



**PENGARUH FERMENTASI *Aspergillus oryzae* TERHADAP
KADAR GENISTEIN DAN AKTIVITAS PENGHAMBATAN
TIROSINASE KEDELAI (*Glycine max*) *IN VITRO***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan program strata satu pada Fakultas Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh :

**Estika Yunindarwati
NIM 112210101001**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW;
2. Orang tua tercinta, Ibu Supadmi, A.Ma.Pd dan Bapak Sudarto, S.Sos, yang tiada hentinya selalu memberikan doa, kasih sayang, pengorbanan, dorongan, nasihat yang tidak bisa terhitung dan senantiasa mengiringi setiap langkah demi kebahagiaan, keberhasilan dan kesuksesan saya serta ajaran tentang arti hidup dan perjuangan untuk menjadi seseorang yang lebih baik;
3. Kakak tercinta Dariska Kukuh Wahyudianto, S.T yang juga selalu memberikan nasihat, motivasi, dukungan dan bantuan selama ini;
4. Para pengajar sejak Taman Kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi yang terhormat, yang telah memberikan ilmunya dan membimbing saya dengan penuh ketulusan;
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

Sesungguhnya bersama kesulitan pasti ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai dari suatu urusan, kerjakanlah dengan sungguh-sungguh urusan yang lain. Dan hanya kepada Tuhanmulah kamu berharap.

(QS. Al-insyirah: 6-8)

Positive, Persistence, Pray

(Muhammad Assad, Notes from Qatar)

Filosofi padi, semakin berisi maka padi akan semakin merunduk , semakin kita merasa bisa maka kita harus bisa semakin merasa

(Tere Liye, Pukat)

A pessimist sees the difficulty in every opportunity, an optimist sees the opportunity in every difficulty

(Winston S. Churchill)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Estika Yunindarwati

NIM : 112210101001

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Penghambatan Tirosinase Kedelai (*Glycine max*) *In vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 26 Mei 2015

Yang menyatakan,

Estika Yunindarwati

NIM 112210101001

SKRIPSI

**PENGARUH FERMENTASI *Aspergillus oryzae* TERHADAP KADAR
GENISTEIN DAN AKTIVITAS PENGHAMBATAN TIROSINASE KEDELAI
(*Glycine max*) *IN VITRO***

Oleh

Estika Yunindarwati

112210101001

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Endah Puspitasari S. Farm., M.Sc., Apt

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Penghambatan Tirosinase Kedelai (*Glycine max*) *In vitro*” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Kamis, 25 Juni 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

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

Endah Puspitasari S. Farm., M.Sc., Apt
NIP 198107232006042002

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

Ayik Rosita P., S.Farm.,M.Farm., Apt
NIP 198102012006042001

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

Mengesahkan,

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

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Penghambatan Tirosinase Kedelai (*Glycine max*) *In vitro*: Estika Yunindarwati, 112210101001; 2015, 53 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kaum wanita sebagian besar menginginkan kulit cerah, putih, terlihat cantik serta berpenampilan menarik, khususnya kaum wanita di Asia yang memiliki barometer kecantikan yaitu berkulit putih. Saat ini berbagai produk kosmetik terutama produk pemutih kulit banyak dipasarkan. Salah satu mekanisme bahan pemutih kulit adalah menghambat kerja tirosinase. Tirosinase merupakan enzim yang berperan penting dalam biosintesis melanin, pigmen warna pada kulit. Proses pembentukan melanin dapat direduksi ketika tirosinase dihambat, sehingga menyebabkan kulit tampak lebih cerah.

Kedelai (*Glycine max*), suku Fabaceae, merupakan tanaman kacang-kacangan yang banyak mengandung senyawa isoflavon. Isoflavon merupakan salah satu senyawa golongan flavonoid yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase. Isoflavon memiliki bentuk aglikon, glikosida, malonil glikosida dan asetil glikosida. Aktivitas hambatan tirosinase isoflavon aglikon (genistein, daidzein dan glisitein) lebih besar daripada isoflavon glikosida (genistin, daidzin dan glisitin).

Salah satu usaha untuk mendapatkan senyawa isoflavon aglikon yang lebih besar adalah dengan cara fermentasi. Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh fermentasi kedelai menggunakan *Aspergillus oryzae* terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase.

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah preparasi sampel yang terdiri dari kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-1,2,3, dan 4. Kemudian

dilakukan pengukuran kadar genistein menggunakan metode KLT-densitometri dan aktivitas hambatan tirosinase menggunakan spektrofotometri.

Hasil penetapan kadar genistein menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar genistein selama proses fermentasi. Kadar genistein ekstrak kedelai meningkat 6,98; 17,89; 27,91; dan 1,15 kali selama fermentasi hari ke- 1, 2, 3, dan 4 dibandingkan kadar genistein ekstrak kedelai non-fermentasi.

Hasil uji aktivitas hambatan tirosinase menunjukkan terjadi peningkatan aktivitas yang ditandai dengan menurunnya nilai IC_{50} pada kedelai terfermentasi hari ke-1, 2 dan 3. Nilai IC_{50} ekstrak kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-1,2,3, dan 4 secara berurutan sebesar $292 \pm 8,464$; $287,76 \pm 5,834$; $239,36 \pm 9,681$; $180,153 \pm 2,846$; dan $288,81 \pm 8,69$ $\mu\text{g/ml}$. Nilai penghambatan tirosinase tertinggi dengan nilai IC_{50} terendah dihasilkan oleh ekstrak kedelai terfermentasi hari ke-3. Jika dibandingkan dengan nilai IC_{50} genistein sebagai kontrol positif, aktivitas penghambatan tirosinase dari masing-masing ekstrak lebih rendah. Nilai IC_{50} genistein sebesar $130,31$ $\mu\text{g/ml}$.

Hasil analisis statistik uji one-way annova uji post-hoc LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase pada sampel kedelai fermentasi hari ke-2 dan ke-3 daripada non-fermentasi yang ditunjukkan dengan nilai $p < 0,05$. Dapat disimpulkan bahwa fermentasi menggunakan *A. oryzae* dapat meningkatkan kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase kedelai (*Glycine max*).

PRAKATA

Bismillahirrohmanirohim

Puji syukur ke hadirat ALLAH SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Penghambatan Tirosinase Kedelai (*Glycine max*) *In vitro*”. Sholawat dan salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya.

Dengan terselesaikannya skripsi ini, penulis menyadari dan mengakui bahwa upaya, doa, arahan, bimbingan dan dukungan dari keluarga maupun dosen pembimbing serta pihak-pihak lainnya sangat membantu dalam terselesaikannya skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini, dengan sepenuh hati penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada terhormat:

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Lestyo Wulandari S.Si., Apt., M.Farm atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
2. Ibu Evi Umayah Ulfa S.Si., M.Si., Apt selaku dosen pembimbing utama dan Ibu Endah Puspitasari S.Farm., M.Sc., Apt selaku dosen pembimbing anggota serta Bapak Moch. Amrun Hidayat S.Si., Apt., M.Farm yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam membantu dan membimbing penulis hingga akhir penyusunan skripsi ini;
3. Ibu Ayik Rosita Puspaningtyas, S.Farm., M.Farm., Apt dan Ibu Budipratiwi Wisudyaningih, S.Farm., M.Farm., Apt yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan dalam skripsi ini;
4. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;

5. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan memperluas ilmu pengetahuan serta wawasan penulis selama menempuh masa kuliah;
6. Pimpinan dan para karyawan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas bantuannya selama penulis belajar di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
7. Kedua orangtua tercinta, Bapak Sudarto, S.Sos dan Ibu Supadmi, A.Ma.Pd , yang tak pernah lelah memberikan doa, dukungan, motivasi, kasih sayang dan pengorbanan yang tiada padam selama ini;
8. Kakak tersayang, Dariska Kukuh Wahyudianto, S.T, terimakasih atas kasih sayang, dukungan, doa dan semangat yang tiada henti diberikan dalam menyelesaikan skripsi ini;
9. Rekan kerja dan Sahabat seperjuangan Risti, Pipit, Ichlasul, Prisma, Puspita, Meyladia, Ratih, Lintang, Alifia, dan Ika yang telah memberikan semangat, kebersamaan, kekompakan, dan bantuan selama ini;
10. Ekwan Riski Pramono, A.Md atas semangat, dukungan, motivasi, bantuan dan kebersamaannya selama ini;
11. Penghuni kos kalem tua tercinta Melda, Rizki, Rachel, Eka, Akita, Icha, Fia, Afifah, Mbak Wanda, Mbak Devi, Iik, Ayuk, Reni, Yuli, Yogi, Emi, Hilma, Memey, Tery, Iva atas kebersamaan dan dukungannya;
12. Bu Widi, Mbak Anggra, Mbak Dini, dan Mbak Indri selaku teknisi laboratorium Biologi dan Farmasi Klinik atas bantuannya;
13. Sahabat-sahabat nge-lab di Laboratorium Biologi Fitria, Elisa, Okta, Lili, Iik, Zuhro, Liza, Liyas, Lintang, Defitri, dan Risti atas kebersamaan, bantuan dan kekompakan kalian selama pengerjaan penelitian ini;
14. Sahabat dan keluarga angkatan 2011 “ASMEF” PASTI BISA!
15. Serta semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas bantuan dan perhatiannya baik langsung maupun tidak langsung dalam menyelesaikan skripsi ini;

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Mei 2015

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	01
1.1 Latar Belakang	01
1.2 Rumusan Masalah	04
1.3 Tujuan Penelitian	04
1.4 Manfaat Penelitian	04
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	05
2.1 Tinjauan tentang Kedelai	05
2.1.1 Uraian Tumbuhan	05
2.1.2 Klasifikasi Tanaman Kedelai.....	05
2.1.3 Morfologi Tumbuhan.....	06
2.1.4 Kandungan Kimia Kedelai	07
2.1.5 Aktivitas Farmakologi yang Sudah Diteliti	07
2.2 Tinjauan tentang Fermentasi	08
2.3 Kapang	10

2.4 Tinjauan tentang <i>Aspergillus oryzae</i>	11
2.5 Tinjauan tentang Isoflavon	12
2.6 Tinjauan tentang Biosintesis Isoflavon	13
2.7 Pengaruh Fermentasi terhadap Profil Isoflavon.....	14
2.8 Tinjauan tentang Genistein	16
2.9 Tinjauan tentang Enzim Tirosinase	17
2.10 Tinjauan tentang Penghambatan Tirosinase.....	17
2.11 Tinjauan tentang Mekanisme Melanogenesis.....	19
BAB 3. METODE PENELITIAN	22
3.1 Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.1.1 Jenis Penelitian	22
3.1.2 Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.2 Variabel Penelitian	22
3.2.1 Variabel Bebas	22
3.2.2 Variabel Terikat.....	22
3.2.3 Variabel Terkendali	22
3.3 Rancangan Penelitian	23
3.3.1 Rancangan Operasional	23
3.3.2 Definisi Operasional	24
3.4 Alat dan Bahan	24
3.4.1 Bahan	24
3.4.2 Alat	24
3.5 Prosedur Penelitian	25
3.5.1 Preparasi Kedelai Non-Fermentasi	25
3.5.2 Peremajaan Isolat <i>A. oryzae</i>	25
3.5.3 Pembuatan Suspensi Spora <i>A. oryzae</i>	25
3.5.4 Perhitungan Kepadatan Spora.....	26
3.5.5 Preparasi Kedelai Fermentasi <i>A. oryzae</i>	28
3.5.6 Proses Penghilangan Lemak (<i>defatting</i>)	29

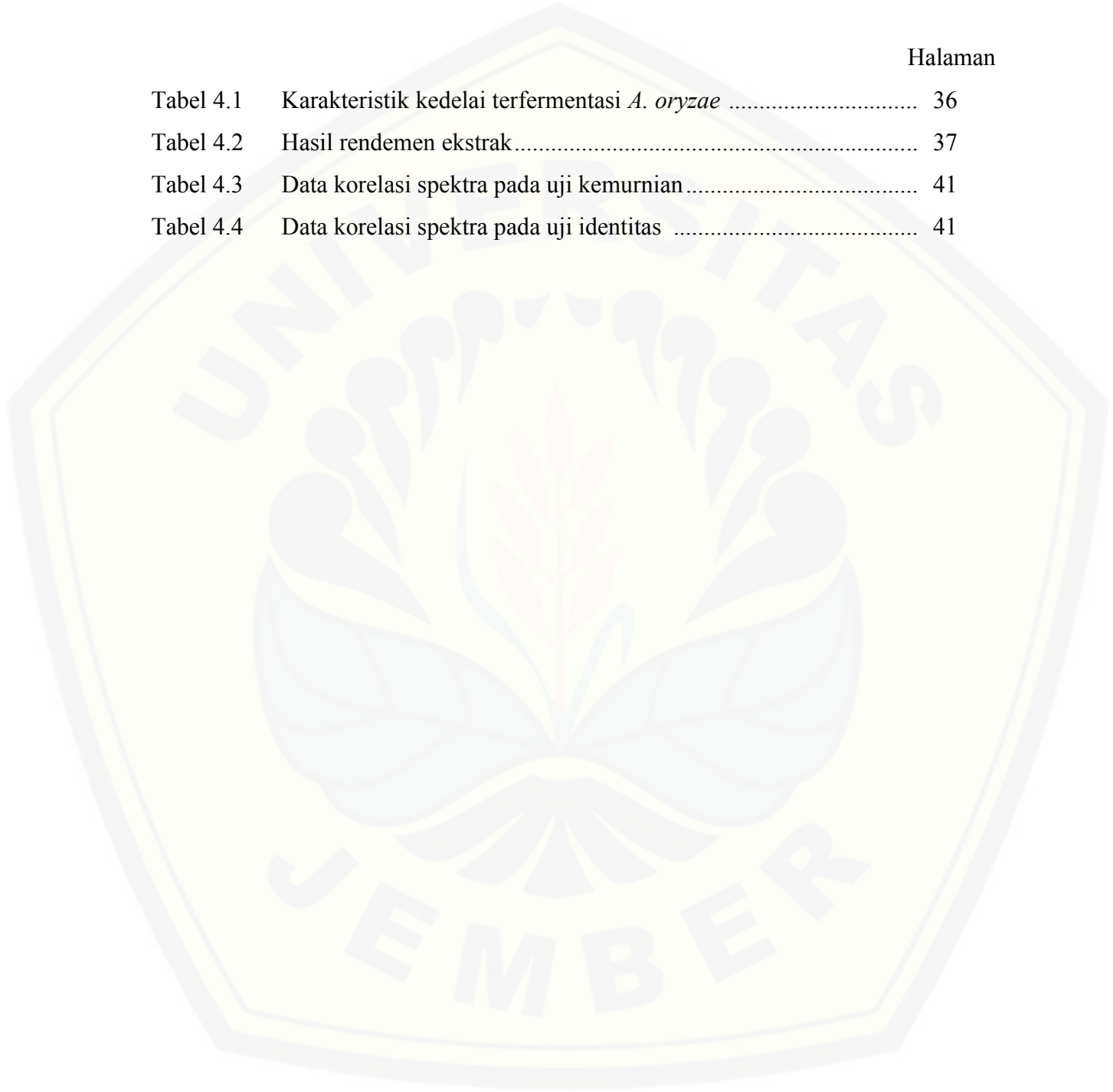
3.5.7	Pembuatan Ekstrak Kedelai	29
3.5.8	Penetapan Kadar Genistein	29
3.5.9	Uji Aktivitas Penghambatan Tirosinase	30
3.6	Analisis Data	23
3.7	Skema Penelitian	34
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1	Karakterisasi Kedelai Terfermentasi <i>Aspergillus oryzae</i>	36
4.2	Hasil Rendemen Ekstrak	36
4.3	Hasil Penetapan Kadar Genistein	36
4.4	Hasil Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase	44
BAB V.	PENUTUP	46
5.1	Kesimpulan	46
5.2	Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	54

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman Kedelai (<i>Glycine max</i>)	06
Gambar 2.2 <i>Aspergillus oryzae</i>	12
Gambar 2.3 Biosintesis isoflavon	15
Gambar 2.4 Biotransformasi genistin menjadi genistein	16
Gambar 2.5 Struktur molekul genistein.....	16
Gambar 2.6 Mekanisme melanogenesis	20
Gambar 3.1 Rancangan penelitian	23
Gambar 3.2 Kamar hitung hemositometer <i>Improved Neubaueur</i>	27
Gambar 3.3 Cara perhitungan spora	27
Gambar 3.4 Skema pembuatan ekstrak	34
Gambar 3.5 Skema penetapan kadar genistein dan uji aktivitas hambatan tirosinase	35
Gambar 4.1 Karakteristik kedelai fermentasi <i>A. oryzae</i>	37
Gambar 4.2 Hasil KLT ekstrak non-fermentasi dan fermentasi hari ke-4	38
Gambar 4.3 Hasil KLT ekstrak terfermentasi hari ke-1,2, dan 3	39
Gambar 4.4 Spektra standar dan sampel pada uji kemurnian dan identitas	40
Gambar 4.5 Kadar genistein pada masing-masing sampel	43
Gambar 4.6 Data nilai IC ₅₀ aktivitas hambatan tirosinase	46
Gambar 4.7 Korelasi antara kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase	47
Gambar 4.8 Perbandingan antara kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Karakteristik kedelai terfermentasi <i>A. oryzae</i>	36
Tabel 4.2 Hasil rendemen ekstrak.....	37
Tabel 4.3 Data korelasi spektra pada uji kemurnian.....	41
Tabel 4.4 Data korelasi spektra pada uji identitas	41



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan	54
1. Perhitungan kepadatan suspensi spora <i>A.oryzae</i>	54
2. Pengenceran suspensi spora <i>A.oryzae</i>	54
3. Perhitungan rendemen ekstrak	54
4. Pembuatan larutan baku	56
5. Pembuatan larutan sampel	57
6. Pembuatan fase gerak	59
7. Penetapan kadar	59
8. Pembuatan larutan dapar fosfat pH 6,5	69
9. Pembuatan larutan substrat L-tirosin 1 mM	70
10. Pembuatan standar genistein uji aktivitas hambatan tirosinase	70
11. Pembuatan larutan sampel uji aktivitas hambatan tirosinase	71
B. Data hasil penelitian aktivitas hambatan tirosinase	73
C. Analisis data	88
D. Gambar hasil penelitian	92
E. Surat keterangan identifikasi <i>A. oryzae</i>	93
F. Sertifikat kedelai baluran	94

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kaum wanita sebagian besar menginginkan kulit cerah, putih, terlihat cantik serta berpenampilan menarik. Khususnya kaum wanita di Asia memiliki barometer kecantikan yaitu memiliki kulit putih dan bersinar (Widyaningsih, 2012). Saat ini berbagai produk kosmetik ditawarkan produsen kepada konsumen terutama wanita. Hal inilah yang menjadi alasan konsumen menggunakan produk pemutih kulit. Produk pemutih kulit adalah sediaan kosmetika yang sangat populer dan banyak diminati bagi kaum wanita, baik remaja maupun dewasa (BPOM, 2007). Produk ini mengandung bahan aktif yang dapat mengurangi produksi melanin, yang merupakan pigmen warna kulit (Smit *et al.*, 2009).

Melanin dibentuk oleh sel melanosit yang terletak di bagian stratum basal pada lapisan epidermis kulit. Mekanisme produksi melanin diawali dengan adanya proses oksidasi asam amino tirosin dengan melibatkan tirosinase. Tirosinase merupakan enzim yang berperan penting dalam biosintesis melanin. Tirosinase akan mengubah tirosin menjadi L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), kemudian L-DOPA akan berubah menjadi dopakuinon, selanjutnya dopakuinon dikonversi melalui beberapa tahap transformasi menjadi melanin (Chang, 2009). Produksi melanin berlebih dapat menyebabkan hiperpigmentasi, sehingga kulit tampak menjadi lebih coklat.

Proses pembentukan melanin pada tubuh manusia dapat direduksi dengan cara yang beragam misalnya menggunakan bahan pemutih topikal, pengelupasan kimiawi, mikrodermabrasi dan terapi laser (Bandem, 2013). Mekanisme kerja bahan pemutih kulit topikal adalah menghambat aktivitas tirosinase, mengganggu transfer melanosom, meningkatkan pergantian lapisan epidermis, dan menghambat proses transkripsi dan translasi enzim melanogenik (Ebanks *et al.*, 2012). Penghambatan

tirosinase merupakan salah satu mekanisme depigmentasi yang sering digunakan, karena tirosinase bersifat spesifik hanya diproduksi oleh sel melanosit (Chang, 2012a).

Bahan pemutih kulit dengan mekanisme penghambatan tirosinase yang telah beredar di pasaran yaitu asam askorbat, asam kojat dan hidrokinon. Namun, dari beberapa senyawa tersebut memiliki kekurangan (Chan *et al.*, 2014). Contohnya asam askorbat mudah terdegradasi dan sensitif terhadap panas (Oyetade *et al.*, 2012); asam kojat dapat menyebabkan reaksi dermatitis kontak (Nakagawa dan Kawai, 1995) dan berpotensi karsinogenik (Takizawa *et al.*, 2003); serta hidrokinon dapat menyebabkan efek samping berupa iritasi kulit, reaksi dermatitis kontak, eritema, rasa terbakar, perubahan warna kuku, dan gangguan pigmentasi yang ireversibel (BPOM, 2007).

Salah satu senyawa alam yang memiliki aktivitas sebagai penghambatan tirosinase adalah senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid digolongkan menjadi beberapa kelompok, salah satunya adalah senyawa isoflavon. Senyawa isoflavon banyak terdapat pada tanaman kacang-kacangan seperti kedelai (Chang *et al.*, 2009). Kedelai memiliki kandungan total isoflavon sebesar 1,2-4,2 mg/g sampel kering (Rostagno *et al.*, 2004).

Bentuk isoflavon pada biji kedelai berupa bentuk aglikon dan glikosida. Isoflavon mayor dalam bentuk glikosida berupa genistin dan daidzin (Teekachunhatean *et al.*, 2013). Senyawa isoflavon glikosida tersebut dapat mengalami deglikosilasi menjadi isoflavon aglikon berupa genistein dan daidzein (Huynh *et al.*, 2014). Isoflavon aglikon memiliki aktivitas penghambatan tirosinase yang lebih baik daripada senyawa isoflavon glikosida (Chang *et al.*, 2005).

Salah satu usaha untuk mendapatkan isoflavon aglikon yang lebih besar adalah dengan cara fermentasi (Lee *et al.*, 2006). Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Fermentasi bisa dilakukan oleh bakteri, khamir, dan kapang (Suprihatin, 2010). Salah satu kapang yang telah digunakan secara luas untuk fermentasi adalah *Aspergillus oryzae*. *A. oryzae* dikenal sebagai kapang yang banyak

menghasilkan bermacam-macam enzim, di antaranya α -amilase, α -galaktosidase, glutaminase, proteinase, dan β -glukosidase (Barbesgaard *et al.*, 1992). β -glukosidase merupakan enzim yang mampu mengubah isoflavon glikosida menjadi aglikon melalui mekanisme deglikosilasi, sehingga dapat meningkatkan kadar isoflavon aglikon (Huynh *et al.*, 2014).

Punjaisee (2011) melaporkan bahwa β -glukosidase yang dihasilkan oleh *A. oryzae* BCC 3088 pada kedelai yang difermentasi suhu 30 °C selama 4 hari menunjukkan adanya penurunan 2,4 kali jumlah total senyawa glikosida, dan peningkatan 2 kali total senyawa aglikon. Penelitian lain juga menunjukkan terjadinya peningkatan jumlah isoflavon aglikon sebesar 10 kali lebih besar pada kedelai yang difermentasi dengan *A. oryzae* CTT 4359 dengan waktu inkubasi selama 2 hari (Silva *et al.*, 2011). Lee *et al.* (2013) juga menunjukkan bahwa terjadi peningkatan isoflavon aglikon dari kedelai yang difermentasi oleh *A. oryzae* KACC 40247.

Berdasarkan latar belakang tersebut, kedelai yang difermentasi akan memiliki kandungan isoflavon aglikon yang lebih besar, sehingga dapat berpotensi memiliki aktivitas penghambatan tirosinase yang besar pula. Bahan yang dapat menghambat tirosinase dapat digunakan sebagai bahan pemutih kulit alami. Hal inilah yang mendorong peneliti untuk mengetahui aktivitas penghambatan tirosinase *in vitro* kedelai sebelum dan sesudah difermentasi oleh *A. oryzae*. Pengukuran kadar isoflavon aglikon juga dilakukan, salah satunya dengan mengukur isoflavon aglikon berupa genistein, karena genistein merupakan isoflavon aglikon yang paling tinggi di dalam kedelai (Mujic, 2011; Genovese, 2006).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah, maka perumusan masalah yang didapat dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimanakah pengaruh fermentasi kedelai dengan *A. oryzae* terhadap kadar genistein?
2. Bagaimanakah pengaruh fermentasi kedelai dengan *A. oryzae* terhadap aktivitas penghambatan tirosinase?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui kadar genistein kedelai yang difermentasi dengan *A. oryzae*
2. Mengetahui aktivitas penghambatan tirosinase kedelai yang difermentasi dengan *A. oryzae*

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang didapatkan dari penelitian ini antara lain sebagai berikut:

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai aktivitas kedelai yang difermentasi oleh *A. oryzae* memiliki potensi dalam penghambatan tirosinase.
2. Uji aktivitas biologi yang dilakukan diharapkan dapat dimanfaatkan untuk pengembangan agen pemutih kulit alami.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Kedelai

2.1.1 Uraian Tumbuhan

Kedelai merupakan tanaman semak, yang tumbuh tegak dan merupakan tanaman semusim. Kedelai berasal dari daerah Manshukuo (Cina bagian utara). Tanaman kedelai kemudian menyebar ke daerah Mansyuria, Jepang (Asia Timur) dan negara-negara lain di Amerika dan Afrika. Di Indonesia, tanaman ini dibudidayakan mulai abad ke-17 sampai sekarang (Purwono, 2008).

