



**PENGARUH FERMENTASI *Rhizopus oligosporus* TERHADAP
KADAR ISOFLAVON GENISTEIN DAN AKTIVITAS
HAMBATAN TIROSINASE KEDELAI (*Glycine max*) *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :

Sekar Risti Praharini

NIM 112210101011

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2015



**PENGARUH FERMENTASI *Rhizopus oligosporus* TERHADAP
KADAR ISOFLAVON GENISTEIN DAN AKTIVITAS
HAMBATAN TIROSINASE KEDELAI (*Glycine max*) *IN VITRO***

SKRIPSI

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

Oleh :

Sekar Risti Praharini

NIM 112210101011

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dan Nabi besar Muhammad SAW;
2. Orang tua tercinta, meme Yulinur Tianing Astiwi dan Almarhum Ayah Slamet Hariyadi, yang selalu memberikan doa, pengorbanan, kasih sayang serta ajaran tentang arti hidup dan perjuangan untuk menjadi seseorang yang lebih baik.
3. Uti tersayang Harsujanti, Tante Ida Hariani dan Om Nanang Sulistyawan yang selalu memberikan doa, kasih sayang, pengorbanan, dorongan, nasihat yang tidak bisa terhitung dan senantiasa mengiringi setiap langkah demi kebahagiaan, keberhasilan dan kesuksesan saya.
4. Almarhum Papa Didik Irianto yang selalu memberikan nasihat, motivasi, dukungan dan bantuan selama ini.
5. Para pengajar sejak Taman Kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi yang terhormat, yang telah memberikan ilmunya dan membimbing saya dengan penuh ketulusan;
6. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

Jangan lihat masa lampau dengan penyesalan, jangan pula melihat masa depan dengan ketakutan, tapi lihatlah sekitarmu dengan penuh kesadaran

(James Thurber)

Lihatlah mereka yang lebih tak beruntung dari pada dirimu, sehingga kau tak mungkin tak berpuas diri atas keberuntungan yang diberikan Allah kepadamu

(Nabi Muhammad saw)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sekar Risti Praharini

NIM : 112210101011

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “*Pengaruh Fermentasi Rhizopus oligosporus terhadap Kadar Isoflavon Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Kedelai (Glycine max) in vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 14 Agustus 2015

Yang menyatakan

Sekar Risti Praharini
112210101011

SKRIPSI

**PENGARUH FERMENTASI *Rhizopus oligosporus* TERHADAP KADAR
ISOFLAVON GENISTEIN DAN AKTIVITAS HAMBATAN TIROSINASE
KEDELAI (*Glycine max*) *IN VITRO***

Oleh

Sekar Risti Praharini

112210101011

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 *Rhizopus oligosporus* terhadap Kadar Isoflavon Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Kedelai (*Glycine max*) *in vitro*” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Jum’at, 14 Agustus 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Pembimbing Utama,

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

Pembimbing Anggota,

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

Tim Penguji

Penguji I,

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

Penguji II,

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

Mengesahkan,



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

RINGKASAN

Pengaruh Fermentasi *Rhizopus oligosporus* terhadap Kadar Isoflavon Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Kedelai (*Glycine max*) *in vitro*:
Sekar Risti Praharini, 112210101011; 2015, 59 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kulit merupakan bagian tubuh penting yang melindungi tubuh dari paparan sinar ultraviolet (UV). Sinar UV merangsang enzim untuk bekerja sehingga meningkatkan jumlah melanin yang dapat menyebabkan hiperpigmentasi. Demi mewujudkan kulit yang cantik, sehat dan terawat kebanyakan orang mencoba berbagai produk kecantikan yang menjadikan kulit tampak lebih putih dan cerah. Salah satu mekanisme bahan pemutih kulit adalah menghambat kerja tirosinase. Tirosinase merupakan enzim yang berperan penting dalam reaksi biosintesis melanin.

Penggunaan tanaman sebagai bahan pemutih kulit alami semakin banyak dikembangkan sehingga diharapkan mampu menghambat pembentukan melanin tanpa bersifat sitotoksik. Salah satu senyawa yang dapat menghambat sintesis melanin adalah isoflavon. Isoflavon banyak terdapat pada kedelai (*Glycine max*). Isoflavon terdiri dari bentuk aglikon, glikosida, asetilglikosida dan malonilglikosida. Isoflavon aglikon (genistein, daidzein, dan glisitein) memiliki aktivitas hambatan tirosinase yang lebih besar daripada isoflavon glikosida (daidzin, genistin, dan glisitin).

Kandungan isoflavon glikosida dapat ditingkatkan dengan cara fermentasi. Proses fermentasi terjadi akibat dari aksi enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Salah satu kapang yang paling banyak ditemukan dalam fermentasi kedelai adalah *Rhizopus oligosporus*. Kedelai yang difermentasi dengan *R. oligosporus* telah terbukti secara signifikan mampu meningkatkan isoflavon aglikon daripada kedelai yang tidak difermentasi. Selain itu, aktivitas

enzim β -glikosidase *R. oligosporus* lebih kuat dibandingkan *R. oryzae*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh fermentasi kedelai varietas Baluran menggunakan *R. oligosporus* terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase.

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah preparasi sampel yang terdiri dari kedelai non-fermentasi, kedelai fermentasi hari ke-2, 3 dan 4. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan menggunakan metode sonikasi dengan pelarut etanol 70%. Kemudian dilakukan pengukuran kadar genistein menggunakan metode KLT-densitometri dan aktivitas hambatan tirosinase menggunakan spektrofotometri.

Hasil penetapan kadar menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar genistein selama proses fermentasi. Kadar genistein ekstrak etanol 70% kedelai meningkat sebesar 10,086; 12,759; dan 12,096 kali selama fermentasi hari ke-2,3 dan 4 dibandingkan dengan kedelai non-fermentasi.

Hasil uji aktivitas hambatan tirosinase menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas yang ditandai dengan menurunnya nilai IC_{50} pada kedelai terfermentasi hari ke-2, 3 dan 4. Nilai IC_{50} ekstrak kedelai non-fermentasi, kedelai terfermentasi hari ke-2, 3 dan 4 secara berturut-turut sebesar 288,718; 223,400; 183,946; dan 196,490 $\mu\text{g/ml}$. Nilai penghambatan tertinggi dengan nilai IC_{50} terendah dihasilkan oleh ekstrak kedelai fermentasi hari ke-3. Hal ini tidak berbeda secara signifikan dengan kedelai yang difermentasi oleh *A. oryzae*. Jika dibandingkan dengan nilai IC_{50} genistein sebagai kontrol positif, aktivitas penghambatan tirosinase dari masing-masing ekstrak lebih rendah.

Hasil analisis statistik dilakukan dengan menggunakan one-way ANOVA uji *post hoc* LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase pada masing-masing sampel yang ditunjukkan dengan nilai $p < 0,05$. Dapat disimpulkan bahwa fermentasi dengan menggunakan *R. oligosporus* dapat meningkatkan kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase kedelai.

PRAKATA

Bismillahirrohmanirohim

Puji syukur ke hadirat ALLAH SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Fermentasi *Rhizopus oligosporus* terhadap Kadar Isoflavon Genistein dan Aktivitas Hambatan 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 Wisudyaningsih, S.Farm., M.Sc., 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, meme Yulinur Tianing Astiwi dan Ayahanda Alm. Slamet Hariyadi, yang tak pernah lelah memberikan doa, dukungan, motivasi, kasih sayang dan pengorbanan yang tiada padam selama ini;
8. Uti tersayang Harsujanti, Tante Ida Hariyani, Om Nanang Sulistyawan, Tante Amandia Dewi Permana Shita dan Tante Ninin terimakasih atas kasih sayang, dukungan, doa dan semangat yang tiada henti diberikan dalam menyelesaikan skripsi ini;
9. Seluruh keluarga besar yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu;
10. Rekan kerja dan Sahabat seperjuangan Estika, Pipit, Lintang, Defitri, Puspita, Dio, Nurul Imamah, Ajeng, Arum, Vita, Habibi, Anggar dan Tintia yang telah memberikan semangat, kebersamaan, kekompakan, dan bantuan selama ini;
11. Bu Widi, Mbak Anggra, Mbak Dini, dan Mbak Indri selaku teknisi laboratorium Biologi dan Farmasi Klinik atas bantuannya;
12. Sahabat-sahabat nge-lab di Laboratorium Biologi Fitria, Elisa, Okta, Lili, Iik, Zuhro, Liza, Liyas, Lintang, Defitri, dan Estika, atas kebersamaan, bantuan dan kekompakan kalian selama pengerjaan penelitian ini;
13. Teman-teman KKN 101 Desa Sanenrejo Lukman, Drajat, Sekar, dan Ekky terimakasih atas kebersamaan, dukungan, bantuan dan motivasi selama 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, 14 Agustus 2015

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tinjauan Kedelai	6
2.1.1 Morfologi Tanaman Kedelai.....	7
2.1.2 Deskripsi Varietas Kedelai	8
2.1.3 Kandungan Kimia Kacang Kedelai	9
2.2 Tinjauan Fermentasi	10
2.3 Tinjauan Kapang	11
2.4 Tinjauan tentang <i>Rhizopus oligosporus</i>	12

2.5 Tinjauan tentang Isoflavon pada Kedelai	14
2.6 Tinjauan tentang Genistein.....	15
2.7 Pengaruh Fermentasi terhadap Profil Isoflavon	16
2.8 Melanogenesis.....	18
2.9 Tinjauan tentang Enzim.....	20
2.9.1 Mekanisme Kerja Ikatan Enzim	20
2.9.2 Hambatan Enzim.....	22
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	24
3.1 Jenis Penelitian.....	24
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	24
3.3 Rancangan Penelitian	24
3.3.1 Rancangan Operasional	25
3.3.2 Definisi Operasional	25
3.4 Variabel Penelitian.....	26
3.4.1 Variabel Bebas	26
3.4.2 Variabel Terikat	26
3.4.3 Variabel Terkendali	26
3.5 Alat dan Bahan Penelitian	27
3.5.1 Alat.....	27
3.5.2 Bahan Penelitian	27
3.6 Prosedur Penelitian.....	27
3.6.1 Preparasi Kedelai Non-Fermentasi	27
3.6.2 Peremajaan Isolat <i>R. oligosporus</i>	28
3.6.3 Pembuatan Suspensi Spora <i>R. oligosporus</i>	28
3.6.4 Perhitungan Kepadatan Spora.....	28
3.6.5 Preparasi Kedelai Fermentasi	30
3.6.6 Proses Penghilangan Lemak (<i>Defatting</i>)	31
3.6.7 Pembuatan Ekstrak Kedelai	31
3.6.8 Penetapan Kadar Isoflavon Genistein.....	32

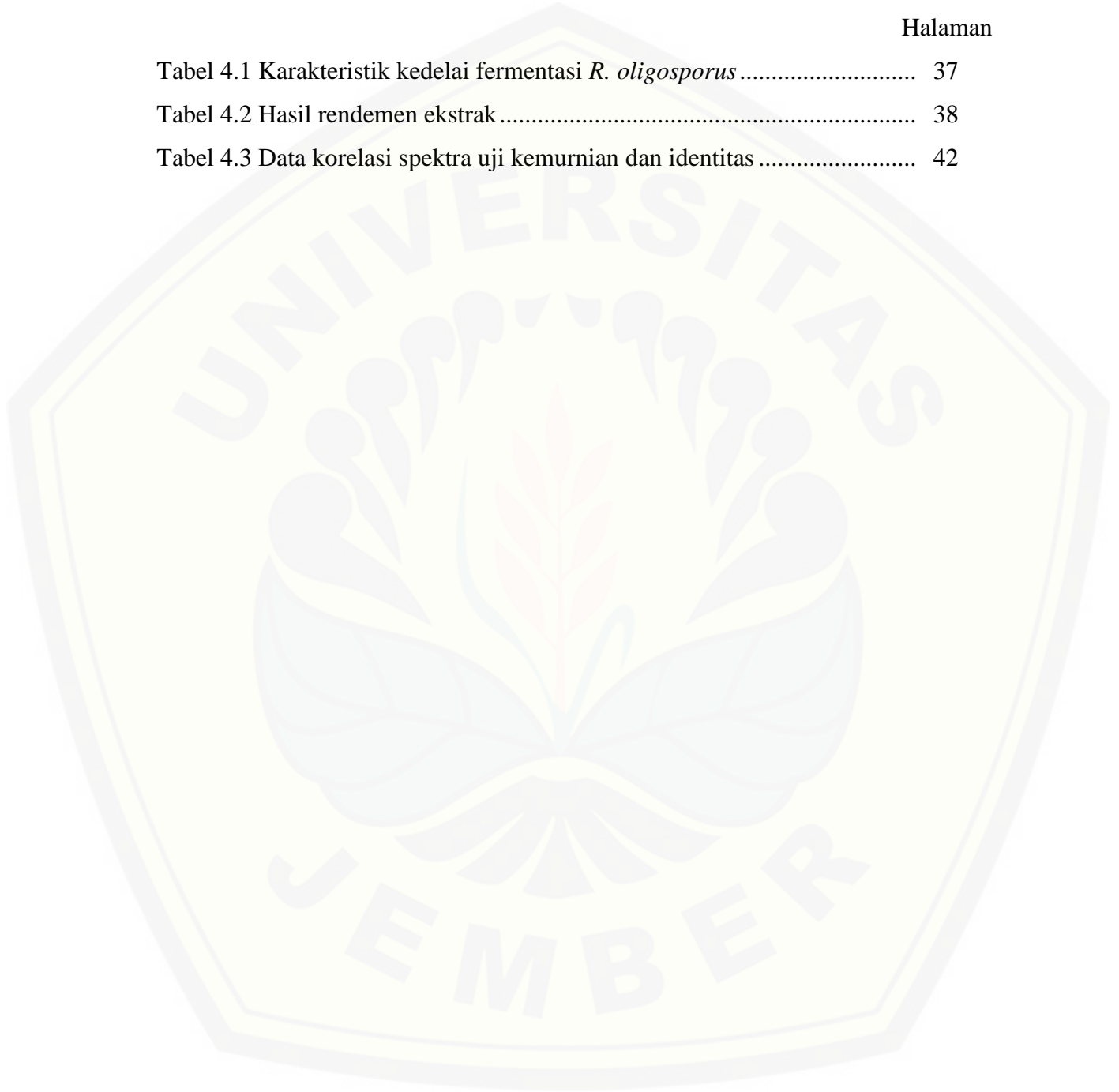
3.6.9 Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase.....	32
3.7 Analisis Data.....	34
3.8 Skema Penelitian.....	35
3.8.1 Pembuatan Ekstrak Kedelai	35
3.8.2 Penetapan Kadar dan Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase	36
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
4.1 Karakteristik Kedelai fermentasi <i>R. oligosporus</i>	37
4.2. Ekstraksi Isoflavon Kedelai Fermentasi.....	38
4.3 Penetapan Kadar Genistein	39
4.4 Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase.....	47
BAB 5 PENUTUP.....	51
5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN.....	60

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman kedelai	07
Gambar 2.2 Biji kedelai	08
Gambar 2.3 Morfologi jamur <i>Rhizopus spp.</i>	13
Gambar 2.4 Struktur kimia isoflavon kedelai	16
Gambar 2.5 Biotransformasi genistin menjadi genistein	17
Gambar 2.6 Jalur biosintesis melanin	19
Gambar 2.7 Model kunci-anak kunci Fischer	21
Gambar 2.8 Model <i>induced fit</i> Koshland	21
Gambar 2.9 Aktivitas inhibitor kompetitif enzim.....	22
Gambar 2.10 Aktivitas inhibitor non-kompetitif enzim.....	23
Gambar 3.1 Rancangan Penelitian	25
Gambar 3.2 Kamar hitung hemasitometer <i>Improved Neubaueur</i>	29
Gambar 3.3 Cara perhitungan spora dengan hemasitometer	30
Gambar 3.4 Skema pembuatan ekstrak.....	35
Gambar 3.5 Skema penetapan kadar dan uji aktivitas hambatan tirosinase ..	36
Gambar 4.1 Karakteristik kedelai fermentasi <i>R. oligosporus</i>	38
Gambar 4.2 Kurva baku standar genistein	39
Gambar 4.3 Hasil KLT ekstrak kedelai non fermentasi dan terfermentasi	40
Gambar 4.4 Spektra standar dan sampel uji kemurnian dan idemtitas	41
Gambar 4.5 Kadar genistein pada masing-masing sampel	43
Gambar 4.6 Reaksi biokonversi daidzein dan genistein menjadi faktor-2.....	45
Gambar 4.7 Data nilai IC ₅₀ aktivitas hambatan tirosinase	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Karakteristik kedelai fermentasi <i>R. oligosporus</i>	37
Tabel 4.2 Hasil rendemen ekstrak.....	38
Tabel 4.3 Data korelasi spektra uji kemurnian dan identitas	42



DAFTAR LAMPIRAN

A. Perhitungan	60
1. Perhitungan kepadatan suspensi spora	60
2. Pengenceran suspensi spora	60
3. Perhitungan rendemen ekstrak	60
4. Pembuatan larutan baku standar genistein	61
5. Pembuatan larutan sampel.....	62
6. Pembuatan fase gerak.....	63
7. Penetapan kadar.....	64
8. Pembuatan dapar fosfat pH 6,5	69
9. Pembuatan substrat L-tirosin 1 mM.....	70
10. Pembuatan standar genistein uji aktivitas hambatan tirosinase ..	70
11. Pembuatan sampel uji aktivitas hambatan tirosinase	71
B. Data Hasil Penelitian Aktivitas Hambatan Tirosinase.....	72
C. Analisis Data	84
1. Hasil analisis data kadar genistein	84
2. Hasil analisis data uji aktivitas hambatan tirosinase	86
D. Gambar Hasil Penelitian	88
E. Sertifikat Kedelai Baluran	89
F. Surat Keterangan Identifikasi <i>R. oligosporus</i>.....	90

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Kulit merupakan bagian penting yang membatasi lingkungan dalam tubuh manusia dengan lingkungan luar. Kulit memiliki beberapa fungsi salah satunya melindungi tubuh dari paparan sinar ultraviolet (UV). Kulit yang terkena paparan sinar UV dalam jangka waktu lama dapat menimbulkan pengaruh buruk. Sinar UV merangsang enzim untuk bekerja sehingga meningkatkan jumlah melanin yang dapat menyebabkan hiperpigmentasi. Hiperpigmentasi adalah gangguan pigmen kulit karena produksi melanin secara berlebihan atau distribusi melanin yang tidak merata (Brown dan Burns, 2002).

Mempunyai kulit putih masih menjadi dambaan wanita Asia. Kulit yang putih dan bersinar menjadi barometer kecantikan di daerah Asia terutama Indonesia. Demi mewujudkan kulit yang cantik, sehat dan terawat kebanyakan orang tidak segan mencoba berbagai produk kecantikan yang menjanjikan kulit tampak lebih putih dan cerah (Widyaningsih, 2012).

Melihat kondisi konsumen saat ini, produsen produk baik domestik maupun asing mulai berlomba-lomba mengeluarkan produk pemutih kulit untuk memenuhi keinginan dan kebutuhan konsumen. Mekanisme kerja dari produk pemutih kulit yaitu dengan menghambat proses melanogenesis sehingga kulit dapat menjadi lebih cerah dan putih. Proses melanogenesis dapat dihambat dengan beberapa mekanisme seperti penghambatan aktivitas enzim tirosinase dan mengurangi sintesis enzim tirosinase (Kim dan Uyama, 2005).

Enzim tirosinase merupakan enzim katalitik pertama dari reaksi sintesis melanin yakni hidroksilasi L-tirosin menjadi 3,4-dihidrofenilalanin (L-DOPA) dan oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon. Senyawa dopakuinon mempunyai

kereaktifan yang sangat tinggi sehingga dapat mengalami oksidasi secara spontan membentuk dopakrom yang kemudian menjadi melanin (Chang *et al.*, 2007). Melanin memiliki peran penting dalam perlindungan kulit terhadap efek radiasi UV dari sinar matahari, namun akumulasi abnormal dari melanin seperti melasma, bintik-bintik di kulit, dan bentuk lain dari hiperpigmentasi dapat merusak keindahan kulit (Chang, 2009).

Kebanyakan senyawa aktif pada produk pemutih kulit bekerja dengan cara menghambat aktivitas tirosinase (Briganti *et al.*, 2003). Namun, tidak semua senyawa kimia yang digunakan dalam produk tersebut aman digunakan contohnya hidrokuinon dan merkuri. Penggunaan hidrokuinon tanpa pengawasan dokter dapat menyebabkan iritasi, kemerahan, dan rasa terbakar pada kulit (BPOM RI, 2007). Merkuri termasuk logam berat berbahaya yang dalam krim pemutih dapat menimbulkan berbagai hal mulai dari perubahan warna kulit yang pada akhirnya dapat menyebabkan bintik-bintik hitam, alergi, iritasi kulit serta pemakaian dengan dosis tinggi dapat menyebabkan kerusakan otak permanen (BPOM RI, 2006). Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan pengembangan produk pemutih kulit dari bahan alam yang aman penggunaannya.

Penggunaan tanaman sebagai bahan depigmentasi kulit alami semakin banyak dikembangkan, dari beberapa penelitian diketahui berbagai senyawa aktif dalam ekstrak tanaman mampu menghambat sintesis melanin tanpa bersifat sitotoksik seperti arbutin, aleosin, isoflavon dan hesperidin (Zhu dan Gao, 2008). Senyawa isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesis oleh tanaman. Pada tanaman golongan Fabaceae, khususnya kedelai mengandung senyawa isoflavon yang cukup tinggi terutama pada bagian biji kedelai (Anderson dan Garner, 1997). Senyawa isoflavon tersebut pada umumnya berupa senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa ikatan glukosida (Koswara, 2006).

Isoflavon merupakan kelompok fenol heterosiklik yang terdiri dari bentuk aglikon (genistein, glisitein, dan daidzein), glukosida (daidzin, genistin,

dan glisitin), asetilglukosida (asetilaidzin, asetilgenistin, dan asetilglisitin) dan malonilglukosida (malonilaidzin, malonilgenistin, dan malonilglisitin) (Huang *et al.*, 2010). Isoflavon menghambat enzim tirosinase dalam proses melanogenesis dengan cara berkompetisi dengan substrat dari tirosinase (Zhu dan Gao, 2008). Sebagian besar isoflavon dalam kedelai terdapat pada bentuk glukosida. Bentuk aktif dari glukosida adalah aglikon yang dihasilkan dari pelepasan glukosa dari isoflavon glukosida. Isoflavon aglikon memiliki aktivitas hambatan tirosinase yang lebih besar daripada bentuk glukosidanya (Chang, 2009).

Kandungan isoflavon aglikon dapat ditingkatkan dengan cara fermentasi. Proses fermentasi terjadi akibat dari aksi enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Salah satu enzim yang berperan dalam proses peningkatan isoflavon aglikon adalah β -glukosidase (Punjaisee *et al.*, 2011). Enzim β -glukosidase dapat mengubah isoflavon glukosida menjadi isoflavon aglikon dan glukosa (Purwoko *et al.*, 2001). Chang *et al.*, (2007) telah berhasil mengisolasi senyawa isoflavon dari kedelai Koji (Jepang) yang difermentasi dengan *Aspergillus oryzae*, yakni: 6-hidroksidaidzein, 8-hidroksidaidzein dan 8-hidroksigenistein yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase yang kuat.

Tempe adalah produk fermentasi kedelai di Indonesia. Spesies kapang yang sering ditemukan dalam tempe adalah *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, dan *Rhizopus stolonifer*. *R. oligosporus* merupakan genus utama yang digunakan dalam proses pembuatan tempe di Indonesia. Kedelai yang difermentasi oleh *R. oligosporus* telah terbukti secara signifikan memiliki aglikon yang lebih tinggi daripada kedelai yang tidak difermentasi (Lin *et al.*, 2006). Selain itu aktivitas enzim β -glukosidase *R. oligosporus* lebih kuat dibandingkan *R. oryzae* (Purwoko, 2004).

