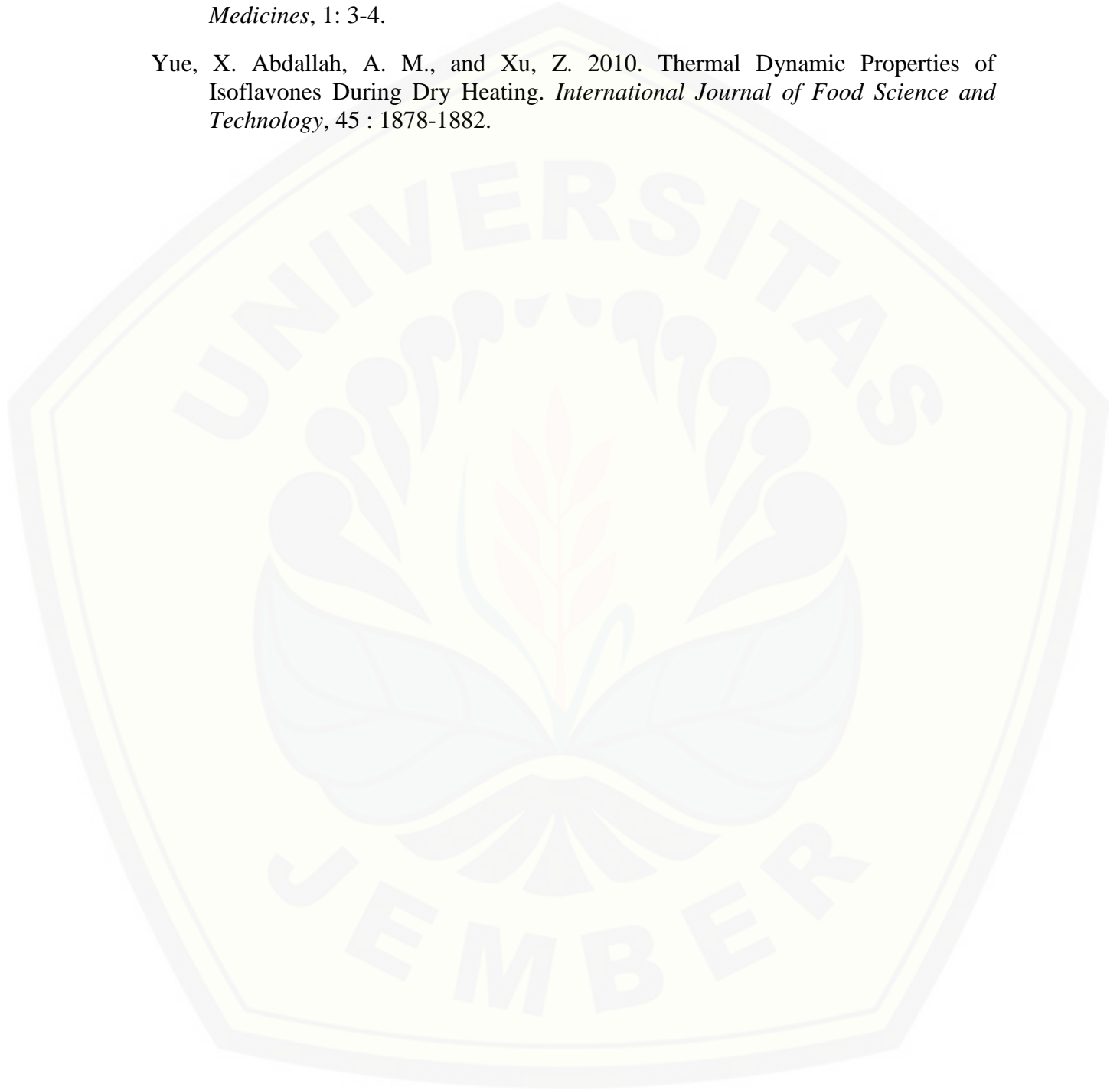
- Hui, M., Tiansheng, Q., and Hai, Z. 2005. Methods For Extracting, Separating, Identifying and Quantifying Daidzein and Genistein. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 03 - 2005.
- Indrayanto, G. and Yuwono, M. 2003. *Validation of TLC Analyses in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Indonesia.
- Kim, D., Park, J., Kim, J., Han, C., Yoon, J., Kim, N., Seo, J., and Lee, C. 2006. Flavonoids as Mushroom Tyrosinase Inhibitors: A Fluorescence Quenching Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 935-941.
- Kim, J. H., Kim, M. R., Lee, E. S., and Lee, C. H. 2009. Inhibitory Effects of Calycosin Isolated from the Root of *Astragalus membranaceus* on Melanin Biosynthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(2) 264-268.
- Konovsky, J., Lumpkin T., A., and McClary, D. 1994. Edamame : The Vegetable Soybean. *Washington State University*. 1-9.
- Lee, M. H., and Lin, C. C. 2007. Comparison of Techniques for Extraction of Isoflavones from The Roots of Radix Puerariae: Ultrasonic and Pressurized Solvent Extractions. *Food Chemistry*, 105: 223–228.
- Likhitwitayawuid, K. 2008. Stilbenes With Tyrosinase Inhibitory Activity. *Current Science*, 94: 44-52.
- Lin, V. C., Ding, H. Y., Tsai, P. C., Wu, J. Y., Lu, Y-H, and Chang, T. S. 2011. In Vitro and In Vivo Melanogenesis Inhibition by Biochanin A from *Trifolium pratense*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(5) : 914-918.
- List, P. H. and Schimdt. 2000. *Phytopharmaceutical Technology*. University of Marburg Germany : CRC Press.
- Luthria, D. L., Biswas R., and Natarajan S. 2007. Comparison of Extraction Solvents and Techniques Used for The Assay of Isoflavones from Soybean. *Food Chemistry*, 105: 325–333.
- Luthria, D. L., and Natarajan S. S. 2009. Influence of Sample Preparation on the Assay of Isoflavones. *Planta Medica*, 75: 704-710.
- Mebrahtu, T., Mohamed, A., Wang, C.Y., and Andebrhan, T. 2004. Analysis of Isoflavone Contents in Vegetable Soybeans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59: 55–61.

- Molina, F. G., Munoz, J. L. Varon, R., Lopez, J. N. R., Canovas, F. G., and Tudela, J. 2007. A Review on Spectrophotometric Method for Measuring the Monophenolase and Dhipenolase Activities of Tyrosinase. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55 : 9739-9749.
- Mulja, M., dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Murray R. K., Daryl K. G., and Victor W. R. 2006. *Biokimia Harper Edisi 27*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Ncube, N. S., Afolayan, A. J., and Okoh, A. I. 2008. Assessment Techniques of Antimicrobial Properties of Natural Compounds of Plant Origin: Current Methods and Future Trends. *African Journal of Biotechnology*, 7 (2): 1797-1806.
- Panizzi, M. C. C., Favoni, S. P. G. and Kikuchi, A. 2002. Extraction Time For Soybean Isoflavone Determination. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45 (4): 515-518.
- Park, J. S., Kim, D. H., Lee, J. K., Lee, J. Y., Kim, D. H., Kim, H. K., Lee, H. J., and Kim, H. C. 2010. Natural Ortho-Dihydroxyisoflavone Derivatives from Aged Korean Fermented Soybean Paste As Potent Tyrosinase and Melanin Formation Inhibitors. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 20: 1162-4.
- Pilsakova L., Riecanaky I., and Jagla F., 2010. The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. *Physiological Research*, 59: 651 – 664.
- Rao, M. S. S., Bhagsari, A. I. and Mohamed. 2002. Fresh Green Seed Yield and Seed Nutritional Traits of Vegetable Soybean Genotypes. *Crop Science Society of America*, 42: 1950-1958.
- Rostagno, M. A., Palma, M., and Barroso, C. G. 2004. Pressurized Liquid Extraction of Isoflavones From Soybeans. *Analytica Chimica Acta*, 522: 169-177.
- Rostagno, M. A., Palma, M., and Barroso, C. G. 2003. Ultrasound Assited Extraction of Soy Isoflavon. *Journal of Chromatography*, 1012 : 119-128.
- Samsu, H. S. 2001. *Membangun Agroindustri Bernuansa Ekspor: Edamame (vegetable soybean)*. Jember: Graha Ilmu dan Florentina.