2.1.2 Klasifikasi Tanaman Kedelai

Klasifikasi tanaman kedelai adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivisi	: Embriophyta
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Superordo	: Rosanae
Orde	: Fabales
Family	: Fabaceae
Genus	: <i>Glycine</i> Wild.
Spesies	: <i>Glycine max</i> (L.) Merr. (USDA, 2003).

2.1.3 Morfologi Tumbuhan

Kedelai merupakan tanaman semusim dengan tinggi berkisar 10 – 200 cm, berupa semak rendah, tegak, berdaun lebat dan dapat bercabang sedikit atau banyak tergantung kultivar. Batang kedelai berbentuk bulat, warna hijau kekuningan, memiliki buku, buku yang dihasilkan menghasilkan buah disebut buku subur. Pada buku tanaman tersebut biasanya akan muncul cabang. Daun kedelai berbentuk bulat (oval) dan *lanceolate* serta berbulu dan daunnya beranak tiga helai daun. Terdapat tiga tipe daun yang berbeda pada kedelai, yakni kotiledon atau daun biji, daun primer sederhana, dan daun bertiga. Daun primer sederhana berupa daun tunggal (unifoliat) dan bertangkai sepanjang 1 – 2 cm, terletak berseberangan pada buku pertama di atas kotiledon (Purwono, 2008).

Kedelai memiliki bunga bergerombol terdiri dari 3-15 bunga yang muncul diketiak daun. Karakteristik bunganya seperti Papilionaceae lainnya, yaitu mahkota bunga (*corolla*) terdiri atas 5 petal, warna petal ungu atau putih dan mempunyai 10 benang sari (*stamen*), 9 *stamen* berkembang mengelilingi putik, sedangkan stamen yang kesepuluh terpisah bebas. Polongnya berwarna hijau saat masih muda dan akan berubah warna menjadi kuning kecoklatan saat masak (Gambar 2.1a). Biji berbentuk bulat atau bulat telur, namun sebagian besar berbentuk bulat telur (Gambar 2.1b) (Purwono, 2008).



a



b

Gambar 2.1 a. Tanaman kedelai b. Biji kedelai (Dinas Pertanian Tanaman Pangan Provinsi Kalimantan Timur, 2012).

2.1.4 Kandungan Kimia Kedelai

Kandungan kimia *Glycine max* L. Merr adalah protein sebesar 35 – 40 % dari berat kedelai kering, 19 % minyak terdiri dari trigliserida, 35 % karbohidrat, 0,0031 % vitamin E, 5 % mineral seperti K, P, Ca, Mg dan Fe, isoflavon dengan jumlah hingga 3 mg/g berat kedelai kering. Isoflavon yang terdapat dalam kedelai terdiri dari isoflavon aglikon seperti genistein, daidzein dan glisitein; isoflavon glikosida seperti genistin, daidzin dan glisitin; malonil glikosida dan asetil glikosida. Kedelai juga memiliki kandungan fitosterol berupa β -sitosterol (53 – 56 %), campesterol (20 – 23 %), dan stigmasterol (17 – 21 %), 1–3 % fosfolipid yang terdiri dari 35 % fosfatidil kolin, 25 % fosfatidil etanolamin, 15 % fosfatidil inositol dan 5-10 % asam fosfatidat, 2 % saponin berupa oleonan tipe glikosida triterpen, dan ferritin (Dixit *et al.*,2011).

2.1.5 Aktivitas Farmakologi yang Sudah Diteliti

Isoflavon kedelai yakni genistein telah diteliti dapat mengurangi resiko terjadinya kanker prostat dengan cara mengurangi pertumbuhan sel tumor. Penelitian *in vitro* terhadap pertumbuhan sel LNCaP, menunjukkan bahwa isoflavon genistein memiliki IC₅₀ sebesar 40 μ M (Onozawa *et al.*, 1998). Ekstrak metanol kedelai telah diuji aktivitas antiinflamasi dengan menggunakan metode *in vitro* melalui penghambatan enzim COX-2 dalam produksi prostaglandin. Persen inhibisi yang dihasilkan yaitu sebesar 92,17 % dalam 20 μ g/ml ekstrak (Zia *et al.*, 2003). Penelitian juga telah dilakukan Chae dan Ha (2011) bahwa ekstrak etanol kedelai berfermentasi dan non-fermentasi memiliki aktivitas antioksidan dan pemutih kulit. Uji antioksidan dilakukan dengan metode uji DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrasil), aktivitas radikal superoksida dan hidroksil, penghambatan asam linoleat, dan penghambatan tirosinase. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dan pemutih kulit pada kedelai terfermentasi lebih tinggi daripada non-fermentasi. Selain itu, isoflavon aglikon kedelai juga memiliki efek aterosklerosis yakni dapat

mengoksidasi LDL melalui aktivitas antioksidan dari isoflavon. Uji ini dilakukan pada kelinci yang diberi ekstrak kedelai kaya aglikon (Yamakoshi *et al.*, 2000).

Ekstrak etanol kedelai yang difermentasi dengan *Bacillus subtilis* memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada kedelai difermentasi oleh LAB (*Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, dan *L. casei*). Aktivitas antioksidan kedelai berfermentasi meningkat daripada non-fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan kedelai berfermentasi *Bacillus subtilis* memiliki penghambatan terhadap radikal bebas dengan metode DPPH sebesar 66,91 % (Chonkeeree, 2013). Senyawa 7,8,4'-trihidroksi isoflavon dan 7,3',4'-trihidroksi isoflavon memiliki aktivitas penghambatan tirosinase dengan IC_{50} sebesar $11,21 \pm 0,8$ μ M dan $5,23 \pm 0,6$ μ M. Kedua senyawa ini merupakan senyawa turunan isoflavon dengan gugus hidroksil pada cincin aromatis. Senyawa tersebut diisolasi dari kedelai Korea yang difermentasi (*Doenjang*) (Park *et al.*, 2010). Chang *et al.* (2005) telah mengisolasi senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan tirosinase dari kedelai koji yang difermentasi dengan *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. Urutan aktivitas penghambatan tirosinase dari yang besar hingga rendah adalah senyawa 6,7,4'-trihidroksiisoflavon, daidzein, genistein dan glisitein, dengan nilai IC_{50} secara berurutan sebesar 0,009; 0,237; 0,262; dan 0,822 mM. Namun, belum pernah dilakukan penelitian uji aktivitas hambatan tirosinase dari kedelai Baluran yang difermentasi oleh kapang *Aspergillus oryzae*.

2.2 Tinjauan tentang Fermentasi

Definisi fermentasi yakni suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Suprihatin, 2010). Menurut Hidayat *et al.* (2006) fermentasi merupakan perubahan gradual oleh enzim beberapa bakteri, khamir dan jamur.

Teknologi fermentasi dapat berperan di bidang pangan yakni dengan melibatkan mikroorganisme yang memfermentasi bahan pangan untuk dapat

menghasilkan perubahan yang menguntungkan (produk-produk fermentasi yang diinginkan) dan perubahan yang merugikan (kerusakan bahan pangan). Mikroorganisme tersebut dapat berupa bakteri (*Acetobacter*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, dll); khamir (*Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Hansenula*); dan kapang (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Munascus*, *Actinomucor*) (Stanbury, 2003).

Dalam proses fermentasi, mikroorganisme harus mempunyai 3 (tiga) karakteristik penting yaitu:

1. mikroorganisme harus mampu tumbuh dengan cepat dalam suatu substrat dan lingkungan yang cocok untuk memperbanyak diri.
2. mikroorganisme harus memiliki kemampuan untuk mengatur ketahanan fisiologi dan memiliki enzim-enzim esensial yang mudah dan banyak supaya perubahan-perubahan kimia yang dikehendaki dapat terjadi.
3. kondisi lingkungan yang diperlukan bagi pertumbuhan harus sesuai supaya produksi maksimum (Suprihatin, 2010).

Proses fermentasi pada kedelai memiliki peranan penting dalam meningkatkan isoflavon aglikon. Isoflavon di dalam kedelai mayoritas berbentuk glikosida. Isoflavon bentuk aglikon merupakan bentuk yang aktif yang memiliki efek fisiologis pada tubuh (Pandit *et al.*, 2011).

Senyawa turunan aglikon dapat diekstraksi dengan menggunakan beberapa cara yaitu penambahan enzim β -glukosidase, hidrolisis dengan asam, ekstraksi menggunakan pelarut, atau sintesis secara kimia (Huynh *et al.*, 2014). Dari beberapa metode tersebut terdapat kekurangan, yakni perlakuan penambahan enzim β -glukosidase dan sintesis secara kimia membutuhkan biaya yang lebih besar, hidrolisis dengan asam dapat bersifat toksik karena dilakukan penambahan asam anorganik, ekstraksi dengan pelarut hanya dapat menghasilkan senyawa aglikon dalam jumlah yang lebih kecil. Sehingga salah satu metode yang ekonomis dan dapat menghasilkan senyawa aglikon yang lebih besar adalah dengan cara fermentasi (Pandit *et al.*, 2011).

2.3 Kapang

Kapang kecil (renik), karena untuk melihat bagian-bagian tubuhnya harus menggunakan kaca pembesar (mikroskop). Oleh karenanya kelompok cendawan ini disebut cendawan-mikro. Kapang berukuran besar sehingga dapat dilihat di bawah mikroskop cukup dengan perbesaran rendah atau sedang (Hastiono, 2004). Menurut Fardiaz (1992) kapang merupakan kelompok mikroba yang tergolong dalam fungi yang mempunyai filamen (miselium).

Kapang terdiri dari suatu thallus (jamak = *thalli*) yang tersusun dari filamen yang bercabang yang disebut hifa (tunggal = *hypha*, jamak = *hyphae*). Kumpulan dari hifa disebut miselium (tunggal = *mycelium*, jamak = *mycelia*). Hifa tumbuh dari spora yang melakukan germinasi membentuk suatu tuba germ, dimana tuba ini akan tumbuh terus membentuk filamen yang panjang dan bercabang yang disebut hifa, kemudian seterusnya akan membentuk suatu massa hifa yang disebut miselium (Fardiaz, 1992).

Kapang umumnya dapat tumbuh baik pada suhu ruang atau bersifat mesofilik. Suhu optimum pertumbuhan kapang antara 25 dan 30 °C, tetapi beberapa dapat tumbuh pada suhu 35–37 °C atau lebih tinggi, misalnya *Aspergillus*. Beberapa kapang bersifat psikrotrofik, yaitu dapat tumbuh baik pada suhu lemari es. Kapang membutuhkan oksigen untuk tumbuh atau bersifat aerob. Kebanyakan kapang dapat tumbuh pada kisaran pH yang luas, yaitu 2–8,5, tetapi biasanya pertumbuhan akan lebih baik pada kondisi asam atau pH rendah. Selain itu, kapang dapat memproduksi enzim hidrolitik, misalnya amilase, pektinase, proteinase, dan lipase. Oleh karena itu, kapang dapat tumbuh pada makanan-makanan yang mengandung pati, pektin, protein, atau lipid (Waluyo, 2005).

Kapang banyak digunakan dalam fermentasi makanan maupun dalam industri kimia. Beberapa golongan kapang yang bermanfaat dalam memfermentasi makanan, misalnya dalam pembuatan tempe (kapang *Mucor* dan *Rhizopus*) dan oncom (kapang *Monifia*), saus kedelai (shoya) oleh *A. oryzae* (di Jepang), dan kecap oleh *A. wentii*

(di Indonesia) (Hastiono, 2004). Dalam industri, kapang banyak digunakan untuk memproduksi berbagai asam, enzim, dan antibiotik (Fardiaz, 1992).

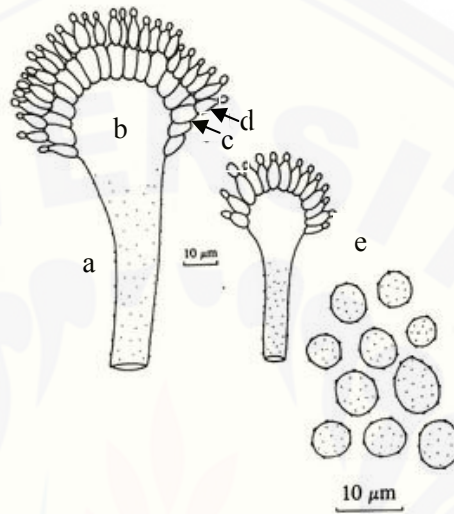
2.4 Tinjauan tentang *Aspergillus oryzae*

A. oryzae pertama kali diisolasi dari koji oleh H. Ahlburg pada tahun 1876. Nama asli jamur ini adalah *Eurotium oryzae* yang kemudian diubah menjadi *A. oryzae* oleh F. Cohn karena terdapat beberapa kekurangan dalam reproduksi seksual. *Aspergillus oryzae* merupakan anggota dari kelompok *A. flavus*. Selain itu, *A. Sojae*, *A. Nomius* dan *A. parasiticus* juga termasuk dalam kelompok *A. flavus* (Elbashiti *et al.*, 2010). Jamur ini bersifat aerob, berfilamen, memiliki koloni berwarna putih yang lama kelamaan menjadi berwarna kuning kehijauan. Perkembangan seksual jamur ini belum diketahui, namun spora aseksual (konidia) mudah dibentuk dan dilepas di udara (Gambar 2.2). Konidiospora berupa hialin dan umumnya berdinding kasar. Beberapa isolat berbentuk uniserat, namun yang lain ada juga yang berbentuk biserat. Suhu optimal pertumbuhan sebesar 32 – 36 °C. *A. oryzae* merupakan jamur yang digunakan sebagai bahan makanan untuk membuat saus kedelai di Jepang dan Cina. Spesies ini menghasilkan beberapa enzim seperti amilase, protease, lipase dan zat kimia tertentu (Barbesgaard *et al.*, 1992).

Berikut adalah taksonomi dari *A. oryzae*:

Domain	: Eukariot
Kingdom	: Fungi
Subkingdom	: Dikarya
Filum	: Ascomycota
Subfilum	: Pezizomycotina
Kelas	: Eurotiomycetes
Subkelas	: Eurotiomycetidae
Ordo	: Eurotiales
Famili	: Aspergillaceae

Genus : *Aspergillus*
Species : *Aspergillus oryzae* (Uniprot, 2002)



Gambar 2.2 *Aspergillus oryzae* a. Konidiofor b. Vesikel c. Metula d. Fialid e. Konidia (Gandjar *et al.*, 1999)

2.5 Isoflavon

Isoflavon merupakan senyawa yang tergolong fitoestrogen, berasal dari bahan alam yang memiliki struktur yang sama dengan 17- β -estradiol dan dapat berikatan dengan *estrogen receptor* (ESR). Isoflavon dapat disebut juga molekul seperti estrogen atau estrogen non-steroid (Preedy, 2013). Di alam isoflavon terdapat pada lebih dari 300 macam tanaman, yang pada umumnya yaitu akar dan biji. Salah satunya isoflavon terdapat pada biji kedelai (Pilsakova *et al.*, 2010).

Isoflavon kedelai merupakan flavonoid yang umumnya dapat diperoleh dari biji kedelai. Isoflavon kedelai dapat dikelompokkan secara kimia berdasarkan gugus fungsi. Terdapat empat kelompok yaitu aglikon (genistein, daidzein, dan glisitein); glikosida (genistin, daidzin dan glisitin); malonil glikosida (malonil genistin, malonil

daidzin dan malonil glisitin) dan asetil glikosida (asetil genistin, asetil daidzin dan asetil glisitin) (Dhaubhadel *et al.*, 2011).

Kedelai yang telah matang memiliki kandungan genistein sebesar 31,26 mg; daidzein 30,76 mg; glisitein 3,75 mg; dan total isoflavon 65,11 mg dalam 100 gram (Bhagwat *et al.*, 2008). Jumlah isoflavon kedelai bervariasi, tergantung pada beberapa faktor yakni varietas, kualitas fisik biji, masa panen, lokasi penanaman (Teekachunhatean *et al.*, 2013).

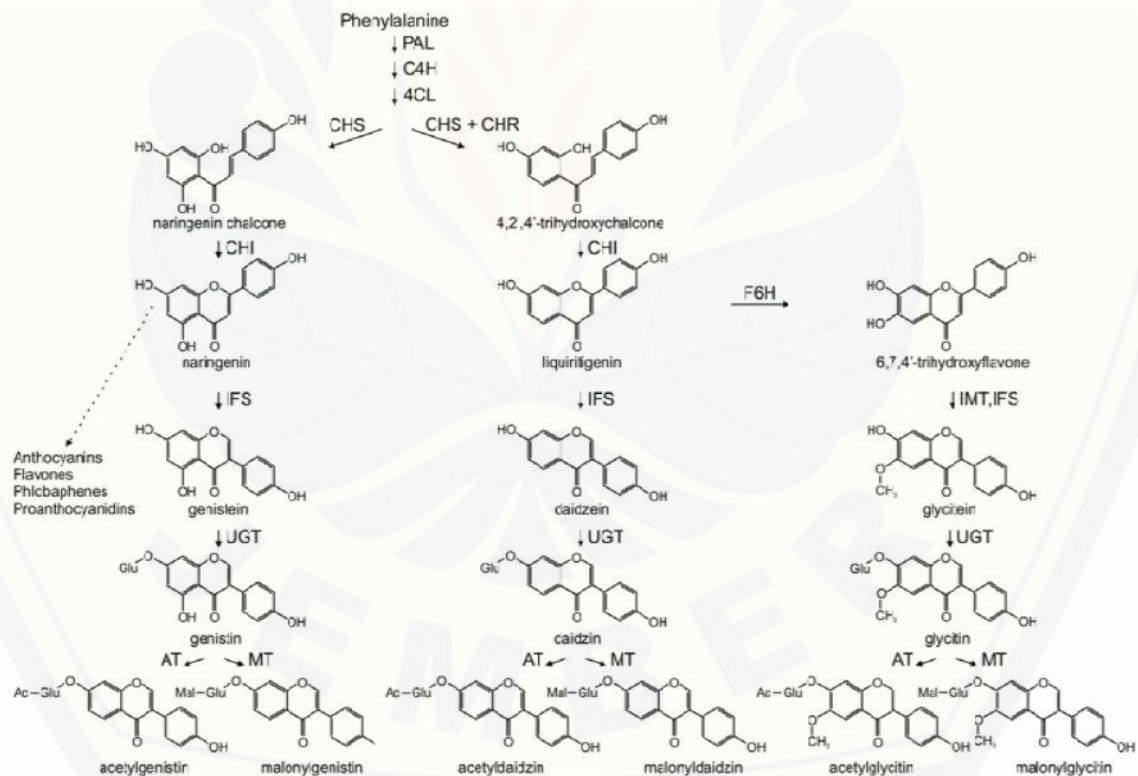
Pada isoflavon tanaman terdapat glukokonjugat yang bersifat tidak aktif secara biologis. Glukokonjugat tersebut dapat menjadi aktif ketika mengalami hidrolisis menjadi aglikon oleh aktivitas bakteri di saluran cerna. Pada manusia, daidzein dan genistein merupakan bentuk isoflavon aktif, karena telah mengalami hidrolisis dari glukokonjugat melalui metabolisme dari biokanin A dan formononetin. Isoflavon aglikon akan ditransport dari usus halus menuju peredaran darah atau akan dimetabolisme langsung pada usus. Isoflavon mengalami degradasi di hati, dan diekskresikan melalui urin atau empedu. Daidzein dan genistein akan dieliminasi dari tubuh tidak lebih dari 24 jam (Pilsakova *et al.*, 2010).

2.6 Biosintesis Isoflavon

Isoflavon disintesis melalui jalur fenilpropanoid. Pada jalur ini, senyawa kalkon merupakan senyawa pertama yang dibentuk dalam produksi flavonoid dan isoflavon. Kalkon dibentuk dengan adanya enzim *chalcone synthase* kalkon (CHS). Pada tanaman kacang-kacangan memproduksi dua jenis kalkon yaitu narigenin kalkon dan isoliquiritigenin kalkon. Kedua jenis kalkon tersebut selanjutnya akan membentuk flavanon dengan adanya enzim *chalcone isomerase* (CHI). Enzim utama yang berfungsi untuk membentuk isoflavon pada jalur fenilpropanoid adalah enzim *isoflavone synthase* (IFS). IFS merupakan enzim sitokrom P450 monooksigenase yang dapat menghasilkan produk 2-hidroksiisoflavon, bersifat sangat tidak stabil.

Senyawa 2-hidroksiisoflavon tersebut akan mengalami dehidrasi oleh dehidrase membentuk genistein dan daidzein (Hakamatsuka, 1998).

Isoflavon pada kedelai terdiri atas sembilan macam, tiga di antaranya berupa isoflavon aglikon (genistein, daidzein, dan glisitein). Isoflavon aglikon merupakan senyawa isoflavon yang paling aktif secara biologis. Senyawa isoflavon aglikon tersebut dapat mengalami transformasi menjadi bentuk glikosida dengan enzim glikosil transferase menghasilkan genistin, daidzin dan glisitin. Selanjutnya, dengan adanya enzim malonil-transferase (MT) mengubah genistin, daidzin dan genistin menjadi malonilgenistin, malonildaizidin, malonilglisitin, serta dengan adanya enzim asetil-transferase dapat dihasilkan asetilgenistein, asetil daidzein, asetilglisitin (Dhaubhadel, 2011). Proses biosintesis isoflavon tersaji pada Gambar 2.3.



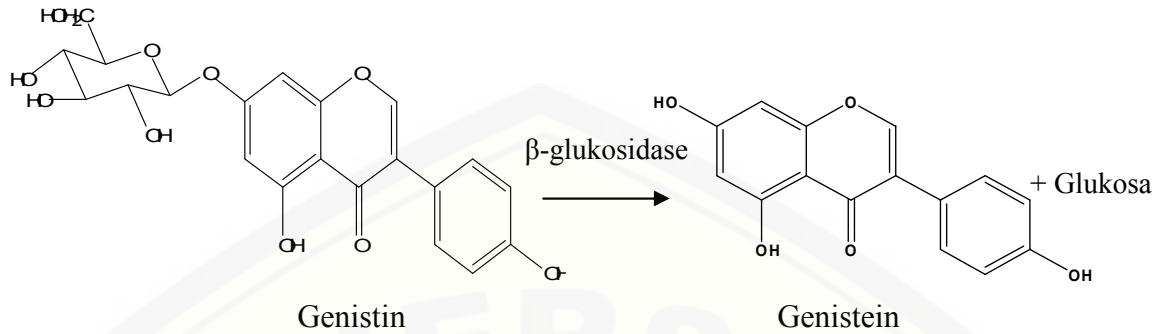
Gambar 2.3 Biosintesis isoflavon (Dhaubhadel, 2011)

2.7 Pengaruh Fermentasi terhadap Profil Isoflavon

Fermentasi merupakan salah satu cara untuk dapat meningkatkan jumlah isoflavon aglikon. Peningkatan jumlah isoflavon aglikon selama proses fermentasi terjadi akibat aksi enzim dari mikroorganisme (Lee dan Chou, 2006). Salah satu enzim yang berperan dalam proses transformasi tersebut adalah β -glukosidase (Punjaisee, 2011).

β -glukosidase (β -glukosida glukohidrolase) merupakan enzim yang berperan utama dalam metabolisme karbohidrat yang berlangsung di bakteri. Enzim yang terdapat pada tanaman, bakteri dan jamur (Kuo dan Lee, 2008). Enzim ini memiliki peranan penting dalam proses biotransformasi, seperti degradasi selulosa (Khan dan Akhtar, 2010), sianogenik glikosida (Lei *et al.*, 1999), dan perubahan flavonoid glikosida (Marotti *et al.*, 2009). β -glukosidase bekerja dengan cara deglikosilasi isoflavon. Deglikosilasi merupakan proses penghilangan gugus glikosil akibat aktivitas glikosil hidrolase, seperti β -glukosidase. Enzim β -glukosidase menyerang glukosa yang berikatan pada flavonoid posisi C3 dan C7. Enzim ini memiliki kemampuan untuk dapat menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidat pada aril dan alkil β -D-glukosida (Huynh *et al.*, 2014). Gambar 2.4 menunjukkan proses transformasi isoflavon glikosida (genistin) dengan adanya enzim β -glukosidase menghasilkan isoflavon aglikon (genistein) dan glukosa (Pandit *et al.*, 2011).