Penelitian yang dilakukan oleh Purwoko, (2004) menunjukkan bahwa kedelai yang difermentasi oleh *R. oligosporus* selama 4 hari mampu menambah jumlah isoflavon aglikon sebesar 552,17-678,23 $\mu\text{g/g}$. Penambahan isoflavon

aglikon tertinggi antara 2 sampai 3 hari yaitu 268,01-284,77 $\mu\text{g/g}$ dan penambahan isoflavon aglikon terendah terjadi antara 3 sampai 4 hari yaitu 70,59-97,50 $\mu\text{g/g}$ (Purwoko, 2004). Produksi enzim β -glukosidase meningkat sejalan dengan pertumbuhan sel pada fase logaritmik karena berhubungan dengan metabolisme dalam sel. Selanjutnya telah terjadi penurunan aktivitas enzim β -glukosidase seiring dengan tercapainya fase stasioner (Setyaningsih *et al.*, 2006). Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan fermentasi kedelai oleh *R. oligosporus* pada hari ke-2, 3 dan 4.

Berdasarkan uraian di atas, tempe yang merupakan hasil fermentasi kedelai dimungkinkan mengandung isoflavon aglikon yang berpotensi sebagai agen pemutih kulit. Pada penelitian ini akan dilakukan fermentasi kedelai dengan isolat murni *R. oligosporus* dan dilakukan penetapan kadar isoflavon aglikon serta uji aktivitas hambatan tirosinase.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah yang diperoleh adalah:

1. Bagaimana pengaruh fermentasi menggunakan *R. oligosporus* pada hari ke-2, 3 dan 4 terhadap kadar isoflavon genistein kedelai?
2. Bagaimana aktivitas hambatan tirosinase kedelai yang difermentasi menggunakan *R. oligosporus* pada hari ke-2, 3 dan 4?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah:

1. Mengetahui pengaruh fermentasi menggunakan *R. oligosporus* pada hari ke-2, 3 dan 4 terhadap kadar isoflavon genistein kedelai.
2. Mengetahui aktivitas hambatan tirosinase kedelai yang difermentasi menggunakan *R. oligosporus* pada hari ke-2, 3 dan 4.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dalam penelitian ini, pembaca mendapatkan informasi pengetahuan mengenai:

1. Aktivitas kedelai yang difermentasi oleh *R. oligosporus* sebagai bahan pemutih kulit alami karena memiliki aktivitas hambatan tirosinase.
2. Pengujian aktivitas hambatan tirosinase kedelai yang difermentasi menggunakan *R. oligosporus* diharapkan dapat dimanfaatkan untuk agen pemutih kulit alami dan aman penggunaannya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Kedelai

Kedelai merupakan tanaman asli daratan Cina dan telah dibudidayakan oleh manusia sejak 2500 SM. Sejalan dengan makin berkembangnya perdagangan antarnegara yang terjadi pada awal abad ke-19, menyebabkan tanaman kedelai ikut tersebar ke berbagai negara tujuan perdagangan tersebut yaitu Jepang, Korea, Indonesia, India, Australia dan Amerika (Irawan, 2006).

Pada tahun 1948 telah disepakati bahwa nama botani kedelai yang dapat diterima dalam istilah ilmiah, yaitu *Glycine max* (L.) Merrill. Klasifikasi tanaman kedelai menurut ITIS (<http://www.itis.gov>) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Steptophyta
Superdivisi	: Embryophyta
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Superorde	: Rosanae
Orde	: Fabales
Family	: Fabaceae
Genus	: <i>Glycine</i> Willd.
Species	: <i>Glycine max</i> (L.) Merrill

2.1.1 Morfologi Tanaman Kedelai

Tanaman kedelai merupakan tanaman tahunan yang tumbuh lebat, berbulu, dan dapat tumbuh dengan tinggi sampai 2 meter. Tanaman kedelai berbatang pendek (30-100 cm), memiliki 3-6 percabangan, berbentuk tanaman perdu dan berkayu. Batang tanaman kedelai biasanya kaku dan rebah, kecuali yang dibudidayakan di musim hujan atau tanaman yang hidup di tempat yang ternaungi (Pitojo, 2003).

Struktur akar tanaman kedelai terdiri atas akar lembaga (*radicula*), akar tunggang (*radix primaria*) dan akar cabang (*radix lateralis*) yang berupa akar rambut. Perakaran kedelai dapat menembus tanah pada kedalaman 150 cm, terutama pada tanah yang subur (Rukmana dan Yuniarsih, 2003) .

Pada node pertama tanaman kedelai yang tumbuh dari biji terbentuk sepasang daun tunggal. Selanjutnya, pada semua node di atasnya terbentuk satu daun bertiga (*trifolat*). Daun majemuk, bertangkai pendek dan berbentuk oval (Gambar 2.1) (Mun'im dan Hanani, 2011).



Gambar 2.1 Tanaman Kedelai (Suastika *et al.*, 1997)

Bunga berwarna putih, merah muda, biru kehijauan, violet atau ungu. Polong membujur dan menggantung dengan panjang 2-8 cm dan lebar 0,5-2 cm. Biji terdapat di dalam polong dimana setiap polong berisi 1-4 biji. Pada saat masih muda biji berukuran kecil, berwarna putih kehijauan dan lunak. Pada perkembangan selanjutnya biji semakin berisi, mencapai berat maksimal dan keras. Biji kacang kedelai berkeping dua dan terbungkus oleh kulit tipis (Pitojo, 2003). Pada umumnya, biji berbentuk bulat telur lonjong dan kulit biji berwarna kuning coklat sampai hitam (Gambar 2.2) (Mun'im dan Hanani, 2011).



Gambar 2.2 Biji Kedelai
Sumber: <http://www.ristek.go.id>

2.1.2 Deskripsi Varietas Kedelai Baluran

Dasar-dasar penentuan varietas kedelai adalah menurut umur, warna biji dan tipe batang. Berikut merupakan deskripsi kedelai varietas Baluran menurut Nurjannah (2013):

Nomor galur	: GC 88025-3-2
Asal	: Persilangan AVRDC
Warna hipokotil	: Ungu
Warna epikotil	: Hijau
Warna daun	: Hijau
Warna bulu	: Coklat

Warna bunga	: Ungu
Warna polong masak	: Coklat
Warna kulit biji	: Kuning
Warna hilum	: Coklat muda
Tipe pertumbuhan	: Determinate
Bentuk biji	: Bulat telur
Tinggi tanaman	: 60-80 cm
Umur berbunga	: 33 hari
Umur polong masak	: 80 hari
Ukuran biji (gr/100 biji)	: 15-17 gram
Potensi hasil	: 2,5-3,5 ton/ha
Kandungan Protein	: 38-40%
Kandungan lemak	: 20-22%

2.1.3 Kandungan Kimia Kacang Kedelai

Kedelai mengandung dua tipe fitoestrogen yaitu isoflavon termasuk genistein, daidzein, ononin, isoformononetin dan komestan seperti komesterol. Dalam kacang kedelai mengandung 35% karbohidrat, protein hingga 45-50%, 20% minyak, saponin, sterol, tokoferol, fosfolipid, lektin, dan isoflavonoid. Protein kedelai terdiri dari globulin dan dibandingkan dengan kacang-kacangan lain, susunan asam amino pada kedelai lebih lengkap dan seimbang (Santoso, 2005). Minyak dalam kedelai mengandung komponen asam linoleat (50%), asam oleat (30-35%), asam linolenat (6-7%), asam palmitat (6%), asam stearat (4%) dan fitosterol yang mengandung β -sitosterol dan stigmasterol (Heinrich *et al.*, 2004; Daniel, 2006; Samuelsson, 1999). Selain itu di dalam lemak kedelai terkandung beberapa fosfolipida yang penting yaitu lesitin, sepalin dan lipositol (Santoso, 2005).

Secara umum kedelai merupakan sumber vitamin B, karena kandungan vitamin B₁, B₂, niasin, piridoksin, dan golongan vitamin B lainnya banyak

terdapat didalamnya. Vitamin lain yang terkandung dalam jumlah banyak ialah vitamin E dan K (Santoso, 2005).

2.2 Tinjauan Fermentasi

Fermentasi adalah suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Proses pertumbuhan mikroba merupakan tahap awal proses fermentasi yang dikendalikan terutama dalam pengembangan inokulum agar dapat diperoleh sel yang hidup. Pengendalian dilakukan dengan pengaturan kondisi medium, komposisi medium, suplai O₂, dan agitasi. Bahkan jumlah mikroba dalam fermentor juga harus dikendalikan sehingga tidak terjadi kompetisi dalam penggunaan nutrisi. Nutrisi dan produk fermentasi juga perlu dikendalikan, sebab jika berlebih nutrisi dan produk metabolit hasil fermentasi tersebut dapat menyebabkan inhibisi dan represi. Pengendalian diperlukan karena pertumbuhan biomassa dalam suatu medium fermentasi dipengaruhi banyak faktor baik ekstraselular maupun faktor intraselular (Suprihatin, 2010).

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).

Kedelai merupakan salah satu bahan yang dapat difermentasi untuk menghasilkan suatu produk makanan. Salah satu produk fermentasi yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan makanan adalah tempe. Kedelai mengandung

senyawa isoflavon glukosida dalam jumlah yang besar. Proses fermentasi pada kedelai berperan dalam meningkatkan kandungan senyawa isoflavon dalam bentuk aglikon. Proses peningkatan konsentrasi aglikon karena kegiatan mikroba dapat meningkatkan bioavailabilitas isoflavon aglikon dalam tubuh manusia (Haron *et al.*, 2009). Bentuk aglikon yang terdapat dalam kedelai yaitu genistein, daidzein dan glisitein yang memiliki aktifitas hambatan tirosinase yang lebih kuat daripada bentuk glukosidanya (Chang, 2009).

2.3 Tinjauan Kapang

Kapang memiliki ukuran yang jauh lebih besar dan lebih kompleks dibandingkan bakteri dan khamir. Beberapa jenis diantaranya tumbuh menyerupai bulu atau rambut yang dikenal sebagai *mycellium*. Ujung-ujungnya berbentuk menyerupai buah yang disebut konidia yang berisi spora. Pada umumnya, spora pada konidia mempunyai warna yang berbeda-beda misalnya warna hijau tumbuh pada roti busuk, oranye atau merah pada oncom, serta putih atau hitam dengan miselium yang putih seperti kapas, tumbuh pada tempe (Suprapti, 2003).

Kapang terdiri dari suatu thallus (jamak = *thalli*) yang tersusun dari filamen yang bercabang disebut hifa (tunggal = *hypha*, jamak = *hyphae*) (Fardiaz, 1992). Hifa yang terbentuk kadang-kadang bersifat multinukleat dengan diameter 2-10 μm . Panjang hifa dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan. Jika tumbuh pada permukaan medium, hifa berukuran sangat panjang, sedangkan jika tumbuh dibawah permukaan (terendam) hifa akan terputus-putus sehingga ukurannya lebih pendek tetapi bercabang-cabang (Suprihatin, 2010).

Pada umumnya kapang dapat menggunakan berbagai komponen makanan, dari yang sederhana sampai kompleks. Kapang dapat memproduksi enzim hidrolitik misalnya amilase, pektinase, proteinase dan lipase, oleh karena itu dapat tumbuh pada makanan-makanan yang mengandung pati, pektin, protein atau lipid. Semua kapang bersifat aerobik yaitu membutuhkan oksigen untuk

pertumbuhannya. Kapang dapat tumbuh pada kisaran pH 2-8,5 tetapi biasanya pertumbuhan akan lebih baik pada kondisi asam atau pH rendah. Kebanyakan kapang bersifat mesofilik yaitu tumbuh pada suhu kamar. Suhu optimum pertumbuhan kapang adalah sekitar 25-30°C, tetapi beberapa dapat tumbuh pada suhu 35-37°C atau lebih tinggi misalnya *Aspergillus* spp. (Fardiaz, 1992).

Pertumbuhan kapang biasanya berjalan lambat bila dibandingkan dengan pertumbuhan bakteri dan khamir. Oleh karena itu jika kondisi pertumbuhan memungkinkan semua mikroorganisme untuk tumbuh, kapang bisa kalah dalam kompetisi khamir dan bakteri. Tetapi sekali kapang dapat mulai tumbuh, pertumbuhan yang ditandai dengan pembentukan miselium dapat berlangsung cepat (Fardiaz, 1992).

Kapang banyak digunakan dalam fermentasi makanan maupun dalam industri kimia. Dalam fermentasi makanan oleh kapang, enzim yang berperan terutama adalah enzim amilolitik dan proteolitik, masing-masing untuk memecah pati dan protein dalam substrat. Kapang yang biasanya digunakan dalam fermentasi makanan adalah *R. oligosporus* atau *R. oryzae* untuk pembuatan tempe dan oncom, *A. oryzae* untuk pembuatan kecap dan koji. Dalam industri, kapang banyak digunakan untuk memproduksi berbagai asam, enzim dan antibiotik misalnya *A. niger* untuk pembuatan asam sitrat, dan *Penicillium chrysogenum* untuk pembuatan penisilin (Fardiaz, 1992).

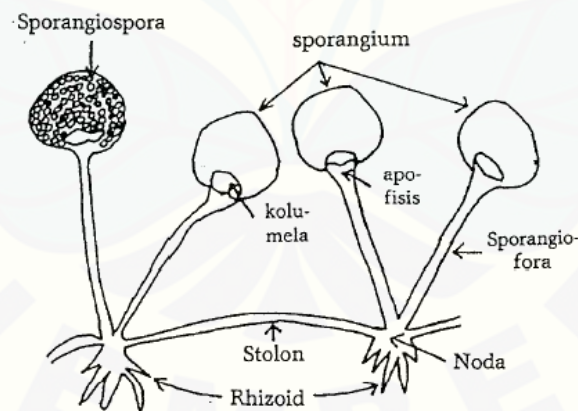
2.4 Tinjauan tentang *Rhizopus oligosporus*

R. oligosporus mempunyai koloni abu-abu kecoklatan dengan tinggi 1 mm atau lebih. Sporangiofor tunggal atau dalam kelompok dengan dinding halus atau agak sedikit kasar, dengan panjang lebih dari 1000 µm dan diameter 10-18 µm. Sporangia globosa yang pada saat masak berwarna hitam kecoklatan, dengan diameter 100-180 µm (Wipradnyadewi *et al.*, 2004).

Menurut Pitt dan Hocking (1985) *R. oligosporus* memiliki panjang sporangiosfor pada media Malt Extract Agar (MEA) 150-400 μm lebih pendek dari *R. oryzae* yaitu lebih dari 1500 μm . *R. oligosporus* memiliki rhizoid yang pendek, sporangium dengan diameter 80-120 μm dan pada saat 7 hari akan pecah menyebabkan spora keluar kolumela dengan diameter 25-75 μm . Morfologi jamur *Rhizopus spp.* dapat dilihat pada (Gambar 2.3).

Menurut New Zealand Organisms Register (NZOR) (<http://www.nzor.org>.) klasifikasi dari *Rhizopus oligosporus* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Fungi
 Phylum : Zygomycota
 Subphylum : Mucoromycotina
 Order : Mucorales
 Family : Mucoraceae
 Genus : *Rhizopus*
 Species : *Rhizopus oligosporus*



Gambar 2.3 Bentuk morfologi jamur *Rhizopus spp.* (Fardiaz, 1992)

Jenis kapang yang digunakan dalam fermentasi kedelai untuk menghasilkan tempe berpengaruh terhadap kadar isoflavon tempe. Tempe yang

dibuat dari kapang *R. oryzae* memiliki aglikon (genistein dan daidzein) lebih rendah dibandingkan dengan tempe dari kapang *R. oligosporus*, tetapi sebaliknya memiliki isoflavon glukosida (genistin dan daidzin) yang lebih tinggi. Hasil penelitian Purwoko *et al.*, (2001) menunjukkan bahwa tempe hasil fermentasi *R. oryzae* menghasilkan isoflavon aglikon sekitar 300 µg/g, sedangkan tempe hasil fermentasi *R. oligosporus* lebih tinggi, sekitar 2 kali, dibandingkan *R. oryzae* (Purwoko, 2004).

2.5 Tinjauan tentang Isoflavon pada Kedelai

Isoflavon terdiri atas struktur dasar C₆-C₃-C₆, secara alami disintesa oleh tumbuh-tumbuhan dan senyawa asam amino aromatik fenilalanin atau tirosin. Biosintesa tersebut berlangsung secara bertahap dan melalui sederetan senyawa antara yaitu asam sinamat, asam kumarat, kalkon, flavon dan isoflavon. Berdasarkan biosintesa tersebut maka isoflavon digolongkan sebagai senyawa metabolit sekunder (Hernawati, 2008).

Isoflavon termasuk dalam kelompok flavonoid (1,2-diarilpropan) dan merupakan kelompok yang terbesar dalam kelompok tersebut. Meskipun isoflavon merupakan salah satu metabolit sekunder, tetapi ternyata pada mikroba seperti bakteri, algae, jamur dan lumut tidak mengandung isoflavon, karena mikroba tersebut tidak mempunyai kemampuan untuk mensintesisnya. Namun pada mikroba-mikroba tertentu mampu melakukan transformasi senyawa isoflavon (Hernawati, 2008).

Tanaman kedelai mengandung senyawa isoflavon yang cukup tinggi. Bagian tanaman kedelai yang mengandung senyawa isoflavon yang lebih tinggi terdapat pada biji kedelai, khususnya pada bagian hipokotil (germ) yang akan tumbuh menjadi tanaman. Sebagian lagi terdapat pada kotiledon yang akan menjadi daun pertama dari tanaman (Anderson dan Garner, 1997).

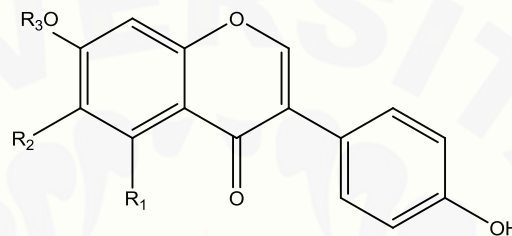
Kandungan isoflavon pada kedelai berkisar 2-4 mg/g kedelai. Senyawa isoflavon tersebut pada umumnya berupa senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa ikatan glukosida sedangkan pada kedelai yang mengalami fermentasi senyawa isoflavon yang lebih dominan adalah aglikon (Coward *et al.*, 1993). Selama proses pengolahan, baik melalui proses fermentasi maupun proses non-fermentasi, senyawa isoflavon dapat mengalami transformasi, terutama melalui proses hidrolisis, sehingga dapat diperoleh senyawa isoflavon bebas yang disebut aglikon. Senyawa aglikon tersebut adalah genistein, glisitein dan daidzein (Hernawati, 2008).

Kedelai dan olahan kedelai diketahui mengandung isoflavon. Isoflavon dalam kedelai terdapat dalam 4 bentuk yaitu malonilglukosida, asetilglukosida, glukosida, dan aglikon (bebas). Struktur isofalvon dalam kedelai dapat dilihat pada (Gambar 2.4). Di antara keempat bentuk isoflavon, aktivitas antioksidatif tertinggi ditunjukkan oleh isoflavon aglikon, terutama genistein (Esaki *et al.*, 1996). Isoflavon malonilglukosida dan asetilglukosida mudah terdeesterifikasi menjadi isoflavon glukosida dengan perlakuan suhu tinggi (di atas 40°C) (Kudou *et al.*, 1991). Hidrolisis dengan asam atau enzim β -glukosidase dapat mengubah isoflavon glukosida menjadi isoflavon aglikon dan glukosa (Purwoko *et al.*, 2001).

2.6 Tinjauan tentang Genistein

Genistein merupakan isoflavon utama yang terdapat pada kedelai. Genistein disebut sebagai senyawa fitoestrogen yang artinya estrogen yang berasal dari tanaman karena struktur dan fungsinya sama dengan estrogen pada manusia. Konsentrasi isoflavon genistein dalam kedelai yaitu antara 0,2-1 mg/g. Genistein tidak dibentuk oleh mikroorganisme tetapi berasal dari hidrolisis glukosida dalam kedelai (Polkowski dan Mazurek, 2000).

Genistein memiliki rumus molekul $C_{15}H_{10}O_5$ dengan berat molekul 270, berwarna, berbentuk kristal, memiliki titik leleh 297-298°C, sukar larut dalam asam asetat glasial dan air, larut dalam metanol dan etanol, sangat larut dalam eter, etanol panas (Wu *et al.*, 2010). Berwarna kuning ketika dilarutkan dalam alkali dan menjadi berwarna merah tua ketika dilarutkan dalam etanolik berisi besi klorida III (O'Neil, 2001).



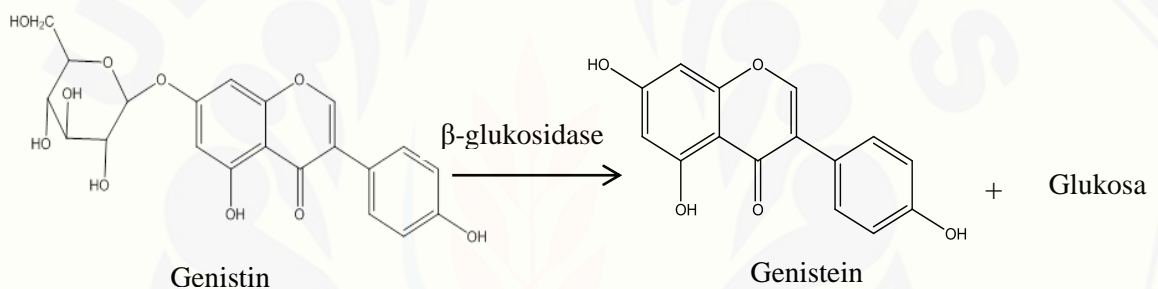
Senyawa	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzein	H	H	H
Glisitein	H	OCH ₃	H
Genistein	OH	H	H
Daidzin	H	H	Glu
Glisitin	H	OCH ₃	Glu
Genistin	OH	H	Glu
Asetilaidzin	H	H	Glu-COCH ₃
Asetilglisitin	H	OCH ₃	Glu-COCH ₃
Asetilgenistin	OH	H	Glu-COCH ₃
Malonilaidzin	H	H	Glu-COCH ₂ COOH
Malonil glisitin	H	OCH ₃	Glu-COCH ₂ COOH
Malonilgenistin	OH	H	Glu-COCH ₂ COOH

Gambar 2.4 Struktur kimia isoflavon kedelai (Yuan *et al.*, 2006)

2.7 Pengaruh Fermentasi terhadap Profil Isoflavon

Peningkatan jumlah isoflavon dapat terjadi karena adanya pengaruh dari fermentasi. Proses fermentasi terjadi akibat dari aksi enzim mikroorganisme. Salah satu enzim yang berperan dalam proses transformasi tersebut adalah β -glukosidase (Punjaisee *et al.*, 2011).

β -glukosidase merupakan enzim yang berperan utama dalam metabolisme karbohidrat. Ha *et al.*, (1992) dan Coward *et al.*, (1993) menyatakan bahwa biotransformasi isoflavon glukosida (daidzin dan genistin) menjadi isoflavon aglikon (daidzein dan genistein) merupakan akibat dari kerja enzim β -glukosidase (Gambar 2.5). Enzim β -glukosidase dihasilkan *Rhizopus* spp. (Purwoko *et al.*, 2001). Menurut Barz *et al.*, (1990), enzim β -glukosidase bekerja optimum pada suhu 45°C dan pH 7,5. Aktivitas enzim β -glukosidase *R. oligosporus* lebih besar dibandingkan *R. oryzae* dan *R. stolonifer* (Purwoko, 2004).