- Santjaka, A. 2011. *Statistik untuk Penelitian Kesehatan*. Yogyakarta: Nuha Medika Yogyakarta.
- Santoso. 2010. *Enzimologi*. Seri Buku Kuliah Biokimia Kedokteran I : Semarang.
- Satiadarma, Mulja, Tjahjono, and Kartasasmita. 2004. *Asas Pengembangan Prosedur Analisis Edisi Pertama*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Shanmugasundaram, S. 1991. Vegetable Soybean; Research Needs For Production and Quality Improvement; Proceedings of a Workshop held at Kenting, Taiwan, 29 April-2 May 1991, AVROC : Taiwan.
- Su, E. G. 2003. An Overview on Skin Whitening. *Sino Lion* : USA.
- Tsukomoto C., Shimada, S., Igitu, K., Kudou, S., Kokubun, M., Okubo, K., and Kitamura, K. 1995. Factors Affecting Isoflavone Content In Soybean Seeds: Change in Isoflavone, Saponins, And Composition Of Fatty Acids At Different Temperature During Seed Development. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 43: 1184–1192.
- USDA. 2010. URL: [www.plants.usda.gov](http://www.plants.usda.gov). [diakses tanggal 22 November 2014].
- Videira, I. F. S., Moura D. F. L., and Magina S. 2013. Mechanisms Regulating Melanogenesis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88 (1) : 76-83.
- Voight, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi. Edisi kelima*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Warrington J. C. and Saville B. A. 1999. Tyrosinase Inactivation in Organic Solvent. *Biotechnology and Bioengineering*, 65 (3): 325–333.
- World Health Organization. 2008. *Maintenance Manual for Laboratory Equipment 2<sup>nd</sup> ed.* Geneva, Switzerland: WHO Press.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Xu, Z., Wu, Q., and Godber, S. 2002. Stabilities of Daidzin, Glycitin, Genistin, and Generation of Derivatives During Heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7402–7406.
- Yang, Z., Kulkarni, K., Zhu, W., and Hu, M. 2012. Bioavailability and Pharmacokinetics of Genistein: Mechanistic Studies on its ADME. *Anticancer Agents Medical Chemistry*, 12 (10) : 1264–1280.



- Yuan, D., Chen Y., Bai, X., Pan, Y., and Kano, Y. 2006. TLC and HPLC Analysis of Soy Isoflavones in Semen Sojæ Praeparatum. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 1: 3-4.
- Yue, X. Abdallah, A. M., and Xu, Z. 2010. Thermal Dynamic Properties of Isoflavones During Dry Heating. *International Journal of Food Science and Technology*, 45 : 1878-1882.





## DAFTAR LAMPIRAN

### LAMPIRAN A : Rendemen Ekstrak yang Diperoleh

Metode Ekstraksi	Replikasi	Bobot Serbuk (gram)	Bobot Ekstrak (gram)	Rendemen (%)	Rata-rata (%)	RSD (%)
Sonikasi	1	120,052	13,749	11,452	11,569	0,911
	2	120,032	13,922	11,599		
	3	120,021	13,991	11,657		
Maserasi kinetik	1	120,012	15,192	12,659	12,634	0,285
	2	120,002	15,181	12,651		
	3	120,005	15,112	13,593		
Soxhletasi	1	120,023	9,722	8,100	8,251	1,589
	2	120,012	9,998	8,331		
	3	120,011	9,989	8,323		

### Contoh Perhitungan Rendemen Ekstrak

Sebanyak 120 gram serbuk biji kedelai edamame diekstraksi menggunakan metode sonikasi, ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan didapatkan 13,9 gram.

Maka % rendemen yang diperoleh adalah :

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Serbuk}} \times 100 \% \\
 &= \frac{13,749 \text{ gram}}{120,052 \text{ gram}} \times 100 \% \\
 &= 11,452 \%
 \end{aligned}$$

### LAMPIRAN B : Perhitungan Penimbangan Bahan

#### B.1 : Perhitungan Pembuatan Standar Genistein Analisis KLT Densitometri

Standar genistein ditimbang sebanyak 5,213 mg, dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a. sehingga diperoleh konsentrasi induk sebesar 521,3 ng/μL. Larutan induk genistein yang diperoleh diencerkan sehingga diperoleh rentang konsentrasi 20,852 μg/mL, 31,278 μg/mL, 52,13 μg/mL, 72,982 μg/mL, dan 93,834 μg/mL.

- Perhitungan pembuatan larutan induk standar genistein;

$$\frac{5,213 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 521,3 \text{ mg/L}$$

$$= 521,3 \text{ ppm}$$

- Larutan induk yang diperoleh dilakukan pengenceran untuk mendapatkan seri konsentrasi yang lebih kecil.

$$\frac{0,04 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 521,3 \text{ ppm} = 20,852 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,06 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 521,3 \text{ ppm} = 31,278 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,1 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 521,3 \text{ ppm} = 52,13 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,14 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 521,3 \text{ ppm} = 72,982 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,18 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 521,3 \text{ ppm} = 93,834 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

## **B.2 : Perhitungan Pembuatan Standar Genistein Analisis Hambatan Tirosinase**

Standar genistein ditimbang sebanyak 5,785 mg, dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a. sehingga diperoleh konsentrasi induk sebesar 578,5 ng/ $\mu$ L. Larutan induk genistein yang diperoleh diencerkan sehingga diperoleh rentang konsentrasi 80,990  $\mu$ g/mL – 173,550  $\mu$ g/mL.

- Perhitungan pembuatan larutan induk standar genistein;

$$\frac{5,785 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 578,5 \text{ mg/L}$$

$$= 578,5 \text{ ppm}$$

- Larutan induk yang diperoleh dilakukan pengenceran untuk mendapatkan seri konsentrasi yang lebih kecil.

$$\frac{0,14 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 578,5 \text{ ppm} = 80,990 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,16 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 578,5 \text{ ppm} = 92,560 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,18 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 578,5 \text{ ppm} = 104,130 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,20 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 578,5 \text{ ppm} = 115,700 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,22 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 578,5 \text{ ppm} = 127,270 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,24 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 578,5 \text{ ppm} = 138,840 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,26 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 578,5 \text{ ppm} = 150,410 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,28 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 578,5 \text{ ppm} = 161,980 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

$$\frac{0,30 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 578,5 \text{ ppm} = 173,550 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$$

### **B.3 : Perhitungan Pembuatan Dapar fosfat**

Dapar fosfat dilakukan dengan cara mencampurkan 50 mL kalium fosfat monobasa 0,2 M dengan 12,60 mL natrium hidroksida 0,2 N, dan encerkan dengan aquadest hingga 200 mL.

➤ Pembuatan 50mL kalium fosfat monobasa 0,2 M

$$0,2 \text{ M} = \frac{x}{133} \times \frac{1000}{50}$$

$$x = 1,330 \text{ gram}$$

➤ Pembuatan 12,60 mL natrium hidroksida 0,2 N

$$0,1 \text{ M} = \frac{x}{40} \times \frac{1000}{12,6}$$

$$x = 0,050 \text{ gram}$$

#### **B.4 : Perhitungan Preparasi Substrat**

Konsentrasi substrat yang digunakan adalah 1mM.

$$1 \text{ mM} = \frac{x \text{ mg}}{181,19 \text{ g/mol}} \times \frac{1000\text{mL}}{25 \text{ mL}}$$

$x = 4,529 \text{ mg}$  , sebanyak 4,529 mg L-tirosin dilarutkan dalam dapar 25 mL.