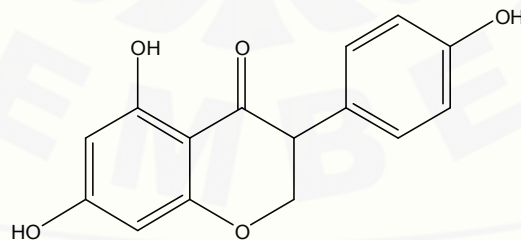
Salah satu golongan jamur yang mampu menghasilkan β -glukosidase lebih besar daripada spesies lainnya adalah *Aspergillus* (Machida *et al.*, 2008). Punjaisee. (2011) melaporkan bahwa β -glukosidase yang dihasilkan oleh *A. oryzae* BCC 3088 pada kedelai yang difermentasi suhu 30 °C selama 4 hari menunjukkan adanya penurunan 2,4 kali jumlah total senyawa glikosida, dan peningkatan 2 kali total senyawa aglikon.



Gambar 2.4 Biotransformasi genistin menjadi genistein (Pandit *et al.*, 2011)

2.8 Genistein

Genistein memiliki rumus molekul $C_{15}H_{10}O_5$, dengan berat molekul 270, berwarna, berbentuk kristal, memiliki titik leleh sebesar $297 - 298\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nama IUPAC genistein adalah 5,7-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil)kromen-4-on. Genistein larut pada pelarut organik, larutan alkali, dan tidak larut dalam air (O'Neil, 2001). Struktur 2 dimensi genistein disajikan dalam Gambar 2.5. Rostagno. (2004) menyebutkan, jumlah kandungan isoflavon genistein, daidzein, dan glisitein pada kedelai memiliki perbandingan sebesar 6:3:1, sehingga penelitian ini menggunakan genistein sebagai *marker* dalam penetapan kadar isoflavon kedelai, serta digunakan sebagai kontrol positif dalam uji aktivitas hambatan tirosinase.



Gambar 2.5 Struktur molekul isoflavon genistein (ChemDraw versi 7.0)

2.9 Enzim Tirosinase

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

Tirosinase (EC.1.14.18.1) yang disebut juga polifenol oksidase merupakan enzim mono-oksigenase yang memiliki gugus ion logam tembaga (Cu^{2+}). Tirosinase memiliki berat molekul sebesar 113.000 dalton (Warrington dan Saville, 1999). Enzim ini terdapat pada mikroorganisme, tanaman dan hewan. Pada jamur dan vertebrata, enzim tirosinase mengkatalisis laju pembentukan pigmen melanin yakni mengkatalisis tiga macam reaksi yaitu hidrosilasi L-tirosinase akan mengubah tirosin menjadi L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) menjadi dopakuinon, yang kemudian dikonversi melalui beberapa tahap transformasi menjadi melanin (Chang, 2009). Proses oksidasi oleh tirosinase juga terjadi pada tanaman yang menyebabkan terjadinya pencoklatan ketika jaringan tanaman mengalami luka. Tirosinase yang diekstraksi dari jamur *Agaricus bisporus* adalah homolog dengan tirosinase mamalia. Saat ini tirosinase dari jamur tersebut sangat sesuai untuk uji melanogenesis (Chang, 2012b).

2.10 Penghambatan Tirosinase

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

Menurut Chang (2009), agen penghambatan tirosinase dapat 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 terbesar sebagai penghambatan tirosinase. Flavonoid termasuk senyawa polifenol yang paling banyak tersebar di daun, biji, kayu, dan bunga pada tanaman. Flavonoid dapat dibagi ke dalam tujuh kelompok yaitu flavon, flavonol, flavanon, flavanol, isoflavon, kalkon dan katekin (Harborne, 2000).

Senyawa flavonoid, termasuk isoflavon di dalamnya, memiliki mekanisme dalam menghambat dan mengkhelat logam tembaga (Cu) enzim tirosinase akibat adanya gugus hidroksil pada cincin A dan B senyawa flavonoid (gugus OH pada C6 – C8 dan C2' – C4') (Chang, 2009). Posisi gugus hidroksil dan jumlah gugus memiliki peranan penting dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase. Semakin banyak jumlah gugus OH pada cincin benzen, maka semakin berfungsi dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase, sedangkan adanya konjugat gula pada cincin benzena dapat menurunkan aktivitas penghambatan (Kim *et al.*, 2006).

Penelitian tentang senyawa bahan alam yang memiliki aktivitas penghambatan tirosinase telah banyak dilaporkan, di antaranya adalah ekstrak metanol *Instia palembanica* memiliki IC₅₀ penghambatan tirosinase sebesar 10,4 µg/ml (Batubara *et al.*, 2010); senyawa Artoindosianin F yang berasal dari *Artocarpus heterophyllus* menunjukkan aktivitas penghambatan tirosinase dengan IC₅₀ 1,75 µg/ml (Rao *et al.*, 2010); senyawa Glabren dan Isoliquiritigenin yang diisolasi dari akar *Glycyrrhiza glabra* memiliki aktivitas penghambatan tirosinase dengan IC₅₀ sebesar 3,5 dan 8,1 µM (Nerya *et al.*, 2003). Fraksi n-heksana dari tanaman kayu bawang (*Protium javanicum*) mampu menghambat kerja reaksi difenolase pada enzim tirosinase dengan IC₅₀ sebesar 114,2 µg/ml dan fraksi etil asetat asetat mampu menghambat reaksi monofenolase enzim tirosinase dengan IC₅₀ 834 µg/ml (Irmanida *et al.*, 2013). Chang *et al.* (2005) telah mengisolasi senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan tirosinase dari kedelai koji yang difermentasi dengan *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. Urutan aktivitas penghambatan tirosinase

dari yang besar hingga rendah adalah senyawa 6,7,4'-trihidroksiisoflavon, daidzein, genistein dan glisitein. Hal tersebut dipengaruhi oleh adanya gugus hidroksil pada posisi C6 dan C7 di struktur isoflavon memberikan pengaruh besar pada aktivitas penghambatan tirosinase.

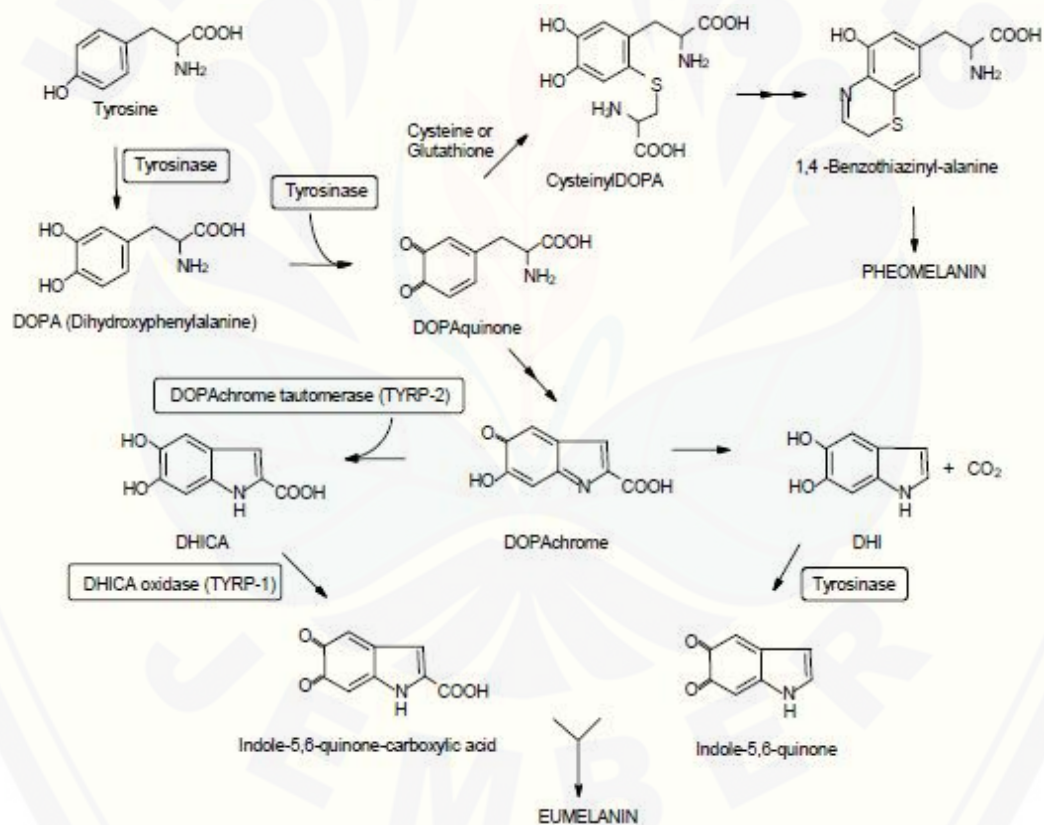
2.11 Mekanisme Melanogenesis

Warna kulit ditentukan oleh jumlah dan sebaran melanin yang dihasilkan oleh melanosom pada melanosit yang memberikan warna coklat pada kulit. Selain itu, juga ada beberapa zat lain yang menentukan warna kulit seseorang yaitu oksihemoglobin pemberi warna merah, hemoglobin tereduksi yang berwarna merah kebiruan serta karoten pemberi warna kuning pada kulit (Tranggono dan Latifah, 2007).

Melanin merupakan pigmen kulit manusia yang dibentuk oleh sel melanosit yang terletak di bagian epidermis. Melanosit merupakan perkembangan dari melanoblas yang berasal dari sel kristal neural. Proses pembentukan pigmen melanin terjadi pada butir-butir melanosom yang dihasilkan oleh sel-sel melanosit yang terdapat di antara sel-sel basal keratinosit di dalam lapisan basal (stratum germinativum). Melalui juluran lengan yang dinamakan dendrit, melanosit memberikan melanosom kepada sejumlah sel-sel keratinosit. Melanosom yang terdapat di dalam keratinosit berbentuk partikel-partikel padat atau gabungan dari 3-4 buah partikel lebih kecil yang mempunyai membran, dinamakan melanosom kompleks (Chang, 2009).

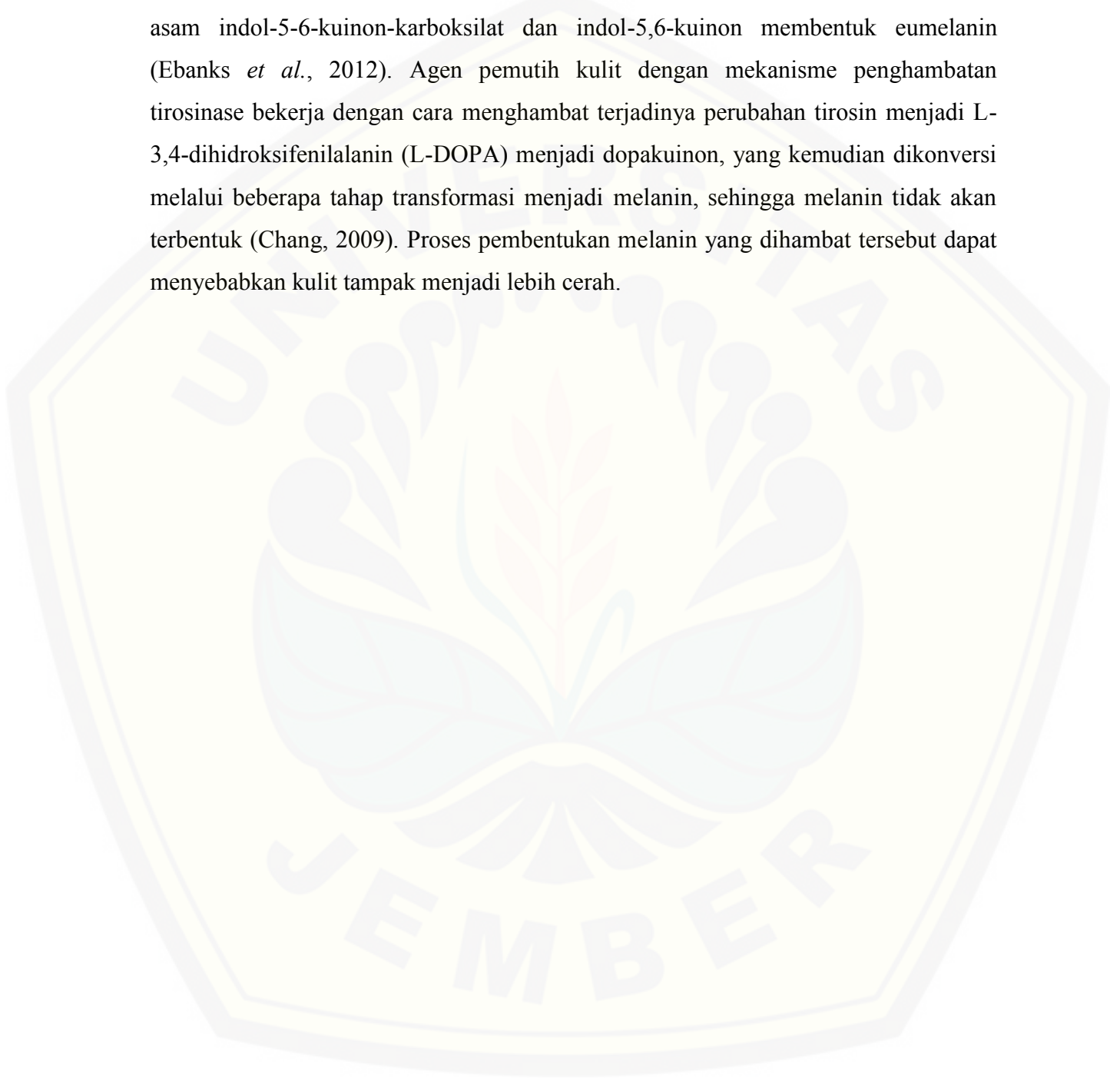
Melanin dibentuk melalui proses melanogenesis yang merupakan kombinasi reaksi katalisis enzimatis dan kimia. Biosintesis melanin ditunjukkan dalam Gambar 2.6. Dua jenis melanin yang disintesis di melanosom adalah eumelanin dan feomelanin. Eumelanin merupakan pigmen melanin hitam kecoklatan, dan feomelanin adalah pigmen melanin kuning kemerah-merahan. Menurut Ito dan Wakamatsu (2003) menyebutkan bahwa eumelanin merupakan pigmen melanin mayor yang menentukan warna kulit. Proses melanogenesis diawali dengan adanya katalisis

L-tirosin menjadi DOPA oleh enzim tirosinase. Kemudian, terjadi proses oksidasi DOPA menjadi dopakuinon. Ketika terdapat sistein atau glution yang akan bereaksi dengan dopakuinon, akan terbentuk sisteinildopa dan turunan benzotiazin kemudian menjadi feomelanin. Selanjutnya, dalam proses pembentukan eumelanin, DOPA yang tidak bereaksi dengan sistein akan membentuk dopakrom, yang kemudian dopakrom mengalami tautomerisasi oleh enzim TYRP-2 (*Tyrosinase related protein-2*) menjadi asam 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilat (DHICA), selanjutnya mengalami oksidasi dengan TYRP-1 menjadi asam indol-5,6-kuinon-karboksilat.



Gambar 2.6 Mekanisme melanogenesis (Ebanks *et al.*, 2012)

Dopakrom mengalami pelepasan gugus asam karboksilat menjadi 5,6-dihidroksiindol (DHI). DHI dikatalisis oleh tirosinase membentuk indol-5,6-kuinon. Selanjutnya asam indol-5-6-kuinon-karboksilat dan indol-5,6-kuinon membentuk eumelanin (Ebanks *et al.*, 2012). Agen pemutih kulit dengan mekanisme penghambatan tirosinase bekerja dengan cara menghambat terjadinya perubahan tirosin menjadi L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) menjadi dopakuinon, yang kemudian dikonversi melalui beberapa tahap transformasi menjadi melanin, sehingga melanin tidak akan terbentuk (Chang, 2009). Proses pembentukan melanin yang dihambat tersebut dapat menyebabkan kulit tampak menjadi lebih cerah.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui suatu pengaruh yang timbul sebagai akibat adanya perlakuan tertentu. Jenis penelitian eksperimental pada penelitian ini adalah *true experimental laboratories* yakni untuk mengetahui perbedaan aktivitas penghambatan tirosinase dan kandungan genistein pada kedelai non-fermentasi dan fermentasi oleh *A. oryzae* (Notoatmodjo, 2010).

3.1.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September 2014 – April 2015 di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Bioteknologi & Mikrobiologi Farmasi Universitas Jember.

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan fermentasi dan waktu fermentasi pada kedelai.

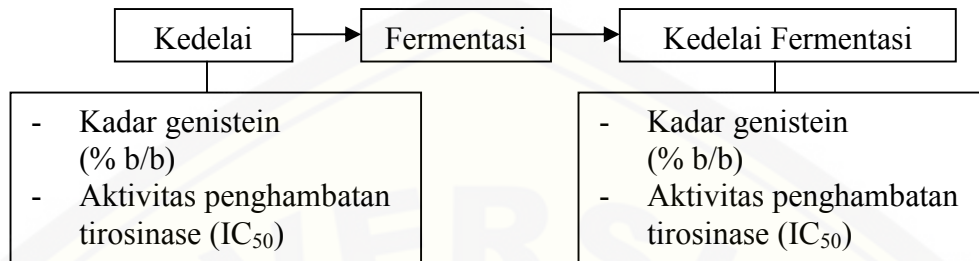
3.2.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar genistein dan aktivitas penghambatan tirosinase.

3.2.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah suhu inkubasi fermentasi kedelai, inokulum fermentasi yang digunakan yakni suspensi spora *A. oryzae* yang mengandung 10^6 spora/ml.

3.3 Rancangan Penelitian



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

3.3.1 Rancangan Operasional

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut:

- Preparasi sampel kedelai non fermentasi.
- Pembuatan suspensi spora *A. oryzae* yang mengandung 10^6 spora/ml.
- Preparasi sampel kedelai yang difermentasi dengan *A. oryzae*.
- Ekstraksi simplisia kedelai dengan pelarut etanol 70 %.
- Penentuan kadar genistein dari masing-masing ekstrak.
- Uji aktivitas penghambatan tirosinase dengan menggunakan metode spektrofotometri.

3.3.2 Definisi Operasional

- Kedelai yang digunakan adalah kedelai varietas Baluran yang diperoleh dari Desa Pontang, Kecamatan Ambulu Kabupaten Jember. Kedelai dipanen saat berumur 70 hari.
- Ekstraksi dilakukan dengan metode sonikasi selama 1 jam pada suhu ruang.
- Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 70 %.

- d. Penetapan kadar isoflavon dalam ekstrak menggunakan standar genistein (isoflavon aglikon) yang dinyatakan dalam % b/b .
- e. Persen penghambatan ekstrak terhadap enzim tirosinase diukur dari intensitas perubahan warna larutan yang tak berwarna pada *microwell plate* menjadi warna kuning orange.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Bahan Penelitian

Kedelai varietas Baluran, isolat *A. oryzae* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember), n-heksana teknis, etanol teknis 70 %, standar genistein (Tocris Bioscience), substrat L-tirosine (Sigma Aldrich), enzim tirosinase (Sigma Aldrich), *Potato Dextrose Agar* (BD difco), akuabides steril, metanol p.a (Fluka), tween 80, etil asetat (Fluka), toluen (Smartlab), aseton (Fluka), asam format (Merck), DMSO (Fluka), buffer fosfat pH 6,5, akuades, *blue tip*, *white tip*.

3.4.2 Alat

Elisa Reader (EL x800), *microwell plate* (Bio One Jerman), Kromatografi lapis tipis (KLT)-Densitometer (TLC-Scanner 3 Camag), *rotary evaporator* (Heildoph), ultrasonikator (Elmasonic), *sentrifuge* (Hermle), silika gel 60 F₂₅₄, chamber KLT (Camag) , mikropipet (Soccorex), oven, *blender*, timbangan analitik digital, alat gelas, soxhlet, mikroskop (Olympus BX53), *haemocytometer* (Neubauer Improved), *laminar air flow* (Airtech), autoklaf (ALP), Timbangan mikro (Sartorius ME36S).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Kedelai Non-fermentasi

Sebanyak 500 gram kedelai dicuci kemudian direndam dalam 3 liter akuades selama satu malam. Setelah itu, kulit ari kedelai dihilangkan. Kemudian, kedelai disterilisasi dan dimatangkan menggunakan autoklaf suhu 121 °C selama 15 menit lalu didinginkan. Setelah dingin, dan kedelai dipotong tipis lalu dikeringkan menggunakan oven suhu 60 °C selama 30 jam. Simplisia dihaluskan menggunakan blender. Setelah itu serbuk diayak menggunakan ayakan mesh 80. Serbuk yang diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya (Lee *et al.*, 2008).

3.5.2 Peremajaan Isolat *A. oryzae*

Isolat *A. oryzae* diremajakan terlebih dahulu dengan cara memindahkan *A. oryzae* sebanyak dua ose ke dalam *potato dextrose agar* (PDA) miring, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 1 hari (Jayanti *et al.*, 2013).

3.5.3 Pembuatan Suspensi Spora *A. oryzae*

Proses pembuatan suspensi spora *A. oryzae* dilakukan dibawah *laminar air flow* (LAF). Suspensi spora *A. oryzae* dibuat dengan cara memipet 10 µl Tween 80 kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang terdapat *A.oryzae* pada media miring PDA. Selanjutnya, menambahkan 1 ml akuades steril. Spora *A. oryzae* di ambil dengan cara mengeruk menggunakan ose steril secara perlahan (jangan sampai media terikut). Spora yang sudah terambil diresuspensi dengan menggunakan mikropipet. Spora yang sudah diresuspensi dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril. Prosedur diatas diulang beberapa kali hingga didapatkan suspensi sejumlah 10 ml. Suspensi spora tersebut kemudian divorteks supaya homogen untuk proses selanjutnya (Lee *et al.*, 2008).

3.5.4 Perhitungan Kepadatan Spora

Kepadatan spora *A. oryzae* dilakukan merujuk pada metode yang berasal dari Hadioetomo. (1993). Spora *A. oryzae* dihitung menggunakan metode *haemocytometer*. Suspensi spora yang akan digunakan sebagai inokulum kedelai yaitu suspensi yang mengandung kepadatan spora sebesar $10^6/\text{ml}$ (Lee *et al.*, 2008).

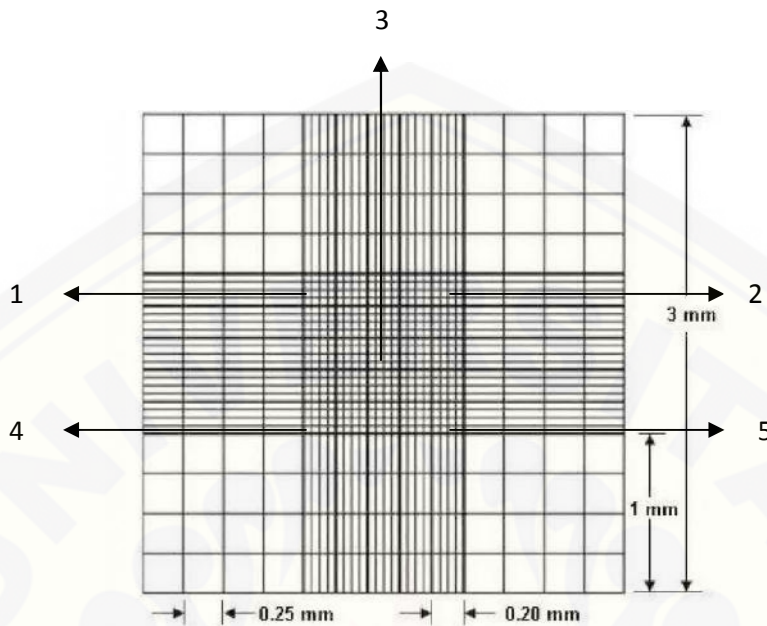
Langkah-langkah perhitungan kepadatan spora adalah sebagai berikut:

Suspensi spora ditetaskan sebanyak satu tetes pada bidang hitung *haemocytometer*, lalu menutupnya dengan gelas penutup. Selanjutnya menghitung spora *A. oryzae* di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x, hingga didapatkan bidang hitung pada *haemocytometer*. Spora yang dihitung hanya yang terletak pada kotak hitung (1 + 2 + 3 + 4 + 5). Perhitungan spora hanya di daerah bertanda kotak seperti yang tersaji dalam Gambar 3.2. Perhitungan spora mengikuti aturan seperti yang dijelaskan dalam Gambar 3.3. Spora yang terletak pada garis batas kotak hitung yang dihitung hanya pada sisi kiri dan atas kotak hitung tersebut. Setelah didapatkan jumlah spora pada kotak hitung 1, 2, 3, 4, dan 5, lalu dihitung jumlah spora/ml pada bidang hitung dengan persamaan (1) sebagai berikut:

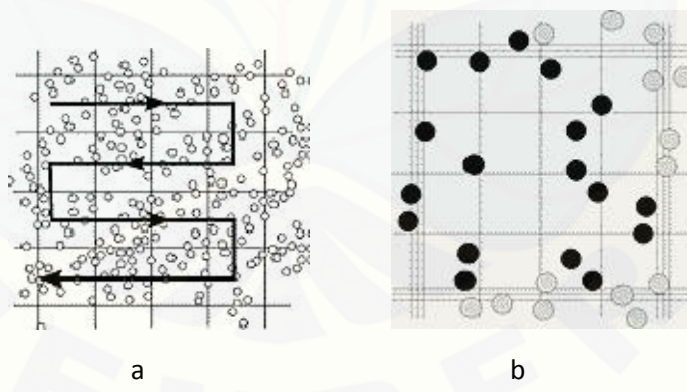
$$S = \frac{X}{t(\text{mm}) \times d \times L(\text{mm}^2)} \times 10^3 \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

- S : Jumlah spora/ml
- X : Jumlah spora yang dihitung (1 + 2 + 3 + 4 + 5)
- L : Luas kotak hitung ($0,04 \times 5 = 0,2 \text{ mm}^2$)
- t : Kedalaman bidang hitung (0,1 mm)
- d : Faktor pengenceran
- 10^3 : Volum suspensi yang diambil ($1 \text{ ml} = 10^3 \text{ mm}^3$) (Modifikasi dari Tim QC APH Golongan Jamur, 2009).