Gambar 2.5 Biotransformasi genistin menjadi genistein oleh enzim β -glukosidase (Pandit *et al.*, 2011)

Menurut Purwoko (2004) selama 4 hari fermentasi, aktivitas enzim β -glukosidase *R. oligosporus* mampu menambah jumlah isoflavon aglikon sebesar 552,17-678,23 $\mu\text{g/g}$. Penambahan isoflavon aglikon tertinggi terjadi pada fermentasi antara 2 sampai 3 hari yaitu 268,01-284,77 $\mu\text{g/g}$. Hal tersebut karena pada fermentasi tersebut nilai pH tempe adalah 6,9-7,3. Nilai pH tersebut mendekati kondisi pH optimum enzim β -glukosidase yaitu 7,5 (Barz *et al.*, 1990). Penambahan isoflavon aglikon terendah terjadi pada fermentasi antara 3 sampai 4 hari yaitu 70,59-97,50 $\mu\text{g/g}$. Pada fermentasi tersebut *R. oligosporus* melakukan sporulasi, sehingga aktivitas enzim β -glukosidase menurun (Purwoko *et al.*, 2001).

2.8 Melanogenesis

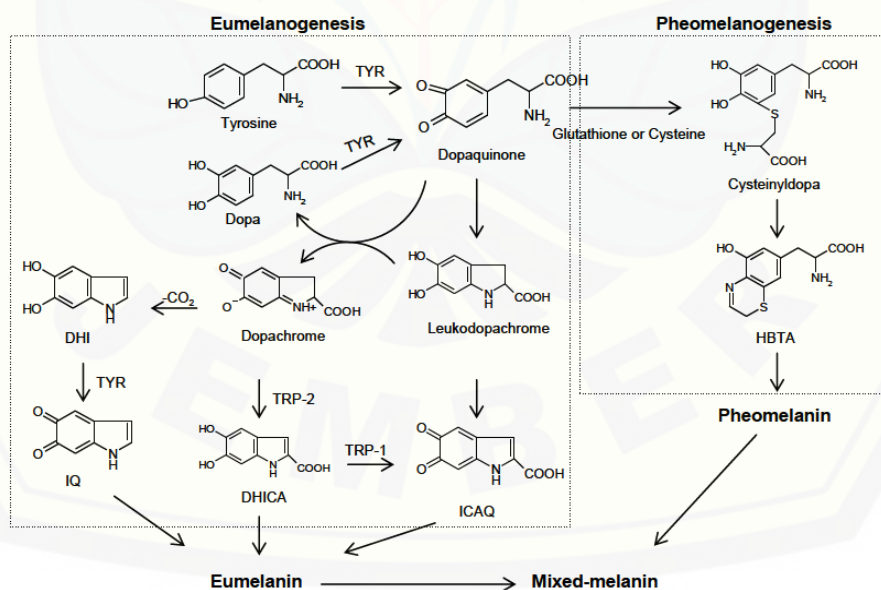
Melanin adalah pigmen hitam/coklat yang ditemukan di organisme hidup mulai dari fungi, tanaman, dan mamalia. Melanin memiliki fungsi yang berbeda pada tiap organisme misalnya, pada invertebrata melanin adalah bagian dari sistem imun dan pada mamalia melanin adalah penentu utama warna kulit, rambut dan mata (Zecca *et al.*, 2001).

Melanin adalah turunan indole DOPA (dihidroksi fenilalanin) yang dibentuk dalam melanosom melalui beberapa tahapan oksidasi. Berdasarkan atas warna akhir dari sintesis melanin, berat molekul dan derajat kelarutannya, dikenal dua tipe melanin yaitu melanin dengan ciri berwarna hitam atau coklat, sukar larut dan berat molekulnya tinggi disebut eumelanin. Sementara melanin yang berwarna kuning kemerahan, mudah larut dan berat molekul lebih rendah disebut feomelanin (Bandem, 2013).

Melanogenesis atau proses pembentukan melanin terjadi di melanosit yang terdapat pada epidermis. Melanogenesis dimulai dengan hidroksilasi asam amino tirosinase oleh enzim tirosinase menjadi L-DOPA. L-DOPA berfungsi sebagai *co-faktor* dalam proses oksidasi berikutnya dan sebagai substrat enzim tirosinase. L-DOPA dioksidasi menjadi dopakuinon, kemudian dopakuinon dikonversi menjadi dopakrom kemudian dikonversi oleh enzim tirosinase menjadi DHI (5,6-dihidroksiindol) atau dikatalisis oleh enzim dopakrom taumerase atau TRP2 menjadi DHICA (*5,6-dihydroxy-indole-2-carboxylic acid*). DHI kemudian di konversi menjadi melanin DHI yang berwarna hitam, tidak larut dan mempunyai berat molekul tinggi, sedangkan DHICA dikonversi menjadi melanin DHICA yang berwarna coklat dan mempunyai berat molekul sedang (Bandem, 2013). Dopakuinon juga dapat berikatan dengan glutation atau sistein membentuk sisteinil DOPA yang berwarna kuning kemerahan dan mempunyai berat molekul ringan yang disebut feomelanin (Bandem, 2013).

Melanin memainkan peran penting dalam melindungi kulit manusia dari efek berbahaya radiasi UV matahari namun, akumulasi abnormal melanin dapat menyebabkan perbedaan secara spesifik pada tiap bagian kulit dimana terdapat kulit yang banyak mengandung melanin dan tidak terdapat melanin (Chang, 2009).

Tirosinase merupakan enzim yang berperan dalam sintesis melanin. Tirosinase disebut juga polifenol oksidase yang memiliki gugus ion logam tembaga (Cu^{2+}) dan berat molekul sebesar 113.000 dalton (Warrington dan Saville, 1999). Sisi aktif dari tirosinase mengandung dua atom tembaga dan enzim dapat berubah menjadi tiga bentuk yaitu deoksi-tirosinase, oksi-tirosinase dan met-tirosinase (Christopher dan Riley, 2010). Tirosinase merupakan enzim utama dalam sintesis melanin karena mempunyai kemampuan mengkatalis tiga reaksi yang berbeda seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.6. Tirosinase mengkatalis reaksi L-tirosin menjadi L-DOPA, oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon dan oksidasi DHI (5,6-dihidroksiindol) menjadi indol-5,6 kuinon yang selanjutnya membentuk melanin (Park dan Yaar, 2012).



Gambar 2.6 Jalur Biosintesis Melanin (Chang, 2009)

2.9 Tinjauan tentang Enzim

Enzim adalah protein yang mengkatalis reaksi-reaksi biokimia. Enzim biasanya terdapat dalam sel dengan konsentrasi yang sangat rendah, dimana enzim tersebut dapat meningkatkan laju reaksi biokimia yang terjadi di dalam tubuh. Enzim tersebut akan merubah suatu susunan molekul menjadi susunan lain yang lebih sederhana berupa produk, bereaksi secara spesifik dan bekerja seperti kunci dan gembok, artinya suatu aktivitas enzim hanya bereaksi terhadap susunan molekul tertentu. Aktivitas kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti inhibitor, aktivator, kofaktor, koenzim, suhu, pH, konsentrasi dari substrat (Kuchel dan Ralston, 2006).

Enzim adalah protein yang berfungsi sebagai katalisator, mempercepat reaksi kimia di dalam sistem biologi. Enzim dalam mempercepat reaksi berikatan dengan substrat dan membentuk kompleks enzim substrat sehingga terjadi perubahan substrat menjadi produk (Sari, 2007).

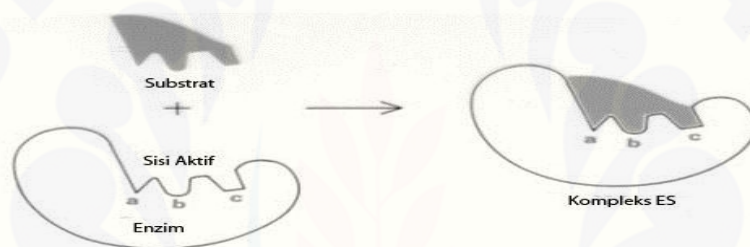
Substrat berikatan dengan enzim pada tempat pengikatan spesifik yang dikenal sebagai tempat katalitik. Tempat katalitik ini merupakan bagian khusus dari molekul enzim yang berfungsi untuk mengenali, mengikat dan mengolah substrat secara spesifik (Sari, 2007). Dari 20 jenis asam amino yang dapat membentuk struktur molekul enzim, hanya beberapa yang sering didapat berulang kali menyusun tempat katalitik. Asam amino tersebut adalah serin, aspartat, histidin, sistein, lisin, arginin, glutamat, tirosin. Diantara asam amino tersebut, serin merupakan yang paling sering didapati menyusun tempat katalitik struktur molekul enzim (Satyanarayana, 2002).

2.9.1 Mekanisme Kerja Ikatan Enzim

Enzim berikatan dengan substrat dibedakan menjadi beberapa model yaitu:

a. Model kunci-anak kunci dan tempat katalitik Fischer

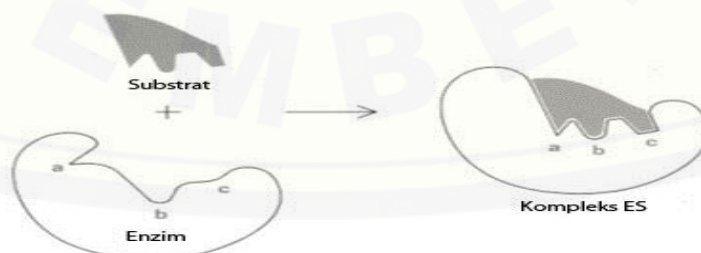
Usaha pertama untuk menerangkan enzim dengan substrat yang demikian spesifik dilakukan oleh Emil Fischer, seorang pakar biokimia enzimologi dengan gagasan model kunci-anak kunci. Menurut model ini, ketika substrat bertemu dengan enzim mungkin saja terjadi benturan dengan bagian tertentu dari molekul enzim yang strukturnya sedemikian rupa, sehingga dapat diduduki secara pas oleh substrat dan terbentuklah kompleks enzim-substrat atau lebih dikenal sebagai kompleks ES (Gambar 2.7). Kompleks ini penting karena merupakan prasyarat untuk berlangsungnya proses katalisis yang berujung kepada pembentukan produk (Murray *et al.*, 2000 ; Sadikin, 2002).



Gambar 2.7 Model kunci-anak kunci Fischer (Sari, 2007)

b. Substrat menimbulkan perubahan konformasi dalam enzim.

Suatu ciri yang kurang menguntungkan pada model Fischer adalah kekakuan (rigiditas) yang diwujudkan pada tempat katalitik. Model yang lebih umum adalah model *induced fit* dari Koshland. Dalam model ini substrat menimbulkan atau menginduksi suatu perubahan bentuk dalam enzim (Gambar 2.8) (Murray *et al.*, 2000).

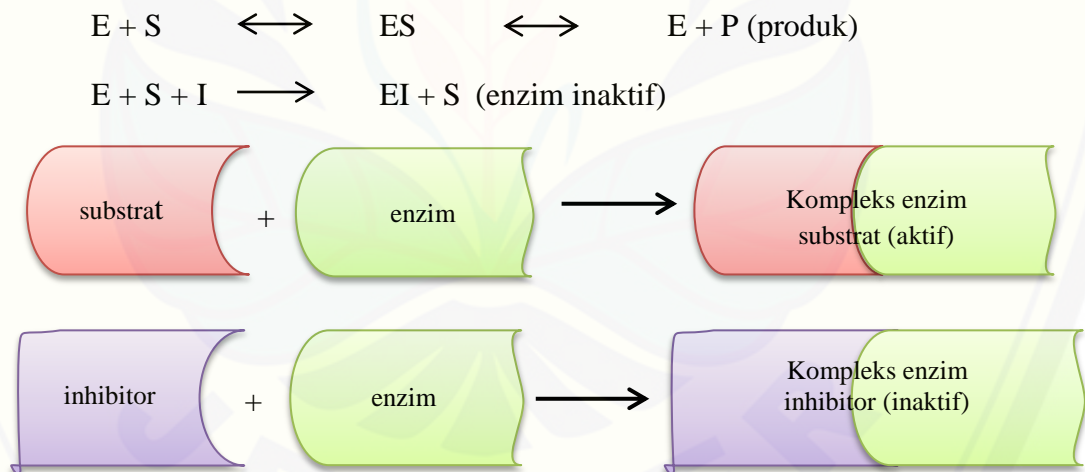


Gambar 2.8 Model *induced fit* Koshland (Sari, 2007)

2.9.2 Hambatan enzim

Inhibitor atau penghambatan suatu enzim adalah suatu senyawa atau zat yang dapat menghalangi aktivitas kerja enzim tersebut. Berdasarkan sifat kestabilan penghambatan, penghambatan enzim dapat dibedakan atas penghambatan *irreversible* (stabil) dan *reversible* (tak stabil) (Sumardjo, 2009). Penghambatan *irreversible* adalah golongan yang bereaksi dengan merusak suatu gugus fungsional pada molekul enzim yang penting bagi aktivitas katalitik sehingga enzim tersebut tidak dapat kembali ke bentuk semula. Penghambatan *reversible* adalah penghambatan enzim yang dapat balik, yang dapat digolongkan menjadi dua jenis yaitu penghambatan yang bersaing (kompetitif) dan penghambatan tidak bersaing (non-kompetitif) (Suhara, 2008).

Zat penghambat yang bersaing itu mempunyai struktur mirip dengan struktur molekul substrat. Suatu penghambatan kompetitif berlomba dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif enzim (Gambar 2.9) (Suhara, 2008).



Gambar 2.9 Aktivitas inhibitor kompetitif enzim (Suhara, 2008)

Zat penghambatan tidak bersaing (non-kompetitif) dapat menempel pada enzim, pada sisi regulasi enzim sehingga mengubah konformasi molekul enzim yang menyebabkan inaktivasi enzim (Gambar 2.10) (Suhara, 2008).



Gambar 2.10 Aktivitas inhibitor non-kompetitif enzim (Suhara, 2008).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

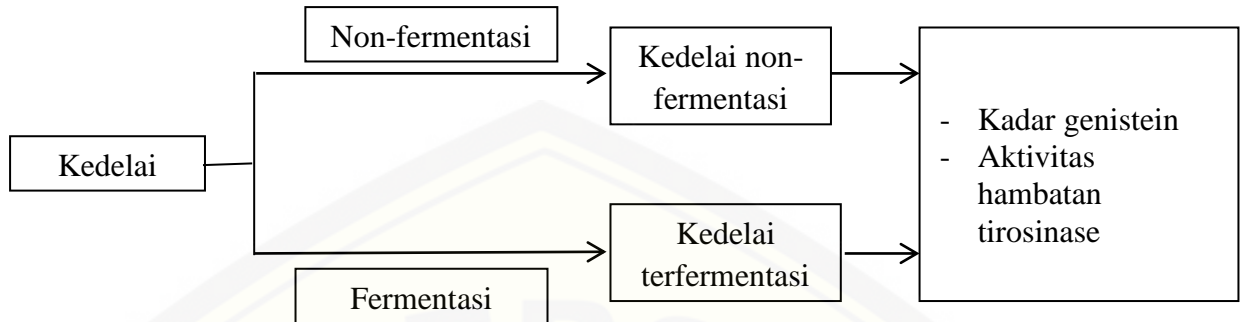
Jenis penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini termasuk jenis penelitian *True Experimental Laboratories* yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan kandungan isoflavon genistein dan perbedaan aktivitas hambatan tirosinase pada ekstrak etanol biji kedelai non-fermentasi dan kedelai yang difermentasi oleh *R. oligosporus* pada hari ke-2, 3 dan 4.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia dan Mikrobiologi bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember mulai bulan Maret 2015 sampai bulan Juli 2015.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan *Post Test Only Control Grup Design* yaitu suatu rancangan penelitian dimana tidak diadakan pretest, karena kasus-kasus telah dirandomisasi baik pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol. Kelompok-kelompok tersebut dianggap sama sebelum dilakukan perlakuan (Notoatmojo, 2005). Secara skematis rancangan tersebut digambarkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

3.3.1 Rancangan Operasional

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut:

- Pengumpulan biji kedelai (*Glycine max*) varietas Baluran.
- Preparasi sampel kedelai non-fermentasi
- Preparasi suspensi spora *R. oligosporus* yang mengandung 10^6 spora/ml.
- Preparasi sampel kedelai yang difermentasi oleh *R. oligosporus*
- Ekstraksi simplisia kedelai dengan pelarut etanol 70%.
- Penetapan kadar isoflavon genistein ekstrak etanol kedelai non-fermentasi dan kedelai terfermentasi dengan menggunakan metode KLT-densitometri
- Uji aktivitas hambatan enzim tirosinase ekstrak etanol kedelai non-fermentasi dan terfermentasi secara *in vitro*.

3.3.2 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dijelaskan sebagai berikut:

- Kedelai yang digunakan diperoleh dari Desa Pontang, Kecamatan Ambulu Kabupaten Jember dengan varietas Baluran.
- Sebelum diekstraksi dilakukan penghilangan lemak (*defatting*) yang terkandung dalam kedelai dengan pelarut n-heksana.

- c. Ekstraksi merupakan proses pengambilan senyawa isoflavon dalam kedelai dengan menggunakan pelarut etanol 70% menggunakan metode ultrasonikasi.
- d. Kadar isoflavon aglikon dalam ekstrak dianalisis dengan menggunakan metode KLT Densitometri dengan genistein sebagai standar.
- e. Pengujian aktivitas hambatan enzim tirosinase dilakukan menggunakan metode spektrofotometri *Elisa reader*.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan fermentasi kedelai menggunakan *R. oligosporus* dan lama waktu fermentasi.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar isoflavon genistein dan aktivitas hambatan tirosinase pada kedelai non-fermentasi dan kedelai yang difermentasi oleh *R. oligosporus*.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah lama perendaman kedelai, pembuatan suspensi inokulum *R. oligosporus*, waktu dan suhu inkubasi fermentasi, cara ekstraksi kedelai, cara penetapan kadar genistein dan cara uji aktivitas hambatan tirosinase.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, pisau, neraca analitik, *blender*, oven (Memmert), *rotary evaporator* (Heildoph), mikropipet (Socorex), *blue tip*, *white tip*, jarum ose, lampu spirtus, hemasitometer (Neubauer Improved), vortex (Barnstead Thermolyne), mikroskop (Olympus BX53), *sentrifuge* (Hermle), ultrasonikator (Elmasonic), soxhlet, densitometer (*TLC-Scanner 3* Camag), autoklaf (ALP), *Laminair Air Flow* (LAF) (Airtech), lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ (Merck), *TLC chamber* (Camag), pipa kapiler, *microwell plate*, *elisa reader* (Plx800), pH meter (Elmetron), aluminium foil.

3.5.2 Bahan Penelitian

Kedelai (*Glycine max*) varietas Baluran, isolat *R. oligosporus* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember), 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., tween 80, toluen, etil asetat, aseton, asam format, dapar fosfat pH 6,5, akuades dan kertas saring.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi Kedelai Non-fermentasi

Sebanyak 500 gram kedelai dicuci kemudian direndam dalam 3 liter akuades (1:6) selama 12 jam. Kulit ari kedelai dihilangkan dan kedelai disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit lalu didinginkan. Setelah dingin kedelai diiris tipis kemudian dikeringkan menggunakan oven suhu 60°C. Simplisia kedelai dihaluskan dan diayak

menggunakan ayakan mesh 80. Serbuk yang diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya (Cheng *et al.*, 2013).

3.6.2 Peremajaan Isolat *R. oligosporus*

Isolat *R. oligosporus* terlebih dahulu diremajakan dengan mengambil sebanyak dua ose *R. oligosporus* dari tabung ke dalam media miring *potato dextrose agar* (PDA) kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) (Lee *et al.*, 2008).

3.6.3 Pembuatan Suspensi Spora *R. oligosporus*

Suspensi spora dibuat dengan cara mencuci miselia dari peremajaan isolat 3.6.2 dengan 10 ml akuades steril yang mengandung 0,1% Tween 80. Proses pemanenan dilakukan dengan menggunakan ose steril dan diresuspensi dengan mikropipet (Cheng *et al.*, 2013). Dari hasil resuspensi diambil 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril dan ditambahkan akuades steril sebanyak 9 ml sehingga diperoleh seri pengenceran 10^2 . Suspensi tersebut divortex agar homogen untuk digunakan pada proses selanjutnya.

3.6.4 Perhitungan Kepadatan Spora

Kepadatan spora hasil pengenceran 10^2 dari *R. oligosporus* dihitung dengan menggunakan alat hemasitometer. Suspensi yang akan digunakan sebagai inokulum kedelai yaitu suspensi yang mengandung kepadatan sebesar 10^6 spora/ml (Cheng *et al.*, 2013).

Untuk menghitung spora dengan hemasitometer dilakukan dengan menggunakan kamar hitung eritrosit *Improved Neubauer*. Langkah-langkah perhitungan menggunakan hemasitometer adalah sebagai berikut:

- Suspensi spora yang telah divortex diteteskan sebanyak satu tetes pada bidang hitung hemasitometer yang sudah ditutup dengan cover glass melalui tepi kamar hitung.
- Perhitungan spora dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x . Spora yang dihitung terletak pada kotak hitung (1+2+3+4+5). Perhitungan spora hanya dilakukan pada daerah yang ditunjukkan pada Gambar 3.2 (a).
- Perhitungan spora dilakukan dengan cara seperti pada Gambar 3.2 (b) yaitu dari kiri kekanan dan di bawahnya dimulai dari kanan ke kiri.
- Jumlah spora yang diperoleh dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$N = \frac{x}{t \text{ (mm)} \times d \times l \text{ (mm}^2\text{)}} \times 10^3$$

Keterangan:

N : Jumlah spora/ml

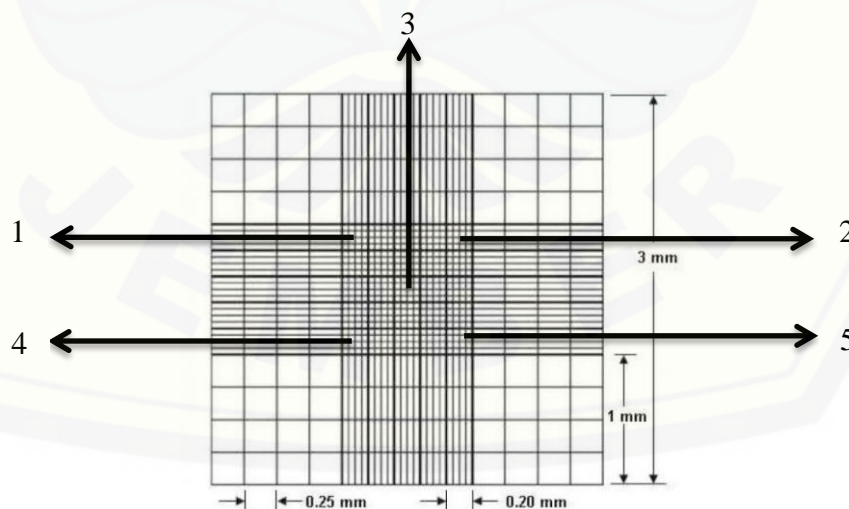
x : Jumlah spora yang dihitung (1+2+3+4+5)

l : Luas kotak hitung (0,04 x 5 = 0,2 mm²)

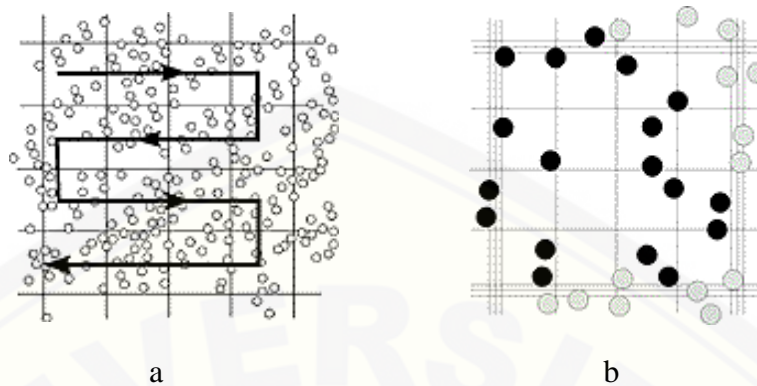
t : Kedalaman bidang hitung (0,1 mm)

10³ : Volume suspensi yang diambil (1 ml=10³ mm³)

(Modifikasi dari Tim QC APH Golongan jamur, 2009)



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



Gambar 3.3 Cara menghitung spora dengan menggunakan hemasitometer (a) Alur perhitungan spora (b) cara perhitungan spora (● menunjukkan spora yang dihitung, ○ menunjukkan spora yang tidak dihitung) (Tim QC APH Golongan Jamur, 2009)

Bila suspensi spora yang didapatkan memiliki kepadatan lebih dari 1×10^6 spora/ml, maka dapat dilakukan pengenceran dengan rumus:

$$N1.V1 = N2.V2$$

Keterangan :

N1 : konsentrasi larutan stok (spora/ml)

V1 : volume larutan stok (ml)

N2 : konsentrasi larutan yang diinginkan (spora/ml)

V2 : volume larutan yang diinginkan (ml)

3.6.5 Preparasi Kedelai Fermentasi

Sebanyak 500 gram kedelai dicuci kemudian direndam dalam 3 liter akuades (1:6) selama 12 jam. Kulit ari kedelai dihilangkan dan kedelai disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit lalu didinginkan. Setelah dingin, 100 gram kedelai matang diinokulasi dengan 1 ml suspensi spora yang memiliki kepadatan (10^6 spora/ml). Setelah dicampur, kedelai dibungkus dengan kertas saring dan diinkubasi pada suhu 30°C (Cheng *et al.*, 2013). Fermentasi dilakukan selama 2, 3 dan 4 hari. Setelah terbentuk tempe yang ditandai dengan

tumbuhnya miselia, tempe diiris tipis kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 60°C. Simplisia tempe dihaluskan dan diayak menggunakan mesh 80. Serbuk yang diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya (Cheng *et al.*, 2013).