#### **B.5 : Perhitungan Preparasi Enzim**

Enzim tirosinase yang tersedia dalam kemasan adalah 50 KU. Pembuatan larutan stok enzim tirosinase dilakukan dengan cara melarutkan semuanya dalam 10 mL dapar fosfat pH 6,5. Sediaan 10 mL dibagi menjadi 2 bagian sehingga setiap 5 mL mengandung 25.000 Unit enzim tirosinase. Sediaan 5 mL *diadjust* dengan dapar fosfat pH 6,5 hingga 10 mL. Sediaan 25.000 unit dalam 10 mL dibagi menjadi 10 bagian, sehingga setiap 1 mL mengandung 2.500 unit tirosinase. Sediaan 1 mL enzim yang mengandung 2.500 unit enzim *diadjust* menggunakan dapar fosfat pH 6,5 hingga 10 mL. Sehingga setiap 1mL mengandung 250 unit enzim tirosinase, konsentrasi inilah yang digunakan untuk uji aktivitas hambatan.

### **B.6 : Perhitungan Preparasi Ekstrak untuk Analisis Aktivitas Hambatan Tirosinase**

➤ Penimbangan Sampel Ekstrak Metode Maserasi Kinetik

Replikasi 1 = 0,0225 gram dan 0,0323 gram

Replikasi 2 = 0,0227 gram dan 0,0326 gram

Replikasi 3 = 0,0223 gram dan 0,0320 gram

➤ Penimbangan Sampel Ekstrak Metode soxhletasi

Replikasi 1 = 0,0224 gram dan 0,0324 gram

Replikasi 2 = 0,0225 gram dan 0,0326 gram

Replikasi 3 = 0,0221 gram dan 0,0322 gram

➤ Penimbangan Sampel Ekstrak Metode Sonikasi

Replikasi 1 = 0,0225 gram dan 0,0326 gram

Replikasi 2 = 0,0223 gram dan 0,0324 gram

Replikasi 3 = 0,0221 gram dan 0,0321 gram

➤ Contoh Perhitungan Preparasi Sampel Ekstrak Maserasi Kinetik untuk Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase

Penimbangan = 0,0225 gram.....(1)

$$\checkmark \frac{22,5 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ ml/L} = 2250 \text{ ppm}$$

$$1. \frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 2250 \text{ ppm} = 112,5 \text{ ppm}$$

$$a. \frac{2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 112,5 \text{ ppm} = 45 \text{ ppm}$$

$$b. \frac{5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 112,5 \text{ ppm} = 56,25 \text{ ppm}$$

$$2. \frac{0,5 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 2250 \text{ ppm} = 225 \text{ ppm}$$

$$a. \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 225 \text{ ppm} = 67,5 \text{ ppm}$$



Penimbangan = 0,0323 gram.....(2)

$$\checkmark \frac{32,3 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ ml/L} = 3230 \text{ ppm}$$

1.  $\frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 3230 \text{ ppm} = 161,5 \text{ ppm}$

a.  $\frac{5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 161,5 \text{ ppm} = 80,75 \text{ ppm}$

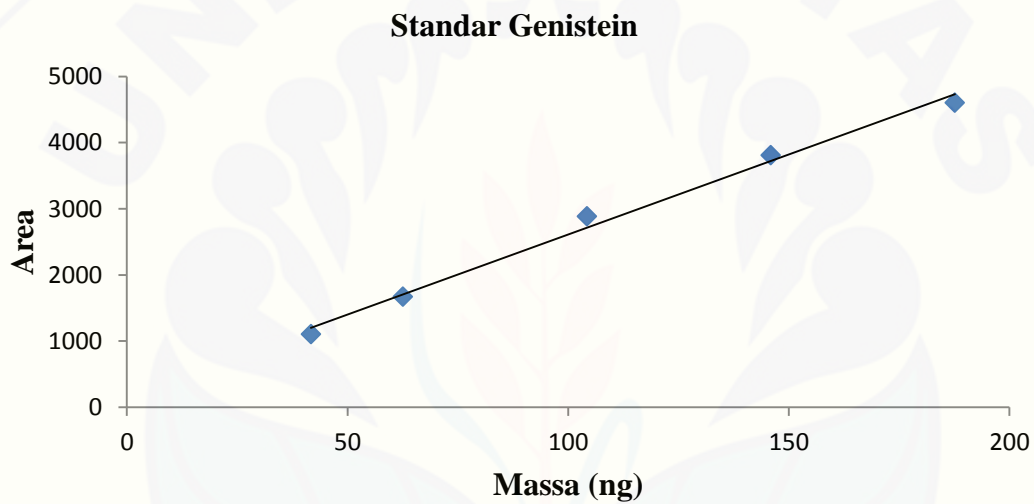
2.  $\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 3230 \text{ ppm} = 323 \text{ ppm}$

a.  $\frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 323 \text{ ppm} = 96,9 \text{ ppm}$

b.  $\frac{4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 323 \text{ ppm} = 129,2 \text{ ppm}$

**LAMPIRAN C : Persamaan Regresi Standar Genistein****C.1 Sampel Sonikasi dan Soxhletasi**

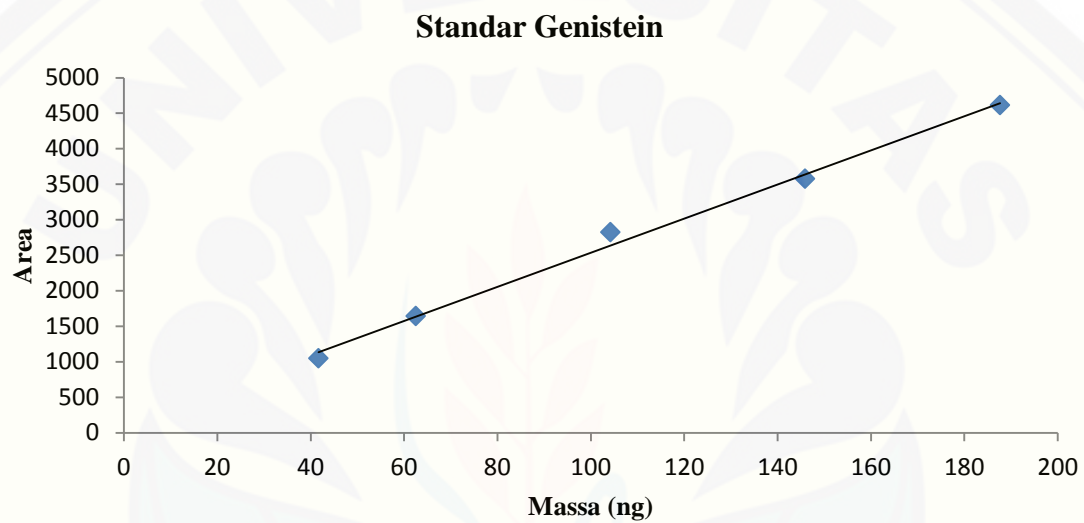
Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Massa (ng)	Area
20,852	41,700	1104,73
31,278	62,560	1672,31
52,13	104,260	2885,45
72,982	145,960	3808,27
93,834	187,670	4602,62



Persamaan regresi yang diperoleh untuk menghitung kadar genistein pada sampel sonikasi dan soxhletasi adalah  $Y = 24,203X + 190,36$  ;  $R = 0,996$

### C.2 Sampel Maserasi Kinetik

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Massa (ng)	Area
20,852	41,700	1048,120
31,278	62,560	1639,530
52,13	104,260	2822,090
72,982	145,960	3576,980
93,834	187,670	4610,250