Gambar 3.2 Kamar hitung hemositometer *Improved Neubauer* (Hansen, 2000)



Gambar 3.3 Cara perhitungan spora a. Alur perhitungan spora b. Cara perhitungan spora pada kamar hitung (● : spora yang dihitung, ○ : spora tidak dihitung) (Tim QC APH Golongan Jamur, 2009)

Apabila suspensi spora yang didapatkan memiliki kepadatan lebih dari 10^6 spora/ml, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan persamaan (2):

$$V1. N1 = V2. N2 \dots\dots(2)$$

Keterangan :

V1 : volum larutan stok (ml)

N1 : konsentrasi larutan stok (spora/ml)

V2 : volum larutan yang diharapkan (ml)

N2 : konsentrasi larutan yang diharapkan (spora/ml)

Hasil perhitungan kepadatan spora dan pengenceran suspensi spora dapat dilihat pada Lampiran A.1 dan A.2.

3.5.5 Preparasi Kedelai Fermentasi *A. oryzae*

Sebanyak 500 gram kedelai dicuci kemudian direndam dalam 3 liter akuades selama satu malam. Setelah itu, kulit ari kedelai dihilangkan. Kemudian, kedelai disterilisasi dan dimatangkan menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit lalu didinginkan. Fermentasi dilakukan dengan menambahkan 10 ml suspensi spora yang mengandung 10^6 spora/ml (inokulum). Setelah dicampur, kedelai dibungkus dengan kertas saring. Selanjutnya diinkubasi selama 1, 2, 3 dan 4 hari pada suhu 30°C RH 95 % dan didapatkan kedelai fermentasi bentuk padat (*Solid-state fermentation*). Setelah diinkubasi, kedelai yang telah difermentasi tersebut diiris tipis lalu dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 60°C selama 30 jam. Setelah kering, simplisia kedelai fermentasi dihaluskan menggunakan blender. Serbuk diayak menggunakan ayakan mesh 80. Serbuk yang diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya (Lee *et al.*, 2008).

3.5.6 Proses Penghilangan Lemak (*defatting*)

Serbuk kedelai fermentasi dan non-fermentasi dilakukan proses penghilangan lemak menggunakan soxlet. Sebanyak 40 g dari masing-masing serbuk kedelai dibungkus dengan kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam timbel soxhlet dan ditambahkan pelarut n-heksana dengan perbandingan 1 : 5 (Hui *et al.*, 2005), kemudian dilakukan proses *defatting* selama 3 jam, serbuk kedelai diambil kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama satu malam dan ditimbang untuk proses selanjutnya.

3.5.7 Pembuatan Ekstrak Kedelai Fermentasi dan Non-fermentasi

Serbuk kedelai bebas lemak diekstraksi dengan cara ultrasonikasi menggunakan pelarut etanol 70 % selama 1 jam. Serbuk bahan ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan pelarut etanol 70 % dengan perbandingan 1 : 6 (Hui *et al.*, 2005), kemudian ditutup dengan alumunium foil. Setelah 1 jam ekstraksi berlangsung, kemudian diendapkan menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 2600 rpm selama 10 menit. Residu yang tersisa diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut etanol 70 % yang baru. Proses tersebut berlangsung 3 kali. Filtrat hasil *sentrifuge* dikumpulkan dalam *beaker glass*, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan digunakan untuk proses selanjutnya (Luthria *et al.*, 2007 dengan modifikasi).

3.5.8 Penetapan Kadar Genistein

Kandungan isoflavon genistein yang terdapat dalam masing-masing ekstrak dapat diketahui dengan menggunakan metode KLT- densitometer (Rahman *et al.*, 2012).

a. Pembuatan Standar Uji

Larutan induk standar genistein dibuat dengan cara menimbang 3,755 mg dan 4,92 mg standar genistein kemudian dilarutkan dalam metanol p.a. hingga didapat konsentrasi 375,5 µg/ml dan 492 µg/ml. Larutan induk tersebut diencerkan hingga didapatkan konsentrasi 0,98; 2,952; 9,840; 18,775; 29,520; dan 39,36 µg/ml. Perhitungan pembuatan larutan standar uji dapat dilihat pada Lampiran A.4.

b. Pembuatan Sampel Uji

Ekstrak kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-4 ditimbang sebanyak 150 mg, kemudian dilarutkan dalam metanol p.a. sampai volum 5 ml, sehingga didapatkan konsentrasi 30.000 µg/ml. Ekstrak kedelai terfermentasi hari ke-1 ditimbang sebanyak 100 mg kemudian dilarutkan dalam metanol p.a. sampai volum 10 ml, sehingga didapatkan konsentrasi 10.000 µg/ml; dan ekstrak kedelai fermentasi hari ke-2, dan 3 ditimbang sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dalam metanol p.a. sampai volum 10 ml, sehingga didapatkan konsentrasi 5000 µg/ml. Perhitungan pembuatan larutan sampel uji tersaji pada Lampiran A.5.

c. Kondisi Analisis

Analisis isoflavon genistein dengan metode KLT dilakukan dengan menggunakan fase diam lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ dan sebagai fase gerak digunakan toluen – etil asetat – aseton – asam format (20:4:2:1) (Yuan *et al.*, 2006 dengan modifikasi). Perhitungan pembuatan fase gerak tersaji pada Lampiran A.6. Volum sampel dan standar yang ditotolkan sebanyak 6 µl dan 2 µl. Noda yang terbentuk diamati dengan lampu UV 254 nm selanjutnya dipindai dengan densitometer pada panjang gelombang maksimum 266 nm.

3.5.9 Uji Aktivitas Penghambatan Tirosinase

Uji aktivitas penghambatan tirosinase berdasarkan pada metode yang dilakukan oleh Batubara *et al.*, (2010) dengan modifikasi. Modifikasi tersebut berdasarkan hasil optimasi yang telah dilakukan oleh Dewi (2015). Hasil optimasi

yang digunakan dalam pengujian yaitu menggunakan hasil yang optimal berupa konsentrasi substrat sebesar 1 mM, waktu inkubasi selama 80 menit dan dipindai menggunakan alat Elisa Reader (EL x800) pada panjang gelombang 478 nm.

a. Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 6,5

KH_2PO_4 ditimbang sebanyak 6,8045 gram dilarutkan dalam akuades sampai volume 250 ml, diperoleh larutan KH_2PO_4 0,2 M. NaOH ditimbang sebanyak 0,4 gram dilarutkan dalam akuades hingga volume 50 ml, diperoleh larutan NaOH 0,2 M. Larutan dapar fosfat pH 6,5 dibuat dengan menambahkan 125 ml KH_2PO_4 0,2 M dengan 31,5 ml NaOH 0,2 M lalu ditambahkan dengan akuades hingga 500 ml. Cek pH dengan pH meter sampai diperoleh pH 6,5, jika perlu ditambahkan NaOH untuk menaikkan pH larutan. Perhitungan pembuatan larutan dapar fosfat pH 6,5 tersaji pada Lampiran A.8.

b. Pembuatan Larutan 1 mM L-Tirosin

L-tirosin sebanyak 4,53 mg dilarutkan dalam dapar fosfat pH 6,5 sampai volume 25 ml. Perhitungan pembuatan larutan substrat L-tirosin 1 mM tersaji pada Lampiran A.9.

c. Penyiapan Larutan Tirosinase

Mushroom tyrosinase 50 KU dilarutkan dengan larutan dapar fosfat pH 6,5 hingga 10 ml. Larutan dibagi menjadi 2 vial masing-masing 5 ml mengandung *mushroom tyrosinase* 25 KU. Satu vial *mushroom tyrosinase* 25 KU dilarutkan lagi dengan larutan dapar fosfat pH 6,5 hingga 10 ml. larutan dibagi menjadi 2 vial masing-masing 5 ml mengandung *mushroom tyrosinase* 12,5 KU. Selanjutnya, larutan tersebut dibagi menjadi 5 vial masing-masing 5 ml mengandung *Mushroom tyrosinase* 2,5 KU dan disimpan di dalam *freezer* dengan suhu $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

d. Pembuatan Standar Uji Genistein

Larutan standar genistein digunakan sebagai kontrol positif dibuat dengan cara menimbang 5 mg dilarutkan dalam 10 ml methanol p.a. sehingga diperoleh larutan induk 500 $\mu\text{g/ml}$. Larutan induk diencerkan menggunakan dapar fosfat pH 6,5 hingga

diperoleh konsentrasi dengan rentang konsentrasi 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, dan 170 µg/ml. Perhitungan pembuatan larutan standar uji genistein tersaji pada Lampiran A.10.

e. Preparasi sampel uji

Masing-masing ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 15 dan 20 mg lalu dilarutkan dalam 1 ml DMSO kemudian ditambahkan dapar fosfat pH 6,5 hingga volume 5 ml, diperoleh konsentrasi 3000 dan 4000 µg/ml. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga didapatkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250 dan 300 µg/ml sebagai variasi konsentrasi pada pengujian untuk mendapatkan nilai IC₅₀. Pembuatan larutan sampel uji tersaji pada Lampiran A.11.

f. Pengujian Aktivitas Penghambatan Tirosinase

Sebanyak 70 µl dari masing-masing ekstrak pengenceran ini ditambahkan dengan 40 µl enzim tirosinase (250 unit/ml dalam buffer fosfat), setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu 26 °C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 110 µl substrat (1 mM L-tirosin) ke dalam tiap lubang *multi-well plate*, campuran diinkubasi selama 80 menit pada suhu 26 °C. Campuran diukur dengan menggunakan *multi-well plate reader* pada panjang gelombang 478 nm, hal ini bertujuan untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambat 50% (IC₅₀). Persentase penghambatan dihitung dengan cara membandingkan serapan sampel tanpa penambahan ekstrak dan sampel dengan penambahan ekstrak. Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier $y = a + bx$. Variabel x merupakan konsentrasi sampel dan variabel y merupakan persen inhibisi. Perhitungan persen penghambatan tirosinase menggunakan persamaan (3) sebagai berikut:

$$\text{hambatan tirosinase (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100 \% \dots\dots\dots(3)$$

A = absorbansi pada 478 nm tanpa ekstrak

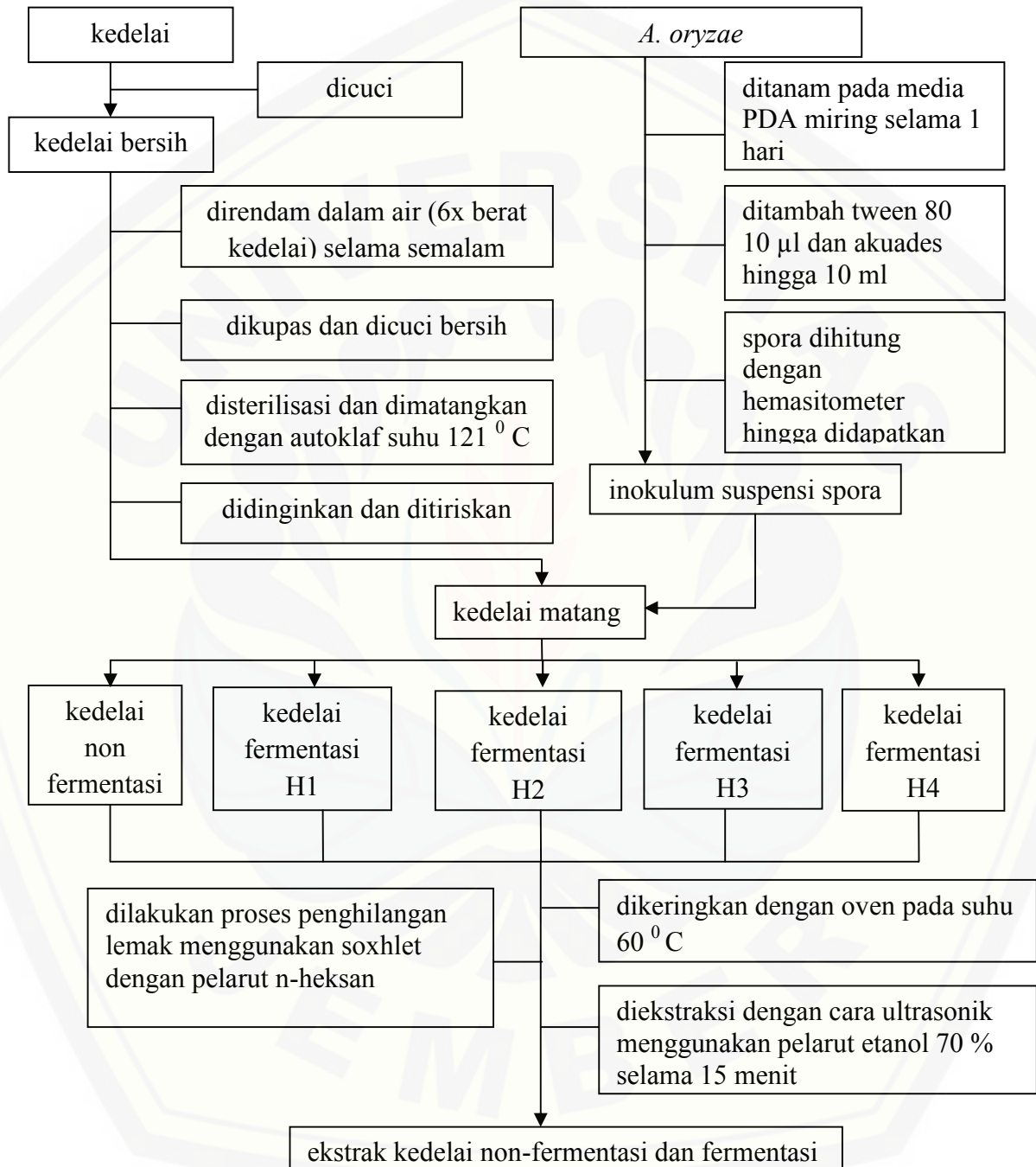
B = absorbansi pada 478 nm dengan ekstrak (Chang, 2009).

3.6 Analisis Data

Data kadar genistein dan IC_{50} yang telah diperoleh kemudian diolah menggunakan program SPSS. Data yang telah diperoleh terdistribusi secara normal dan homogen. Analisis varian satu arah ANOVA dilakukan untuk melihat perbedaan kadar genistein dan aktivitas penghambatan tirosinase dari dua atau lebih kelompok. Uji ANOVA menunjukkan hasil yang berbeda signifikan, maka dapat dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*). Hasil uji ANOVA satu arah dan LSD signifikan bila didapatkan harga $p < 0,05$ (Besral, 2010). Hasil analisis data tersaji pada Lampiran C.

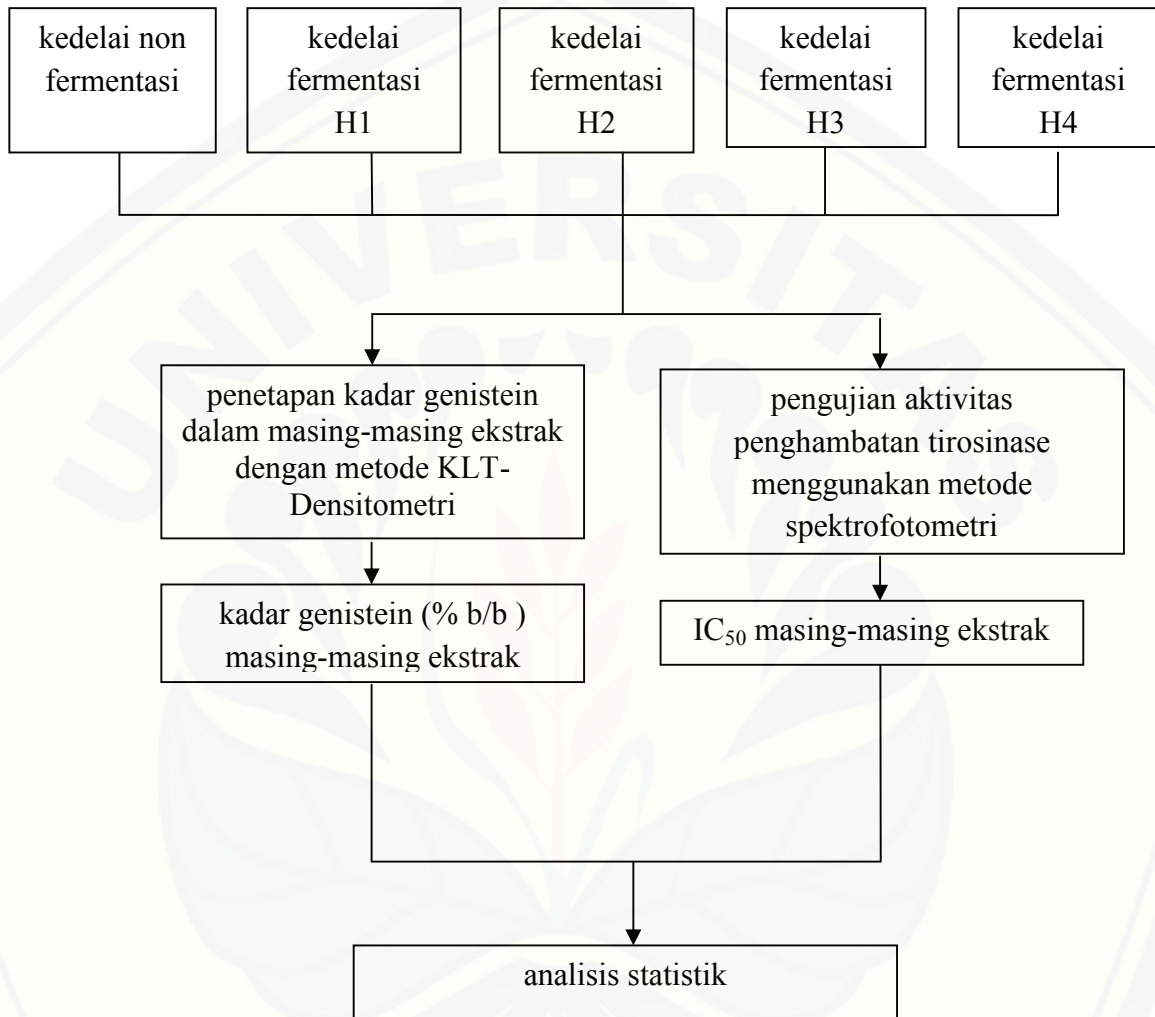
3.7 Skema Pelaksanaan Penelitian

3.7.1 Skema Pembuatan Ekstrak Kedelai Fermentasi dan Non-fermentasi



Gambar 3.4 Skema pembuatan ekstrak kedelai non-fermentasi dan fermentasi

3.7.2 Skema Penetapan Kadar Genistein dan Uji Aktivitas Penghambatan Tirosinase



Gambar 3.5 Skema penetapan kadar genistein dan uji aktivitas penghambatan tirosinase

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakterisasi Kedelai Terfermentasi dengan *Aspergillus oryzae*

Tahap awal yang dilakukan pada penelitian ini adalah proses fermentasi kedelai menggunakan kapang *A. oryzae*. Hasil karakteristik kedelai terfermentasi *A.oryzae* tersaji dalam Tabel 4.1 dan Gambar 4.1. Adanya pertumbuhan jamur yang cepat terlihat dengan terbentuknya miselia pada permukaan biji kedelai yang semakin lama menjadi semakin lebat sehingga menunjukkan warna yang lebih kuning dan massa yang lebih kompak. Semakin lama waktu fermentasi menyebabkan perubahan bau amoniak, yang disebabkan oleh terjadi proses degradasi protein lanjut yang membentuk amoniak (Hidayat *et al.*, 2006).

Tabel 4.1. Karakteristik kedelai terfermentasi *A.oryzae*

Waktu fermentasi (hari)	Warna	Aroma	Penampilan
1	putih	khas tempe	miselium jamur mulai tumbuh, belum merata di permukaan
2	putih kekuningan	khas tempe	miselium jamur berwarna kekuningan, tumbuh merata di permukaan, kompak
3	kuning	sedikit berbau amonia	miselium jamur berwarna kuning, tumbuh merata di permukaan, kompak
4	coklat	berbau amoniak, busuk	miselium jamur berwarna kuning kecoklatan, menyusut

4.2 Hasil Rendemen Ekstrak

Berdasarkan hasil ekstraksi diperoleh ekstrak kental dengan hasil rendemen masing-masing sampel seperti tersaji dalam Tabel 4.2. Perhitungan rendemen masing-masing ekstrak tersaji dapat dilihat pada lampiran A.3. Besarnya rendemen

menunjukkan banyaknya komponen yang terekstrak selama proses ekstraksi menggunakan sonikasi. Adanya perbedaan rendemen ekstrak dipengaruhi oleh banyaknya jumlah komponen senyawa aktif yang terdapat di dalam ekstrak.



Gambar 4.1. Karakteristik kedelai fermentasi *A. oryzae*

Tabel 4.2. Hasil rendemen ekstrak

Waktu fermentasi (hari)	Rendemen ekstrak (% b/b)	Warna ekstrak
0	16,88 %	kuning muda
1	15,64 %	kuning kecoklatan
2	16,3 %	coklat tua
3	17 %	coklat tua
4	16,45 %	coklat tua

4.3 Hasil Penetapan Kadar Genistein

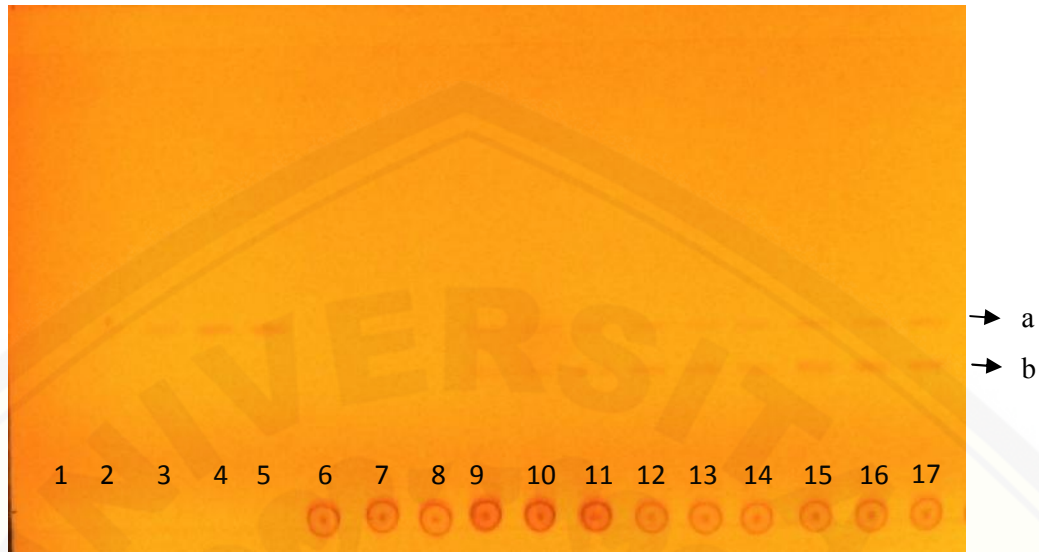
Penetapan kadar genistein dalam sampel ekstrak etanol 70 % kedelai terfermentasi *A. oryzae* menggunakan metode KLT-Densitometri. Terdapat dua persamaan kurva baku yang digunakan untuk penetapan kadar genistein dalam sampel, karena penetapan kadar dilakukan pada dua lempeng yang berbeda. Lempeng KLT pertama digunakan untuk penetapan kadar genistein pada sampel kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-4 (Gambar 4.2). Sedangkan, lempeng KLT

kedua digunakan untuk penetapan kadar genistein dalam sampel kedelai terfermentasi hari ke-1, 2, dan 3 (Gambar 4.3).