3.6.6 Proses Penghilangan Lemak (*defatting*)

Penghilangan lemak kedelai dilakukan dengan menggunakan metode soxhlet. Serbuk kedelai non-fermentasi dan serbuk tempe dibungkus dengan kertas saring masing-masing sebanyak 40 gram kemudian dimasukkan kedalam tabung ekstraktor dari soxhlet. Pelarut yang digunakan adalah n-heksana sebanyak 200 ml (1:5). Proses soxhletasi dilakukan selama 3 jam, serbuk kedelai yang telah dihilangkan lemaknya dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan ditimbang untuk proses selanjutnya (Hui *et al.*, 2005).

3.6.7 Pembuatan Ekstrak Kedelai

Serbuk bebas lemak diekstraksi menggunakan metode sonikasi dengan pelarut etanol 70% selama 1 jam. Serbuk kedelai bebas lemak ditimbang kemudian dimasukkan kedalam *beaker glass* dan ditambahkan dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:4, kemudian ditutup dengan alumunium foil. Proses ekstraksi tersebut dilakukan sebanyak tiga kali dengan menggunakan pelarut yang baru. Campuran kedelai dengan etanol 70% disentrifuse dengan kecepatan 2600 rpm selama 10 menit. Filtrat dipindahkan ke *beaker glass* lain dan residu diresuspensi yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental (Luthria *et al.*, 2007 dengan modifikasi).

3.6.8 Penetapan Kadar Isoflavon Genistein

Penentuan kadar isoflavon aglikon genistein dalam ekstrak kedelai dilakukan dengan menggunakan metode KLT Densitometri (Sari, 2015).

a. Membuat Standar Uji

Membuat larutan standar induk genistein dengan cara menimbang 5,193 mg serbuk standar genistein kemudian dilarutkan dalam metanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi 519,3 $\mu\text{g/ml}$. Larutan induk diencerkan sehingga diperoleh larutan standar dengan konsentrasi 5,193; 15,579; 31,158; 62,316; 103,86 dan 124,632 $\mu\text{g/ml}$. Perhitungan pembuatan standar uji dapat dilihat pada lampiran A.4.

b. Membuat Sampel Uji

Ekstrak kental ditimbang sebanyak 125 mg kemudian dilarutkan dalam metanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 25.000 $\mu\text{g/ml}$.

c. Kondisi Analisis

Fase diam yang digunakan adalah lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) silika gel GF₂₅₄ dan sebagai fase gerak digunakan toluen – etil asetat – aseton – asam format (20:4:2:1). Perhitungan komposisi fase gerak dapat dilihat pada lampiran A.6. Penotolan dilakukan dengan menggunakan pipa kapiler dengan volume masing-masing standar 2 μl dan volume sampel sebanyak 6 μl . Noda yang terbentuk diamati dibawah lampu UV 254 nm dan untuk selanjutnya *discanning* dengan menggunakan densitometer pada panjang gelombang 266 nm.

3.6.9 Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase

Pengujian aktivitas hambatan tirosinase dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Batubara *et al.*, (2010) dengan modifikasi.

a. Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 6,5

Menimbang KH_2PO_4 sebanyak 1,361 gram kemudian dilarutkan dalam aquades sampai dengan volume 50 ml, sehingga diperoleh larutan KH_2PO_4

dengan konsentrasi 0,2 M. Menimbang NaOH sebanyak 400 mg dilarutkan dalam akuades sampai volume 50 ml sehingga diperoleh larutan NaOH dengan konsentrasi 0,2 N. Larutan dapar fosfat dibuat dengan cara menambahkan 50 ml KH_2PO_4 dengan 12,6 ml NaOH lalu diencerkan dengan akuades sehingga diperoleh volume 200 ml. pH dicek dengan menggunakan pH meter bila perlu dilakukan adjust dengan penambahan HCl dan NaOH sampai diperoleh pH sebesar 6,5.

b. Pembuatan Larutan Substrat L-Tirosin

Menimbang L-tirosin sebanyak 4,53 mg, kemudian dilarutkan kedalam 25 ml dapar fosfat pH 6,5 sehingga diperoleh konsentrasi L-tirosin sebesar 1 mM.

c. Pembuatan Larutan Enzim Tirosinase

Mushroom tyrosinase 50 KU dilarutkan dalam dapar fosfat pH 6,5 sebanyak 10 ml. Larutan dibagi menjadi 2 masing-masing vial sebanyak 5 ml. Masing-masing vial dilarutkan dengan menambahkan larutan dapar fosfat sampai 10 ml sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 25 KU. Larutan kemudian diencerkan kembali sampai diperoleh konsentrasi sebesar 2,5 KU dan kemudian disimpan di dalam *freezer* sampai digunakan untuk proses selanjutnya.

d. Pembuatan Sampel uji

Ekstrak kental ditimbang sebanyak 20 mg kemudian dilarutkan dalam 1 ml DMSO, lalu ditambahkan dapar fosfat pH 6,5 sampai dengan 5 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Selanjutnya dilakukan pengenceran sehingga diperoleh konsentrasi 100, 200, 300, 400 dan 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

e. Pembuatan Standar Uji Genistein

Larutan standar genistein digunakan sebagai kontrol positif dibuat dengan cara menimbang 5,193 mg standar genistein kemudian dilarutkan dalam 10 ml metanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi baku induk 519,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Larutan induk diencerkan sehingga diperoleh larutan standar dengan konsentrasi 41,544; 62,316; 83,088; 124,632 dan 145,404 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Perhitungan pembuatan standar uji dapat dilihat pada lampiran A.10.

f. Pengujian Aktivitas Hambatan Tirosinase

Pengujian aktivitas hambatan tirosinase dilakukan dengan memipet 70 μ l ekstrak dimasukkan ke dalam *microwell plate*, kemudian ditambahkan 40 μ l enzim tirosinase (250 unit/ml dalam dapar fosfat pH 6,5). Inkubasi campuran larutan selama 5 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan 110 μ l substrat (1 mM L-tirosin) dan diinkubasi kembali selama 80 menit pada suhu kamar. Warna yang dihasilkan diukur absorbansinya dengan menggunakan *Elisa reader* pada panjang gelombang 478 nm untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambat 50% (IC_{50}). Persen hambatan dihitung dengan cara membandingkan serapan sampel sebelum penambahan ekstrak (A) dengan setelah penambahan ekstrak (B):

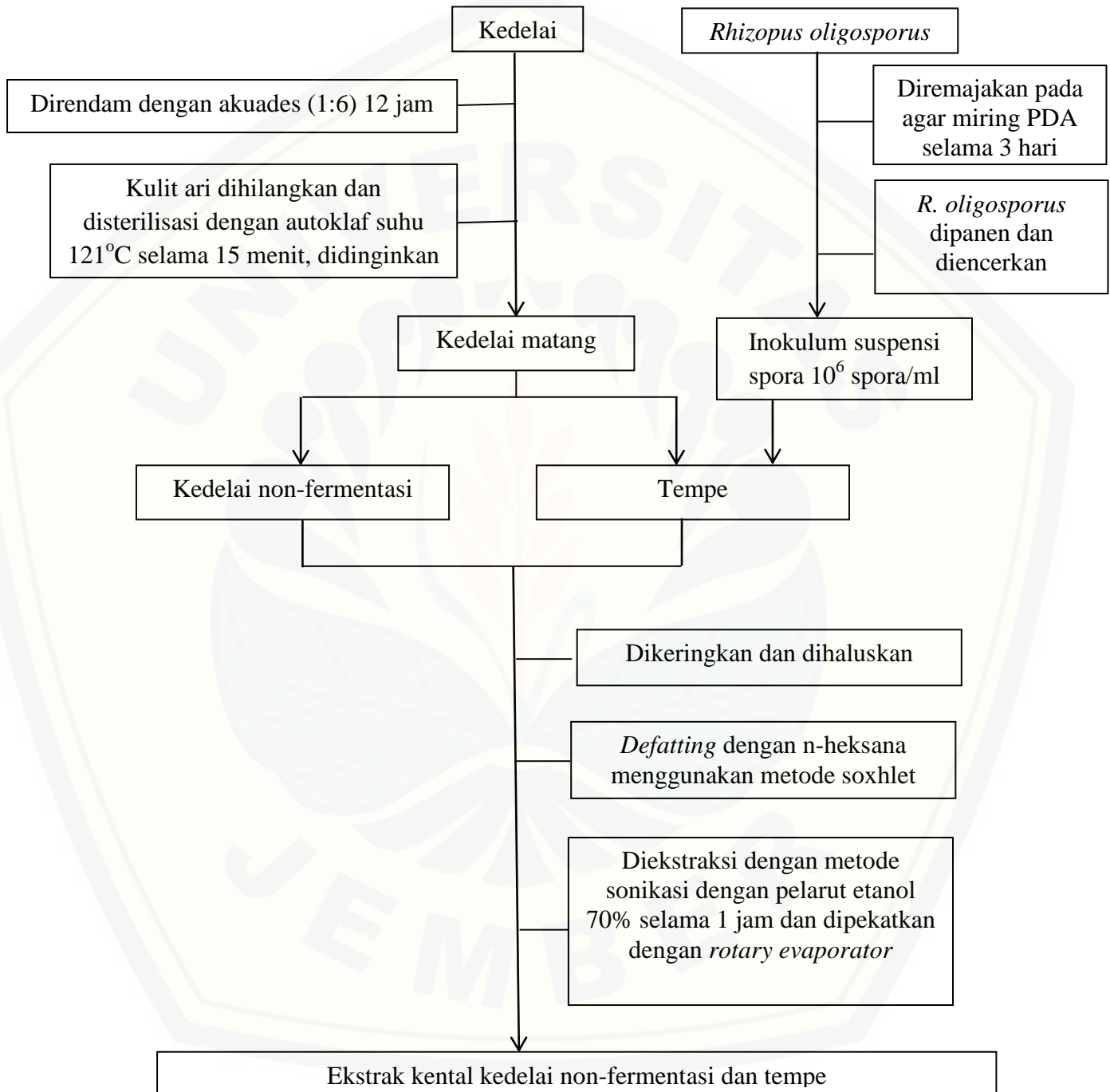
$$\text{Hambatan (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100 \%$$

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan melihat uji normalitas dan uji varians yang digunakan sebagai syarat uji analisis varian satu arah ANOVA untuk melihat perbedaan rata-rata kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase dari dua atau lebih kelompok. Jika tidak memenuhi syarat, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya distribusi menjadi normal dan varians menjadi sama. Jika, pada uji ANOVA menghasilkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc* LSD (Dahlan, 2011).

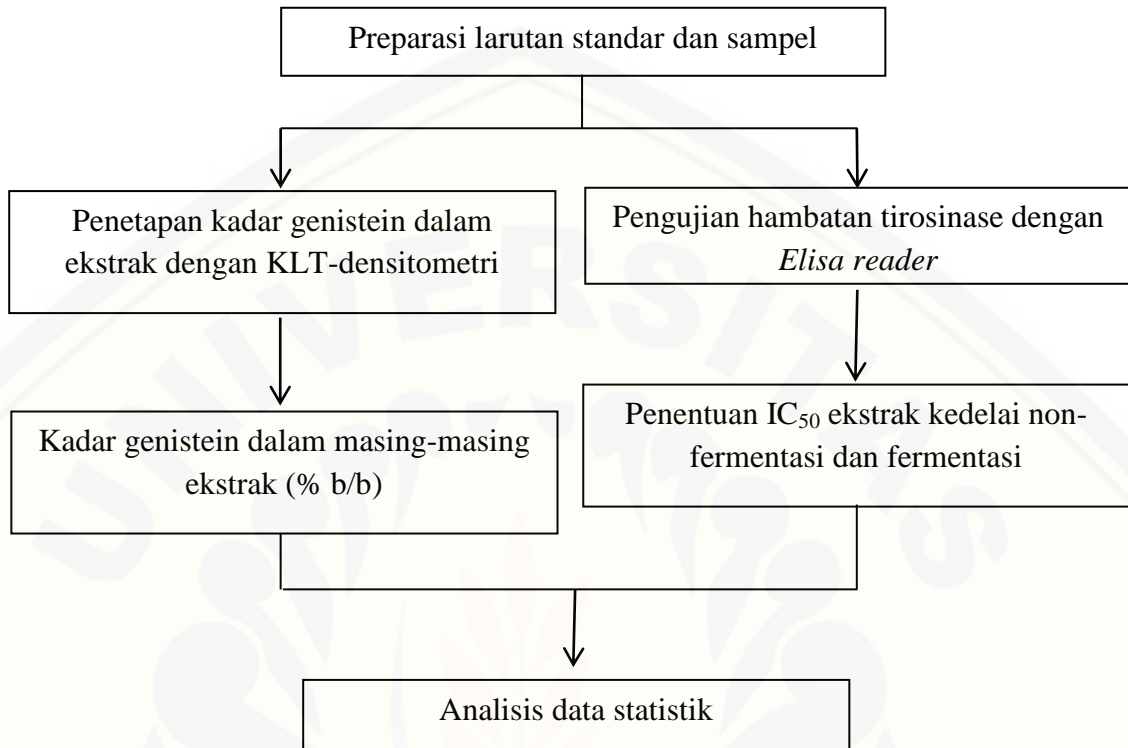
3.8 Skema Penelitian

3.8.1 Pembuatan Ekstrak Kedelai Non-fermentasi dan Terfermentasi



Gambar 3.4 Skema alur pembuatan ekstrak kedelai non-fermentasi dan kedelai fermentasi

3.8.2 Penetapan Kadar Genistein dan Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase



Gambar 3.5 Skema alur penelitian penetapan kadar genistein dan uji aktivitas hambatan tirosinase

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Kedelai Fermentasi dengan *Rhizopus oligosporus*

Pembuatan tempe dimulai dengan merendam kedelai dalam air. Perendaman bertujuan agar kedelai dapat menyerap air sebanyak mungkin, sehingga membuatnya lebih lunak dan memudahkan proses pengupasan kulit. Proses sterilisasi dengan autoklaf diperlukan untuk memastikan bahwa kedelai dalam keadaan matang dan steril (Utari *et al.*, 2010). Karakteristik kedelai yang difermentasi dengan menggunakan *R. oligosporus* tersaji pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.1.

Tabel 4.1 Karakteristik kedelai fermentasi dengan *R. oligosporus*

Waktu fermentasi (hari)	Warna miselia	Aroma	Penampilan
2	Putih	Khas tempe	Kedelai ditumbuhi oleh miselia jamur yang belum merata dan kurang kompak.
3	Putih keabu-abuan	Khas tempe, sedikit berbau amoniak	Kedelai ditumbuhi miselia jamur seperti kapas berwarna putih keabu-abuan yang merata dan berbentuk kompak
4	Putih keabu-abuan	Berbau amoniak, busuk	Kedelai ditumbuhi miselia jamur seperti kapas berwarna putih keabu-abuan yang merata dan berbentuk kompak.

Pertumbuhan kapang terlihat dengan terbentuknya miselia yang terdapat pada permukaan biji kedelai yang semakin lebat seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi. Semakin lama waktu fermentasi menyebabkan perubahan warna miselia kapang yang semula berwarna putih menjadi berwarna putih keabu-abuan akibat tumbuhnya spora disertai dengan bau amoniak yang berasal dari proses degradasi protein dan asam amino (Purwoko, 2004). Pembusukan tempe terjadi ketika protein yang terkandung dalam tempe mengalami reaksi deaminasi.

Deaminasi merupakan suatu reaksi kimia yang melepaskan gugus amina dari asam amino pada tempe. Gugus amina ini akan terkonversi menjadi amonia yang menyebabkan tempe berbau busuk (Anindya *et al.*, 2014).



Hari ke-2

Hari ke-3

Hari ke-4

Gambar 4.1 Karakteristik kedelai yang difermentasi dengan *R. oligosporus*

4.2 Ekstraksi Isoflavon Kedelai Non-fermentasi dan Kedelai Fermentasi

Hasil rendemen masing-masing sampel tersaji pada Tabel 4.2. Perhitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada lampiran A.3. Besarnya rendemen menunjukkan banyaknya jumlah senyawa yang terekstrak selama proses ekstraksi. Perbedaan rendemen ekstrak dipengaruhi oleh banyaknya jumlah senyawa yang terdapat di dalam ekstrak.

Tabel 4.2 Hasil rendemen ekstrak

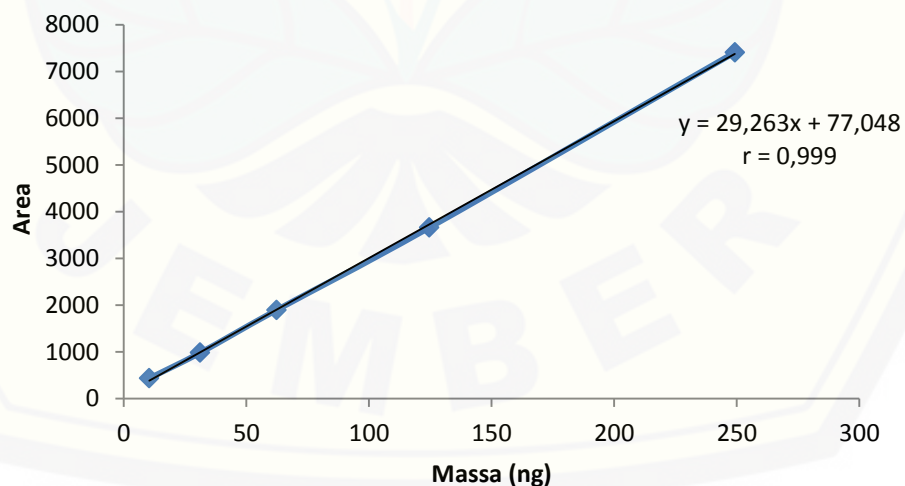
Waktu fermentasi	Rendemen Ekstrak (% b/b)
Hari ke-0	14,30
Hari ke-2	15,62
Hari ke-3	16,92
Hari ke-4	16,79

Ekstraksi isoflavon dilakukan dengan cara sonikasi menggunakan pelarut etanol 70%. Etanol 70% diketahui mampu mengekstrak isoflavon secara optimal

(Kudou *et al.*, 1991). Menurut Rostagno *et al.*, (2004) adanya air 30-40% pada pelarut ekstraksi menyebabkan peningkatan jumlah isoflavon. Hal ini dikarenakan polifenol dengan gugus hidroksi bersifat hidrofilik dan sebagian besar larut dalam hidroalkoholid. Selain itu, etanol 70% memiliki harga yang relatif lebih murah, toksisitas yang rendah dan lebih kompatibel pada lingkungan daripada metanol (Rostagno *et al.*, 2004). Sonikasi merupakan cara ekstraksi senyawa organik yang mudah dan membutuhkan waktu yang relatif lebih singkat. Menurut Lutria *et al.*, (2007) ekstraksi kedelai dengan menggunakan metode sonikasi memberikan hasil total isoflavon yang optimum dibandingkan dengan metode *soxhlet*, *shaker*, *vortex* dan *stirring*.