Persamaan regresi yang diperoleh untuk menghitung kadar genistein pada sampel sonikasi dan soxhletasi adalah  $Y = 24,025X + 134,32$  ;  $R = 0,997$

**LAMPIRAN D : Hasil perhitungan kadar genistein dalam sampel**

Metode Ekstraksi	Penimbangan Ekstrak (mg)	Area	Massa dalam 6 mikroliter (ng)	Massa dalam 10 mL (ng)	Massa dalam 10 mL (mg)	% b/b	Rata-rata (%)	SD	RSD (%)
Sonikasi	502	2013,140	75,312*	125520,252	0,126	0,025	0,025	5,214 x 10 <sup>-4</sup>	2,066
	512	2040,340	76,436*	127393,298	0,127	0,025			
	520	2141,600	80,620*	134366,263	0,134	0,026			
maserasi kinetik	508	1335,430	49,994**	83323,621	0,083	0,016	0,017	3,223 x 10 <sup>-4</sup>	1,931
	511	1389,260	52,235**	87057,926	0,087	0,017			
	500	1332,290	49,863**	83105,793	0,083	0,016			
Soxhletasi	520	3523,360	137,710*	229517,002	0,229	0,044	0,044	4,417 x 10 <sup>-4</sup>	1,012
	509	3389,670	132,187*	220310,843	0,220	0,043			
	512	3425,940	133,685*	222808,467	0,223	0,044			

Keterangan :

\*) Persamaan regresi standar untuk metode sonikasi dan soxhletasi adalah  $y = 24,203x + 190,36$  ;  $R=0,996$

\*\*\*) Persamaan regresi standar untuk metode maserasi kinetik adalah  $y = 24,025x + 134,32$  ;  $R=0,997$

**LAMPIRAN E :Contoh Perhitungan Kadar Genistein dalam Sampel**

Misal : Larutan sampel ditotolkan sebanyak 6  $\mu\text{L}$  pada lempeng KLT Silika Gel 60  $F_{254}$  kemudian dielusi sampai tanda batas, dikeringkan dan noda discan dengan densitometer. Konsentrasi genistein yang diperoleh metode sonikasi sebagai berikut;

1) Replikasi 1. 75,31215 ng/6 $\mu\text{L}$ , jika massa sampel yang ditimbang 502 mg, maka kadar genistein dalam sampel edamame adalah:

➤ Konsentrasi analit

$$\begin{aligned} &= \frac{75,31215 \text{ ng}}{6\mu\text{L}} \\ &= 12,552 \text{ ng}/\mu\text{L} \\ &= 12,552 \mu\text{g}/\text{mL} \end{aligned}$$

➤ Jumlah analit dalam 10 mL sampel

$$\begin{aligned} &= 12,552 \mu\text{g}/\text{mL} \times 10 \text{ mL} \\ &= 125,520 \mu\text{g} \\ &= 0,125520 \text{ mg} \end{aligned}$$

➤ Kadar genistein dalam sampel yang ditimbang (%b/b)

$$\begin{aligned} &= \frac{0,125520 \text{ mg}}{502 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 0,025\% \end{aligned}$$

2) Replikasi 2. 76,436 ng/6 $\mu\text{L}$ , jika massa sampel yang ditimbang 512 mg, maka kadar genistein (%b/b) dalam sampel edamame; (perhitungan sama seperti no. 1)

$$= 0,0249\%$$

3) Replikasi 3. 80,6198 ng/6 $\mu\text{L}$ , jika massa sampel yang ditimbang 529 mg, maka kadar genistein (%b/b) dalam sampel edamame; (perhitungan sama dengan no. 1)

$$= 0,0258\%$$



➤ **Rata-rata**

$$= \frac{(0,0250)+(0,0249) + (0,0258)}{3}$$

$$= 0,0252\%$$

➤ **SD**

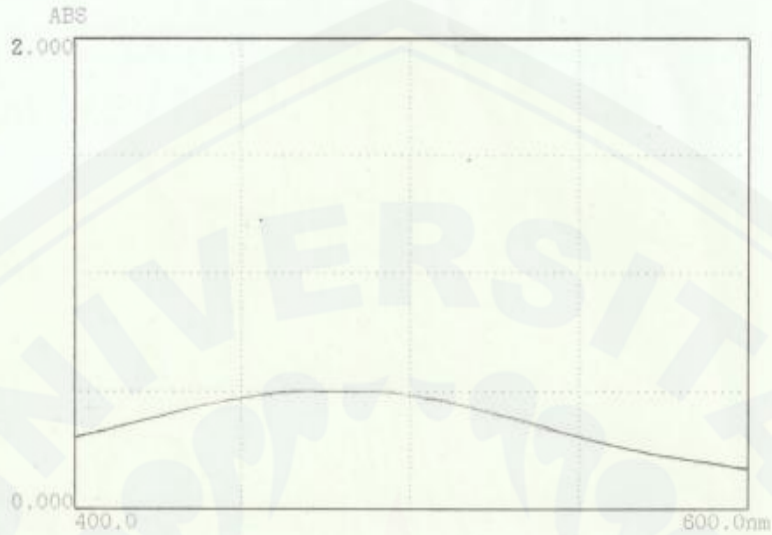
$$= \sqrt{[(0,0250-0,0252)^2 + (0,0249-0,0252)^2 + (0,0258-0,0252)^2]/(3-1)}$$

$$= 5,214 \times 10^{-4}$$

➤ **RSD**

$$= \frac{5,214 \times 10^{-4}}{0,0252} \times 100\%$$

$$= 2,066 \%$$

**LAMPIRAN F : Hasil Optimasi Panjang Gelombang Maksimum Dopakrom**

Panjang gelombang maksimum dopakrom

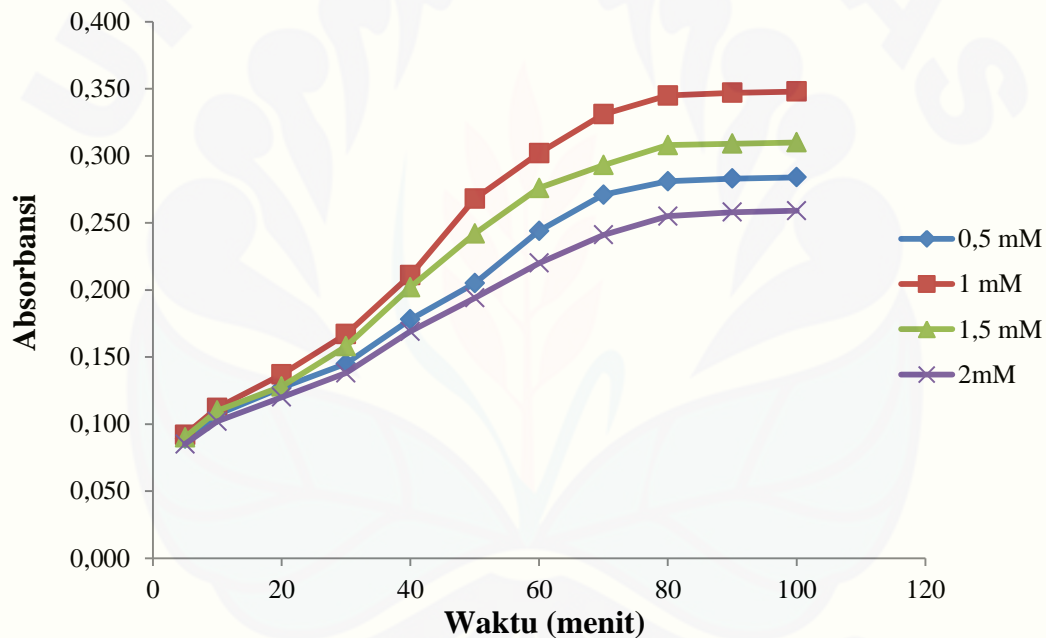
Panjang Gelombang (nm)	Nilai Absorbansi (A)
470	0,498
471	0,499
472	0,499
473	0,499
474	0,500
475	0,500
476	0,501
477	0,501
478	0,501
479	0,501
480	0,501
481	0,500
482	0,500
483	0,500
484	0,500
485	0,499
486	0,489
487	0,498