Gambar 4.2 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-4 yang dilihat dengan sinar UV 254 nm

- Keterangan:
1. Standar genistein 1,968 ng, Rf 0,36
 2. Standar genistein 1,968 ng, Rf 0,35
 3. Standar genistein 5,904 ng, Rf 0,35
 4. Standar genistein 9,840 ng, Rf 0,35
 5. Standar genistein 19,680 ng, Rf 0,35
 6. Standar genistein 29,520 ng, Rf 0,35
 7. Standar genistein 37,550 ng, Rf 0,35
 8. Sampel non-fermentasi (1) Rf 0,34
 9. Sampel non-fermentasi (2) Rf 0,34
 10. Sampel non-fermentasi (3) Rf 0,34
 11. Sampel non-fermentasi (4), tampak dua noda dengan Rf 0,23 dan 0,34
 12. Sampel fermentasi H4 (1), tampak dua noda dengan Rf 0,22 dan 0,33
 13. Sampel fermentasi H4 (2), tampak dua noda dengan Rf 0,23 dan 0,33
 14. Sampel fermentasi H4 (3), tampak dua noda dengan Rf 0,23 dan 0,33
 15. Sampel fermentasi H4 (4), tampak dua noda dengan Rf 0,22 dan 0,33



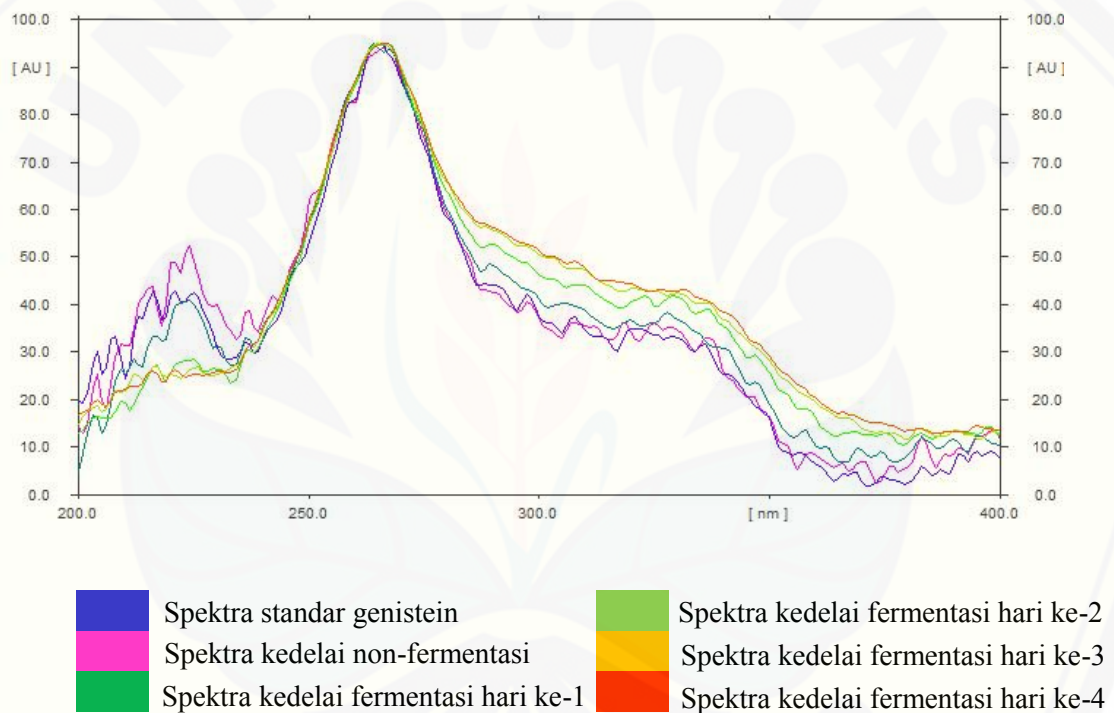
Gambar 4.3 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak kedelai terfermentasi H1,H2 dan H3 yang dilihat dengan sinar UV 254 nm.

- Keterangan:
1. Standar genistein 5,904 ng, Rf 0,4
 2. Standar genistein 19,68 ng, Rf 0,39
 3. Standar genistein 37,55 ng, Rf 0,39
 4. Standar genistein 59,04 ng, Rf 0,39
 5. Standar genistein 78,72 ng, Rf 0,39
 6. Sampel non-fermentasi (1): tidak terdeteksi adanya puncak
 7. Sampel non-fermentasi (2): tidak terdeteksi adanya puncak
 8. Sampel non-fermentasi (3): tidak terdeteksi adanya puncak
 9. Sampel fermentasi H1(1), tampak dua noda dengan Rf 0,29 dan 0,39
 10. Sampel fermentasi H1 (2), tampak dua noda dengan Rf 0,29 dan 0,39
 11. Sampel fermentasi H1 (3), tampak dua noda dengan Rf 0,30 dan 0,39
 12. Sampel fermentasi H2 (1), tampak dua noda dengan Rf 0,30 dan 0,40
 13. Sampel fermentasi H2 (2), tampak dua noda dengan Rf 0,30 dan 0,39
 14. Sampel fermentasi H2 (3), tampak dua noda dengan Rf 0,30 dan 0,39
 15. Sampel fermentasi H3 (1), tampak dua noda dengan Rf 0,30 dan 0,40
 16. Sampel fermentasi H3 (2), tampak dua noda dengan Rf 0,30 dan 0,40
 17. Sampel fermentasi H3 (3), tampak dua noda dengan Rf 0,30 dan 0,40

Gambar 4.2 dan 4.3 merupakan foto lempeng KLT pada sinar UV 254 nm. Pemeriksaan lempeng KLT di bawah sinar UV bertujuan untuk mengetahui noda yang dapat teredam. Hasil penyinaran lempeng di bawah sinar UV menunjukkan 2 noda yang teredam pada sampel. Noda genistein pada sampel memiliki nilai Rf yang hampir sama dengan standar genistein, yang ditunjukkan dengan huruf “a”.

yang ditunjukkan dengan huruf “b” kemungkinan merupakan noda daidzein. Berdasarkan penelitian Yuan *et al.* 2006, nilai Rf daidzein berkisar 0,25, sedangkan pada penelitian ini noda “b” memiliki nilai Rf yang hamper sama dengan noda daidzein.

Selain dilihat dari nilai Rf, perlu dilakukan uji identitas untuk mengetahui ada atau tidaknya genistein dalam masing-masing ekstrak, dan uji kemurnian untuk mengetahui kemurnian genistein yang terdapat pada standar maupun sampel. Spektra genistein dari uji identitas dan kemurnian tersaji dalam Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Spektra uji identitas dan kemurnian genistein dalam standar dan sampel

Data mengenai korelasi spektra pada uji kemurnian dan identitas standar dan sampel kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-1, 2, 3, dan 4 dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan 4.4. Kemurnian genistein dalam sampel dilihat berdasarkan nilai $r(s,m)$ dan $r(m,e)$ pada tabel 4.3. 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. Dari Tabel 4.3 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* standar dan *track* analit dalam sampel. Analit dalam sampel dikatakan identik dengan standar jika nilai korelasinya lebih dari 0,99. Dari Tabel 4.4 dapat dilihat bahwa nilai korelasi spektra yang didapatkan pada penelitian ini lebih dari 0,99. Sehingga analit dalam sampel identik dengan standar genistein.

Tabel 4.3. Data korelasi spektra uji kemurnian

	$r(s,m)$	$r(m,e)$	kemurnian
Standar genistein	0,999888	0,999036	ok
Sampel non-fermentasi	0,999894	0,999849	ok
Sampel fermentasi hari ke-1	0,999942	0,999738	ok
Sampel fermentasi hari ke-2	0,999943	0,999269	ok
Sampel fermentasi hari ke-3	0,999851	0,999552	ok
Sampel fermentasi hari ke-4	0,999904	0,999362	ok

Tabel 4.4. Data korelasi spektra uji identitas

	$r(s,s)$	$r(s,a)$	identitas
Standar genistein	0,999678		N/A
Sampel non-fermentasi	0,999678	0,993652	ok
Sampel fermentasi hari ke-1	0,999678	0,997207	ok
Sampel fermentasi hari ke-2	0,999678	0,998741	ok
Sampel fermentasi hari ke-3	0,999678	0,997262	ok
Sampel fermentasi hari ke-4	0,999678	0,998163	ok

Persamaan kurva baku yang terdapat pada lempeng KLT pertama, menggunakan standar genistein dengan konsentrasi sebesar 0,984; 2,952; 4,92; 9,840;

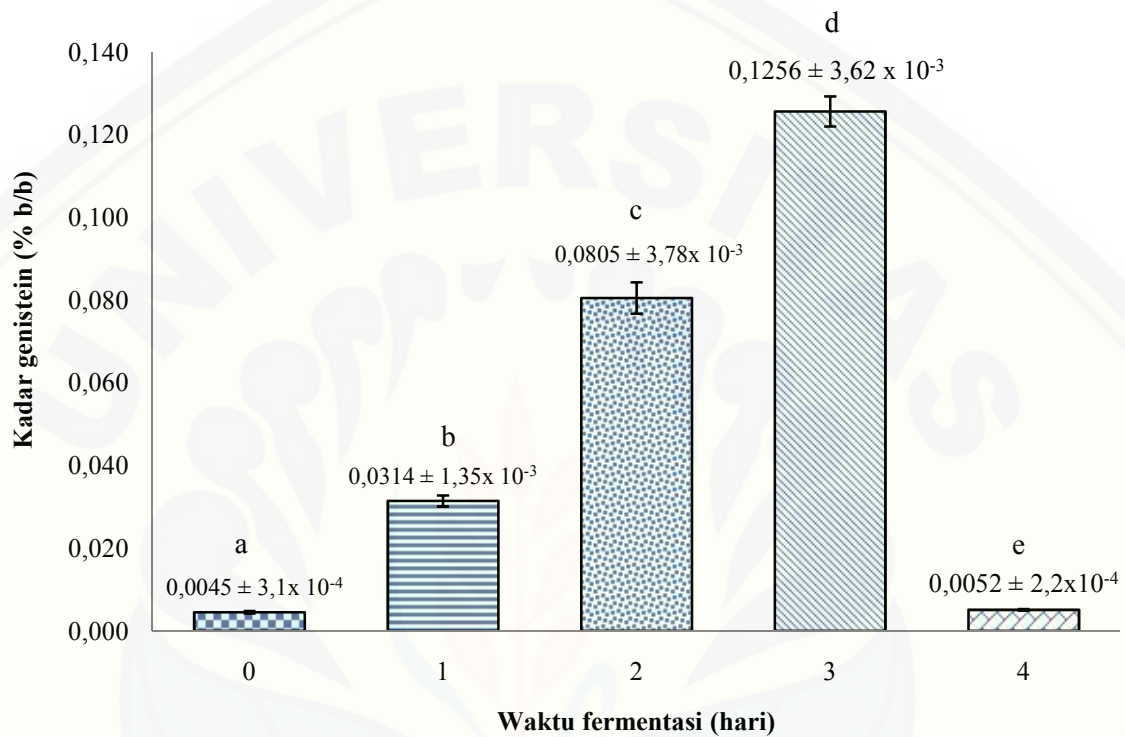
14,76 dan 18,775 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan kurva baku tersebut, diperoleh persamaan regresi sebagai berikut $Y = 38,78 x + 155,1$ dengan nilai $r = 0,991$. Persamaan kurva baku kedua digunakan untuk penetapan kadar genistein pada lempeng KLT kedua. Standar genistein yang digunakan memiliki konsentrasi sebesar 2,952; 9,840; 18,775; 29,520; dan 39,36 $\mu\text{g/ml}$. Persamaan kurva baku yang dihasilkan yaitu $Y = 27,16 x + 125,5$ dengan nilai $r = 0,999$. Perhitungan standar genistein yang digunakan dalam penetapan kadar dapat dilihat pada Lampiran A.4.

Berdasarkan persamaan kurva baku yang telah diperoleh, dilakukan penetapan kadar genistein dalam sampel kedelai non-fermentasi dan terfermentasi *A.oryzae*. Hasil penetapan kadar genistein pada sampel tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.3. Peningkatan kadar genistein kedelai terfermentasi *A.oryzae* hari 1, 2, 3 dan 4 dibandingkan kedelai non-fermentasi berturut-turut sebesar 6,98; 17,89; 27,91; dan 1,15 kali.

Data yang diperoleh dari penetapan kadar genistein kemudian dilakukan uji statistik. Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data telah terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$), setelah dilakukan proses transformasi. Berdasarkan hasil uji Anova, nilai signifikansi 0,00 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa paling tidak terdapat dua kelompok yang memiliki perbedaan bermakna kadar genistein akibat pengaruh fermentasi. Selanjutnya, dilakukan uji *post hoc* LSD untuk menunjukkan kelompok yang memiliki perbedaan secara bermakna. Hasil uji *post hoc* LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar genistein yang signifikan ($p < 0,05$) dari masing-masing kelompok sampel.

Adanya perbedaan kadar genistein pada kedelai terfermentasi hari ke 1 hingga 4 disebabkan oleh aktivitas enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh jamur *A.oryzae* selama proses fermentasi. Mekanisme enzim β -glukosidase dalam meningkatkan isoflavon aglikon (genistein, daidzein dan glisitein) adalah dengan melakukan transformasi isoflavon glikosida (genistin, daidzin dan glisitin) menjadi aglikon (genistein, daidzein dan glisitein) melalui proses deglikosilasi (Huynh *et al.*, 2014). Berdasarkan Gambar 4.5 dapat dilihat bahwa kadar genistein tertinggi dihasilkan oleh

sampel kedelai terfermentasi hari ke-3. Pada penelitian ini, kedelai terfermentasi hari ke 4 telah mengalami penurunan kadar genistein daripada kedelai terfermentasi hari ke 3.



Gambar 4.5. Kadar genistein pada masing-masing sampel. Data yang disajikan berupa nilai rata-rata kadar genistein \pm SD (% b/b) ($n=3$ untuk sampel H1,2,3; $n=4$ untuk sampel H0 dan H4). Perbedaan notasi huruf menunjukkan perbedaan yang signifikan. (LSD, $p < 0,05$)

Setyaningsih *et al.* (2006) menyebutkan bahwa produksi enzim β -glukosidase meningkat sejalan dengan pertumbuhan sel pada fase logaritmik karena berhubungan dengan metabolisme primer dalam sel. Selanjutnya telah terjadi penurunan aktivitas enzim β -glukosidase seiring dengan tercapainya fase stasioner yang sudah menunjukkan terjadinya kekurangan nutrisi yang mendukung pertumbuhan sel. Penyebab penurunan kadar genistein pada hari ke 4 tersebut dimungkinkan adanya

penurunan aktivitas enzim β -glukosidase yang terjadi pada fase stasioner *A. oryzae*. Selain itu, menurut Chang *et al.* (2014), selama proses fermentasi *A. oryzae* memiliki enzim sitokrom P450 yang dapat mengkatalisis genistein menjadi hidroksi genistein. Adanya penurunan kadar genistein pada hari fermentasi ke-4 kemungkinan dapat disebabkan juga oleh adanya konversi genistein menjadi hidroksi genistein.

Nam *et al.* (2011) menyebutkan bahwa kadar genistein kedelai terfermentasi oleh *A. oryzae* NL5 hari ke-1 hingga ke-6 meningkat sebesar 1,414; 2,302; 2,414; 3,391; 3,884; dan 1,06 kali dari kedelai non-fermentasi, sedangkan pada hari ke-7 mengalami penurunan sebesar 0,837 kali dari kedelai non-fermentasi. Menurut Punjaisee *et al.* (2011), kedelai terfermentasi *Aspergillus oryzae* BCC 3088 pada hari ke 4 masih menunjukkan peningkatan genistein yang signifikan ($p < 0,05$), yakni sebesar 5,2 kali dari kedelai non-fermentasi. Adanya perbedaan kadar genistein antara penelitian Nam *et al.*, 2011 dan Punjaisee *et al.*, 2011 dengan hasil penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jenis varietas kapang yang digunakan untuk fermentasi, dan varietas kedelai yang digunakan. Pada penelitian Nam *et al.* (2011), kedelai yang digunakan adalah kedelai varietas Aga 3 dan Daewon, Punjaisee *et al.* (2011) menggunakan jenis kedelai SJ.2, sedangkan pada penelitian ini menggunakan kedelai varietas Baluran.

Menurut Teekachunhatean *et al.* (2013) kadar isoflavon dalam kedelai bervariasi bergantung pada beberapa faktor yakni varietas, kualitas fisik biji, masa tanam, dan lokasi penanaman. Perbedaan varietas kedelai akan menghasilkan kadar isoflavon yang berbeda, hal ini dipengaruhi oleh genotip dari masing-masing varietas. Biji kedelai yang berukuran besar dan kompak memiliki kandungan isoflavon yang lebih besar daripada biji kedelai kecil, dan tidak kompak. Masa tanam yang menghasilkan kadar isoflavon tinggi adalah saat ditanam pada awal musim kemarau. Lokasi penanaman yaitu ditanam di dataran tinggi dan rendah menunjukkan adanya perbedaan kadar isoflavon, hal tersebut dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti suhu, nutrisi tanah, dan lain sebagainya.

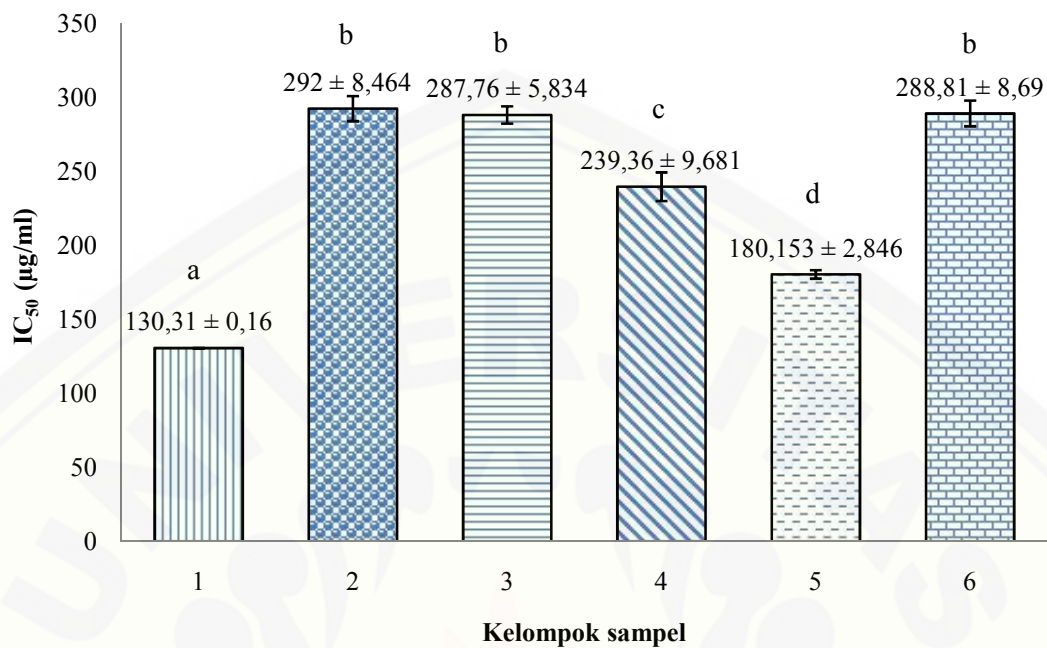
4.5 Hasil Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase

Tirosinase merupakan enzim utama yang berperan penting dalam biosintesis melanin, suatu pigmen warna pada kulit. Hambatan terhadap aktivitas enzim ini dapat menyebabkan terhambatnya proses pembentukan melanin, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai salah satu mekanisme bahan pemutih kulit (Chang, 2009). Metode spektrofotometri merupakan salah satu metode uji aktivitas hambatan tirosinase *in vitro* (Boyer, 1993).

Proses pengujian aktivitas hambatan tirosinase telah disesuaikan dengan kondisi laboratorium. Suhu inkubasi yang digunakan adalah suhu ruang $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suhu yang dianjurkan dalam pustaka sebesar $25\text{ }^{\circ}\text{C} - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$. pH dapar yang akan digunakan selalu diamati menggunakan pH meter. Larutan dapar yang digunakan adalah dapar fosfat pH 6,5. pH optimum reaksi katalisis tirosinase menurut pustaka berada pada kisaran 6,5 – 7,0 sehingga pada penelitian ini reaksi katalisis tirosinase berlangsung pada kondisi suhu dan pH yang telah sesuai dengan Boyer (1993).

Hasil penelitian pengujian hambatan tirosinase dinyatakan dalam IC_{50} . IC_{50} merupakan konsentrasi efektif yang dapat menghambat 50 % tirosinase. Nilai IC_{50} yang diperoleh dari standar genistein dan masing-masing sampel dapat dilihat dalam Gambar 4.6. Gambar 4.6 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas penghambatan tirosinase selama proses fermentasi. Nilai penghambatan tirosinase tertinggi dengan nilai IC_{50} terendah pada sampel fermentasi hari ke-3(H3) yakni pada konsentrasi $180,153 \pm 2,846\text{ }\mu\text{g/ml}$. Namun pada fermentasi hari ke-4 (H4) mengalami penurunan aktivitas penghambatan tirosinase. Jika dibandingkan dengan nilai IC_{50} genistein sebagai kontrol positif, aktivitas penghambatan tirosinase dari masing-masing ekstrak lebih rendah.

Berdasarkan hasil statistik menunjukkan bahwa data telah terdistribusi normal dan homogen, kemudian dilanjutkan dengan uji Anova yang menunjukkan nilai signifikansi 0,00 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa paling tidak terdapat dua kelompok yang memiliki perbedaan aktivitas hambatan tirosinase yang bermakna.



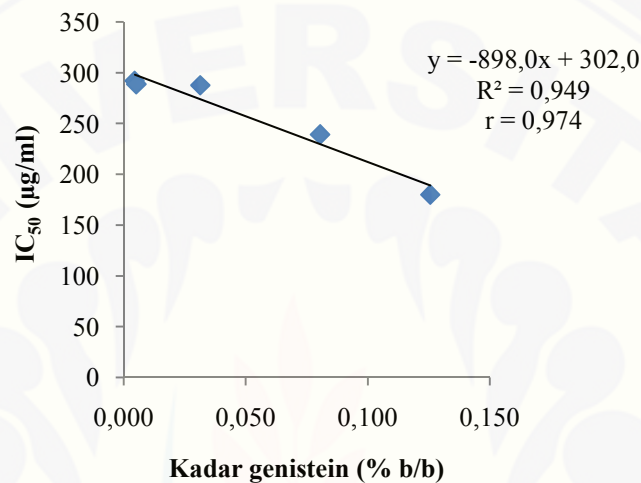
Gambar 4.6 Data nilai IC₅₀ aktivitas hambatan tirosinase kelompok standar genistein (1); sampel non-fermentasi (2); fermentasi H1 (3); fermentasi H2 (4); fermentasi H3 (5); fermentasi H4 (6). Data yang disajikan dalam bentuk rata-rata IC₅₀ ± SD (µg/ml) (n=3). Perbedaan notasi huruf menunjukkan perbedaan yang signifikan. (LSD, $p < 0,05$).

Selanjutnya, berdasarkan hasil uji *post hoc* LSD didapatkan bahwa tidak ada perbedaan aktivitas hambatan tirosinase yang bermakna pada sampel kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-1 (H1) dan ke-4 (H4) ($p > 0,05$). Sampel terfermentasi hari ke-2 (H2), ke-3 (H3) dan standar genistein menunjukkan hasil perbedaan aktivitas hambatan tirosinase yang bermakna ($p < 0,05$).

Kadar genistein dari masing-masing sampel dikorelasikan terhadap nilai IC₅₀ masing-masing sampel menggunakan persamaan regresi linier untuk mengetahui korelasi antara keduanya. Berdasarkan hasil korelasi, diperoleh persamaan regresi linier seperti Gambar 4.7.

Berdasarkan hasil dari regresi linier diketahui korelasi antara IC₅₀ (y) dan kadar genistein (x) mempunyai koefisien korelasi $r = 0,974$ ($y = - 898,8 x + 302,0$). Harga r tabel untuk taraf kesalahan 5 % dengan n=5 diperoleh 0,878 dan untuk taraf

kesalahan 1 % sebesar 0,958. Harga r hitung lebih besar dari r tabel baik untuk kesalahan 5 % maupun 1 % ($0,878 < 0,974 > 0,958$), maka dapat disimpulkan terdapat hubungan yang linier antara kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase kedelai.

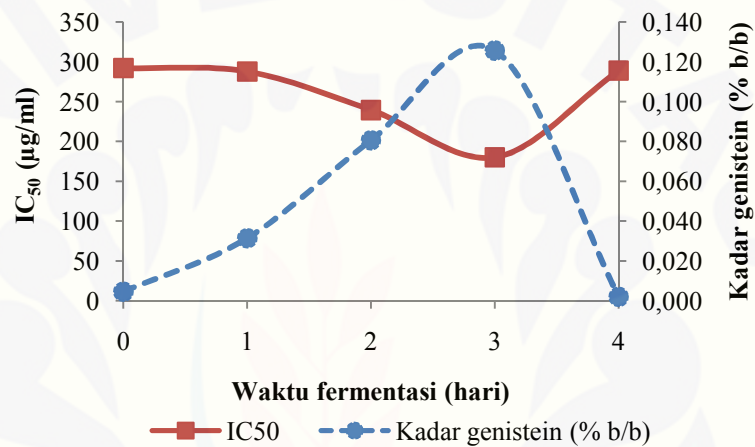


Gambar 4.7. Korelasi linier antara aktivitas hambatan tirosinase IC₅₀ (y) dan kadar genistein (x)

Nilai koefisien determinasi yang diperoleh melalui persamaan regresi $y = -898,0x + 302$ adalah $r^2 = 0,949$. Hal ini menunjukkan bahwa 94,9 % aktivitas hambatan tirosinase karena kontribusi senyawa genistein (Javanmardi *et al.*, 2003). Menurut Chang *et al.* (2005), aktivitas hambatan tirosinase tidak hanya ditentukan oleh senyawa genistein, namun juga berasal dari senyawa isoflavon aglikon daidzein, dan glisitein, maupun isoflavon glikosida.