4.3 Penetapan Kadar Genistein

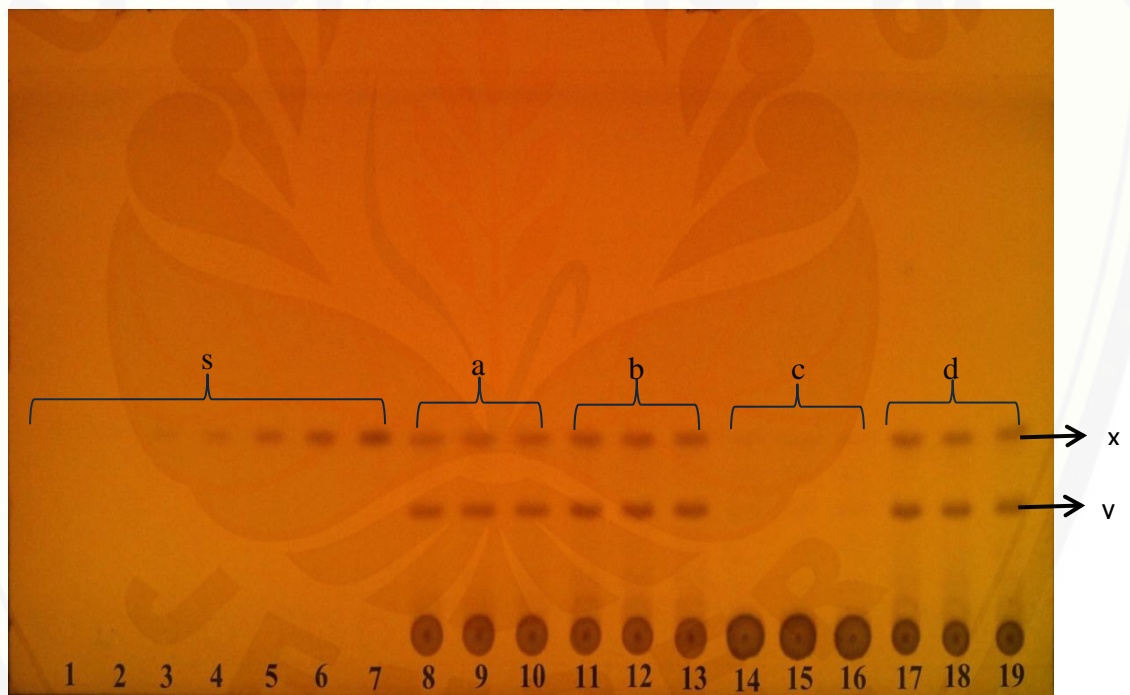
Preparasi sampel dilakukan dengan menimbang masing-masing ekstrak sebanyak ± 125 mg dengan tiga kali pengulangan. Persamaan kurva diperoleh menggunakan standar genistein dengan konsentrasi 5,193 $\mu\text{g/ml}$, 15,579 $\mu\text{g/ml}$, 31,158 $\mu\text{g/ml}$, 62,316 $\mu\text{g/ml}$ dan 124,632 $\mu\text{g/ml}$. Hubungan massa genistein (ng) dengan area ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Kurva baku standar genistein

Berdasarkan Gambar 4.2 diketahui persamaan kurva baku : $y = 29,263x + 77,048$ dengan nilai $r = 0,999$, $V_{x0} = 1,802\%$ dan $X_p = 9,624$ ng. Persamaan tersebut telah memenuhi persyaratan linieritas dengan nilai r mendekati ± 1 dan secara statistik r hitung lebih besar dari r tabel ($0,999 > 0,878$) (Suliyanto, 2012), $V_{x0} < 2\%$ dan $X_p <$ nilai konsentrasi terkecil yang digunakan (Indrayanto dan Yuwono, 2003)

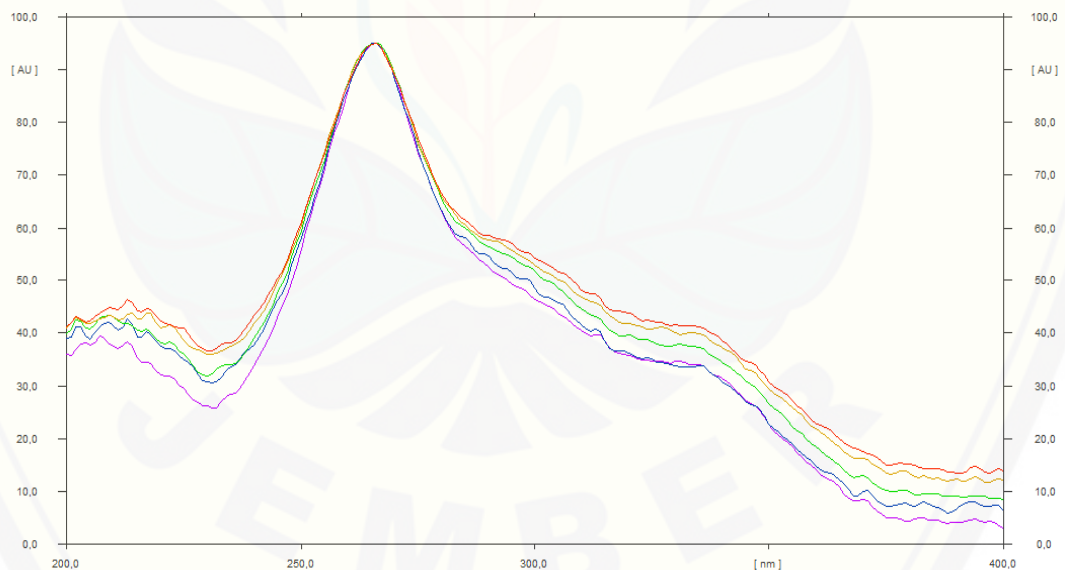
Penetapan kadar isoflavon dalam sampel ekstrak etanol 70% kedelai non-fermentasi dan terfermentasi dengan *R. oligosporus* dilakukan dengan menggunakan metode KLT-densitometri. Gambar 4.3 menunjukkan noda dari genistein yang dilihat di bawah sinar UV-254 nm.








Gambar 4.3 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak etanol 70% kedelai non-fermentasi dan terfermentasi dengan *R. oligosporus* yang diamati di bawah sinar UV 254 nm untuk noda standar genistein (s), noda sampel kedelai fermentasi hari ke-2 (a), noda sampel kedelai fermentasi hari ke-3 (b), noda sampel kedelai non-fermentasi (c), noda sampel kedelai fermentasi hari ke-4 (d). Noda genistein (x), noda daidzein (y).

Pada sampel kedelai non-fermentasi dan kedelai fermentasi menunjukkan adanya dua noda yang teredam. Noda dari genistein pada sampel menunjukkan nilai Rf yang hampir sama dengan noda dari standar genistein (Rf 0,35) yang ditunjukkan dengan huruf “a” Noda pada huruf “b” menunjukkan adanya senyawa lain dalam ekstrak yang kemungkinan merupakan noda dari daidzein (Rf 0,22). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yuan *et al.*, (2006), nilai Rf dari daidzein lebih kecil dibandingkan dengan genistein yaitu sekitar 0,25. Noda yang terdapat pada penelitian memiliki nilai Rf yang hampir sama dengan daidzein.

Uji identitas dan kemurnian dilakukan untuk memastikan bahwa di dalam sampel mengandung genistein. Uji identitas digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya genistein dalam masing-masing ekstrak dan uji kemurnian digunakan untuk mengetahui kemurnian genistein yang terdapat pada standar maupun sampel. Spektra genistein dari uji identitas dan kemurnian dapat dilihat pada Gambar 4.4.



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

	Spektra standar genistein (Rf 0,36)		Spektra kedelai fermentasi hari ke-3 (Rf 0,35)
	Spektra kedelai non-fermentasi (Rf 0,35)		Spektra kedelai fermentasi hari ke-4 (Rf 0,36)
	Spektra kedelai fermentasi hari ke-2 (Rf 0,35)		

Kemurnian genistein dalam sampel dilihat berdasarkan nilai $r(s,m)$ dan $r(m,e)$. Nilai $r(s,m)$ menunjukkan korelasi antara spektra yang diambil pada posisi awal/start (s) puncak dengan spektra pada puncak/maximum (m). Nilai $r(m,e)$ menunjukkan korelasi antara spektra yang diambil pada posisi puncak (m) dengan spektra pada posisi akhir/end (e). Suatu analit dikatakan memiliki kemurnian jika nilai $r(s,m)$ dan nilai $r(m,e)$ pada uji menghasilkan nilai lebih dari 0,99 (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Data pada Tabel 4.3 menunjukkan nilai korelasi spektra genistein lebih dari 0,99. Hal ini menunjukkan bahwa analit dalam sampel dan standar 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 nilai $r(s,a)$ menunjukkan korelasi antara track standar dan track sampel. Analit di dalam sampel dikatakan identik dengan standar bila korelasinya lebih dari 0,99 (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Tabel 4.3 dapat dilihat bahwa nilai korelasi spektra yang didapatkan pada penelitian ini lebih dari 0,99. Sehingga analit dalam sampel identik dengan standar genistein.

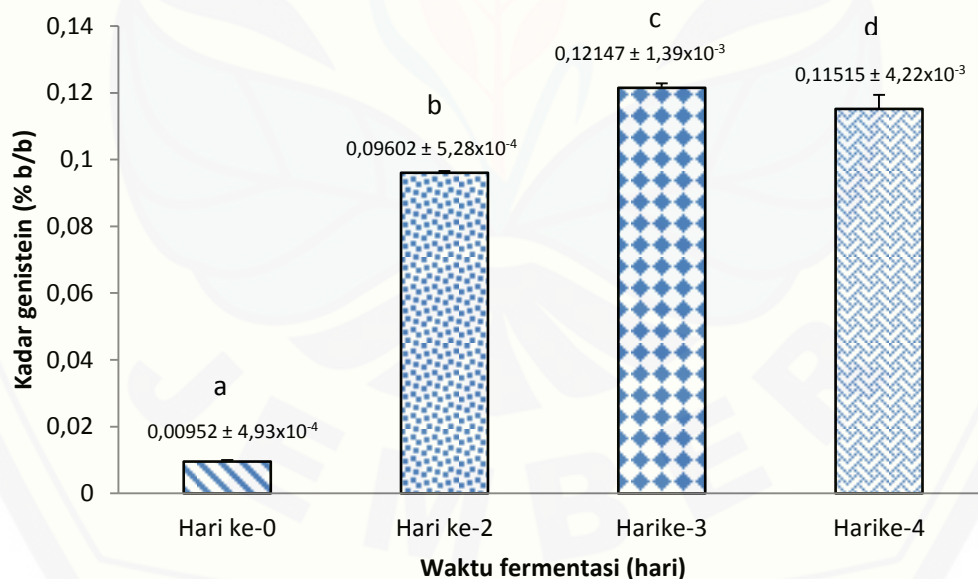
Tabel 4.3 Data korelasi spektra uji kemurnian dan identitas

	$r(s,m)$	$r(m,e)$	Kemurnian	$r(s,s)$	$r(s,a)$	Identitas
Standar genistein	0,998049	0,999730	Murni	0,993291	0,999576	N/A
Sampel non-fermentasi	0,997435	0,999530	Murni	0,995896	0,998354	identik
Sampel Fermentasi hari ke-2	0,996407	0,999494	Murni	0,995896	0,997276	identik
Sampel Fermentasi hari ke-3	0,998100	0,999507	Murni	0,995896	0,999003	identik
Sampel fermentasi hari ke-4	0,996831	0,999566	Murni	0,995896	0,998107	identik

Hasil penetapan kadar genistein dalam sampel kedelai non-fermentasi dan kedelai terfermentasi dengan *R. oligosporus* dapat dilihat pada Gambar 4.5. Peningkatan kadar genistein kedelai terfermentasi dengan *R. oligosporus* hari ke-

2, 3 dan 4 dibandingkan dengan kedelai non-fermentasi berturut-turut sebesar 10,086; 12,759; dan 12,096 kali. Perhitungan kadar genistein dapat dilihat pada lampiran A.7. Nilai RSD masing-masing sampel penetapan kadar telah memenuhi persyaratan untuk konsentrasi aktual analit 0,001 % yaitu 7,3%, 0,01% yaitu 5,3% dan 0,1% yaitu 3,7% (Huber, 2007).

Data hasil penetapan kadar selanjutnya diuji statistik untuk mengetahui adanya perbedaan bermakna tiap sampel. Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$). Berdasarkan uji ANOVA diperoleh nilai signifikansi 0,00 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa paling tidak terdapat dua kelompok yang memiliki perbedaan bermakna kadar genistein terhadap pengaruh fermentasi. Uji *post hoc* LSD dilakukan untuk menunjukkan kelompok mana yang memiliki perbedaan secara bermakna. Hasil uji *post hoc* LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar genistein yang signifikan ($p < 0,05$) data dapat dilihat pada lampiran C1.



Gambar 4.5 Diagram batang menunjukkan kadar genistein di waktu fermentasi yang berbeda. Data yang disajikan berupa nilai rata-rata kadar genistein \pm SD (% b/b) ($n=3$ untuk masing-masing sampel). Perbedaan notasi huruf menunjukkan perbedaan yang signifikan (LSD, $p < 0,05$).

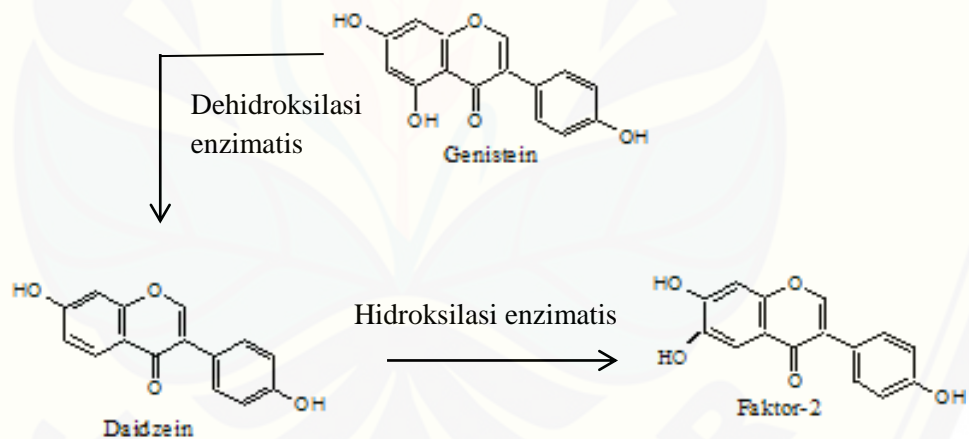
Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Yunindarwati, (2015) pada kedelai non-fermentasi varietas Baluran didapatkan kadar isoflavon genistein sebesar 0,0045% b/b. Hasil tersebut berbeda dari hasil penelitian ini, pada penelitian ini kadar kedelai non-fermentasi varietas Baluran memiliki kadar isoflavon sebesar 0,0095% b/b. Tinggi rendahnya kisaran hasil hasil isoflavon disebabkan karena berbagai faktor seperti iklim, suhu, tempat tumbuh kedelai, waktu pemanenan, kondisi tanah dan cara bertanam (Wang dan Murphy, 1994).

Kadar isoflavon dalam kedelai bervariasi tergantung pada berbagai faktor yaitu 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 juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti suhu, nutrisi tanah dan lain sebagainya (Teekachunhatean *et al.*, 2013).

Berdasarkan Gambar 4.5 dapat dilihat bahwa penambahan isoflavon tertinggi terjadi pada fermentasi antara 2 sampai 3 hari. Namun pada fermentasi hari ke-4 kadar genistein mengalami penurunan dibandingkan dengan kedelai terfermentasi hari ke-3. Menurut Barz *et al.*, (1990) *Rhizopus* spp. mampu melakukan transformasi genistein menjadi bentuk yang lain. Senyawa isoflavon aglikon daidzein dan genistein dapat mengalami transformasi lebih lanjut membentuk senyawa baru, yaitu faktor-2 (6,7,4'-trihidroksi isoflavon) (Pawiroharsono, 1995).

Faktor-2 (6,7,4'-trihidroksi isoflavon) adalah hasil biokonversi isoflavon aglikon selama proses fermentasi. Enzim yang berperan dalam proses biokonversi ini adalah enzim β -glikosidase, terutama yang berasal dari *R. oligosporus*

(Kusumaningsih *et al.*, 2006). Menurut Rudiretna (1991) mekanisme terjadinya biokonversi daidzein dan genistein menjadi faktor-2 diduga diawali dari konversi genistein menjadi daidzein yang selanjutnya diikuti konversi daidzein menjadi faktor-2 (Gambar 4.6). Terbentuknya faktor-2 dapat dimulai dengan dua cara yaitu hidroksilasi gugus C₆ dari senyawa daidzein atau dimetilasi gugus C₆ dari senyawa glisitein (Ariani, 1997). Menurut Klus *et al.*, (1993) biosintesis faktor-2 (6,7,4'-trihidroksi isoflavon) dihasilkan melalui dimetilasi glisitein oleh bakteri *Brevibactericum epidermis* dan *Micrococcus luteus* atau melalui hidroksilasi daidzein. *M. Luteus* dan *B. epidermis* merupakan salah satu mikroba kontaminan selama fermentasi tempe dan berpotensi membentuk faktor-2. Faktor-2 merupakan senyawa yang hanya terdapat pada tempe dan tidak terdapat pada kedelai (Pawiroharsono, 1995). Selain itu menurut Chang *et al.*, (2014) selama proses fermentasi dengan *R. oligosporus* isoflavon aglikon genistein mengalami transformasi membentuk hidroksi genistein.



Gambar 4.6 Reaksi biokonversi daidzein dan genistein menjadi faktor-2

Menurut Purwoko (2004) selama 4 hari fermentasi aktivitas enzim β -glukosidase *R. oligosporus* mampu menambah jumlah isoflavon aglikon yaitu sebesar 552,17-678,23 $\mu\text{g/g}$. Adanya perbedaan kadar isoflavon aglikon dengan penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jenis varietas kapang yang digunakan untuk fermentasi dan varietas kedelai yang digunakan. Penelitian yang

dilakukan Cheng *et al.*, (2013) menyatakan bahwa kedelai yang difermentasi selama 6 hari menggunakan jenis kapang yang berbeda menunjukkan penambahan isoflavon aglikon genistein yang berbeda pula yaitu kedelai hitam yang difermentasi oleh *R. oryzae* sebesar 244,4 µg/g, *R. oligosporus* NTU-5 sebesar 424,3 µg/g dan *R. oligosporus* BCRC 31996 sebesar 502,2 µg/g.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Yunindarwati (2015) pada kedelai dengan varietas Baluran yang difermentasi menggunakan *Aspergillus oryzae* menunjukkan bahwa terjadi peningkatan isoflavon aglikon yang berbeda dengan hasil penelitian ini. Pada fermentasi hari kedua dan keempat menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar isoflavon genistein yang bermakna antara kedelai varietas Baluran yang difermentasi oleh *A. oryzae* dan *R. oligosporus*. Namun, pada hari ketiga kadar isoflavon aglikon genistein menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan suhu optimum dari kapang yang berbeda. *R. oligosporus* dapat tumbuh cepat pada suhu 30-37°C (Hesseltine *et al.*, 1963). *A. oryzae* memiliki suhu optimum 32-36 °C (Barbesgaard *et al.*, 1992). Karena suhu pertumbuhan *R. oligosporus* lebih mendekati suhu inkubasi dibandingkan *A. oryzae*, maka kemungkinan periode *lag phase* *R. oligosporus* lebih cepat dibandingkan *A. oryzae*. Oleh karena itu, pada awal fermentasi biotransformasi isoflavon *R. oligosporus* lebih besar. Menurut Lee dan Chou (2006) aktivitas transformasi isoflavon glukosida menjadi aglikon selama fermentasi oleh *Rhizopus spp.* lebih kuat daripada *A. oryzae*.

Pada fermentasi hari ketiga pertumbuhan *A. oryzae* sudah menyamai *R. oligosporus*. Pada saat itu enzim β-glukosidase *A. oryzae* bekerja lebih baik dibandingkan *R. oligosporus*, karena menurut Barz *et al.*, (1990), enzim β-glukosidase bekerja optimum pada suhu 45°C dan pH 7,5. Namun, pada hari keempat kedelai yang difermentasi oleh *A. oryzae* mengalami penurunan kadar yang signifikan dibandingkan dengan kedelai yang difermentasi oleh *R. oligosporus*. Hal ini menunjukkan bahwa kedelai yang difermentasi dengan

menggunakan *R. oligosporus* lebih baik dalam mempertahankan kadar isoflavon aglikon genistein. Penelitian yang dilakukan oleh Sari (2015) menunjukkan bahwa tempe yang ada di pasaran menunjukkan kadar genistein yang lebih tinggi yaitu 0,245% b/b.

Perbedaan kadar genistein pada kedelai terfermentasi pada hari yang berbeda disebabkan oleh aktivitas dari enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh kapang *R. oligosporus* selama fermentasi. Enzim β -glukosidase melakukan biotransformasi isoflavon glukosida (daidzin dan genistin) menjadi isoflavon aglikon (daidzein dan genistein) (Ha *et al.*, 1992 dan Coward *et al.*, 1993). 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 (Setyaningsih *et al.*, 2006).

4.4 Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase

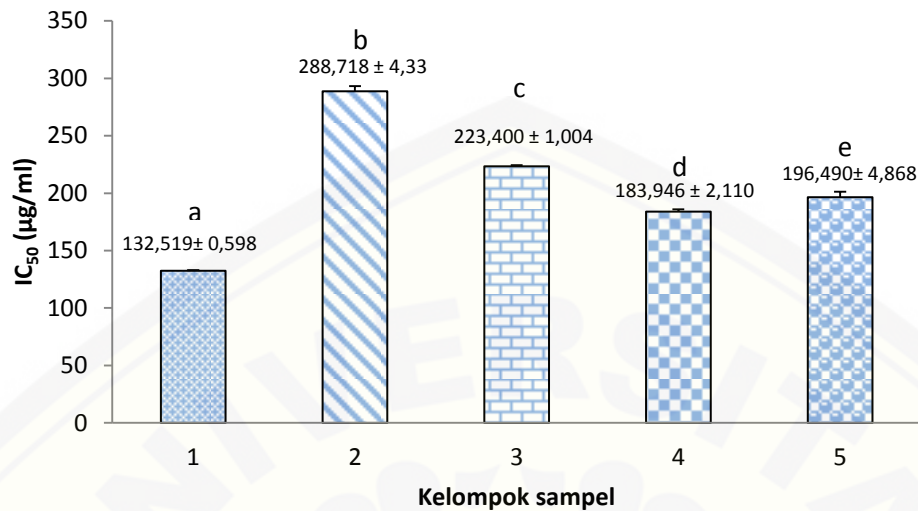
Tirosinase merupakan enzim utama yang berperan dalam sintesis melanin karena mempunyai kemampuan mengkatalis tiga reaksi yang berbeda yakni mengkatalis L-tirosin menjadi L-DOPA, oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon dan oksidasi DHI (5,6-dihidroksiindol) menjadi indol-5,6 kuinon yang selanjutnya membentuk melanin (Park, 2012). Untuk memperoleh hasil inhibisi yang efektif, karakteristik kerja enzim seperti pH, suhu dan waktu inkubasi harus diperhatikan karena kerja enzim sangat spesifik, sehingga perubahan sedikit saja pada kondisi kerjanya, akan mempengaruhi aktivitas enzim.

Suhu ruangan yang digunakan untuk inkubasi dikendalikan pada suhu $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hal ini dikarenakan suhu yang optimum berdasarkan metode analisis tirosinase menggunakan spektrofotometri yang dilakukan Boyer (1993) adalah $25-30^{\circ}\text{C}$. Larutan dapar yang digunakan adalah dapar fosfat pH 6,5. pH optimum

reaksi katalisis tirosinase menurut Boyer (1993) berada pada kisaran 6,5-7,0. Waktu inkubasi dilakukan selama 80 menit sesuai dengan hasil optimasi yang dilakukan oleh Dewi (2015).

Reaksi antara substrat L-tirosin dengan tirosinase menghasilkan produk dopakrom. Pada penelitian ini, pembentukan produk (dopakrom) oleh reaksi tirosin-tirosinase ditandai dengan terbentuknya warna coklat. Penentuan intensitas warna coklat dilakukan dengan metode spektrofotometer. Serapan yang diperoleh (absorbansi) digunakan untuk mengetahui seberapa besar aktivitas ekstrak kedelai terfermentasi dan non-fermentasi dalam menghambat reaksi tirosin-tirosinase.

Hasil pengujian hambatan tirosinase dinyatakan dalam IC_{50} . IC_{50} merupakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50 persen aktivitas tirosinase. Untuk menentukan nilai IC_{50} dibuat kurva hubungan antara konsentrasi inhibitor (ekstrak kedelai non-fermentasi dan terfermentasi) terhadap persen inhibisi. Data yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 4.7. Perhitungan nilai IC_{50} dapat dilihat pada lampiran B. Besarnya nilai IC_{50} tersebut, diperoleh dengan memasukkan nilai 50% aktivitas hambatan dalam persamaan regresi. Gambar 4.7 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas penghambatan tirosinase selama proses fermentasi. Aktivitas penghambatan reaksi tirosin-tirosinase tertinggi dengan nilai IC_{50} terendah dihasilkan oleh sampel kedelai fermentasi hari ke-3 yakni pada konsentrasi $183,946 \pm 2,11 \mu\text{g/ml}$. Jika dibandingkan dengan nilai IC_{50} standar genistein sebagai kontrol positif, aktivitas penghambatan tirosinase dari masing-masing ekstrak lebih rendah. Menurut Chang *et al.*, (2005), aktivitas hambatan tirosinase tidak hanya ditentukan oleh senyawa genistein, namun juga berasal dari senyawa isoflavon aglikon lain yaitu daidzein dan glisitein, maupun isoflavon glukosida.



Gambar 4.7 Diagram batang menunjukkan nilai IC₅₀ kedelai yang difermentasi pada hari yang berbeda. Data IC₅₀ aktivitas hambatan tirosinase kelompok standar genistein (1); sampel non-fermentasi (2); fermentasi H2 (3); fermentasi H3 (4); fermentasi H4 (5). Data yang disajikan dalam bentuk rata-rata IC₅₀ ± SD (µg/ml) (n=3). Perbedaan notasi huruf menunjukkan perbedaan yang signifikan (LSD, p <0,05)

Data uji statistik menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen, sehingga 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 penghambatan tirosinase yang bermakna. Berdasarkan uji *post hoc* LSD didapatkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas hambatan tirosinase yang bermakna (p <0,05) data dapat dilihat pada lampiran C2.