### LAMPIRAN G. Hasil Optimasi Waktu dan Konsentrasi Substrat L-Tirosin

a) Nilai absorbansi kompleks substrat dan enzim

Konsentrasi Substrat	Waktu Inkubasi (Menit)										
	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0,5mM	0,089	0,107	0,127	0,145	0,178	0,205	0,244	0,271	0,281	0,283	0,284
1 mM	0,092	0,112	0,137	0,167	0,211	0,268	0,302	0,331	0,345	0,347	0,348
1,5 mM	0,09	0,11	0,128	0,158	0,202	0,242	0,276	0,293	0,308	0,309	0,31
2 mM	0,085	0,102	0,12	0,138	0,169	0,194	0,22	0,241	0,255	0,258	0,259

b) Kurva waktu vs Nilai absorbansi kompleks substrat dan enzim



Berdasarkan kurva optimasi waktu dan konsentrasi substrat, waktu inkubasi yang terpilih adalah 80 menit. Konsentrasi substrat yang dipilih adalah 1 mM karena dalam waktu inkubasi yang sama dan konsentrasi enzim yang sama nilai absorbansi maksimum diperoleh dengan substrat 1mM.

**LAMPIRAN H : Nilai Persen Hambatan Tirosinase Standar Genistein**

## a. Kontrol Negatif

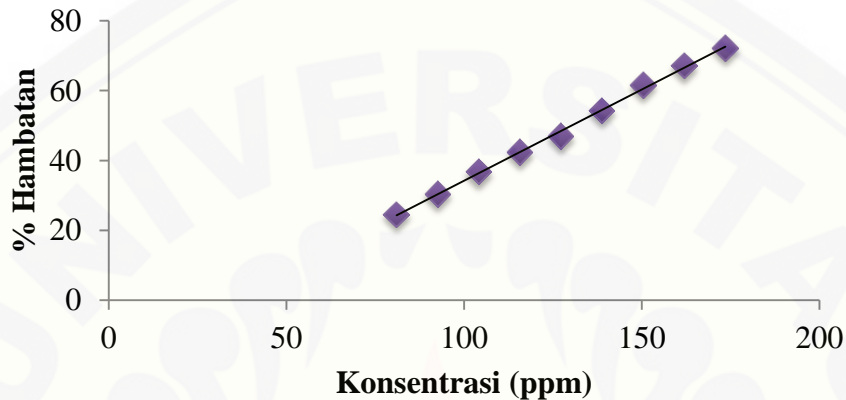
$Abs_k$	$Abs_{478}$	$A_{hit}$
0,05	0,393	0,343
0,05	0,401	0,351
0,05	0,393	0,343
Rata-Rata		0,346

## b. Standar Genistein

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	$Abs_k$	$Abs_{478}$	$A_{hit}$	% Hambatan Tirosinase	Rata-Rata
80,990	0,049	0,308	0,259	25,072	24,493
	0,047	0,309	0,262	24,204	
	0,047	0,309	0,262	24,204	
92,560	0,047	0,288	0,241	30,280	30,376
	0,049	0,289	0,240	30,569	
	0,047	0,288	0,241	30,280	
104,130	0,048	0,268	0,220	36,355	36,837
	0,050	0,267	0,217	37,223	
	0,050	0,268	0,218	36,933	
115,700	0,048	0,248	0,200	42,141	42,430
	0,048	0,247	0,199	42,430	
	0,050	0,248	0,198	42,719	
127,270	0,048	0,234	0,186	46,191	46,962
	0,051	0,233	0,182	47,348	
	0,050	0,232	0,182	47,348	
138,840	0,049	0,210	0,161	53,423	54,291
	0,052	0,208	0,156	54,870	
	0,050	0,207	0,157	54,581	
150,410	0,048	0,182	0,134	61,234	61,620
	0,050	0,184	0,134	61,234	
	0,050	0,180	0,130	62,392	
161,980	0,049	0,161	0,112	67,599	67,117
	0,048	0,163	0,115	66,731	
	0,050	0,164	0,114	67,020	
173,55	0,049	0,143	0,094	72,806	72,131
	0,049	0,146	0,097	71,938	
	0,050	0,147	0,098	71,649	

Keterangan ;  $Abs_k$  = Absorbansi plate kosong  
 $Abs_{478}$  = Absorbansi sampel/standar pada 478 nm  
 $A_{hit}$  =  $Abs_{478} - Abs_k$

c. Kurva % Inhibisi Standar Genistein



Grafik % hambatan genistein terhadap tirosinase

Berdasarkan grafik di atas diperoleh persamaan regresi  $y = 0,522x - 17,931$   
 Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh dari persamaan regresi linier adalah 130,136 ng/ $\mu$ L.

➤ **Contoh Perhitungan % Hambatan standar genistein**

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{(\text{abs kontrol negatif} - \text{abs genistein})}{\text{Abs kontrol negatif}} \times 100\%$$

$$\text{Abs kontrol negatif} = 0,346$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Hambatan} &= \frac{(0,346 - 0,259)}{0,346} \times 100\% \\ &= 25,072 \% \end{aligned}$$

➤ **Contoh Perhitungan 50% ( $IC_{50}$ ) Hambatan standar genistein**

$$50 = 0,522x - 17,931$$

$$X = 130,136 \text{ ng}/\mu\text{L}.$$



**LAMPIRAN I. Nilai Persen Hambatan Tirosinase Ekstrak****I.1 Perhitungan Sampel Sonikasi**

## Kontrol Negatif

<b>Abs<sub>k</sub></b>	<b>Abs<sub>478</sub></b>	<b>A<sub>hit</sub></b>
0,05	0,393	0,343
0,05	0,401	0,351
0,05	0,393	0,343
Rata-Rata		0,346

## Replikasi 1

<b>Konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Abs<sub>k</sub></b>	<b>Abs<sub>478</sub></b>	<b>A<sub>hit</sub></b>	<b>% Hambatan Tirosinase</b>	<b>IC<sub>50</sub> (ppm)</b>
45	0,048	0,292	0,244	29,480	
56,25	0,045	0,27	0,225	34,971	
67,5	0,050	0,250	0,200	42,197	
81,5	0,051	0,232	0,181	47,688	
97,8	0,049	0,210	0,161	53,468	91,966
112,5	0,053	0,195	0,142	58,960	
130,4	0,052	0,175	0,123	64,451	
162	0,050	0,135	0,085	75,343	

## Replikasi 2

<b>Konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Abs<sub>k</sub></b>	<b>Abs<sub>478</sub></b>	<b>A<sub>hit</sub></b>	<b>% Hambatan Tirosinase</b>	<b>IC<sub>50</sub> (ppm)</b>
44,6	0,048	0,291	0,243	29,769	
55,75	0,048	0,272	0,224	35,260	
66,9	0,049	0,252	0,203	41,329	
81	0,050	0,232	0,182	47,399	
97,2	0,052	0,216	0,164	52,601	91,505
111,5	0,050	0,191	0,141	59,249	
129,6	0,048	0,168	0,120	65,318	
163	0,049	0,133	0,084	75,723	