Gambar 4.8 menjelaskan bahwa peningkatan dan penurunan kadar genistein diikuti pula dengan peningkatan dan penurunan aktivitas hambatan tirosinase. Chang *et al.* (2007) menyebutkan bahwa isoflavon aglikon memiliki aktivitas hambatan tirosinase yang lebih baik daripada senyawa glikosida. Hal ini disebabkan adanya gugus OH di cincin benzena pada isoflavon aglikon, sedangkan pada isoflavon

glikosida terdapat konjugat gula di cincin benzena yang dapat menurunkan aktivitas hambatan tirosinase. Gugus OH yang terdapat pada cincin benzen di struktur senyawa isoflavon dapat mengkhelat logam Cu^{2+} yang terdapat pada sisi aktif enzim tirosinase, sehingga kerja enzim tirosinase dapat terhambat (Kim *et al.*, 2006). Selama fermentasi terjadi peningkatan kadar isoflavon aglikon yang sebanding dengan aktivitas hambatan tirosinase (Chang *et al.*, 2007).



Gambar 4.8 Perbandingan antara kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase dari masing-masing sampel

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

- a. Proses fermentasi kedelai menggunakan *A. oryzae* dapat meningkatkan kadar genistein selama fermentasi hari ke 1,2, dan 3, sedangkan pada fermentasi hari ke-4 mengalami penurunan kadar genistein. Kadar genistein \pm SD kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke 1,2,3, dan 4 berturut-turut sebesar $0,0045 \pm 0,00031$; $0,0314 \pm 0,00135$; $0,0805 \pm 0,00378$; $0,1256 \pm 0,00362$; $0,0052 \pm 0,00022$ % (b/b).
- b. Fermentasi kedelai menggunakan *A. oryzae* dapat meningkatkan aktivitas hambatan tirosinase selama fermentasi hari ke 1,2, dan 3, sedangkan pada fermentasi hari ke-4 mengalami penurunan aktivitas hambatan tirosinase, yang sebanding dengan adanya peningkatan dan penurunan kadar genistein. Nilai $IC_{50} \pm$ SD kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke 1,2,3, dan 4 berturut-turut sebesar $292 \pm 8,464$; $287,76 \pm 5,834$; $239,36 \pm 9,681$; $180,153 \pm 2,846$; $288,81 \pm 8,69$ μ g/ml.

5.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan berdasarkan penelitian ini adalah:

- a. Perlu penelitian lanjutan untuk menganalisis jenis dan jumlah masing-masing isoflavon pada kedelai Baluran terfermentasi *A. oryzae*.
- b. Perlu dilakukan penelitian lanjutan fermentasi kedelai menggunakan kombinasi kapang, untuk mengetahui pengaruh kombinasi kapang terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase.

DAFTAR PUSTAKA

- Bandem, A. W. 2013. Analisis pemilihan terapi kelainan kulit hiperpigmentasi. *Medicinus*. 26(2): 47-52.
- Barbesgaard, P., Hheldt-Hansen, H., dan Diderichsen, B. 1992. On the safety of *Aspergillus oryzae* : a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36 : 569–572.
- Batubara, I., Darusma, L. K., Mitsunaga, T., Rahminiwati, M., dan Djauhari, E. 2010. Indonesian medical plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. *Journal of Biological Sciences*. 10(2): 138–144.
- Besral. 2010. *Pengolahan dan analisis data-I menggunakan SPSS*. Depok: Universitas Indonesia.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., dan Holden, J. M. 2008. USDA Database for the isoflavone content of selected foods, Release 2.0. U.S. *Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory*. Available from: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/isoflav> [Accessed : 19 Januari 2015].
- Boyer, R.F. 1993. *Modern experimental biochemistry*. 2nd edition. California ; The Benjamin/ Cumming Publishing Co.
- BPOM, 2007. Kenalilah kosmetik anda, sebelum menggunakannya. *Info POM*. 8(4) : 4 - 5. Edisi Juli 2007. Jakarta. Available from: http://BPOM.org/index2.php?option=com_content&do=1&id=56 [Accessed : 18 Januari 2015].
- Chae, G. Y., dan Ha, B. J. 2011. The comparative evaluation of fermented and non-fermented soybean extract on antioxidation and whitening. *Toxicology Research*. 27 (40): 205–209.
- Chan, C. F. 2014. Fermented broth in tyrosinase and melanogenesis Inhibition. *Molecules*. 19 : 13122-13135.
- Chang, T. S. 2014. Isolation, bioactivity, and production of *ortho*-hydroxydaidzein and *ortho*-hydroxygenistein. *International Journal of Molecular Science*. 15(2014): 5699-5716.

- Chang, T. S., Ding, H. Y., dan 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., dan Wu, C.Y. 2007. Mushroom tyrosinase inhibitor effects of isoflavone isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. *Food Chemistry*. 105 (2007): 1430–1438.
- Chang, T. S. 2012a. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials*. 5: 1661–1685.
- Chang, T. S. 2009. An update review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 10: 2440-2475.
- Chang, T. M. 2012b. Tyrosinase and tyrosinase inhibitors. *Journal of Biocatalysis and Biotransformation*. 1-2.
- Chonkeeree, A. 2013. Antioxidant activity and total phenolic content of dried fermented-soybean products fermented with *Bacillus subtilis* and LAB : potential for functional food application. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*. 58 (4):16–21.
- Dewi, E. N. A. 2015. “Pengaruh perbedaan metode ekstraksi terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase edamame (*Glycine max*) *in vitro*”. Belum Diterbitkan. Skripsi. Jember: Universitas Jember
- Dhaubhadel, S. 2011. *Regulation of isoflavonoid biosynthesis in soybean seeds*. Kanada : Southern crop protection and food research center. 243-258.
- Dinas Pertanian Tanaman Pangan Provinsi Kalimantan Timur. 2002. URL: www.kaltimprov.disperten.go.id. [diakses tanggal 3 Februari 2015].
- Dixit, A.K., Antony, J.I.X., Sharma, N.K., dan Tiwari, R.K. 2011. Soybean constituents and their functional benefits. *Research Signpost*. 37 (2) : 367–383.
- Ebanks, J. P., Wickett, R. R., dan Boissy, R. E. 2009. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. *International Journal of Molecular Sciences*. 10: 4066–4087.
- Elbashiti, T., Amal, F., dan Abboud, E. 2010. Isolation and identification of *Aspergillus oryzae* and the production of soy sauce with new aroma. *Pakistan Journal of Nutrition*. 9 (12): 1171-1175.

- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi pangan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama
- Gandjar, I., Robert, A.S., Karin, V.D., Ariyanti, O., dan Iman, S. 1999. *Pengenalan kapang topik umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Genovese, M. I., Davila, J., dan Lajolo, F. M. 2006. Isoflavones in processed soybean products from Ecuador. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49 (5): 853-859.
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi dasar dalam praktek*. Jakarta : PT Gramedia Pustaka Utama.
- Hakamatsuka, T., Mori, K., Ishida, S., Ebizuka, Y., dan Sankawa, U. 1998. Purification of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase from the cell culture of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry*. 49 (2): 497-505.
- Hansen, P. J. 2000. *Use of a hemacytometer*. University of Florida: PJ Hansen Laboratory.
- Harborne, J.B dan Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55 (6):481-504.
- Hastiono, S. 2014. *Hikmah hidup bersama kapang*. Jakarta : Departemen Pertanian
- Hidayat, N., Padaga, M.C., dan Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi industri*. Yogyakarta : Penerbit ANDI.
- Hui, M., Tiansheng, Q., dan Hai, Z. 2005. Methods for extracting, separating, identifying and quantifying daidzein and genistein. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*. 03. Abstract from: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-YYHS200503007.htm [15 Januari 2015].
- Huynh, N.T., Camp, J.V., Smagghe, G., dan Raes, K. 2014. Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes : A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 15 : 19369-19388.
- Irmanida, B., dan Adfa, M. 2013. Potensi daun kayu bawang (*Protium javanicum*) sebagai penghambat kerja enzim tirosinase. *Sains & Matematika*. 1 (2): 52–56.
- Ito, S., dan Wakamatsu, K. 2003. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 16: 523–531.

- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., dan Vivanco, J.M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*. 83: 547-550.
- Jayanti, D., Wuryanti, dan Taslimah. 2013. Isolasi, karakterisasi, dan amobilisasi α -amilase dari *Aspergillus oryzae* FNCC 6004. *Journal of Chemistry Information*. 1(1): 76-84.
- Khan, I., dan Akhtar, M. W. 2010. The biotechnological perspective of beta-glukosidases. *Nature Precedings*. 4945 (1): 1–8.
- Kim, D., Park, J., Kim, J., Han, C., Yoon, J., Kim, N., Seo, J., dan Lee, C. 2009. Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: a fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (3): 935–941.
- Kuo, L. C., dan Lee, K. T. 2008. Cloning, expression, and characterization of two β -glukosidases from isoflavone glycoside-hydrolyzing *Bacillus subtilis* natto. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (1): 119–125.
- Lee, I. H., dan Chou, C. C. 2006. Distribution profiles of isoflavone isomers in black bean kojis prepared with various filamentous fungi. *Journal of Agriculture Chemistry*. 54 (4): 1309–1314.
- Lee, I. H., Hung, Y. H., dan Chou, C. C. 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and antocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology*. 121 (2008): 150–156.
- Lee, S. H., Seo, M. H., dan Oh, D. K. 2013. Deglycosylation of isoflavone in isoflavone-rich soy germ flour by *Aspergillus oryzae* KACC 40247. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 61(49) : 12101-121010.
- Lei, V., Awua, W. K. A. A., dan Brimer, L. 1999. Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 53 (2-3): 169-184.
- Luthria, D. L., Biswas, R., dan Natarajan, S. 2007. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isolavones from soybean. *Food Chemistry*. 105 (2007): 325-333.
- Machida, M., Yamada, O., dan Gomi, K. 2008. Genomics of *Aspergillus oryzae* : learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Research*. 15 (4): 173–183.

- Marotti, I., Bonetti, A., Biavati, B., Catizone, P., dan Dinelli, G. 2007. Biotransformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flavonoid glycosides by bifidobacterium species from human intestinal origin. *Journal Agriculture of Food Chemistry*. 55(10):9-13.
- Mujic, I., Sertovic, E., Jokic, S., Saric, Z., Alibabic, V., Vidovic, S., dan Zivkovic, J. 2011. Isoflavone content and antioxidant properties of soybean seeds. *Croatian Journal Food Science and Technology*. 3 (1): 16-20.
- Murray, R.K., Granner, D.K., dan Rodwell, V.W. 2006. *Biokimia Harper*. Edisi 27. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Nam, D.H., Kim, H.J., Lim, J.S., Kim, K.H., Park, C.S., Kim, J.H., Lim, J., Kwon, D.Y., Kim, I.H., dan Kim, J.S. 2011. Simultaneous enhancement of free isoflavone content and antioxidant potential of soybean by fermentation with *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Science*. 76(8):194-200.
- Nerya, O., Vaya, J., Musa, R., Izrael, S., Ben-Arie, R., dan Tamir, S. 2003. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 51 (5): 1201-1207.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi penelitian kesehatan*. Jakarta : PT Rineka Cipta.
- O'Neil, M. J.(Ed). 2001. *The merck index; An encyclopedia of chemicals, drugs, and biological*. (Edisi Ketiga belas) . Whitehouse Station; Merck.
- Onozawa, M., Fukuda, K., Ohtani, M., Akaza, H., Sugimura, T., dan Wakabayashi, K. 1998. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Japan Journal Clinical of Oncology*. 28(6): 360-363.
- Oyetade, O.A., Oyeleke, G.O., Adegoke, B.M., dan Akintude, A.O. 2012. Stability studies on ascorbic acid (vitamin C) from different sources. *International Organization of Scientific Research*. 2 (4) : 20–24.
- Pandit, N. T., dan Patravale, V. B. 2011. Design and optimization of a novel method for extraction of genistein. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 73 (2): 184-192.
- Park, J.S., Kim, D.H., Lee, J.K., Lee, J.Y., Kim, D.H., Kim, H.K., Lee, H.J., dan Kim, H.C. 2010. Natural ortho-dihydroxyisoflavone derivatives from aged Korean fermented soybean paste as potent tyrosinase and melanin formation inhibitors. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* . 20 (2010): 1162–1164.
- Pilsakova, L., Riecanaky, I., dan Jagla, F. 2010. The Physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiology Research*. 59 : 651–664.

- Preedy, V. R. 2013. *Isoflavones: chemistry, analysis, function and effects*. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry.
- Punjaisee, C., Visessanguan, W., Punjaisee, S., dan Chaiyasut, C. 2011. Screening of potential *aspergillus* spp. for production of fermented soybean with high antioxidative activity. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*. 10 (2): 197-212.
- Purwono. 2008. *Budidaya 8 jenis tanaman pangan unggul*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Rahman, L., Warnida, H., dan Djide, N. 2012. Pengaruh fermentasi sari kedelai dengan *Lactobacillus* sp. Terhadap kadar dan profil kromatografi lapis tipis genistein serta formulasinya dalam granul efervesen. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 10(2):126-131.
- Rao, G. V., Mukhopadhyay, T., dan Radhakrishnan, N. 2010. Artoindonesianin F, a potent tyrosinase inhibitor from the roots of *Artocarpus heterophyllus* Lam. *Indian Journal of Chemistry*. 49B: 1264–1266.
- Rostagno, M. A., Palma, M., dan Barroso, C. G. 2004. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta*. 522 (2004): 169 – 177.
- Setyaningsih, D., Tresnawati, K., Soehartono, M.T., dan Apriyantono, A. 2006. Pengaruh aktivitas β -glukosidase eksternal dari kapang terhadap kadar vanilin buah vanili. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. 16(1):28-35.
- Silva, L. H.D., Celeghini, R. M. S., dan Chang, Y. K. 2011. Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. *Food Chemistry*. 128 (3): 640–644.
- Smit, N., Vicanova, J., dan Pavel, S. 2009. The hunt for natural skin whitening agents. *International Journal Molecules Science*. 10 : 5326–5349.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., dan Hall S. J. 2003. *Principles of fermentation technology second edition*. Great Britain: MPG Books Ltd. Bodmin, Cornwall.
- Suprihatin. 2010. *Teknologi fermentasi*. Surabaya : Penerbit UNESA.
- Takizawa, T., Mitsumori, K., Tamura, T., Nasu, M., Ueda, M., Imai, T., dan Hirose, M. 2003. Hepatocellular tumor induction in heterozygous p53-deficient CBA mice by a 26-week dietary administration of kojic acid. *Toxicology Sciences*. 73(2):287-293.

- Teekachunhatean, S., Hanprasertpong, N., dan Teekachunhatean, T. 2013. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds grown in Thailand. *International Journal of Agronomy*. 2013 (163573): 1–11.
- Tim QC APH Golongan Jamur. 2009. *Modul quality control (QC) APH golongan jamur*. Surabaya: Balai Besar Pembenihan dan Proteksi Tanaman perkebunan (BPPTP).
- Tranggono, R. I., dan Latifah, F. 2007. *Buku pegangan ilmu pengetahuan kosmetik*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Umum.
- Uniprot. 2002. URL: www.uniprot.org. [diakses tanggal 3 Februari 2015]
- USDA. 2003. URL: www.plants.usda.gov. [diakses tanggal 22 September 2014].
- Waluyo, L. 2005. *Mikrobiologi umum*. Malang: UMM Press.
- Warrington, J.C., dan Saville, B.A. 1999. Tyrosinase inactivation in organic solvent. *Biotechnology and Bioengineering*. 65 (3) : 325–333.
- Widyaningsih, D. 2012. *Pengaruh atribut produk terhadap sikap konsumen muda dalam menggunakan pemutih wajah pond's white beauty*. Skripsi : Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Yogyakarta.
- Yamakoshi, J., Piskula, M.K., Izumi, T., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Obata, A., dan Kikuchi, M. 2000. Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *Journal Nutrition*. 130 (8): 1887–1893.
- Yuan, D., Chen, Y., Bai, X., Pan, Y., dan Kano, Y. 2006. TLC and HPLC analysis of soy isoflavones in semen sojae praeparatum. *Asian Journal of Traditional Medicines*. 1 (2006): 3–4.
- Zia, U.H.M., Landa, P., Kutil, Z., Qayum, M., dan Ahmad, S. 2003. Evaluation of anti-inflammatory activity of selected legumes. *Pakistan Journal Pharmaceutical Sciences*. 26 (1): 185–187.

LAMPIRAN**A. PERHITUNGAN**

1. Perhitungan kepadatan suspensi spora *A. oryzae*

Jumlah spora pada kotak hitung 1 = 10 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 2 = 9 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 3 = 16 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 4 = 10 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 5 = 13 spora

Rata-rata jumlah spora = 11,6 spora

Perhitungan kepadatan spora/ml (S)

$$S = \frac{11,6}{0,1 \times 0,2 \times 0,1} \times 10^3$$

$$S = 5,8 \cdot 10^6/\text{ml}$$

2. Pengenceran suspensi spora

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

$$5,8 \cdot 10^6 \cdot 10 \text{ ml} = 10^6 \cdot V2$$

V2 = 58 ml, maka akuades yang ditambahkan sebesar 48 ml

3. Perhitungan Rendemen Ekstrak

Volume etanol 70 % yang dibutuhkan = 900 ml

- a. Kedelai non-fermentasi

Bobot serbuk kering = 50,4 gram

Ekstrak kental = 8,45 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu

$$= \frac{8,45 \text{ gram}}{50,04 \text{ gram}} \times 100 \% = 16,886 \%$$

b. Kedelai terfermentasi hari ke-1

Bobot serbuk kering = 50 gram

Ekstrak kental = 7,82 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu

$$= \frac{7,82 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100 \% = 15,64 \%$$

c. Kedelai terfermentasi hari ke-2

Bobot serbuk kering = 50 gram

Ekstrak kental = 8,15 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu

$$= \frac{8,15 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100 \% = 16,3 \%$$

d. Kedelai terfermentasi hari ke-3

Bobot serbuk kering = 50 gram

Ekstrak kental = 8,50 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu

$$= \frac{8,50 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100 \% = 17 \%$$

e. Kedelai terfermentasi hari ke-4

Bobot serbuk kering = 50,03 gram

Ekstrak kental = 8,23 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu

$$= \frac{8,23 \text{ gram}}{50,03 \text{ gram}} \times 100 \% = 16,45 \%$$

4. Pembuatan Larutan Baku

a. Larutan Baku Induk

- i. Ditimbang 3,755 mg genistein dan dilarutkan dalam 10 ml metanol

$$\frac{3,755 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 375,5 \mu\text{g/ml}$$

Jadi diperoleh larutan baku induk 375,5 $\mu\text{g/ml}$

- Ditimbang 4,92 mg genistein dan dilarutkan dalam 10 ml metanol

$$\frac{4,92 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 492 \mu\text{g/ml}$$

Jadi diperoleh larutan baku induk 492 $\mu\text{g/ml}$

b. Pembuatan larutan baku

- i. Larutan baku konsentrasi 4,92
- $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{0,1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 492 \mu\text{g/ml} = 4,92 \mu\text{g/ml}$$

- ii. Larutan baku konsentrasi 0,984
- $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 4,92 \mu\text{g/ml} = 0,984 \mu\text{g/ml}$$

- iii. Larutan baku konsentrasi 2,952
- $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{3 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 4,92 \mu\text{g/ml} = 2,952 \mu\text{g/ml}$$

- iv. Larutan baku konsentrasi 9,84
- $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{0,2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 492 \mu\text{g/ml} = 9,84 \mu\text{g/ml}$$

- v. Larutan baku konsentrasi 14,76
- $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{0,3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 492 \mu\text{g/ml} = 14,76 \mu\text{g/ml}$$

- vi. Larutan baku konsentrasi 18,775
- $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 375,5 \mu\text{g/ml} = 18,775 \mu\text{g/ml}$$

- vii. Larutan baku konsentrasi 29,52
- $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{0,6 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 492 \mu\text{g/ml} = 29,52 \mu\text{g/ml}$$

viii. Larutan baku konsentrasi 39,36 $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{0,8 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 492 \text{ } \mu\text{g/ml} = 39,36 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

5. Pembuatan Larutan Sampel

a. Sampel kedelai non-fermentasi

i. Replikasi 1

$$\frac{150,4 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 30080 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

ii. Replikasi 2

$$\frac{149,5 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 29900 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

iii. Replikasi 3

$$\frac{151,6 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 30320 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

iv. Replikasi 4

$$\frac{151,5 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 30300 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

b. Sampel kedelai fermentasi hari ke-1

i. Replikasi 1

$$\frac{115,2 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 11520 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

ii. Replikasi 2

$$\frac{100,8 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 10080 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

iii. Replikasi 3

$$\frac{100,3 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 10030 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

c. Sampel kedelai fermentasi hari ke-2

i. Replikasi 1

$$\frac{55,9 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5590 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

ii. Replikasi 2

$$\frac{52,8 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5280 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

iii. Replikasi 3

$$\frac{50,5 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5050 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

d. Sampel kedelai fermentasi hari ke-3

i. Replikasi 1

$$\frac{51,7 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5170 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

ii. Replikasi 2

$$\frac{52,4 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5240 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

iii. Replikasi 3

$$\frac{50,9 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5090 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

e. Sampel kedelai fermentasi hari ke-4

i. Replikasi 1

$$\frac{151,1 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 30220 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

ii. Replikasi 2

$$\frac{151,5 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 30300 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

iii. Replikasi 3

$$\frac{150,8 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 30160 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

iv. Replikasi 4

$$\frac{150 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 30000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

6. Pembuatan fase gerak

- a. Fase gerak = toluen : etil asetat : aseton : asam format (20 : 4 : 2 : 1)

(Yuan *et al.*, 2006) dibuat sebanyak 20 ml

- b. Perhitungan masing-masing komposisi fase gerak

$$\text{Toluen} = \frac{20}{27} \times 20 \text{ ml} = 15 \text{ ml}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{4}{27} \times 20 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$$

$$\text{Aseton} = \frac{2}{27} \times 20 \text{ ml} = 1,5 \text{ ml}$$

$$\text{Asam format} = \frac{1}{27} \times 20 \text{ ml} = 0,74 \text{ ml}$$

7. Penetapan Kadar

- a. Standar pada lempeng pertama

	Rf	Massa (ng)	Area
Standar 0,984 $\mu\text{g/ml}$	0,36	1,968	163,62
Standar 0,984 $\mu\text{g/ml}$	0,35	1,968	199,87
Standar 2,952 $\mu\text{g/ml}$	0,35	5,904	392,64
Standar 4,92 $\mu\text{g/ml}$	0,35	9,840	674,76
Standar 9,84 $\mu\text{g/ml}$	0,35	19,68	872,05
Standar 14,76 $\mu\text{g/ml}$	0,35	29,52	1331,61
Standar 18,775 $\mu\text{g/ml}$	0,35	37,55	1577,85

Persamaan regresi : $Y = 38,78X + 155,1$ $r = 0,999$

b. Sampel non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-4

Sampel	Replikasi	Rf	Area
Non-fermentasi	1	0,34	474,52
	2	0,34	438,72
	3	0,34	487,45
	4	0,34	489,1
Fermentasi hari ke-4	1	0,33	537,35
	2	0,33	529,03
	3	0,33	512,19
	4	0,33	500,07

c. Perhitungan Kadar

i. Sampel Non-fermentasi

Replikasi 1

$$Y = 38,78X + 155,1$$

$$474,52 = 38,78X + 155,1$$

$$X = 8,238 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} = \frac{8,238 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l}$$

$$= 0,00687 \text{ mg}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 150,4 \text{ mg}$$

$$\text{Kadar genistein (\% b/b)} = \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,00687 \text{ mg}}{150,4 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,00456 \%$$

Replikasi 2

$$Y = 38,78X + 155,1$$

$$438,72 = 38,78X + 155,1$$

$$X = 7,315 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} = \frac{7,315 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l}$$

$$= 0,00610 \text{ mg}$$

Penimbangan ekstrak = 149,5 mg

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00610 \text{ mg}}{149,5 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,00408 \% \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$Y = 38,78 X + 155,1$$

$$487,45 = 38,78X + 155,1$$

$$X = 8,572 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} &= \frac{8,572 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ &= 0,00714 \text{ mg} \end{aligned}$$

Penimbangan ekstrak = 151,5 mg

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00714 \text{ mg}}{151,5 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,00472 \% \end{aligned}$$

Replikasi 4

$$Y = 38,78 X + 155,1$$

$$489,1 = 38,78X + 155,1$$

$$X = 8,614 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} &= \frac{8,614 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ &= 0,00718 \text{ mg} \end{aligned}$$