Isoflavon aglikon memiliki aktivitas penghambatan tirosinase yang lebih baik daripada senyawa glukosida. Hal ini disebabkan adanya gugus OH pada cincin benzena pada isoflavon aglikon, sedangkan pada isoflavon glukosida terdapat konjugat gula pada cincin benzena (Chang *et al.*, 2007). Gugus OH pada cincin benzena dapat mengkhelat logam Cu²⁺ pada sisi aktif enzim tirosinase, sehingga kerja dari enzim tirosinase dapat terhambat (Kim *et al.*, 2006).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yunindarwati (2015) nilai IC_{50} terkecil terdapat pada kedelai yang difermentasi dengan *A. oryzae* pada hari ketiga yaitu 180,153 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini sama dengan penelitian ini yang menunjukkan pada hari ketiga kedelai yang difermentasi dengan *R. oligosporus* memiliki nilai IC_{50} yang paling kecil. Pada fermentasi hari ketiga nilai IC_{50} kedelai yang difermentasi dengan *R. oligosporus* dan *A. oryzae* tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, sehingga dapat disimpulkan bahwa keduanya baik untuk digunakan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sari (2015) menunjukkan bahwa tempe yang beredar di pasaran memiliki nilai IC_{50} yang kecil yaitu 55,420 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini kemungkinan dikarenakan pada tempe yang beredar di pasaran menggunakan kombinasi kapang *Rhizopus spp.* sehingga isoflavon aglikon yang dihasilkan jumlahnya lebih besar daripada kedelai yang difermentasi dengan biakan tunggal. Oleh karena itu, perlu ditelusuri kembali jenis kombinasi kapang yang optimal sehingga aktivitas hambatan tirosinase dapat meningkat. Pada penelitian ini belum dilakukan penelitian mengenai kinetika dari kerja enzim dan mekanisme jenis inhibisi enzim, sehingga dibutuhkan penelitian lebih lanjut.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Kedelai yang difermentasi dengan kapang *R. oligosporus* pada hari ke-2,3 dan 4 dapat meningkatkan kadar isoflavon aglikon genistein. Semakin lama waktu fermentasi jumlah isoflavon aglikon mengalami peningkatan dan mengalami penurunan pada hari keempat. Kadar genistein \pm SD kedelai non fermentasi dan terfermentasi hari ke-2, 3 dan 4 berturut-turut sebesar $0,00952 \pm 0,00049$; $0,09602 \pm 0,00053$; $0,12147 \pm 0,0014$; $0,11515 \pm 0,00425$ % (b/b).
2. Fermentasi kedelai menggunakan *R. oligosporus* dapat meningkatkan aktivitas hambatan tirosinase yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} . Kadar isoflavon aglikon genistein sebanding dengan peningkatan dan penurunan aktivitas hambatan tirosinase. Nilai $IC_{50} \pm$ SD kedelainya non-fermentasi dan kedelai fermentasi hari ke-2, 3 dan 4 berturut-turut sebesar $288,718 \pm 4,333$; $223,400 \pm 1,004$; $183,946 \pm 2,110$; $196,49 \pm 4,868$ μ g/ml.

5.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan pada penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai fermentasi kedelai menggunakan kombinasi kapang, untuk mengetahui pengaruh kombinasi kapang terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jenis inhibisi yang terjadi pada reaksi tirosin-tirosinase dan menentukan tetapan Michaelis-Menten (K_M).

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J.J.B dan Garner. 1997. Phytoestrogen and Human. *J. Nutr.* 32: 232-239.
- Anindya H.R., Sukandar U. dan Harimawan A. 2014. *Deaminasi Tempe*. Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri ITB.
- Ariani, S.R.D. 1997. Pembuatan Keju Kedelai yang Mengandung Senyawa Faktor-2 Hasil Biokonversi Isoflavon pada Tahu oleh *Rhizopus oligosporus* (L.41). *BioSMART* 5 (1); 8-12
- Bandem, A. W. 2013. Analisis Pemilihan Terapi Kelainan Kulit Hiperpigmentasi. *Medicinus*, 2 (26): 47-52.
- Barbesgaard, P., Hheldt-Hansen, H. dan Diderichsen, B. 1992. On the Safety of *Aspergillus oryzae*: A Review. *App. Microbiol and Biotech.* 36: 569-572
- Barz, W.H., Boger-Papendorf G. dan Rehms H. 1990. Characterization of Glycohydrolases, Phosphatases and Isoflavone Metabolism in Tempe-Forming *Rhizopus*-strains. *Proceeding of the 2nd Asian Symposium on Non-salted Soybean Fermentation.* 13-15.
- Batubara, I., Darusma, L.K., Mitsunaga, T., Rahminiwati, M. dan Djauhari, E.. 2010. Indonesian Medical Plants as Tyrosinase Inhibitor and Antioxidant Agent. *J. Biol. Sci.* 10 (2): 138–144.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2006. *Kosmetik yang Mengandung Bahan dan Zat Warna Yang Dilarang*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2007. *Kosmetik Mengandung Bahan Berbahaya dan Zat Warna yang Dilarang: Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.03.1.23.08.11.07517*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Briganti, S., Camera, E., dan Picardo, M. 2003. Chemistry and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. *Pigm. Cell Res.* 16(2): 101-110.
- Brown, R.G. dan Burns, T. 2002. *Lecture Notes on Dermatology*, Adapted by Zakaria. Lecture Notes on Dermatology. Jakarta: Erlangga.

- Boyer, R.F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. 2nd edition. California : The Benjamin Cumming Publishing Co.
- Chang, T. S., Ding, H. Y., dan Lin, H. C. 2005. Identifying 6,7,4' trihydroxyisoflavone as a Potent Tyrosinase Inhibitor. *Biosci. Biotech. Biochem.* 69 (10): 1999-2001.
- Chang, T.S., Ding, H. Y., Tai S.S, dan Wung, C. Y. 2007. Mushroom Tyrosinase Inhibitor Effects of Isoflavone Isolated from Soygerm Koji Fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. *Food Chem.* 105: 1430–1438.
- Chang, T. S. 2009. An Update Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2440-2475.
- Chang, T.S. 2014. Isolation Bioactivity and Production of ortho-Hydroxydaidzein and ortho-Hydroxygenistein. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 5699-5716.
- Cheng, K.C., Wu, J.Y. dan Lin, J.T. 2013. Enhancements of Isoflavone Aglycones, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Black Soybean by Solide-state Fermentation with *Rhizopus spp.* *Eur. Food Res. Technol.* 236: 1107-1113.
- Christopher A. R. dan P.A. Riley. 2010. Mechanistic Studies of Tyrosinase Suicide Inactivation. *ARKIVOC* (1) 260-274
- Coward, L., Barnes, N. C., Setchell, K. D. R., dan Barnes S. 1993. Genistein, Daidzein and Other β -Glycoside Conjugates: Antitumor Isoflavones in Soybean Foods from American and Asian Diets. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1961-1967.
- Dahlan, M. S. 2011. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Salemba Medika.
- Daniel, M. 2006. *Medical Plants Chemistry and Propertis*. USA: Science Publisher.
- Deputi Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Permasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi. <http://www.ristek.go.id> [diakses tanggal 15 April 2015)
- Dewi, E.N.A. 2015. *Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tيروسinase Edamame (Glycine max) in vitro*. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.

- Esaki, H., Onozaki, H., Morimitsu, Y., Kawakishi, S. dan Osawa, T. 1996. New Antioxidant Isolated from Tempeh. *J. Agri. Food and Chem.* 41: 1961-1967.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Ha, E.Y.W., Morr C.V. dan Seo A. 1992. Isoflavone Aglucones and Volatile Organic Compounds in Soybeans; Effects of Soaking Treatment. *J. Food Sci.* 57: 414-417.
- Hansen, P.J. 2000. *Use of Hemacytometer*. University of Florida : PJ Hansen Laboratory.
- Haron, H., Ismail, A., Azlan A., Shahar S. dan Peng L. S. 2009. Daidzein and Genistein Contents in Tempeh and Selected Soy Products. *Food Chem.*, 115: 1350-1356.
- Heinrich M., Barnes J., Gibbons, S. dan Williamson E.M. 2004. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone Elsevier. 255.
- Hernawati. 2008. Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isoflavon dari Tanaman Kedelai. *Universitas Pendidikan Indonesia*.
- Hesseltine, C.W., Smith M., Bradle B. dan Djien K.S. 1963. *Investigations of Tempeh and Indonesian Food*. Development in Industrial Microbiology
- Huang, C., Hsu B., Wu N., Tsui W., Lin T., Su C., dan Hung C. 2010. Anti-Photoaging Effect of Soy Isoflavone Extract (Aglicone and Acetylglucoside Form) from Soybean Cake. *Int. J.Mol. Sci.*, 11(12), 4782-4795.
- Huber, Ludwig. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories Second Edition*. New York: Informa Healthcare USA Inc.
- Hui, M., Tiansheng, Q., dan Hai, Z. 2005. Methods for Extracting, Sparating, Identifying and Qualifying Daidzein and Genistein. *Chinese J. Appl. and Environ. Biol.* 03. Abstract from : http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-YYHS200503007.htm. [diakses 17 Maret 2015].
- Irawan, A. W. 2006. *Budidaya Tanaman Kedelai*. Fakultas Pertanian Universitas Padjajaran.
- ITIS. 2011. <http://www.itis.gov>. [diakses tanggal 17 Maret 2015].

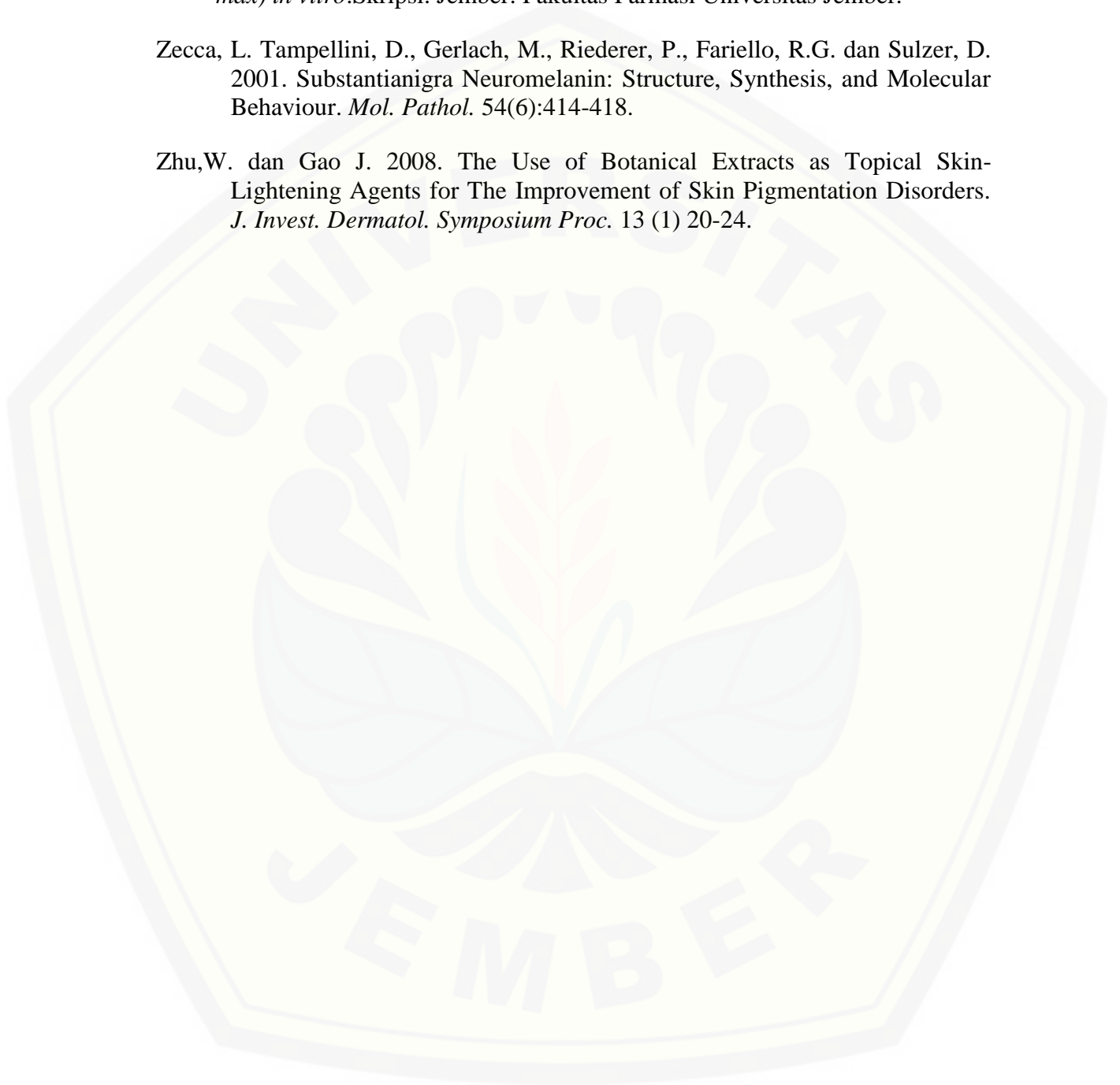
- Indrayanto, G. dan Yuwono, M. 2003. *Validation of TLC Analyses in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Indonesia.
- Kim, Y.J. dan Uyama H. 2005. Tyrosinase Inhibitor from Natural and Synthetic Source: Structure, Inhibition Mechanism and Prespective for Future. *Cell Mol. Life Sci.* 62 (15): 1707-1723.
- Klus, K., Papendorf, G. B. dan Barz W. 1993. Formation of 6,7,4'-trihydroxyisoflavone (Factor 2) from Soybean Seed Isoflavone by Bacteria Isolated from Tempe. *Phytochem.* 34 (4): 979-981.
- Koswara, S. 2006. Isoflavon Senyawa Multi-Manfaat dalam Kedelai. www.ebookpangan.com [diakses tanggal 20 Maret 2015].
- Kuchel, P. dan Ralston, G.B. 2006. Terjemahan Eva Laelasari. *Biokimia*. Jakarta : Erlangga .
- Kudou, S., Fleury Y., Welti D., Magnolato D., Uchida T., Kitamura K. dan Okubo K. 1991. Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seed (*Glycine max Merrill*). *Agric. Biol. Chem.* 55: 2227 – 2233.
- Kusumaningsih, T., Ariani., S.R.D. dan Agustina W. 2006. Profil Kandungan Daidzein dan Genistein pada Tempe Gembus Selama Proses Fermentasi. *J. Alchemy*, 5(1): 45-53.
- Lee, I. H. dan Chou C.C. 2006. Distribution Profiles of Isoflavone Isomer in Black Bean Kojis Prepared with Various Filamentous Fungi. *J. Agric. and Food Chem.*, 54: 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. *Int. J. Food Microbiol.* 121 : 150–156.
- Lin, C. H., Wei, Y. T., dan Chou, C. C. 2006. Enhanced Antioxidative Activity of Soybean Koji Prepared with Various Filamentous Fungi. *J. Food Microbiol.* 23: 628–633.
- Luthria, D. L., Biswas, R., dan Natarajan, S. 2007. Comparison of Extraction Solvents and Techniques Used for the Assay of Isolavones from Soybean. *Food Chem.* 105: 325-333.

- Mun'im, A. dan Hanani E. 2011. *Fitoterapi Dasar*. Jakarta : Dian Rakyat, 237-239.
- Murray R.K., Daryl K. G. dan Victor W. R. 2009. *Biokimia Harper*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- New Zealand Organism Register. <http://www.nzor.org.nz/>. [diakses tanggal 17 Maret 2015]
- Notoatmojo, S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta : PT Rineka Cipta. Halaman 167.
- Nurjannah, S. 2013. *Hubungan Beberapa Sifat Kimia dan Populasi Rhizobia Tanah Inceptisol dengan Keragaan Tanaman Kedelai Varietas Baluran di Beberapa Wilayah Jawa Timur*. Skripsi. Jember : PS Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- O'Neil, M. J.(Ed). 2001. *The Merck Index; an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biological*. (Edisi Ketiga belas) . Whitehouse Station; Merck.
- Pandit, N. T., dan Patravale, V. B. 2011. Design and Optimization of a Novel Method for Extraction of Genistein. *Indian J. of Pharm. Sci.* 73(2): 184-192.
- Park H.Y. dan Yaar M. 2012. *Biology of Melanocytes*. New York: McGraw-Hill.
- Pawiroharsono, S. 1995. Metabolisme Isoflavon dan Faktor-II Pada Proses Pembuatan Tempe. *Prosiding Simposium Nasional Pengembangan Tempe dalam Industri Pangan Modern*. UGM Yogyakarta
- Pitt, J.L. dan Hocking A.D. 1985. *Fungi and Food Spoilage*. Australia : Academic Press.
- Pitojo, S. 2003. *Seni Penangkaran Benih Kedelai*. Yogyakarta : Kanisius, 18-20.
- Polkowski K. dan Mazurek A. P. 2000. Biological Propertis of Genistein A Review of in vitro and in vivo data. *Acta Poloniae Pharm.* 57 (2) : 135-155.
- 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 J. Nat. Sci.*. 10 (2) 197-212.

- Purwoko T., Pawiroharsono S. dan Gandjar I. 2001. Biotransformasi Isoflavon oleh *Rhizopus oryzae* UICC 524. *BioSMART*, 3 (2): 7-12.
- Purwoko, T. 2004. Kandungan Isoflavon Aglikon pada Tempe Hasil Fermentasi *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* : Pengaruh Perendaman. *BioSMART*, 3 (2): 85-87.
- Rostagno, M. A., Palma, M., dan Barroso, C. G. 2004. Pressurized Liquid Extraction of Isoflavones from Soybeans. *Anal. Chimica Act.* 522 (2004): 169–177.
- Rudiretna, A. 1991. Studi *Pendahuluan Biokonversi Isoflavon pada Proses Fermentasi Tempe dengan Teknik Perendaman (Submerge)* Tesis, Fakultas Pasca Sarjana ITB. Bandung
- Rukmana, Rahmat dan Yuniarsih Y. 2003. *Kedelai Budidaya dan Pascapanen*. Jakarta : Kanisius.
- Sadikin, M. 2002. *Biokimia Enzim*. Jakarta : Widya Medika.
- Samuelsson, G. 1999. *Drug of Natural Origin a Textbook of Pharmacognocny 4th Edition*. Sweeden : Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press.
- Santoso. 2005. *Teknologi Pengolahan Kedelai (Teori Dan Praktek)*. Malang : Universitas Widyagama.
- Sari, M. I. 2007. Peranan Tempat Katalitik pada Enzim dalam Reaksi Enzimatik. *Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara*.
- Sari, L. P. 2015. *Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai (Glycine max L.) Sebagai Agen Pemutih Kulit Alami*. Skripsi: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Satyanarayana. 2002. *Biochemistry*. Haryana : Elsevier.
- Setyaningsih, D., Tresnawati, K., Soehartono, M.T., dan Apriyantono, A. 2006. Pengaruh Aktivitas β -glukosidase Eksternal dari Kapang terhadap Kadar Vanilin Buah Vanili. *J. Teknol Industri Pertanian*. 16(1):28-35.
- Suastika, I W., Ratmini S. dan Tumarlan. 1997. *Budidaya Kedelai di Lahan Pasang Surut*. Bandung : Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Suhara. 2008. *Dasar-Dasar Biokimia* Edisi 1. Bandung : Prisma Press.

- Suliyanto. 2012. *Pendekatan Praktis dengan Microsoft Excel*. Yogyakarta : Andi.
- Sumardjo, D. 2009. *Pengantar Kimia: Buku Pandian Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Bioeksakta*. Jakarta: EGC.
- Suprapti, M. L. 2003. *Pembuatan Tempe*. Yogyakarta: Kanisius
- Suprihatin. 2010. *Teknologi Fermentasi*. Surabaya: UNESA Press.
- Teekachunhatean, S., Hanprasertpong, N., dan Teekachunhatean, T. 2013. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds Grown in Thailand. *Inter. J. Agron.* 2013 (163573): 1–11.
- Tim QC APH Golongan Jamur. 2009. *Modul Quality Control (QC) APH Golongan Jamur*. Surabaya. Balai Besar Pembenuhan dan Proteksi Tanaman Perkebunan.
- Utari, D.M., Rimbawan, Riyadi, H. Muhila dan Purwastyastuti. 2010. Pengaruh Pengolahan Kedelai Menjadi Tempe dan Pemasakan Tempe terhadap Kadar Isoflavon. *PGM* 33 (2); 148-153.
- Wang, H dan Murphy P.A. 1994. Isoflavone Content in Comercial Soybean Food. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1666-1673.
- Warrington, J.C., dan Saville, B.A. 1999. Tyrosinase Inactivation in Organic Solvent. *Biotechnol. 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. Yogyakarta : Fakultas Ekonomi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Wipradnyadewi, P. A. S., Endang, S. R. dan Raharjo S. 2004. Isolasi Identifikasi *Rhizopus oligosporus* pada Beberapa Inokulum Tempe. *Laporan Penelitian Tim Pasca Sarjana Angkatan I Tahun ke-2*.
- Wu, J.G., Ge J., Zhang Y.P., Yu Y., dan Zhang X.Y. 2010. Solubility of Genistein in Water, Methanol, Ethanol, Propan-2-ol, 1-Butanol and Ethyl Acetate from (280 to 333) K. *J. Chem.* 55: 5286-5288.
- Yuan D., Chen Y., Bai X., Pan Y dan Kano Y. 2006. TLC and HPLC Analysis of Soy Isoflavones in Semen Sojae Praeparatum. *Asian J. Trad. Med.* 1: 3–4.

- Yunindarwati, E.S. 2015. *Pengaruh Fermentasi Aspergillus oryzae Terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Penghambatan Tirosinase Kedelai (Glycine max) in vitro*. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Zecca, L. Tampellini, D., Gerlach, M., Riederer, P., Fariello, R.G. dan Sulzer, D. 2001. Substantianigra Neuromelanin: Structure, Synthesis, and Molecular Behaviour. *Mol. Pathol.* 54(6):414-418.
- Zhu, W. dan Gao J. 2008. The Use of Botanical Extracts as Topical Skin-Lightening Agents for The Improvement of Skin Pigmentation Disorders. *J. Invest. Dermatol. Symposium Proc.* 13 (1) 20-24.



LAMPIRAN

A. Perhitungan

1. Perhitungan kepadatan suspensi spora *R.oligosporus*

Jumlah spora pada kotak hitung 1 = 6

Jumlah spora pada kotak hitung 2 = 3

Jumlah spora pada kotak hitung 3 = 7

Jumlah spora pada kotak hitung 4 = 5

Jumlah spora pada kotak hitung 5 = 7

Rata-rata jumlah spora = 5,6 spora

Perhitungan kepadatan spora/ml (S)

$$S = \frac{5,6}{0,1 \times 0,2 \times 0,2} \times 10^3$$

$$S = 1,4 \times 10^6$$

2. Pengenceran suspensi spora

$$N1.V1 = N2.V2$$

$$1,4 \times 10^6 \cdot 10 \text{ ml} = 10^6 \cdot V2$$

$V2 = 14 \text{ ml}$ akuades yang ditambahkan, maka akuades yang ditambahkan sebesar 4 ml.