Replikasi 3

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Abs <sub>k</sub>	Abs <sub>478</sub>	A <sub>hit</sub>	% Hambatan Tirosinase	IC <sub>50</sub> (ppm)
44,2	0,047	0,295	0,248	28,324	
55,25	0,048	0,277	0,229	33,815	
66,3	0,049	0,258	0,209	39,595	
80,25	0,057	0,244	0,187	45,954	
96,3	0,051	0,218	0,167	51,734	94,915
110,5	0,048	0,197	0,149	56,936	
128,4	0,045	0,173	0,128	63,006	
161	0,051	0,140	0,089	74,277	

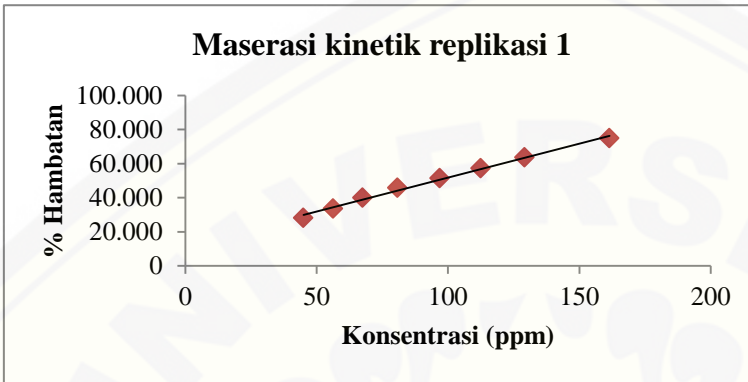
Keterangan ; Abs<sub>k</sub> = Absorbansi plate kosong

Abs<sub>478</sub> = Absorbansi sampel/standar pada 478 nm

A<sub>hit</sub> = Abs<sub>478</sub> - Abs<sub>k</sub>

**I.2 Perhitungan IC<sub>50</sub> Metode Maserasi Kinetik**

Konsentrasi (ppm)	45	56,25	67,5	80,75	96,9	112,5	129,2	161,5
% Hambatan	28,035	33,526	39,884	45,665	51,445	57,225	63,584	74,855

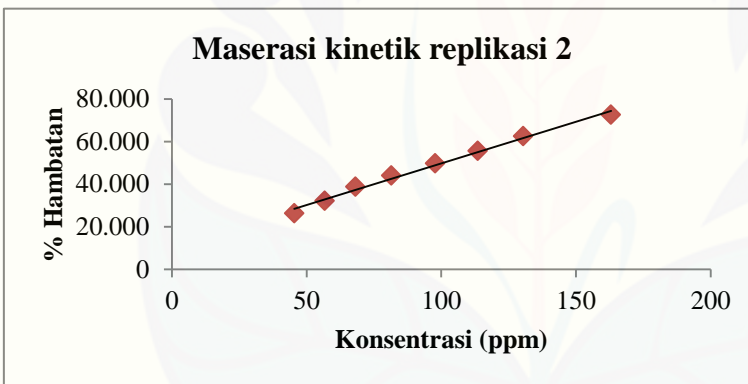


$$y = 0,398x + 12,004$$

$$R = 0,997$$

Nilai IC<sub>50</sub>  
 $50 = 0,398x + 12,004$   
 $X = 95,467 \text{ ppm}$

Konsentrasi (ppm)	45,4	56,75	68,1	81,5	97,8	113,5	130,4	163
% Hambatan	26,301	32,081	38,728	43,931	49,711	55,491	62,428	72,543

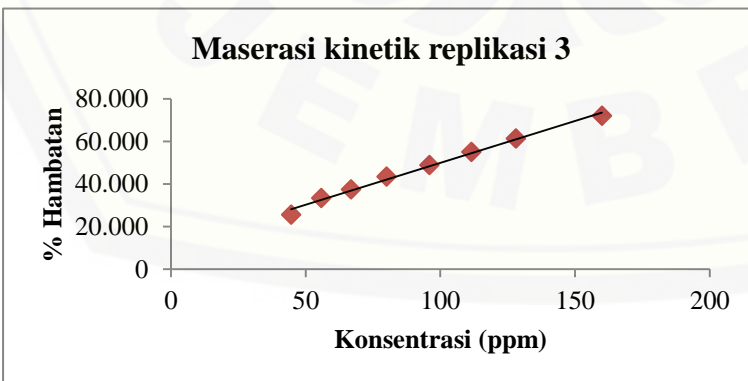


$$y = 0,390x + 10,775$$

$$R = 0,996$$

Nilai IC<sub>50</sub>  
 $50 = 0,390x + 10,775$   
 $X = 100,577 \text{ ppm}$

Konsentrasi (ppm)	44,6	55,75	66,9	80	96	111,5	128	160
% Hambatan	25,434	33,237	37,283	43,353	48,844	54,913	61,272	71,965



$$y = 0,393x + 10,567$$

$$R = 0,996$$

Nilai IC<sub>50</sub>  
 $50 = 0,393x + 10,567$   
 $X = 100,338 \text{ ppm}$

## I.3 Perhitungan Sampel Maserasi Kinetik

Replikasi 1

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Abs <sub>k</sub>	Abs <sub>478</sub>	A <sub>hit</sub>	% Hambatan Tirosinase	IC <sub>50</sub> (ppm)
45	0,045	0,294	0,249	28,035	95,467
56,25	0,047	0,277	0,23	33,526	
67,5	0,046	0,254	0,208	39,884	
80,75	0,048	0,236	0,188	45,665	
96,9	0,048	0,216	0,168	51,445	
112,5	0,049	0,197	0,148	57,225	
129,2	0,046	0,172	0,126	63,584	
161,5	0,049	0,136	0,087	74,885	

Replikasi 2

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Abs <sub>k</sub>	Abs <sub>478</sub>	A <sub>hit</sub>	% Hambatan Tirosinase	IC <sub>50</sub> (ppm)
45,4	0,047	0,302	0,255	26,301	100,577
56,75	0,049	0,284	0,235	32,081	
68,1	0,051	0,263	0,212	38,728	
81,5	0,048	0,242	0,194	43,931	
97,8	0,051	0,225	0,174	49,711	
113,5	0,052	0,206	0,154	55,491	
130,4	0,050	0,180	0,130	62,428	
163	0,048	0,143	0,095	72,965	

Replikasi 3

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Abs <sub>k</sub>	Abs <sub>478</sub>	A <sub>hit</sub>	% Hambatan Tirosinase	IC <sub>50</sub> (ppm)
44,6	0,047	0,305	0,258	25,434	100,338
55,75	0,047	0,278	0,231	33,327	
66,9	0,05	0,267	0,217	37,283	
80	0,05	0,246	0,196	43,353	
96	0,05	0,227	0,177	48,844	
111,5	0,05	0,206	0,156	54,913	
128	0,05	0,184	0,134	61,272	
160	0,05	0,147	0,097	71,965	

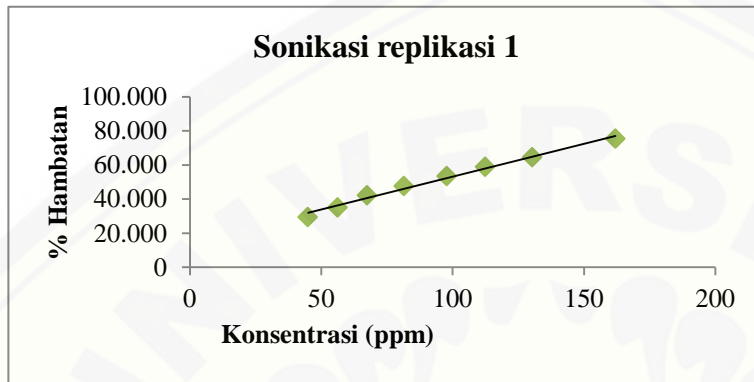
Keterangan ; Abs<sub>k</sub> = Absorbansi plate kosong