Penimbangan ekstrak = 151,6 mg

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00718 \text{ mg}}{151,6 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,00474 \% \end{aligned}$$

$$\text{Kadar genistein rata-rata} = \frac{0,00456+0,00408+0,00472+0,00474}{4} \times 100 \% \\ = 0,00452 \%$$

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{(0,00456-0,00452)^2 + (0,00408-0,00452)^2 + (0,00472-0,00452)^2 + (0,00474-0,00452)^2}{4-1}} \\ = 0,00031$$

$$\text{CV} = \frac{\text{SD}}{\% \text{ b/b}} \times 100 \% \\ = \frac{0,00031}{0,00452} \times 100 \% = 6,78 \%$$

ii. Sampel fermentasi hari ke-4

Replikasi 1

$$Y = 38,78X + 155,1$$

$$537,35 = 38,78X + 155,1$$

$$X = 9,859 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} = \frac{9,859 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ = 0,00882 \text{ mg}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 151,1 \text{ mg}$$

$$\text{Kadar genistein (\% b/b)} = \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ = \frac{0,00882 \text{ mg}}{151,1 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,00544 \%$$

Replikasi 2

$$Y = 38,78X + 155,1$$

$$529,03 = 38,78X + 155,1$$

$$X = 9,644 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} = \frac{9,644 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ = 0,00804 \text{ mg}$$

Penimbangan ekstrak = 151,5 mg

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00804 \text{ mg}}{151,5 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,00530 \% \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$Y = 38,78X + 155,1$$

$$512,19 = 38,78X + 155,1$$

$$X = 9,210 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} &= \frac{9,210 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ &= 0,00768 \text{ mg} \end{aligned}$$

Penimbangan ekstrak = 150,8 mg

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00768 \text{ mg}}{150,8 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,00509 \% \end{aligned}$$

Replikasi 4

$$Y = 38,78X + 155,1$$

$$500,73 = 38,78X + 155,1$$

$$X = 8,914 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} &= \frac{8,914 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ &= 0,00743 \text{ mg} \end{aligned}$$

Penimbangan ekstrak = 150 mg

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00743 \text{ mg}}{150 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,00495 \% \end{aligned}$$

$$\text{Kadar genistein rata-rata} = \frac{0,00544 + 0,00530 + 0,00509 + 0,00495}{4} \times 100 \% = 0,00520 \%$$

$$SD = \sqrt{\frac{(0,00544-0,00520)^2 + (0,00530-0,00520)^2 + (0,00509-0,00520)^2 + (0,00495-0,00520)^2}{4-1}}$$

$$= 0,00022$$

$$CV = \frac{SD}{\% b/b} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,00022}{0,00520} \times 100 \% = 4,17 \%$$

d. Standar pada lempeng kedua

	Rf	Massa (ng)	Area
Standar 2,952 µg/ml	0,40	5,904	303,85
Standar 9,84 µg/ml	0,39	19,68	626,00
Standar 18,775 µg/ml	0,39	37,55	1138,89
Standar 29,520 µg/ml	0,39	59,04	1773,92
Standar 39,36 µg/ml	0,39	78,72	2240,44

Persamaan regresi : $Y = 27,16 X + 125,5$

$$r = 0,999$$

e. Sampel terfermentasi hari ke-1,2 dan 3

Sampel	Replikasi	Rf	Area
Fermentasi hari ke-1	1	0,39	744,12
	2	0,39	630,35
	3	0,39	624,45
Fermentasi hari ke-2	1	0,40	889,77
	2	0,39	824,04
	3	0,39	754,42
Fermentasi hari ke-3	1	0,40	1204,30
	2	0,40	1212,92
	3	0,40	1132,93

f. Perhitungan kadar

i. Sampel fermentasi hari ke-1

Replikasi 1

$$Y = 27,16 X + 125,5$$

$$744,12 = 27,16 X + 125,5$$

$$X = 22,773 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 10 \text{ ml} &= \frac{22,773 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} \\ &= 0,038 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 115,2 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,038 \text{ mg}}{115,2 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,0329 \% \end{aligned}$$

Replikasi 2

$$Y = 27,16 X + 125,5$$

$$630,35 = 27,16 X + 125,5$$

$$X = 18,584 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 10 \text{ ml} &= \frac{18,584 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} \\ &= 0,031 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 100,8 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,031 \text{ mg}}{100,8 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,0307 \% \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$Y = 27,16 X + 125,5$$

$$624,45 = 27,16 X + 125,5$$

$$X = 18,367 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 10 \text{ ml} &= \frac{18,367 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} \\ &= 0,031 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 100,3 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,031 \text{ mg}}{100,3 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,0305 \% \end{aligned}$$

$$\text{Kadar genistein rata-rata} = \frac{0,0329+0,0307+0,0305}{3} \times 100 \% = 0,0314 \%$$

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \sqrt{\frac{(0,0329-0,0314)^2 + (0,0307-0,0314)^2 + (0,0305-0,0314)^2}{3-1}} \\ &= 0,00135 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CV} &= \frac{\text{SD}}{\% \text{ b/b}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00135}{0,0305} \times 100 \% = 4,285 \% \end{aligned}$$

ii. Sampel fermentasi hari ke-2

Replikasi 1

$$Y = 27,16 X + 125,5$$

$$889,77 = 27,16 X + 125,5$$

$$X = 28,136 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 10 \text{ ml} &= \frac{28,136 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} \\ &= 0,047 \text{ mg} \end{aligned}$$

Penimbangan ekstrak = 55,9 mg

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,047 \text{ mg}}{55,9 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,0839 \% \end{aligned}$$

Replikasi 2

$$Y = 27,16 X + 125,5$$

$$824,04 = 27,16 X + 125,5$$

$$X = 25,716 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam 10 ml} &= \frac{25,716 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} \\ &= 0,043 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 52,8 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,043 \text{ mg}}{52,8 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,0812 \% \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$Y = 27,16 X + 125,5$$

$$754,42 = 27,16 X + 125,5$$

$$X = 23,152 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam 10 ml} &= \frac{22,152 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} \\ &= 0,039 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 50,5 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,039 \text{ mg}}{50,5 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,0764 \% \end{aligned}$$

$$\text{Kadar genistein rata-rata} = \frac{0,0839+0,0812+0,0764}{3} \times 100 \% = 0,0805 \%$$

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \sqrt{\frac{(0,0839-0,0805)^2 + (0,0812-0,0805)^2 + (0,0764-0,0805)^2}{3-1}} \\ &= 0,00378 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CV} &= \frac{\text{SD}}{\% \text{ b/b}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00378}{0,0805} \times 100 \% = 4,7023 \% \end{aligned}$$

iii. Sampel fermentasi hari ke-3

Replikasi 1

$$Y = 27,16 X + 125,5$$

$$1204,3 = 27,16 X + 125,5$$

$$X = 39,716 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 10 \text{ ml} &= \frac{39,716 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} \\ &= 0,066 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 51,7 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,066 \text{ mg}}{51,7 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,128 \% \end{aligned}$$

Replikasi 2

$$Y = 27,16 X + 125,5$$

$$1212,92 = 27,16 X + 125,5$$

$$X = 40,034 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 10 \text{ ml} &= \frac{40,034 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} \\ &= 0,067 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 52,4 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,067 \text{ mg}}{52,4 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,127 \% \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$Y = 27,16 X + 125,5$$

$$1132,93 = 27,16 X + 125,5$$

$$X = 37,089 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 10 \text{ ml} &= \frac{37,089 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 10000 \mu\text{l} \\ &= 0,062 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 50,9 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (\% b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,062 \text{ mg}}{50,9 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,121 \% \end{aligned}$$

$$\text{Kadar genistein rata-rata} = \frac{0,128+0,127+0,121}{3} \times 100 \% = 0,1256 \%$$

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \sqrt{\frac{(0,128-0,1256)^2 + (0,127-0,1256)^2 + (0,121-0,1256)^2}{3-1}} \\ &= 0,00362 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CV} &= \frac{\text{SD}}{\% \text{ b/b}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00362}{0,1256} \times 100 \% = 2,882 \end{aligned}$$

8. Pembuatan dapar fosfat pH 6,5

- Pembuatan KH_2PO_4 0,2 M

$$M = \frac{\text{massa (gr)}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{v}$$

$$0,2 \text{ M} = \frac{\text{massa (gr)}}{136,09} \times \frac{1000}{250}$$

$$\text{Massa} = 6,8045 \text{ gram}$$

- Pembuatan NaOH 0,2 N

$$N = \frac{\text{massa (gr)}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{v} \times e$$

$$0,2 = \frac{\text{massa (gr)}}{40} \times \frac{1000}{50} \times 1$$

$$\text{Massa} = 0,4 \text{ gram}$$

- Untuk membuat 500 ml dapar fosfat pH 6,5 dengan cara menambahkan 125 ml KH_2PO_4 0,2 M dan 31,5 ml NaOH 0,2 N, kemudian ditambah akuades hingga 500 ml, dan dilakukan penambahan basa hingga diperoleh pH 6,5.

9. Pembuatan substrat L-tirosin 1 mM

$$M = \frac{\text{massa (gr)}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{v}$$

$$1 \text{ mM} = \frac{\text{massa (mg)}}{181,19} \times \frac{1000}{25}$$

$$\text{Massa} = 4,53 \text{ mg}$$

10. Pembuatan standar genistein uji aktivitas hambatan tirosinase

Pembuatan larutan standar genistein induk 578,5 ppm:

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

Pembuatan larutan standar uji:

- Larutan standar genistein 80,99 ppm

$$\frac{0,14 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times 578,5 \text{ } \mu\text{g/ml} = 80,99 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 92,56 ppm

$$\frac{0,16 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times 578,5 \text{ } \mu\text{g/ml} = 92,56 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 104,13 ppm

$$\frac{0,18 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times 578,5 \text{ } \mu\text{g/ml} = 104,13 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 115,7 ppm

$$\frac{0,20 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times 578,5 \text{ } \mu\text{g/ml} = 115,7 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 127,27 ppm

$$\frac{0,22 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times 578,5 \text{ } \mu\text{g/ml} = 127,27 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 138,84 ppm

$$\frac{0,24 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times 578,5 \text{ } \mu\text{g/ml} = 138,84 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 150,41 ppm

$$\frac{0,26 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times 578,5 \text{ } \mu\text{g/ml} = 150,41 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 161,98 ppm

$$\frac{0,28 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times 578,5 \text{ } \mu\text{g/ml} = 161,98 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 173,55 ppm

$$\frac{0,3 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times 578,5 \text{ } \mu\text{g/ml} = 173,55 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

11. Pembuatan sampel uji aktivitas hambatan tirosinase

Penimbangan sampel

Sampel	Replikasi	Penimbangan 1	Penimbangan 2
Non-fermentasi	1	22,6 mg	15,4 mg
	2	22,5 mg	15,5 mg
	3	22,5 mg	15,4 mg
Fermentasi hari ke-1	1	21,7 mg	16,2 mg
	2	20 mg	15,5 mg
	3	20,8 mg	16,5 mg
Fermentasi hari ke-2	1	22,8 mg	15,2 mg
	2	22 mg	15 mg
	3	21,4 mg	15,5 mg
Fermentasi hari ke-3	1	21,3 mg	17,4 mg
	2	21,1 mg	17 mg
	3	21 mg	17,1 mg
Fermentasi hari ke-4	1	22,2 mg	15,3 mg
	2	22,2 mg	15,3 mg
	3	21,9 mg	15 mg

Contoh perhitungan :

Pembuatan larutan sampel induk:

$$\text{Larutan sampel induk 1} = \frac{22,6 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4520 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Larutan sampel induk 2} = \frac{15,4 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 3080 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pembuatan larutan sampel uji:

- Larutan sampel 56,5 ppm

$$\frac{5 \text{ } \mu\text{l}}{400 \text{ } \mu\text{l}} \times 4520 \text{ } \mu\text{g/ml} = 56,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan sampel 113 ppm

$$\frac{10 \text{ } \mu\text{l}}{400 \text{ } \mu\text{l}} \times 4520 \text{ } \mu\text{g/ml} = 113 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan sampel 169,5 ppm

$$\frac{15 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 4520 \mu\text{g/ml} = 169,5 \mu\text{g/ml}$$

- Larutan sampel 226 ppm

$$\frac{20 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 4520 \mu\text{g/ml} = 226 \mu\text{g/ml}$$

- Larutan sampel 256,67 ppm

$$\frac{25 \mu\text{l}}{300 \mu\text{l}} \times 3080 \mu\text{g/ml} = 256,67 \mu\text{g/ml}$$

- Larutan sampel 308 ppm

$$\frac{30 \mu\text{l}}{300 \mu\text{l}} \times 3080 \mu\text{g/ml} = 308 \mu\text{g/ml}$$

B. DATA HASIL PENELITIAN**Hasil Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase****Contoh Perhitungan:****Kontrol negatif**

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,049	0,392	0,343
0,048	0,399	0,351
0,049	0,392	0,343
Rata-rata		0,346

Sampel/Standar

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
80,990	0,049	0,308	0,259	25,145 %	130,516 $\mu\text{g/ml}$
92,560	0,047	0,288	0,241	30,347 %	
104,130	0,048	0,268	0,220	36,416 %	
115,700	0,048	0,248	0,200	42,141 %	
127,270	0,048	0,234	0,186	46,197 %	
138,840	0,049	0,21	0,161	53,468 %	
150,410	0,048	0,182	0,134	61,272 %	
161,980	0,049	0,161	0,112	67,630 %	
173,55	0,049	0,143	0,094	72,832 %	

*) : A_k = absorbansi plate kosong

A_{478} = absorbansi sampel/standart pada 478 nm

A_{hit} = $A_{478} - A_k$

$$\text{Hambatan tirosinase} = \frac{A_{hit} \text{ kontrol negatif} - A_{hit} \text{ sampel/standar}}{A_{hit} \text{ kontrol negatif}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,346 - 0,259}{0,346} \times 100 \%$$

$$= 25,144 \%$$

$$\text{Persamaan } Y = 0,523 X - 18,26$$

$$50 + 18,26 = 0,523 X$$

$$X = 130,516 \mu\text{g/ml} \rightarrow IC_{50}$$

Standar Genistein**Kontrol negatif**

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,049	0,392	0,343
0,048	0,399	0,351
0,049	0,392	0,343
Rata-rata		0,346

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
80,990	0,049	0,308	0,259	25,145 %	130,516 $\mu\text{g/ml}$
92,560	0,047	0,288	0,241	30,347 %	
104,130	0,048	0,268	0,220	36,416 %	
115,700	0,048	0,248	0,200	42,141 %	
127,270	0,048	0,234	0,186	46,197 %	
138,840	0,049	0,21	0,161	53,468 %	
150,410	0,048	0,182	0,134	61,272 %	
161,980	0,049	0,161	0,112	67,630 %	
173,55	0,049	0,143	0,094	72,832 %	

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
80,990	0,047	0,309	0,262	24,277 %	130,290 $\mu\text{g/ml}$
92,560	0,049	0,289	0,240	30,636 %	
104,130	0,05	0,267	0,217	37,283 %	
115,700	0,048	0,247	0,199	42,486 %	
127,270	0,051	0,233	0,182	47,399 %	
138,840	0,052	0,208	0,156	54,913 %	
150,410	0,05	0,184	0,134	61,272 %	
161,980	0,048	0,163	0,115	66,763 %	
173,55	0,049	0,146	0,097	71,965 %	

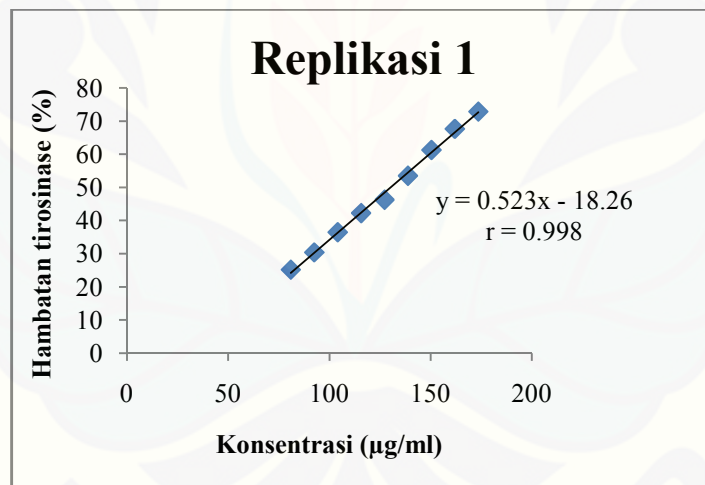
Replikasi 3

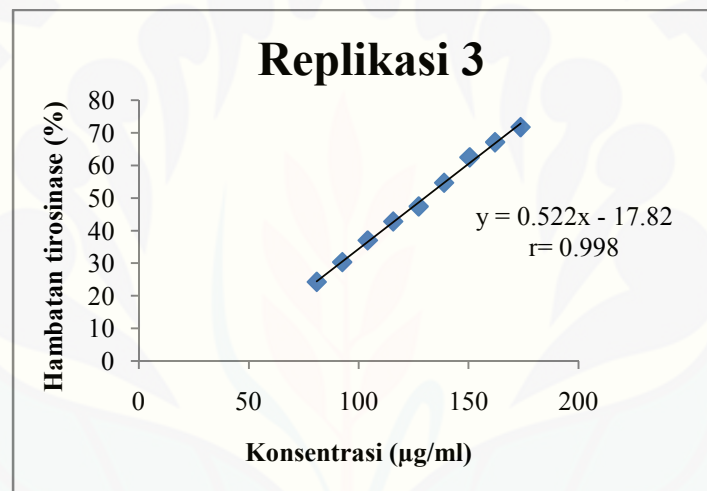
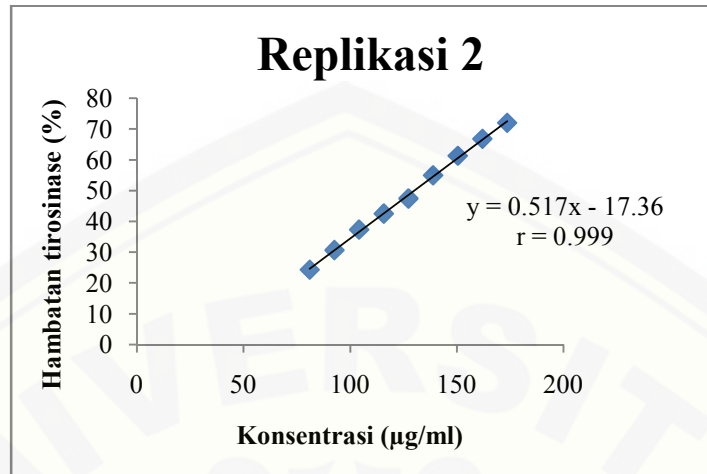
Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
80,990	0,047	0,309	0,262	24,277 %	129,923 $\mu\text{g/ml}$
92,560	0,047	0,288	0,241	30,347 %	
104,130	0,05	0,268	0,218	36,994 %	
115,700	0,05	0,248	0,198	42,775 %	
127,270	0,05	0,232	0,182	47,399 %	
138,840	0,05	0,207	0,157	54,624 %	
150,410	0,05	0,18	0,130	62,428 %	
161,980	0,05	0,164	0,114	67,052 %	
173,55	0,049	0,147	0,098	71,676 %	

IC_{50} rata-rata = 130,2433 $\mu\text{g/ml}$

SD = 0,299

CV = 0,230 %





Sampel Non-Fermentasi

Kontrol negatif

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,06	0,45	0,39
0,057	0,427	0,37
0,052	0,432	0,38
Rata-rata		0,38

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
56,5	0,063	0,314	0,251	33,947 %	283,662 $\mu\text{g/ml}$
113	0,063	0,291	0,228	40 %	
169,5	0,063	0,29	0,227	40,263 %	
226	0,059	0,275	0,216	43,158 %	
256,67	0,06	0,252	0,192	49,474 %	
308	0,067	0,245	0,178	53,158 %	

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
56,25	0,06	0,312	0,252	33,684 %	300,588 $\mu\text{g/ml}$
112,5	0,062	0,293	0,231	39,210 %	
168,75	0,059	0,288	0,229	39,737 %	
225	0,059	0,274	0,215	43,421 %	
258,3	0,061	0,268	0,207	45,526 %	
310	0,064	0,24	0,176	53,684 %	

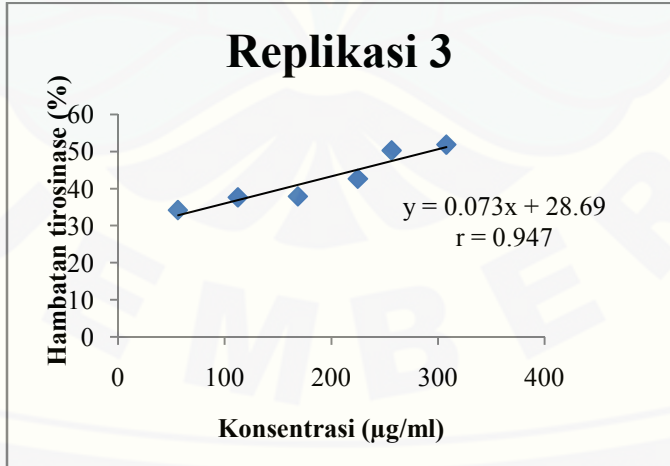
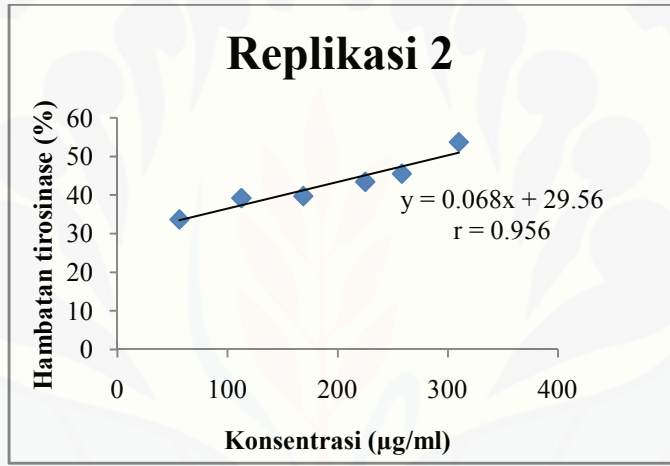
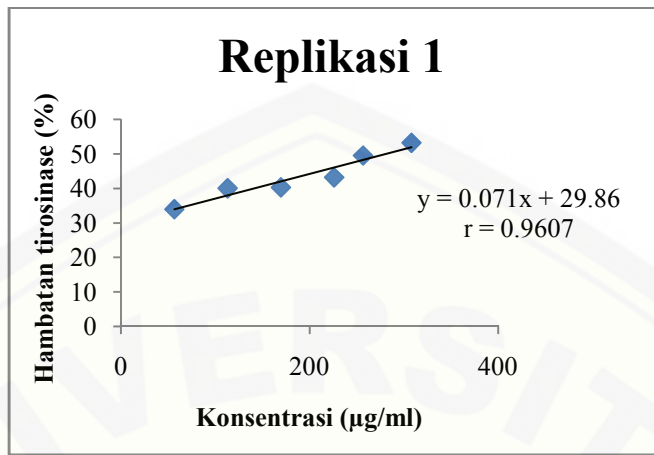
Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
56,25	0,06	0,31	0,25	34,210 %	291,918 $\mu\text{g/ml}$
112,5	0,06	0,297	0,237	37,632 %	
168,75	0,058	0,294	0,236	37,895 %	
225	0,059	0,277	0,218	42,632 %	
256,67	0,061	0,25	0,189	50,263 %	
308	0,062	0,245	0,183	51,842 %	

IC_{50} rata-rata = 292,056 $\mu\text{g/ml}$

SD = 8,464

CV = 2,89 %



Sampel Fermentasi Hari ke-1

Kontrol negatif

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,06	0,45	0,39
0,057	0,427	0,37
0,052	0,432	0,38
Rata-rata		0,38

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
54,25	0,061	0,289	0,228	40 %	289,778 $\mu\text{g/ml}$
108,5	0,064	0,282	0,218	42,63 %	
162,75	0,064	0,28	0,216	43,158 %	
217	0,066	0,275	0,209	45 %	
270	0,061	0,252	0,191	49,737 %	
324	0,07	0,251	0,181	52,368 %	

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
50	0,066	0,287	0,221	41,842 %	281,19 $\mu\text{g/ml}$
100	0,064	0,283	0,219	42,368 %	
150	0,064	0,28	0,216	43,158 %	
200	0,065	0,275	0,21	44,737 %	
258,33	0,061	0,252	0,191	49,737 %	
310	0,07	0,251	0,181	52,368 %	