3. Perhitungan rendemen ekstrak

Volume etanol 70% yang dibutuhkan = 600 ml

- a. Kedelai non-fermentasi

Bobot serbuk kering = 50 gram

Ekstrak kental = 7,152 gram

$$\text{Rendemen yang diperoleh} = \frac{7,152 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100\% = 14,30 \text{ gram}$$

- b. Kedelai fermentasi hari ke-2

Bobot serbuk kering = 54,12 gram

Ekstrak kental = 8,453 gram

$$\text{Rendemen yang diperoleh} = \frac{8,453 \text{ gram}}{54,12 \text{ gram}} \times 100\% = 15,62 \%$$

c. Kedelai fermentasi hari ke-3

Bobot serbuk kering = 52,62 gram

Ekstrak kental = 8,955 gram

$$\text{Rendemen yang diperoleh} = \frac{8,955 \text{ gram}}{52,92 \text{ gram}} \times 100\% = 16,92 \%$$

d. Kedelai fermentasi hari ke-4

Bobot serbuk kering = 50,54 gram

Ekstrak kental = 8,486 gram

$$\text{Rendemen yang diperoleh} = \frac{8,486 \text{ gram}}{50,54 \text{ gram}} \times 100\% = 16,79 \%$$

4. Pembuatan larutan baku standar genistein

a. Larutan Baku Induk

Ditimbang 5,193 mg genistein dilarutkan dalam 10 ml metanol p.a.

$$\frac{5,193 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 519,3 \mu\text{g/ml}$$

Jadi diperoleh larutan standar baku induk 519,3 ppm

b. Pembuatan larutan baku

i. Larutan baku konsentrasi 5,193 ppm

$$\frac{0,1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 519,3 \mu\text{g/ml} = 5,193 \mu\text{g/ml}$$

ii. Larutan baku konsentrasi 15,579 ppm

$$\frac{0,3 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 519,3 \mu\text{g/ml} = 15,579 \mu\text{g/ml}$$

iii. Larutan baku konsentrasi 31,158 ppm

$$\frac{0,6 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 519,3 \mu\text{g/ml} = 31,158 \mu\text{g/ml}$$

iv. Larutan baku konsentrasi 62,316 ppm

$$\frac{1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 311,5 \mu\text{g/ml} = 62,316 \mu\text{g/ml}$$

v. Larutan baku konsentrasi 103,86 ppm

$$\frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 519,3 \mu\text{g/ml} = 103,86 \mu\text{g/ml}$$

vi. Larutan baku konsentrasi 124,632 ppm

$$\frac{2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 311,58 \mu\text{g/ml} = 124,632 \mu\text{g/ml}$$

vii. Larutan baku konsentrasi 311,5 ppm

$$\frac{3 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 519,3 \mu\text{g/ml} = 311,58 \mu\text{g/ml}$$

5. Pembuatan larutan sampel

a. Penimbangan sampel

Replikasi	Non-fermentasi	Fermentasi hari ke-2	Fermentasi hari ke-3	Fermentasi hari ke-4
1	125,2	125,2	125,2	128,3
2	125,6	125	125,5	128
3	125	125	125,1	124,7

b. Sampel kedelai non fermentasi

i. Replikasi 1

$$\frac{125,2 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25040 \mu\text{g/ml}$$

ii. Replikasi 2

$$\frac{125,6 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25120 \mu\text{g/ml}$$

iii. Replikasi 3

$$\frac{125 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25000 \mu\text{g/ml}$$

c. Sampel kedelai fermentasi hari ke-2

i. Replikasi 1

$$\frac{125,2 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25040 \mu\text{g/ml}$$

ii. Replikasi 2

$$\frac{125 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25000 \mu\text{g/ml}$$

iii. Replikasi 3

$$\frac{125 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25000 \mu\text{g/ml}$$

d. Sampel kedelai fermentasi hari ke-3

i. Replikasi 1

$$\frac{125,2 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25040 \mu\text{g/ml}$$

ii. Replikasi 2

$$\frac{125,5 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25100 \mu\text{g/ml}$$

iii. Replikasi 3

$$\frac{125,1 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25020 \mu\text{g/ml}$$

e. Sampel kedelai fermentasi hari ke-4

i. Replikasi 1

$$\frac{126,6 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25320 \mu\text{g/ml}$$

ii. Replikasi 2

$$\frac{125 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25000 \mu\text{g/ml}$$

iii. Replikasi 3

$$\frac{125,3 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 25060 \mu\text{g/ml}$$

6. Pembuatan fase gerak

a. Fase gerak = Toluena : Etil asetat : Aseton : Asam format (20:4:2:1)

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

b. Perhitungan komposisi masing- masing fase gerak

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

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

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

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

7. Penetapan kadar

a. Standar dalam penetapan kadar

	Rf	Massa (ng)	Area
Standar 5,193 ppm	0,37	10,39	431,86
Standar 15,579 ppm	0,36	31,16	979,03
Standar 31,158 ppm	0,36	62,32	1892,49
Standar 62,316 ppm	0,36	124,63	3656,24
Standar 124,632 ppm	0,35	249,26	7406,09

Persamaan regresi $y = 77,169 + 29,262X$

$r = 0,999$

$V_{x0} \text{ value} = 1,802$

$X_p \text{ value} = 9,624$

b. Sampel dalam penetapan kadar

Sampel	Replikasi	Rf	Area	Massa Genistein (ng/spot)
Non-fermentasi	1	0,35	801,52	24,75
	2	0,35	790,72	24,39
	3	0,35	732,34	22,39
Fermentasi hari ke-2	1	0,35	4323,49	145,12
	2	0,35	4287,87	143,90
	3	0,35	4271,07	143,32
Fermentasi hari ke-3	1	0,35	5377,98	181,15
	2	0,35	5501,16	185,36
	3	0,35	5381,92	181,29
Fermentasi hari ke-4	1	0,35	5459,84	183,95
	2	0,35	5068,13	170,56
	3	0,36	5109,28	171,97

c. Perhitungan Kadar

i. Sampel non-fermentasi

Replikasi 1

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{24,75 \text{ ng}}{10 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,012375 \text{ mg}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 125,2 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ b/b} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{0,012375 \text{ mg}}{125,2 \text{ mg}} \times 100\% = 0,0098842 \% \end{aligned}$$

Replikasi 2

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{24,39 \text{ ng}}{10 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,012195 \text{ mg}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 125,6 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ b/b} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{0,012195 \text{ mg}}{125,6 \text{ mg}} \times 100\% = 0,0097094 \% \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{22,39 \text{ ng}}{10 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,011195 \text{ mg}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 125 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ b/b} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{0,011195 \text{ mg}}{125 \text{ mg}} \times 100\% = 0,0089560 \% \end{aligned}$$

$$\overline{\% \text{ b/b}} = \frac{0,0098842 + 0,0097094 + 0,0089560}{3} = 0,0095165 \%$$

Standar Deviasi (SD)

$$= \sqrt{\frac{(0,0098842 - 0,0095165)^2 + (0,0097094 - 0,0095165)^2 + (0,008956 - 0,0095165)^2}{3 - 1}}$$

$$= 0,00049324$$

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

$$= \frac{0,00049324}{0,0095165} \times 100 \% = 5,183 \%$$

ii. Sampel fermentasi hari ke-2

Replikasi 1

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{145,12 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,12093 \text{ mg}$$

Penimbangan ekstrak = 125,2 mg

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

$$= \frac{0,12093 \text{ mg}}{125,2 \text{ mg}} \times 100\% = 0,096592 \%$$

Replikasi 2

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{143,9 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,11991 \text{ mg}$$

Penimbangan ekstrak = 125 mg

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

$$= \frac{0,11991 \text{ mg}}{125 \text{ mg}} \times 100\% = 0,095933 \%$$

Replikasi 3

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{143,22 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,11943 \text{ mg}$$

Penimbangan ekstrak = 125 mg

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

$$= \frac{0,11943 \text{ mg}}{125 \text{ mg}} \times 100\% = 0,095547 \%$$

$$\% \text{ b/b} = \frac{0,096592 + 0,095933 + 0,095547}{3} = 0,096024 \%$$

Standar Deviasi (SD)

$$= \sqrt{\frac{(0,096592 - 0,096024)^2 + (0,095933 - 0,096024)^2 + (0,095547 - 0,096024)^2}{3 - 1}}$$

$$= 0,00052841$$

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

$$= \frac{0,00052841}{0,096024} \times 100 \% = 0,55029 \%$$

iii. Sampel fermentasi hari ke-3

Replikasi 1

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{181,15 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,15096 \text{ mg}$$

Penimbangan ekstrak = 125,2 mg

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

$$= \frac{0,15096 \text{ mg}}{125,2 \text{ mg}} \times 100\% = 0,12057 \%$$

Replikasi 2

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{185,36 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,15447 \text{ mg}$$

Penimbangan ekstrak = 125,5 mg

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

$$= \frac{0,15447 \text{ mg}}{125,5 \text{ mg}} \times 100\% = 0,12308 \%$$

Replikasi 3

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{181,29 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,15107 \text{ mg}$$

Penimbangan ekstrak = 125,1 mg

$$\begin{aligned} \% b/b &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{0,15107 \text{ mg}}{125,1 \text{ mg}} \times 100\% = 0,12076 \% \end{aligned}$$

$$\overline{\% b/b} = \frac{0,12057 + 0,12308 + 0,12076}{3} = 0,12147 \%$$

Standar Deviasi (SD)

$$\begin{aligned} &= \sqrt{\frac{(0,12057 - 0,12147)^2 + (0,12308 - 0,12147)^2 + (0,12076 - 0,12147)^2}{3 - 1}} \\ &= 0,0013975 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} RSD &= \frac{SD}{\% b/b} \times 100 \% \\ &= \frac{0,0013975}{0,12147} \times 100 \% = 1,1505 \% \end{aligned}$$

iv. Sampel fermentasi hari ke-4

Replikasi 1

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{183,95 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,15329 \text{ mg}$$

Penimbangan ekstrak = 128,3 mg

$$\begin{aligned} \% b/b &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{0,15329 \text{ mg}}{128,3 \text{ mg}} \times 100\% = 0,11948 \% \end{aligned}$$

Replikasi 2

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{170,56 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,14213 \text{ mg}$$

Penimbangan ekstrak = 128 mg

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

$$= \frac{0,14213 \text{ mg}}{128 \text{ mg}} \times 100\% = 0,11104 \%$$

Replikasi 3

$$\text{Massa genistein dalam 5 ml} = \frac{171,97 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} = 0,14331 \text{ mg}$$

Penimbangan ekstrak = 124,7 mg

$$\begin{aligned} \% \text{ b/b} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{0,14331 \text{ mg}}{124,7 \text{ mg}} \times 100\% = 0,11492 \% \end{aligned}$$

$$\overline{\% \text{ b/b}} = \frac{0,11948 + 0,11104 + 0,11492}{3} = 0,11515\%$$

Standar Deviasi (SD)

$$\begin{aligned} &= \sqrt{\frac{(0,11948 - 0,11515)^2 + (0,11104 - 0,11515)^2 + (0,11492 - 0,11515)^2}{3 - 1}} \\ &= 0,0042232 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{RSD} &= \frac{SD}{\% \text{ b/b}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0042232}{0,11515} \times 100\% = 3,67\% \end{aligned}$$

8. Pembuatan dapar fosfat pH 6,5

- Pembuatan KH_2PO_4 0,2 M

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

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

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

- Pembuatan NaOH 0,2 M

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

$$N = \frac{\text{massa (g)}}{40} \times \frac{1000}{50} \times 1$$

Massa = 0,4 gram

- Dapar fosfat pH 6,5 sebanyak 500 ml dibuat dengan cara menambahkan 125 ml KH_2PO_4 0,2 M dan 31,5 ml NaOH 0,2 N, kemudian ditambahkan akuades hingga 500 ml dan dilakukan penambahan basa hingga diperoleh pH 6,5.

9. Pembuatan substrat L-tirosin 1 mM

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

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

Massa = 4,53 mg

10. Pembuatan standar genistein uji aktivitas hambatan tirosinase

Pembuatan larutan standar induk genistein 519,3 ppm:

$$\frac{5,193 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 519,3 \mu\text{g/ml}$$

Pembuatan larutan standar uji:

- Larutan standar genistein 41,544 ppm

$$\frac{40 \mu\text{l}}{500 \mu\text{l}} \times 519,3 \mu\text{g/ml} = 41,544 \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 62,316 ppm

$$\frac{60 \mu\text{l}}{500 \mu\text{l}} \times 519,3 \mu\text{g/ml} = 62,316 \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 83,088 ppm

$$\frac{80 \mu\text{l}}{500 \mu\text{l}} \times 519,3 \mu\text{g/ml} = 83,088 \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 103,86 ppm

$$\frac{100 \mu\text{l}}{500 \mu\text{l}} \times 519,3 \mu\text{g/ml} = 103,86 \mu\text{g/ml}$$

- Larutan standar genistein 124,632 ppm

$$\frac{120 \mu l}{500 \mu l} \times 519,3 \mu g/ml = 124,632 \mu g/ml$$

- Larutan standar genistein 145,404 ppm

$$\frac{140 \mu l}{500 \mu l} \times 519,3 \mu g/ml = 145,404 \mu g/ml$$

11. Pembuatan sampel uji aktivitas hambatan tirosinase

Penimbangan sampel

Sampel	Replikasi	Penimbangan (mg)
Non-fermentasi	1	20,3
	2	20,6
	3	20,4
Fermentasi hari ke-2	1	20,3
	2	20,1
	3	20,3
Fermentasi hari ke-3	1	21
	2	20,1
	3	21
Fermentasi hari ke-4	1	20,5
	2	20
	3	20,5

Contoh perhitungan:

Pembuatan larutan sampel induk

$$\frac{20,3 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu g/ml = 4060 \mu g/ml$$

Pembuatan larutan sampel uji:

- Larutan sampel 101,5 ppm

$$\frac{10 \mu l}{400 \mu l} \times 4060 \mu g/ml = 101,5 \mu g/ml$$

- Larutan sampel 203 ppm

$$\frac{20 \mu l}{400 \mu l} \times 4060 \mu g/ml = 203 \mu g/ml$$

- Larutan sampel 304,5 ppm

$$\frac{30 \mu l}{400 \mu l} \times 4060 \mu g/ml = 304,5 \mu g/ml$$

- Larutan sampel 406 ppm

$$\frac{40 \mu l}{400 \mu l} \times 4060 \mu g/ml = 406 \mu g/ml$$

- Larutan sampel 507,5 ppm

$$\frac{50 \mu l}{400 \mu l} \times 4060 \mu g/ml = 507,5 \mu g/ml$$

B. Data Hasil Penelitian

Hasil Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase

Contoh perhitungan:

Kontrol negatif

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,052	0,4	0,348
0,055	0,395	0,34
0,052	0,396	0,344
Rata-rata		0,344

Sampel/Standar

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu g/ml$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
41,544	0,055	0,369	0,314	8,721 %	133,115 $\mu g/ml$
62,316	0,055	0,349	0,294	14,535 %	
83,088	0,056	0,309	0,253	26,453 %	
103,86	0,055	0,275	0,22	36,047 %	
124,632	0,062	0,248	0,186	45,930 %	
145,404	0,056	0,206	0,15	56,395 %	

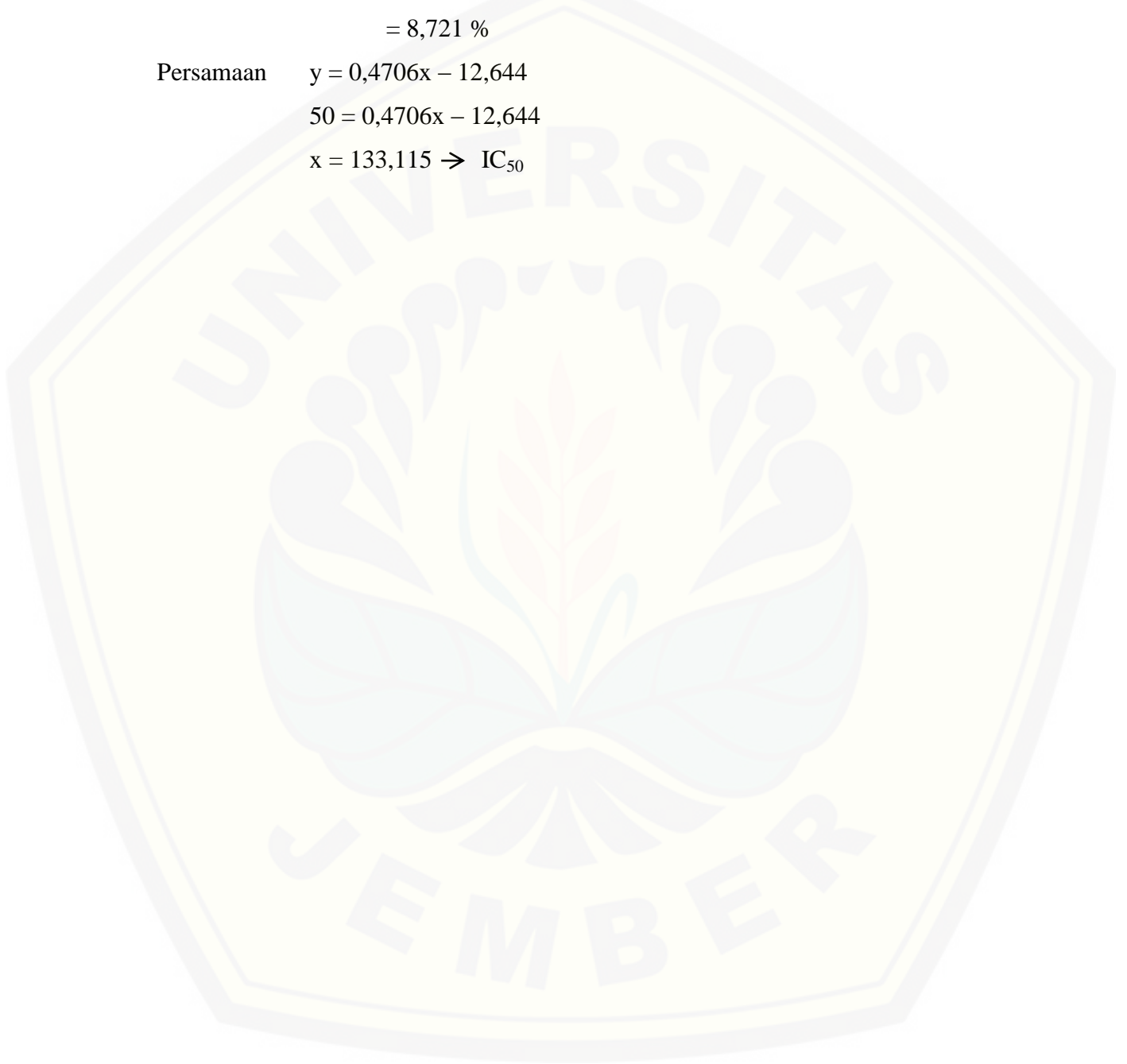
*) : A_k = absorbansi plate kosong

A_{478} = absorbansi sampel/standar pada panjang gelombang 478 nm

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

$$\begin{aligned}\text{Hambatan tirosinase} &= \frac{\text{Ahit kontrol negatif} - \text{Ahit sampel/standar}}{\text{Ahit kontrol negatif}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,344 - 0,314}{0,344} \times 100 \% \\ &= 8,721 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Persamaan} \quad y &= 0,4706x - 12,644 \\ 50 &= 0,4706x - 12,644 \\ x &= 133,115 \rightarrow \text{IC}_{50}\end{aligned}$$



Standar Genistein

Kontrol negatif

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,052	0,4	0,348
0,055	0,395	0,34
0,052	0,396	0,344
Rata-rata		0,344

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
41,544	0,055	0,369	0,314	8,721 %	133,115 $\mu\text{g/ml}$
62,316	0,055	0,349	0,294	14,535 %	
83,088	0,056	0,309	0,253	26,453 %	
103,86	0,055	0,275	0,22	36,047 %	
124,632	0,062	0,248	0,186	45,930 %	
145,404	0,056	0,206	0,15	56,395 %	

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
41,544	0,055	0,37	0,315	8,430 %	131,920 $\mu\text{g/ml}$
62,316	0,062	0,358	0,296	13,953 %	
83,088	0,06	0,312	0,252	26,744 %	
103,86	0,062	0,279	0,217	36,919 %	
124,632	0,063	0,247	0,184	46,512 %	
145,404	0,056	0,205	0,149	56,686 %	

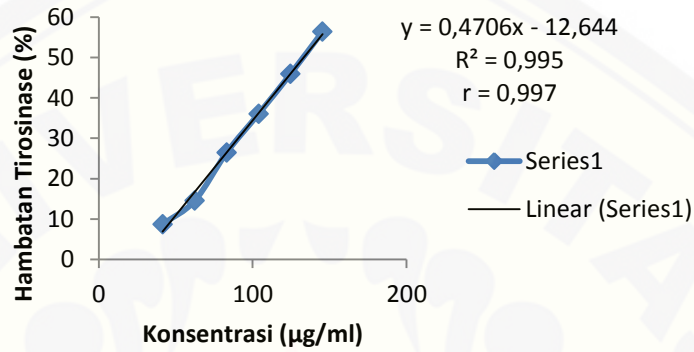
Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
41,544	0,055	0,371	0,314	8,139 %	132,524 $\mu\text{g/ml}$
62,316	0,058	0,355	0,294	13,663 %	
83,088	0,061	0,314	0,253	26,453 %	
103,86	0,056	0,275	0,22	36,337 %	
124,632	0,055	0,238	0,186	46,802 %	
145,404	0,058	0,209	0,15	56,105 %	

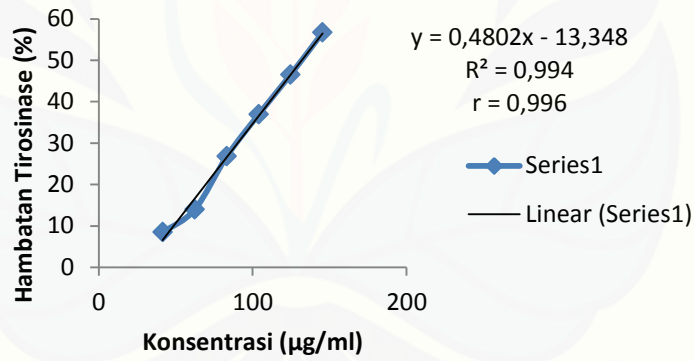
IC_{50} rata-rata = 132,519

SD = 0,596
 RSD = 0,451 %

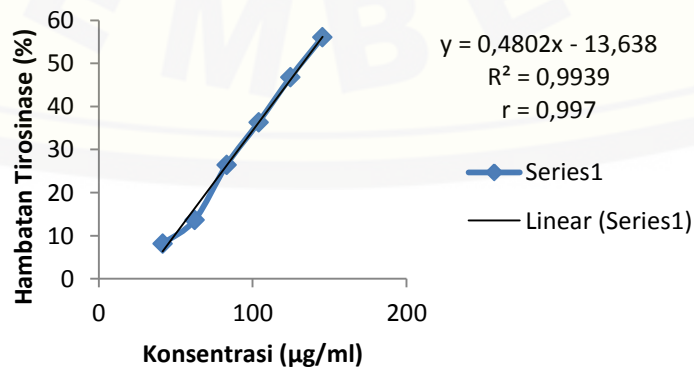
Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3



Sampel Non-fermentasi

Kontrol negatif

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,056	0,413	0,357
0,058	0,434	0,376
0,058	0,417	0,359
Rata-rata		0,364

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
101,5	0,051	0,268	0,217	40,384 %	293,719 $\mu\text{g/ml}$
203	0,059	0,258	0,199	45,329 %	
304,5	0,056	0,227	0,171	53,022 %	
406	0,059	0,22	0,161	55,769 %	
507,5	0,061	0,214	0,153	57,967 %	

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
103	0,059	0,273	0,214	41,208 %	287,166 $\mu\text{g/ml}$
206	0,056	0,254	0,198	45,604%	
309	0,056	0,226	0,17	53,297%	
412	0,057	0,217	0,16	56,044 %	
515	0,059	0,21	0,151	58,791%	