Abs<sub>478</sub> = Absorbansi sampel/standar pada 478 nm

A<sub>hit</sub> = Abs<sub>478</sub> - Abs<sub>k</sub>

**I.4 Perhitungan IC<sub>50</sub> Metode Sonikasi**

Konsentrasi (ppm)	45	56,25	67,5	81,5	97,8	112,5	130,4	162
% Hambatan	29,480	34,971	42,197	47,688	53,468	58,960	64,451	75,434

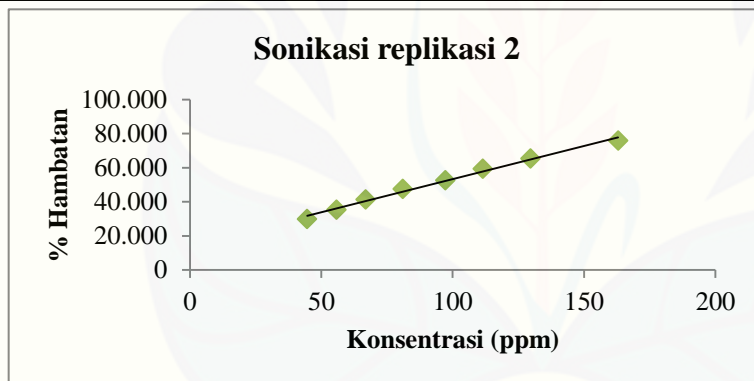


$$y = 0,386x + 14,501$$

$$R = 0,994$$

Nilai IC<sub>50</sub>  
 $50 = 0,386x + 14,501$   
 $X = 91,966 \text{ ppm}$

Konsentrasi (ppm)	44,6	55,75	66,9	81	97,2	111,5	129,6	163
% Hambatan	29,769	35,260	41,329	47,399	52,601	59,249	65,318	75,723

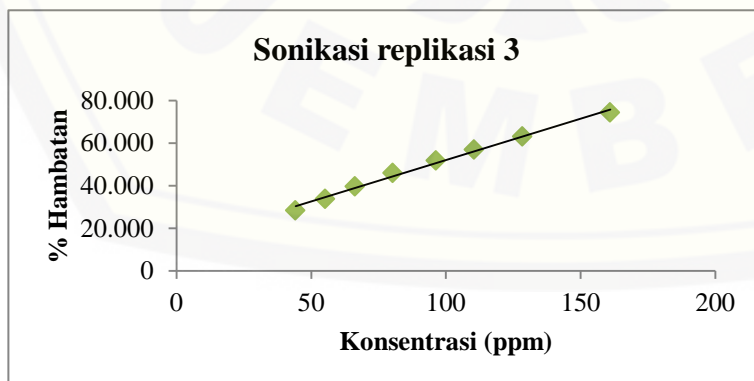


$$y = 0,388x + 14,496$$

$$R = 0,996$$

Nilai IC<sub>50</sub>  
 $50 = 0,388x + 14,496$   
 $X = 91,505 \text{ ppm}$

Konsentrasi (ppm)	44,2	55,25	66,3	80,25	96,3	110,5	128,4	161
% Hambatan	28,324	33,815	39,595	45,954	51,734	56,936	63,006	74,277



$$y = 0,389x + 13,078$$

$$R = 0,996$$

Nilai IC<sub>50</sub>  
 $50 = 0,389x + 13,078$   
 $X = 94,915 \text{ ppm}$



## I.5 Perhitungan Sampel Soxhletasi

## Replikasi 1

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Abs <sub>k</sub>	Abs <sub>478</sub>	A <sub>hit</sub>	% Hambatan Tirosinase	IC <sub>50</sub> (ppm)
44,8	0,049	0,271	0,222	35,838	75,524
56	0,049	0,249	0,200	42,197	
67,2	0,048	0,232	0,184	46,821	
81	0,047	0,214	0,167	51,734	
97,2	0,048	0,189	0,141	59,249	
112	0,048	0,159	0,111	67,919	
129,6	0,05	0,145	0,095	72,543	
163	0,049	0,111	0,062	82,081	

## Replikasi 2

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Abs <sub>k</sub>	Abs <sub>478</sub>	A <sub>hit</sub>	% Hambatan Tirosinase	IC <sub>50</sub> (ppm)
45	0,051	0,272	0,221	36,127	76,42
56,25	0,048	0,247	0,199	42,486	
67,5	0,049	0,239	0,190	45,087	
81,5	0,048	0,212	0,164	52,601	
97,8	0,047	0,188	0,141	59,249	
112,5	0,048	0,161	0,113	67,341	
130,4	0,049	0,147	0,098	71,676	
162	0,048	0,109	0,061	82,370	

## Replikasi 3

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Abs <sub>k</sub>	Abs <sub>478</sub>	A <sub>hit</sub>	% Hambatan Tirosinase	IC <sub>50</sub> (ppm)
44,2	0,045	0,272	0,227	34,393	79,392
55,25	0,048	0,253	0,205	40,751	
66,3	0,047	0,241	0,194	43,931	
80,5	0,047	0,218	0,171	50,578	
96,6	0,049	0,196	0,147	57,514	
110,5	0,049	0,169	0,120	65,318	
128,8	0,047	0,152	0,105	69,653	
160,5	0,049	0,110	0,061	82,370	

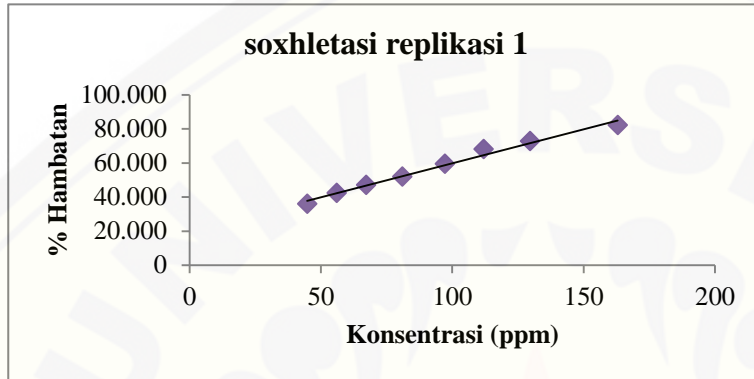
Keterangan ; Abs<sub>k</sub> = Absorbansi plate kosong

Abs<sub>478</sub> = Absorbansi sampel/standar pada 478 nm

A<sub>hit</sub> = Abs<sub>478</sub> - Abs<sub>k</sub>

**I.6 Perhitungan IC<sub>50</sub> Metode Soxhletasi**

Konsentrasi (ppm)	44,8	56	67,2	81	97,2	112	129,6	163
% Hambatan	35,838	42,197	46,821	51,734	59,249	67,919	72,543	82,081

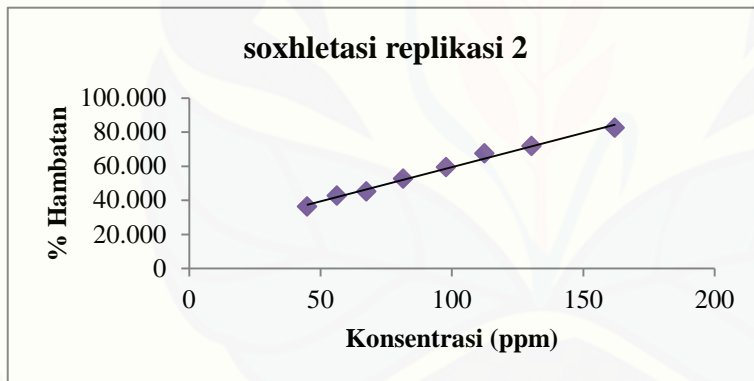


$$y = 0,399x + 19,866$$

$$R = 0,993$$

Nilai IC<sub>50</sub>  
 $50 = 0,399x + 19,866$   
 $X = 75,524 \text{ ppm}$

Konsentrasi (ppm)	45	56,25	67,5	81,5	97,8	112,5	130,4	162
% Hambatan	36,127	42,486	45,087	52,601	59,249	67,341	71,676	82,370