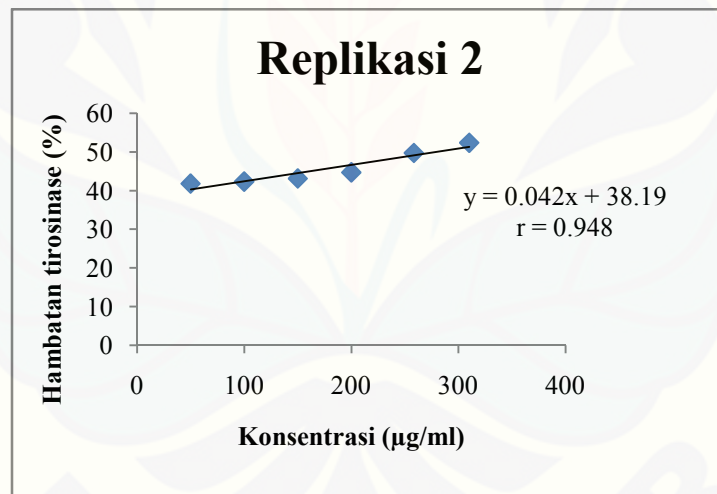
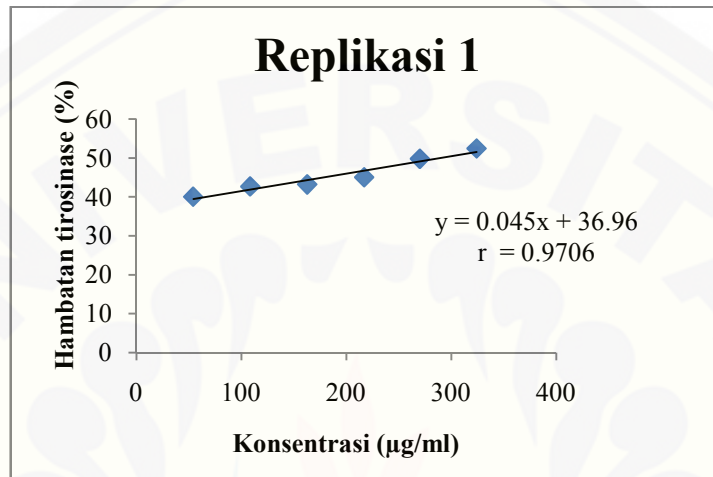
Replikasi 3

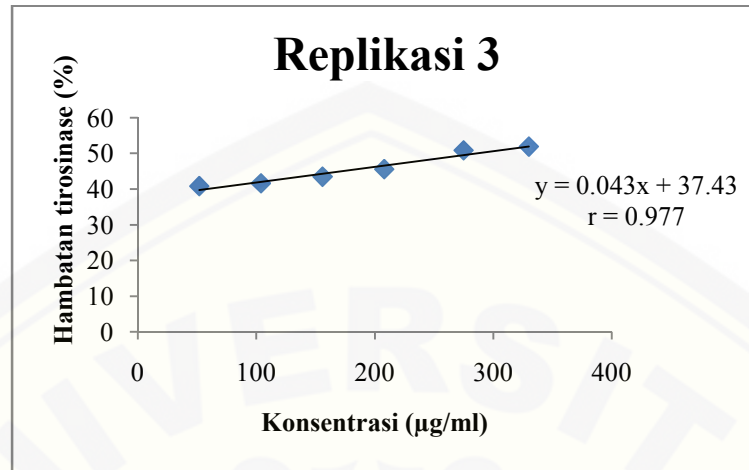
Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
52	0,066	0,291	0,225	40,789 %	292,326 $\mu\text{g/ml}$
104	0,063	0,285	0,222	41,579 %	
156	0,064	0,279	0,215	43,421 %	
208	0,065	0,272	0,207	45,526 %	
275	0,065	0,252	0,187	50,789 %	
330	0,069	0,252	0,183	51,842 %	

IC₅₀ rata-rata = 287,765 µg/ml

SD = 5,834

CV = 2,02 %





Sampel Fermentasi Hari ke-2

Kontrol negatif

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,06	0,45	0,39
0,057	0,427	0,37
0,052	0,432	0,38
Rata-rata		0,38

Replikasi 1

Konsentrasi (µg/ml)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
57	0,057	0,285	0,228	40 %	245 µg/ml
114	0,058	0,272	0,214	43,684 %	
171	0,059	0,268	0,209	45 %	
228	0,06	0,248	0,188	50,526 %	
253	0,063	0,248	0,185	51,316 %	
304	0,062	0,244	0,182	52,105 %	

Replikasi 2

Konsentrasi (µg/ml)	A _k *	A ₄₇₈ *	A _{hit} *	Hambatan tirosinase	IC ₅₀
55	0,056	0,283	0,227	40,263 %	228,182 µg/ml
110	0,055	0,27	0,215	43,421 %	
165	0,059	0,262	0,203	46,579 %	
220	0,061	0,25	0,189	50,263 %	
250	0,062	0,242	0,18	52,632 %	
300	0,06	0,239	0,179	52,895 %	

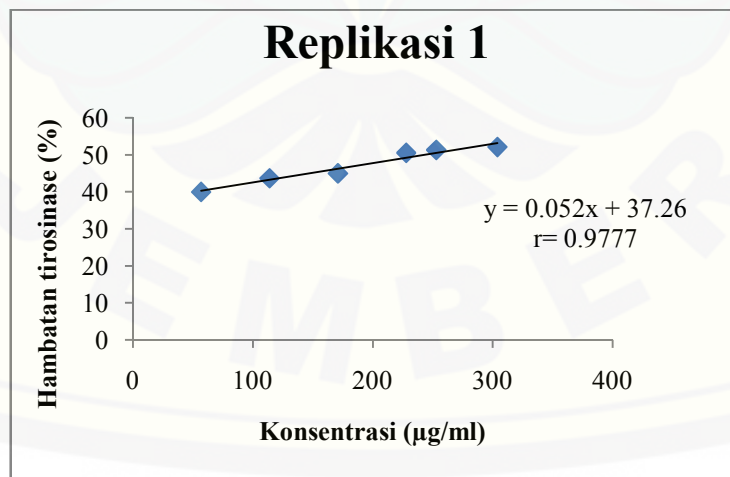
Replikasi 3

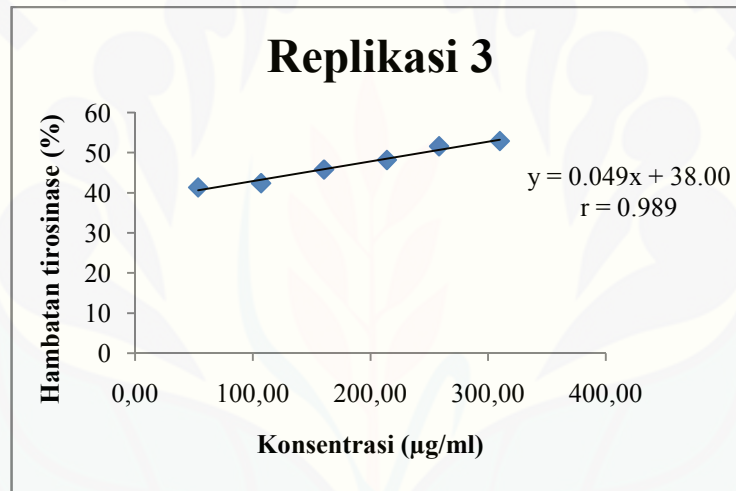
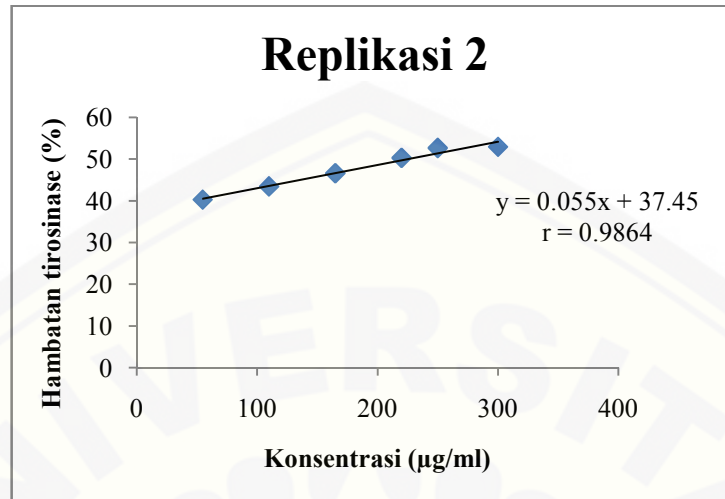
Konsentrasi (µg/ml)	A _k *	A ₄₇₈ *	A _{hit} *	Hambatan tirosinase	IC ₅₀
53,5	0,057	0,28	0,223	41,316 %	244,898 µg/ml
107	0,054	0,273	0,219	42,368 %	
160,5	0,059	0,265	0,206	45,789 %	
214	0,061	0,258	0,197	48,158 %	
258,3	0,06	0,244	0,184	51,579 %	
310	0,062	0,241	0,179	52,895 %	

IC₅₀ rata-rata = 239,360 µg/ml

SD = 9,6806

CV = 4,044 %





Sampel Fermentasi Hari ke-3

Kontrol negatif

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,06	0,45	0,39
0,057	0,427	0,37
0,052	0,432	0,38
Rata-rata		0,38

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
53,25	0,057	0,275	0,218	42,632 %	178,75 $\mu\text{g/ml}$
106,5	0,058	0,262	0,204	46,316 %	
159,75	0,059	0,255	0,196	48,421 %	
213	0,063	0,243	0,18	52,632 %	
290	0,06	0,225	0,165	56,579 %	
348	0,06	0,216	0,156	58,947 %	

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
52,75	0,058	0,282	0,224	41,053 %	178,281 $\mu\text{g/ml}$
105,5	0,058	0,266	0,208	45,263 %	
158,25	0,059	0,251	0,192	49,474 %	
211	0,062	0,24	0,178	53,158 %	
283,3	0,06	0,22	0,16	57,895 %	
340	0,061	0,217	0,156	58,947 %	

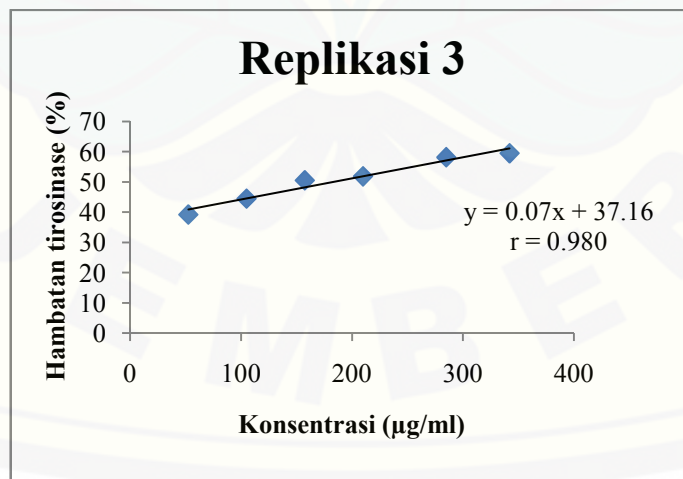
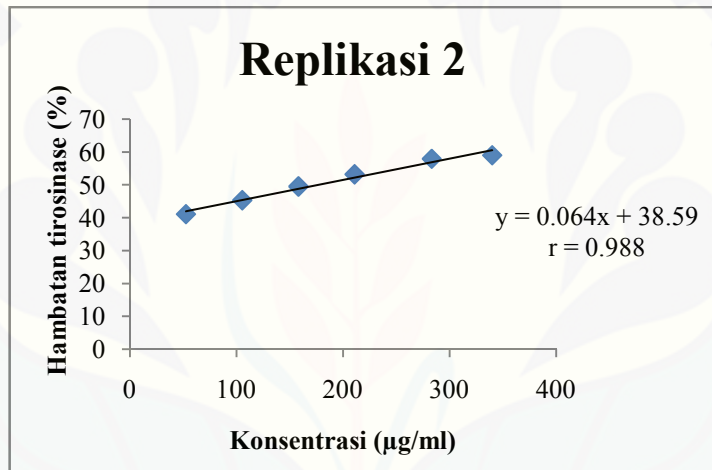
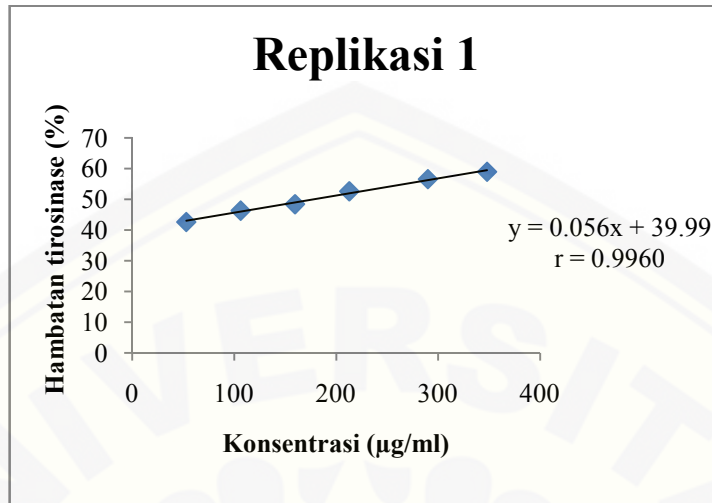
Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
52,5	0,058	0,289	0,231	39,2105 %	183,429 $\mu\text{g/ml}$
105	0,057	0,268	0,211	44,4737 %	
157,5	0,06	0,248	0,188	50,5263 %	
210	0,062	0,245	0,183	51,8421 %	
285	0,063	0,222	0,159	58,1579 %	
342	0,061	0,215	0,154	59,4737 %	

IC_{50} rata-rata = 180,153 $\mu\text{g/ml}$

SD = 2,846

CV = 1,58 %



Sampel Fermentasi Hari ke-4

Kontrol negatif

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,06	0,45	0,39
0,057	0,427	0,37
0,052	0,432	0,38
Rata-rata		0,38

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
55,5	0,059	0,287	0,228	40,000 %	283 $\mu\text{g/ml}$
111	0,056	0,28	0,224	41,053 %	
166,5	0,06	0,275	0,215	43,421 %	
222	0,059	0,266	0,207	45,526 %	
255	0,07	0,265	0,195	48,684 %	
306	0,06	0,239	0,179	52,895 %	

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
55,5	0,06	0,284	0,224	41,053 %	298,809 $\mu\text{g/ml}$
111	0,058	0,279	0,221	41,842 %	
166,5	0,06	0,275	0,215	43,421 %	
222	0,059	0,264	0,205	46,053 %	
255	0,06	0,26	0,2	47,368 %	
306	0,059	0,241	0,182	52,105 %	

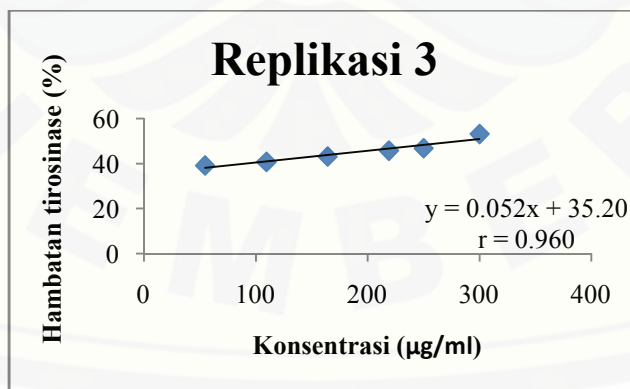
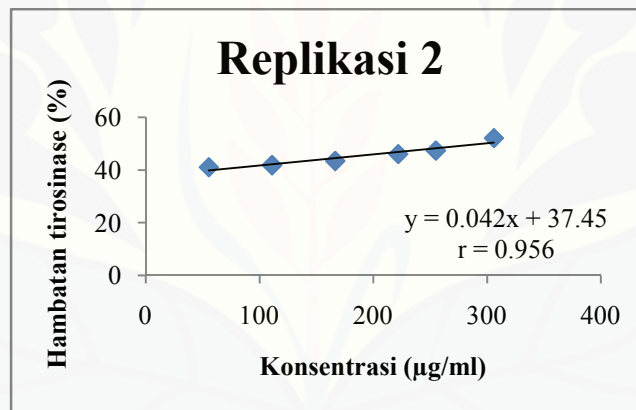
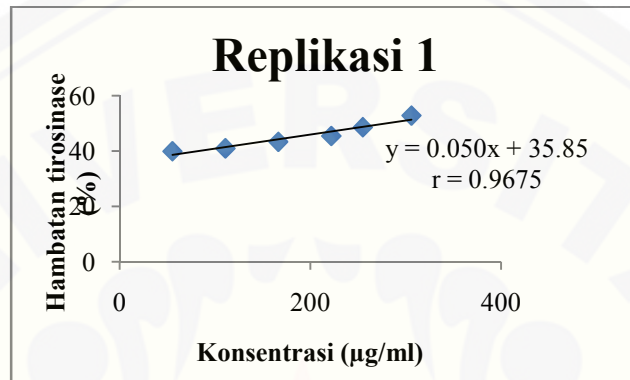
Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
54,75	0,05	0,281	0,231	39,210 %	284,615 $\mu\text{g/ml}$
109,5	0,055	0,28	0,225	40,790 %	
164,25	0,061	0,277	0,216	43,158 %	
219	0,059	0,265	0,206	45,790 %	
250	0,062	0,264	0,202	46,842 %	
300	0,059	0,237	0,178	53,158 %	

IC₅₀ rata-rata = 288,808 µg/ml

SD = 8,699

CV = 3,012 %



C. ANALISIS DATA

1. Hasil Analisis Kadar Genistein

Tests of Normality

SAMPEL		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
LOG_KADAR2	non_fermentasi	.313	4	.	.797	4	.097
	fermentasi_hari1	.356	3	.	.817	3	.155
	fermentasi_hari2	.243	3	.	.972	3	.679
	fermentasi_hari3	.351	3	.	.828	3	.183
	fermentasi_hari4	.212	4	.	.949	4	.709

a. Lilliefors Significance Correction

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

Test of Homogeneity of Variances

LOG KADAR2

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.702	4	12	.605

Data bersifat homogen ($p > 0,05$)

ANOVA

LOG KADAR2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.229	4	1.557	3338.261	.000
Within Groups	.006	12	.000		
Total	6.234	16			

Terdapat paling tidak dua kelompok memiliki perbedaan kadar genistein yang signifikan ($p < 0,05$).

**Post Hoc
Multiple Comparisons**

LOG_KADAR2
LSD

(I) SAMPEL	(J) SAMPEL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
non_fermentasi	fermentasi_hari1	-.84546*	.01650	.000	-.8814	-.8095
	fermentasi_hari2	-1.25421*	.01650	.000	-1.2902	-1.2183
	fermentasi_hari3	-1.44767*	.01650	.000	-1.4836	-1.4117
	fermentasi_hari4	-.05375*	.01527	.004	-.0870	-.0205
fermentasi_hari1	non_fermentasi	.84546*	.01650	.000	.8095	.8814
	fermentasi_hari2	-.40875*	.01763	.000	-.4472	-.3703
	fermentasi_hari3	-.60221*	.01763	.000	-.6406	-.5638
	fermentasi_hari4	.79171*	.01650	.000	.7558	.8276
fermentasi_hari2	non_fermentasi	1.25421*	.01650	.000	1.2183	1.2902
	fermentasi_hari1	.40875*	.01763	.000	.3703	.4472
	fermentasi_hari3	-.19346*	.01763	.000	-.2319	-.1550
	fermentasi_hari4	1.20046*	.01650	.000	1.1645	1.2364
fermentasi_hari3	non_fermentasi	1.44767*	.01650	.000	1.4117	1.4836
	fermentasi_hari1	.60221*	.01763	.000	.5638	.6406
	fermentasi_hari2	.19346*	.01763	.000	.1550	.2319
	fermentasi_hari4	1.39392*	.01650	.000	1.3580	1.4299
fermentasi_hari4	non_fermentasi	.05375*	.01527	.004	.0205	.0870
	fermentasi_hari1	-.79171*	.01650	.000	-.8276	-.7558
	fermentasi_hari2	-1.20046*	.01650	.000	-1.2364	-1.1645
	fermentasi_hari3	-1.39392*	.01650	.000	-1.4299	-1.3580

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Sampel kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-1, 2, 3, dan 4 menunjukkan perbedaan kadar genistein yang signifikan ($p < 0,05$).

2. Hasil Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase

Tests of Normality

sampel		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ic50	non_fermentasi	.309	3	.	.901	3	.389
	fermentasi_1	.297	3	.	.917	3	.443
	fermentasi_2	.355	3	.	.819	3	.161
	fermentasi_3	.260	3	.	.958	3	.606
	fermentasi_4	.210	3	.	.991	3	.820
	standar	.204	3	.	.993	3	.844

a. Lilliefors Significance Correction

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

Test of Homogeneity of Variances

ic50

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.991	5	12	.152

Data bersifat homogen ($p > 0,05$).

ANOVA

ic50

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	69835.615	5	13967.123	316.030	.000
Within Groups	530.347	12	44.196		
Total	70365.962	17			

Terdapat paling tidak dua kelompok memiliki perbedaan aktivitas hambatan tirosinase yang signifikan ($p < 0,05$).

Post Hoc Test

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
non_fermentasi	fermentasi_1	-.5822667	5.4280495	.916	-12.408970	11.244437
	fermentasi_2	51.9276000*	5.4280495	.000	40.100896	63.754304
	fermentasi_3	109.0071667*	5.4280495	.000	97.180463	120.833870
	fermentasi_4	1.4545667	5.4280495	.793	-10.372137	13.281270
	standar	161.6673333*	5.4280495	.000	149.840630	173.494037
fermentasi_1	non_fermentasi	.5822667	5.4280495	.916	-11.244437	12.408970
	fermentasi_2	52.5098667*	5.4280495	.000	40.683163	64.336570
	fermentasi_3	109.5894333*	5.4280495	.000	97.762730	121.416137
	fermentasi_4	2.0368333	5.4280495	.714	-9.789870	13.863537
	standar	162.2496000*	5.4280495	.000	150.422896	174.076304
fermentasi_2	non_fermentasi	-51.9276000*	5.4280495	.000	-63.754304	-40.100896
	fermentasi_1	-52.5098667*	5.4280495	.000	-64.336570	-40.683163
	fermentasi_3	57.0795667*	5.4280495	.000	45.252863	68.906270
	fermentasi_4	-50.4730333*	5.4280495	.000	-62.299737	-38.646330
	standar	109.7397333*	5.4280495	.000	97.913030	121.566437
fermentasi_3	non_fermentasi	-109.0071667*	5.4280495	.000	-120.833870	-97.180463
	fermentasi_1	-109.5894333*	5.4280495	.000	-121.416137	-97.762730
	fermentasi_2	-57.0795667*	5.4280495	.000	-68.906270	-45.252863
	fermentasi_4	-107.5526000*	5.4280495	.000	-119.379304	-95.725896
	standar	52.6601667*	5.4280495	.000	40.833463	64.486870
fermentasi_4	non_fermentasi	-1.4545667	5.4280495	.793	-13.281270	10.372137
	fermentasi_1	-2.0368333	5.4280495	.714	-13.863537	9.789870
	fermentasi_2	50.4730333*	5.4280495	.000	38.646330	62.299737
	fermentasi_3	107.5526000*	5.4280495	.000	95.725896	119.379304
	standar	160.2127667*	5.4280495	.000	148.386063	172.039470
standar	non_fermentasi	-161.6673333*	5.4280495	.000	-173.494037	-149.840630
	fermentasi_1	-162.2496000*	5.4280495	.000	-174.076304	-150.422896
	fermentasi_2	-109.7397333*	5.4280495	.000	-121.566437	-97.913030
	fermentasi_3	-52.6601667*	5.4280495	.000	-64.486870	-40.833463
	fermentasi_4	-160.2127667*	5.4280495	.000	-172.039470	-148.386063

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Kelompok fermentasi hari ke-2, dan 3 adalah kelompok yang memiliki perbedaan aktivitas hambatan tirosinase yang signifikan. Kelompok non-fermentasi dan fermentasi hari ke-1, dan 4 tidak memiliki perbedaan aktivitas hambatan tirosinase yang signifikan.

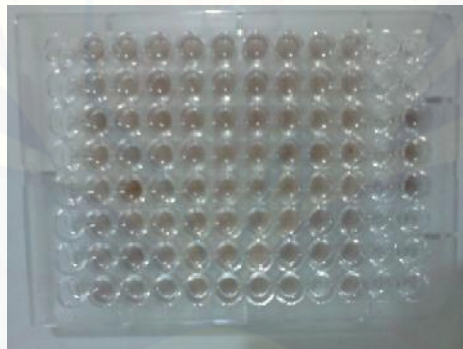
D. GAMBAR HASIL PENELITIAN



Isolat *Aspergillus oryzae*



Proses *defatting*



Uji aktivitas hambatan tirosinase

E. SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI *Aspergillus oryzae*



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM JURUSAN BIOLOGI
Jalan Kalimantan III No. 23 FMIPA, Universitas Jember, Jawa
Timur 68123

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

Berdasarkan hasil pengamatan pada jamur yang digunakan di Laboratorium Mikrobiologi,
Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember oleh:

Nama/NIM : Estika Yunindarwati / 112210101001

Jur/Fak/PT : Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Maka dapat disampaikan hasilnya bahwa jamur tersebut adalah:

Aspergillus oryzae

Demikian mudah-mudahan bermanfaat.

Jember, 30 Januari 2015

di Laboratorium



Dis. Rudy Winarso, M. Kes

NIP. 1960081612989021001

F. SERTIFIKAT KEDELAI BALURAN