Replikasi 3

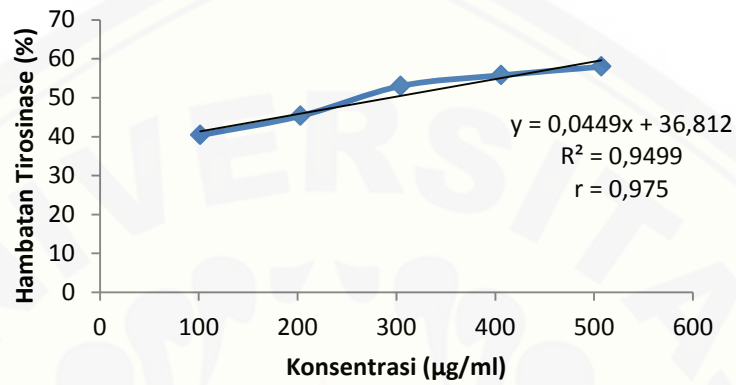
Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
102	0,053	0,267	0,214	41,208 %	285,270 $\mu\text{g/ml}$
204	0,056	0,255	0,199	45,329 %	
306	0,057	0,226	0,169	53,571 %	
408	0,062	0,222	0,16	56,044 %	
510	0,061	0,212	0,151	58,516 %	

IC_{50} rata-rata = 288,703

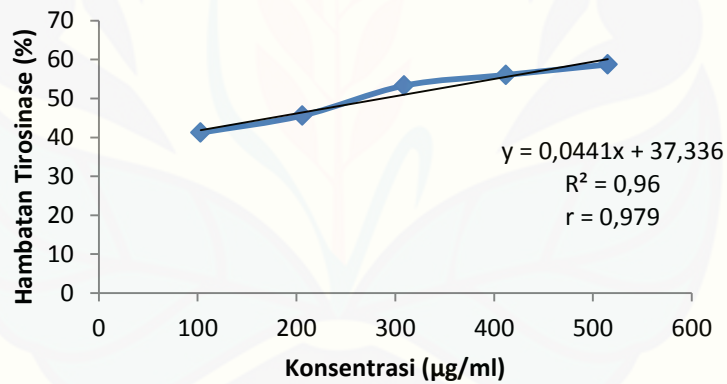
SD = 4,433

RSD = 1,535 %

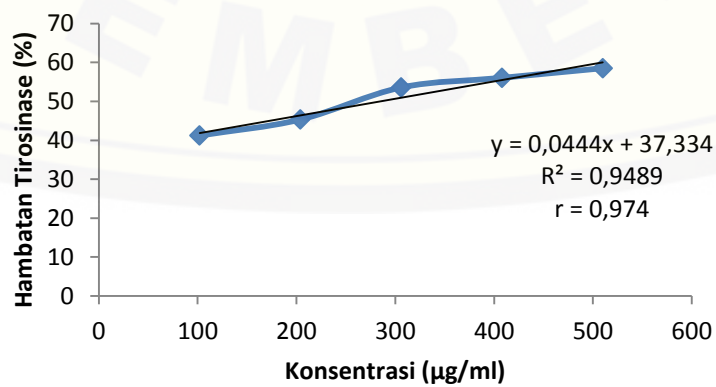
Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3



Kontrol negatif

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,056	0,413	0,357
0,058	0,434	0,376
0,058	0,417	0,359
Rata-rata		0,364

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
101,5	0,054	0,256	0,202	44,505 %	224,418 $\mu\text{g/ml}$
203	0,055	0,238	0,183	49,725 %	
304,5	0,055	0,222	0,167	54,121 %	
406	0,055	0,211	0,156	57,143 %	
507,5	0,057	0,209	0,152	58,241 %	

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
100,5	0,05	0,251	0,201	44,780 %	223,371 $\mu\text{g/ml}$
201	0,054	0,239	0,185	49,175 %	
301,5	0,056	0,222	0,166	54,395 %	
402	0,057	0,215	0,158	56,593 %	
502,5	0,061	0,211	0,15	58,791 %	

Replikasi 3

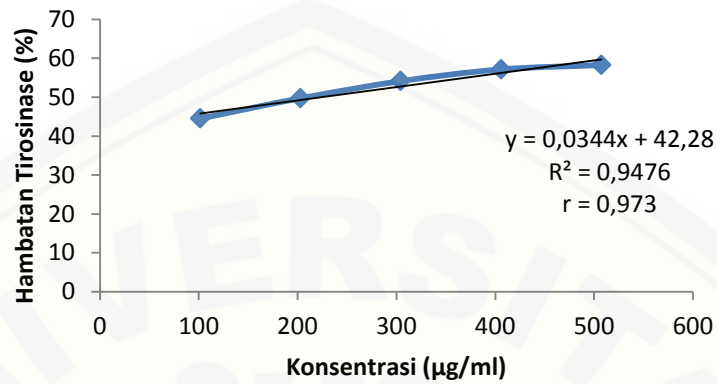
Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
101,5	0,056	0,257	0,201	44,780 %	222,411 $\mu\text{g/ml}$
203	0,057	0,24	0,183	49,725 %	
304,5	0,056	0,223	0,167	54,121 %	
406	0,061	0,218	0,157	56,868 %	
507,5	0,061	0,213	0,152	58,242 %	

IC_{50} rata-rata = 222,400

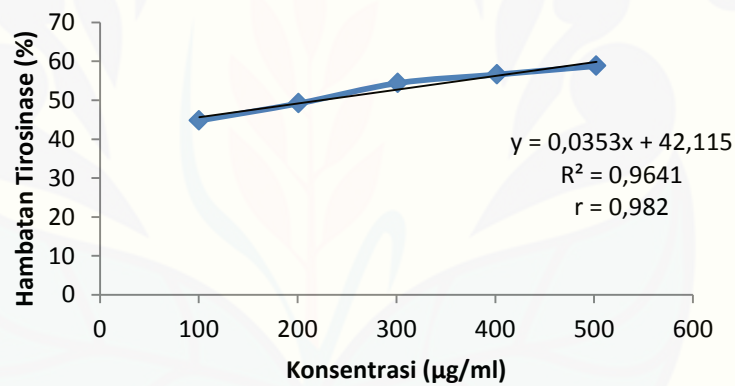
SD = 1,004

RSD = 0,449 %

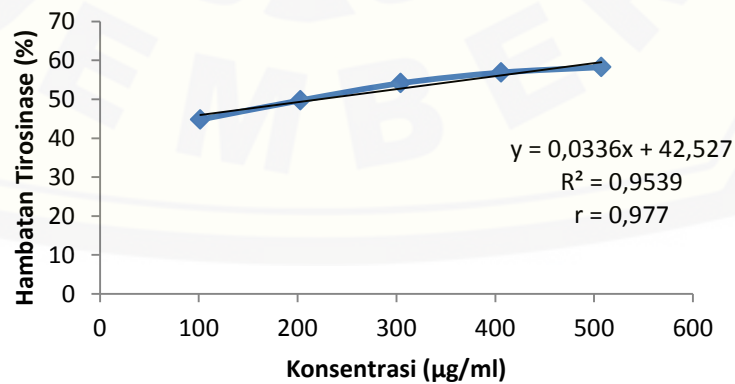
Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3



Kontrol negatif

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,056	0,413	0,357
0,058	0,434	0,376
0,058	0,417	0,359
Rata-rata		0,364

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
105	0,053	0,245	0,192	47,252 %	181,515 $\mu\text{g/ml}$
210	0,053	0,231	0,178	51,099 %	
315	0,053	0,219	0,166	54,395 %	
420	0,056	0,208	0,152	58,242 %	
525	0,058	0,2	0,142	60,989 %	

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
103	0,053	0,246	0,193	46,978 %	185,308 $\mu\text{g/ml}$
206	0,053	0,235	0,182	50,00 %	
309	0,053	0,216	0,163	55,219 %	
412	0,061	0,211	0,150	58,791 %	
515	0,058	0,203	0,145	60,165 %	

Replikasi 3

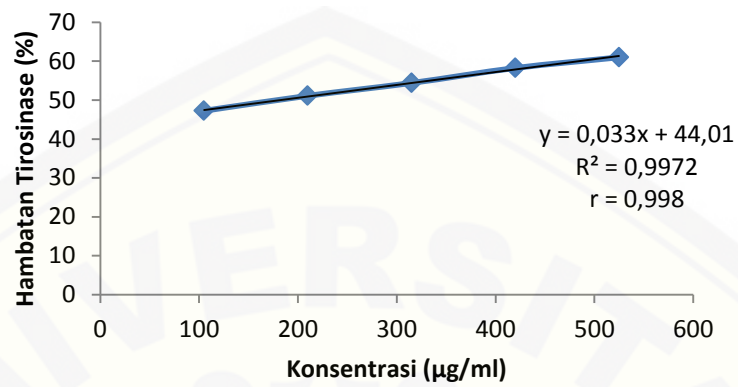
Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
105	0,054	0,247	0,193	46,978 %	185,014 $\mu\text{g/ml}$
210	0,054	0,232	0,178	51,099 %	
315	0,054	0,22	0,166	54,396 %	
420	0,053	0,204	0,151	58,516 %	
525	0,061	0,202	0,141	61,263 %	

IC_{50} rata-rata = 183,946

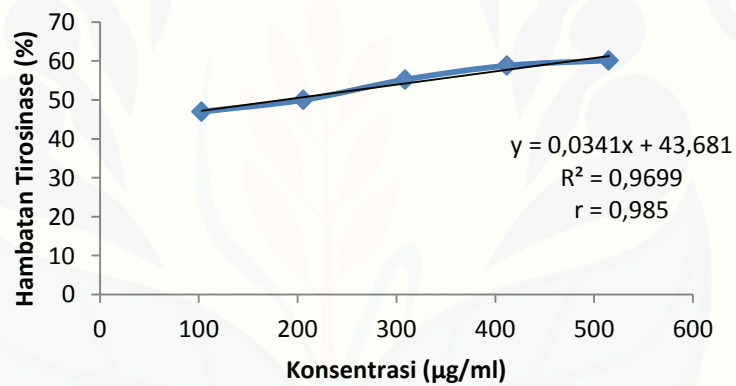
SD = 2,110

RSD = 1,147 %

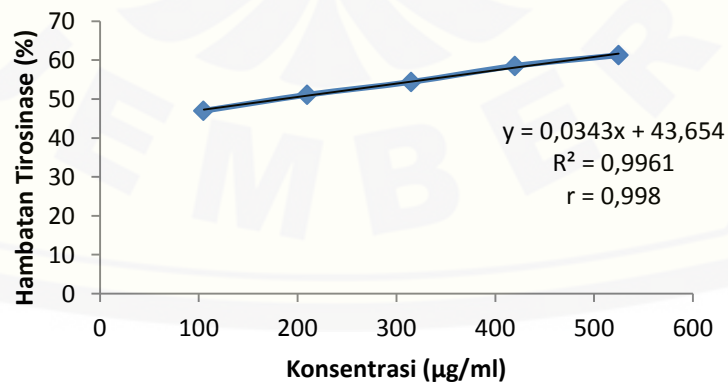
Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3



Kontrol negatif

A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*
0,056	0,413	0,357
0,058	0,434	0,376
0,058	0,417	0,359
Rata-rata		0,364

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
102,5	0,054	0,25	0,196	46,154%	195,776 $\mu\text{g/ml}$
205	0,055	0,232	0,177	51,374%	
307,5	0,055	0,226	0,171	53,022%	
410	0,059	0,21	0,151	58,516 %	
512,5	0,059	0,203	0,144	60,439%	

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
100	0,05	0,248	0,198	45,604%	201,676 $\mu\text{g/ml}$
20	0,054	0,232	0,178	51,099 %	
300	0,056	0,228	0,172	52,747%	
400	0,059	0,211	0,152	58,241%	
500	0,056	0,204	0,148	59,341%	

Replikasi 3

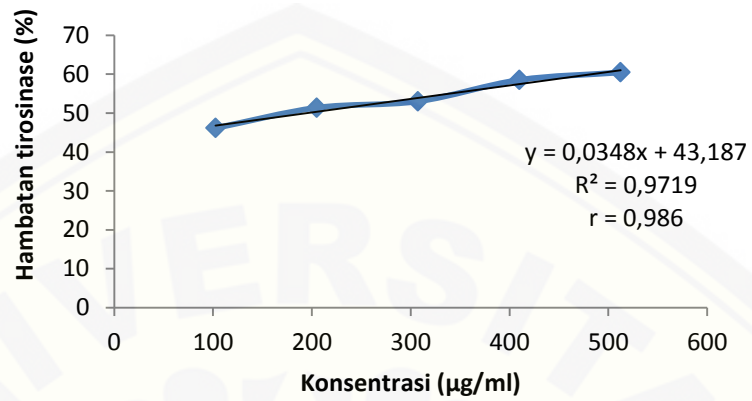
Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_k^*	A_{478}^*	A_{hit}^*	Hambatan tirosinase	IC_{50}
102,5	0,056	0,251	0,195	46,429%	192,018 $\mu\text{g/ml}$
205	0,057	0,235	0,178	51,099%	
307,5	0,056	0,225	0,169	53,571 %	
410	0,061	0,213	0,152	58,241%	
512,5	0,059	0,205	0,146	59,890 %	

IC_{50} rata-rata = 196,490

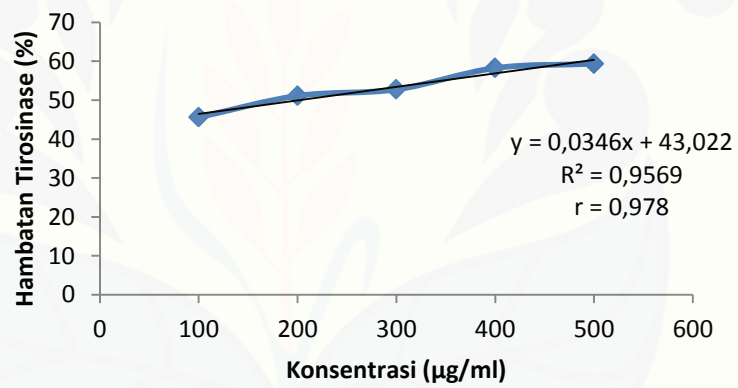
SD = 4,868

RSD = 2,478 %

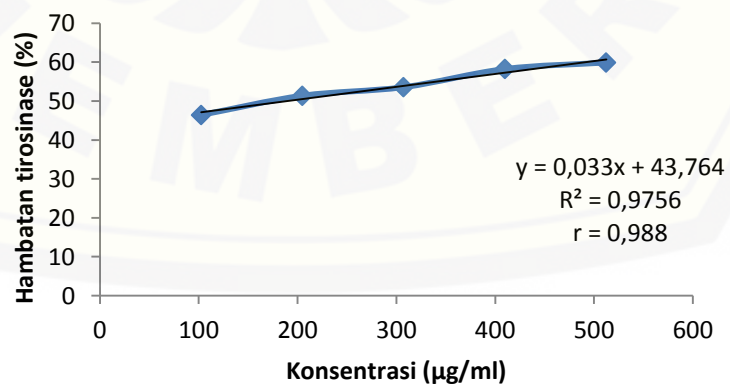
Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3



C. Analisis Data

1. Hasil Analisis Kadar Genistein

Tests of Normality

Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar_genistein non_fermentasi	,319	3	.	,885	3	,340
fermentasi_2	,235	3	.	,978	3	,714
fermentasi_3	,361	3	.	,806	3	,130
fermentasi_4	,188	3	.	,998	3	,911

a. Lilliefors Significance Correction

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

Test of Homogeneity of Variances

Kadar_genistein

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,991	3	8	,096

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

ANOVA

Kadar_genistein

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,024	3	,008	1586,819	,000
Within Groups	,000	8	,000		
Total	,024	11			

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

*Post Hoc***Multiple Comparisons**

Kadar_genistein

LSD

(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
non_fermentasi	fermentasi_2	-,086507413*	,001839855	,000	-,09075013	-,08226470
	fermentasi_3	-,111956170*	,001839855	,000	-,11619888	-,10771346
	fermentasi_4	-,105630807*	,001839855	,000	-,10987352	-,10138809
fermentasi_2	non_fermentasi	,086507413*	,001839855	,000	,08226470	,09075013
	fermentasi_3	-,025448757*	,001839855	,000	-,02969147	-,02120604
	fermentasi_4	-,019123394*	,001839855	,000	-,02336611	-,01488068
fermentasi_3	non_fermentasi	,111956170*	,001839855	,000	,10771346	,11619888
	fermentasi_2	,025448757*	,001839855	,000	,02120604	,02969147
	fermentasi_4	,006325363*	,001839855	,009	,00208265	,01056808
fermentasi_4	non_fermentasi	,105630807*	,001839855	,000	,10138809	,10987352
	fermentasi_2	,019123394*	,001839855	,000	,01488068	,02336611
	fermentasi_3	-,006325363*	,001839855	,009	-,01056808	-,00208265

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

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

2. Hasil Analisis Data Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase

Tests of Normality

Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IC50 standar_genistein	.176	3	.	1.000	3	.988
non_fermentasi	.304	3	.	.908	3	.412
fermentasi_2	.378	3	.	.768	3	.039
fermentasi_3	.360	3	.	.808	3	.133
fermentasi_4	.225	3	.	.984	3	.757

a. Lilliefors Significance Correction

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

Test of Homogeneity of Variances

IC50

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.084	4	10	.068

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

ANOVA

IC50

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	39386.303	4	9846.576	995.066	.000
Within Groups	98.954	10	9.895		
Total	39485.257	14			

Terdapat paling tidak dua kelompok memiliki perbedaan IC₅₀ yang signifikan ($p < 0,05$)

Post Hoc
Multiple Comparisons

IC50

LSD

(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
standar_genistein	non_fermentasi	-1.56198667E2	2.56844968E0	.000	-1.6192153E2	-1.5047580E2
	fermentasi_2	-9.12136667E1	2.56844968E0	.000	-96.9365292	-85.4908041
	fermentasi_3	-5.14260000E1	2.56844968E0	.000	-57.1488625	-45.7031375
	fermentasi_4	-6.39703333E1	2.56844968E0	.000	-69.6931959	-58.2474708
non_fermentasi	standar_genistein	1.56198667E2	2.56844968E0	.000	150.4758041	161.9215292
	fermentasi_2	64.98500000	2.56844968E0	.000	59.2621375	70.7078625
	fermentasi_3	1.04772667E2	2.56844968E0	.000	99.0498041	110.495292
	fermentasi_4	92.22833333	2.56844968E0	.000	86.5054708	97.9511959
fermentasi_2	standar_genistein	91.21366667	2.56844968E0	.000	85.4908041	96.9365292
	non_fermentasi	-6.49850000E1	2.56844968E0	.000	-70.7078625	-59.2621375
	fermentasi_3	39.78766667	2.56844968E0	.000	34.0648041	45.5105292
	fermentasi_4	27.24333333	2.56844968E0	.000	21.5204708	32.9661959
fermentasi_3	standar_genistein	51.42600000	2.56844968E0	.000	45.7031375	57.1488625
	non_fermentasi	-1.04772667E2	2.56844968E0	.000	-1.1049553E2	-99.0498041
	fermentasi_2	-3.97876667E1	2.56844968E0	.000	-45.5105292	-34.0648041
	fermentasi_4	-1.25443333E1	2.56844968E0	.001	-18.2671959	-6.8214708
fermentasi_4	standar_genistein	63.97033333	2.56844968E0	.000	58.2474708	69.6931959
	non_fermentasi	-9.22283333E1	2.56844968E0	.000	-97.9511959	-86.5054708
	fermentasi_2	-2.72433333E1	2.56844968E0	.000	-32.9661959	-21.5204708
	fermentasi_3	12.54433333	2.56844968E0	.001	6.8214708	18.2671959

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

Sampel kedelai non-fermentasi dan fermentasi hari ke-2, 3, dan 4 menunjukkan perbedaan IC_{50} yang signifikan ($p < 0,05$).

D. Gambar Hasil Penelitian



Isolat *Rhizopus oligosporus*



Kedelai sebelum di autoklaf



Kedelai setelah di autoklaf



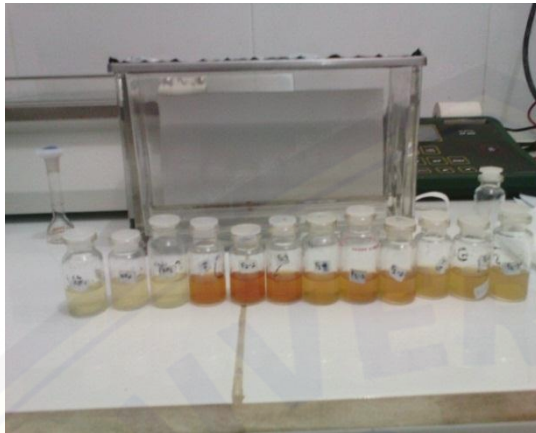
Proses inkubasi tempe



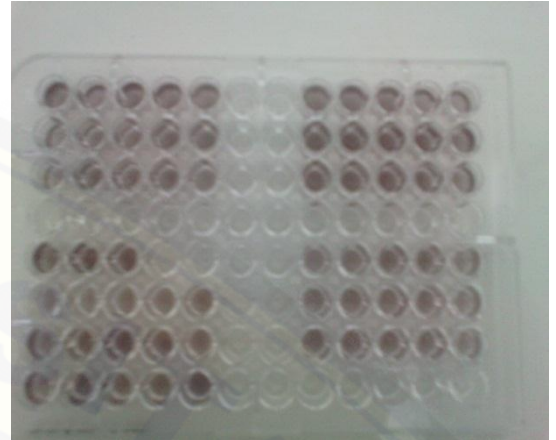
Proses *defatting*



Filtrat ekstraksi dengan sonikasi

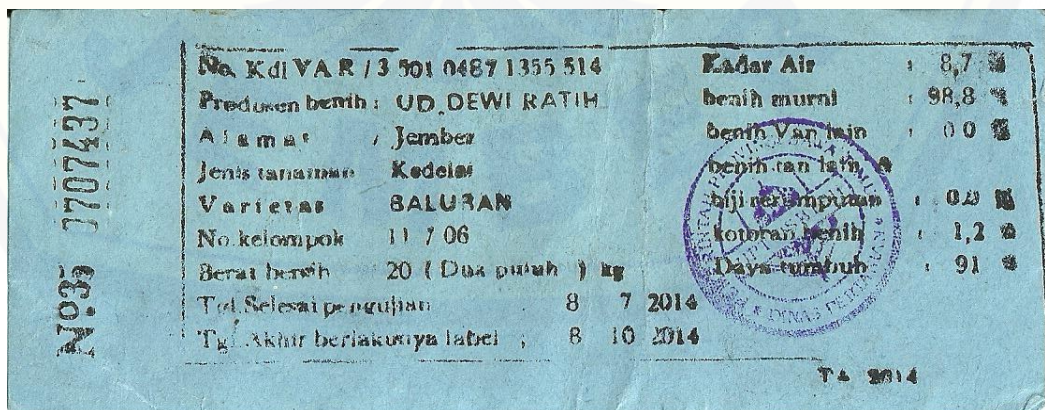



Proses eluasi KLT



Kompleks warna dopakrom

E. Sertifikat Kedelai Baluran



F. Surat Keterangan Identifikasi *R. oligosporus*

KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
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:

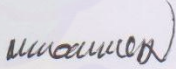
Nama/NIM : Sekar Risti Prahardini
Jur/Fak/PT : Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Maka dapat disampaikan hasilnya bahwa jamur tersebut adalah:

Rhizopus oligosporus

Demikian mudah-mudahan bermanfaat.

Jember, 30 Januari 2015
Ka, Laboratorium


Drs. Rudju Winarso, M. Kes
NIP. 1960081612989021001