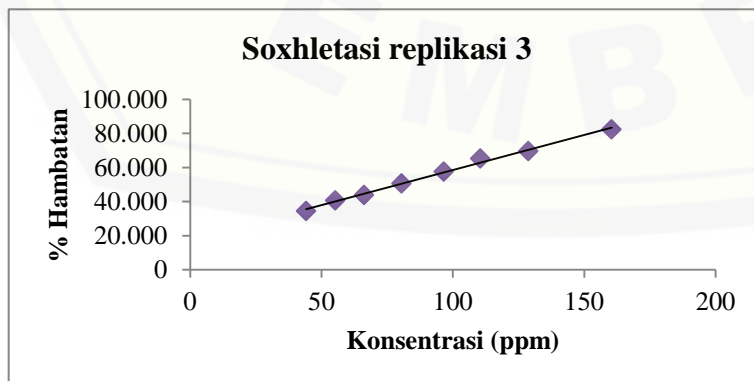


$$y = 0,400x + 19,432$$

$$R = 0,995$$

Nilai IC<sub>50</sub>  
 $50 = 0,400x + 19,432$   
 $X = 76,42 \text{ ppm}$

Konsentrasi (ppm)	44,2	55,25	66,3	80,5	96,6	110,5	128,8	160,5
% Hambatan	34,393	40,751	43,931	50,578	57,514	65,318	69,653	82,370



$$y = 0,411x + 17,370$$

$$R = 0,997$$

Nilai IC<sub>50</sub>  
 $50 = 0,411x + 17,370$   
 $X = 79,392 \text{ ppm}$

Metode	Replikasi	IC <sub>50</sub> (ng/μL)	Rata-rata (ng/μL)	SD	RSD (%)
Maserasi Kinetik	1	95,467	98,794	2,884	2,919
	2	100,577			
	3	100,338			
Sonikasi	1	91,966	92,795	1,850	1,994
	2	91,505			
	3	94,915			
Soxhletasi	1	75,524	77,112	2,025	2,626
	2	76,420			
	3	79,392			

➤ **Contoh Perhitungan % Hambatan ekstrak**

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{(\text{abs kontrol negatif} - \text{abs genistein})}{\text{Abs kontrol negatif}} \times 100\%$$

$$\text{Abs kontrol negatif} = 0,346$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Hambatan} &= \frac{(0,346 - 0,227)}{0,346} \times 100\% \\ &= 34,393 \% \end{aligned}$$

**LAMPIRAN J. Hasil Analisis Data****J.1 Hasil Analisis Data Kadar Genistein**

Tests of Normality			
Metode	Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.
Sonikasi	,832	3	,194
Kadar maserasi kinetik	,964	3	,637
Soxhletasi	,923	3	,463

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances				
Kadar	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	,715	2	6	,527

ANOVA					
Kadar Genistein	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,001	2	,001	3350,438	,000
Within Groups	,000	6	,000		
Total	,001	8			

\*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

Multiple Comparisons						
Kadar Genistein						
LSD						
(I) Metode	(J) Metode	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Sonikasi	maserasi kinetik	,0085667*	,0003367	,000	,007743	,009390
	Soxhletasi	-,0184000*	,0003367	,000	-,019224	-,017578
maserasi kinetik	Sonikasi	-,0085667*	,0003367	,000	-,009390	-,007743
	Soxhletasi	-,0269667*	,0003367	,000	-,027790	-,026143
Soxhletasi	Sonikasi	,0184000*	,0003367	,000	,017576	,019224
	maserasi kinetik	,0269667*	,0003367	,000	,026143	,027790

\*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

**J.2 Hasil Analisis Data Aktivitas Hambatan Tirosinase**

**Tests of Normality**

Metode	Shapiro-Wilk		Sig.	
	Statistic	df		
Hambatan	Sonikasi	,849	3	,239
	maserasi kinetik	,785	3	,079
	Soxhletasi	,912	3	,426

a. Lilliefors Significance Correction

**Test of Homogeneity of Variances**

Hambatan (IC<sub>50</sub>)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,861	2	6	,469

**ANOVA**

Hambatan (IC<sub>50</sub>)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	752,060	2	376,030	71,225	,000
Within Groups	31,677	6	5,279		
Total	783,737	8			

\*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

**Multiple Comparisons**

Hambatan  
LSD

(I) metode	(J) metode	Mean Difference (I-J)		Sig.	95% Confidence Interval	
			Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
Sonikasi	maserasi kinetik	-5,998667*	1,876069	,019	-10,58924	-1,40809
	Soxhletasi	15,683333*	1,876069	,000	11,09276	20,27391
maserasi kinetik	Sonikasi	5,998667*	1,876069	,019	1,40809	10,58924
	Soxhletasi	21,682000*	1,876069	,000	17,09143	26,27257
Soxhletasi	Sonikasi	-15,683333*	1,876069	,000	-20,27391	-11,09276
	maserasi kinetik	-21,682000*	1,876069	,000	-26,27257	-17,09143

\*. The mean difference is significant at the 0,05 level.



LAMPIRAN K. Gambar Alat dan Bahan Penelitian



Kedelai Edamame



Biji kedelai edamame



Rajangan kedelai edamame



Biji kedelai edamame  
diblender



Proses deffating biji  
edamame



Proses ekstraksi biji kedelai  
edamame metode  
ultrasonikasi



Proses ekstraksi metode soxhletasi



Proses ekstraksi metode maserasi kinetik



Proses pemekatan ekstrak cair edamame menggunakan rotavapour



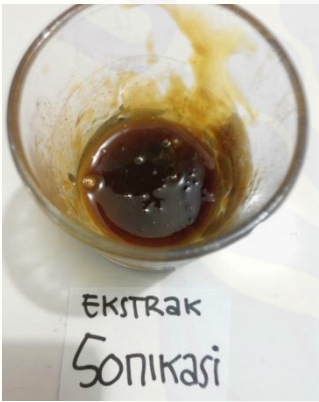
Timbangan digital analitik



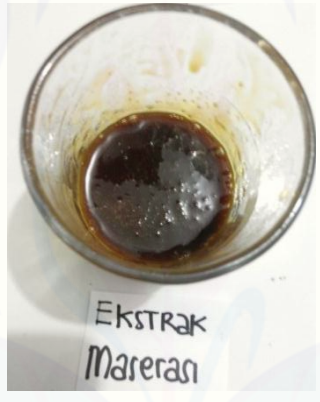
Alat-alat gelas



Mikropipet



Ekstrak edamame (metode sonikasi)

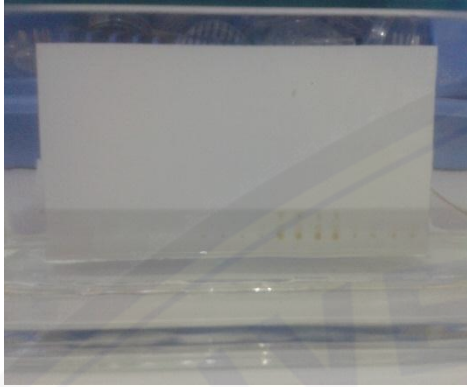


Ekstrak edamame (metode maserasi kinetik)



Ekstrak edamame (metode soxhletasi)





Proses eluasi penentuan kadar genistein dalam ekstrak edamame



Proses inkubasi substrat + enzim + ekstrak pada suhu 25°C



Analisis absorbansi sampel menggunakan ELISA reader



Hasil Inkubasi ekstrak, substrat, dan enzim dalam *multi-well plate reader*