



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

**SKRIPSI**

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

**Oleh :**

**Fitria Dwi Kartini  
NIM 112210101007**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW;
2. Orang tua tercinta, Ibu Sringatin dan Bapak Hariyanto, S.Pd, yang selalu memberikan kasih sayang serta ajaran tentang arti hidup dan perjuangan untuk menjadi orang yang lebih baik;
3. Kakak tercinta Septian Eko Purwanto, S.T, yang juga selalu memberikan nasihat, motivasi, dukungan dan bantuan selama ini;
4. Para pengajar sejak Taman Kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi yang terhormat, yang telah memberikan ilmunya dan membimbing saya dengan penuh ketulusan;
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

## MOTTO

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

(QS. Al-Insyirah: 6-8)

Man Jadda Wajada, Man Shabara Zhafira. Siapa yang bersungguh-sungguh akan mendapatkan, siapa yang bersabar akan beruntung.

(Pepatah Arab)

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fitria Dwi kartini

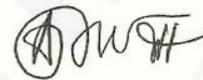
NIM : 112210101007

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

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

Jember, 14 Agustus 2015

Yang menyatakan,



Fitria Dwi Kartini

NIM 112210101007

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Fitria Dwi Kartini**

**112210101007**

Pembimbing:

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

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Pengaruh Perbedaan Pelarut Ekstraksi terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Edamame (*Glycine max*) *In vitro*” telah diuji dan disahkan oleh fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

Hari : Jumat  
Tanggal : 14 Agustus 2015  
Tempat : Fakultas Farmasi

**Tim Pembimbing,**

Dosen Pembimbing Utama,



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

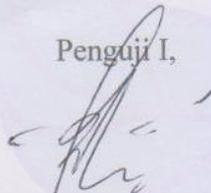
Dosen Pembimbing Anggota,



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

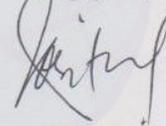
**Tim Penguji,**

Penguji I,



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

Penguji II,



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



Mengesahkan,

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember

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

NIP 197604142002122001

## RINGKASAN

**Pengaruh Perbedaan Pelarut Ekstraksi terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Edamame (*Glycine max*) *In vitro*:** Fitria Dwi Kartini, 112210101007; 2015, 41 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Warna kecoklatan sampai kehitaman pada kulit disebabkan oleh pigmen melanin yang ada di kulit. Semakin banyak akumulasi melanin dapat menyebabkan hiperpigmentasi yang dapat merusak keindahan kulit dan dapat menimbulkan rasa tidak percaya diri pada penderita. Kosmetik pemutih kulit dibutuhkan untuk mengatasi masalah hiperpigmentasi tersebut. Salah satu mekanisme kerja bahan pemutih kulit adalah menghambat kerja tirosinase. Tirosinase adalah enzim yang berperan penting dalam sintesis melanin. Proses pembentukan melanin dapat berkurang ketika tirosinase dihambat sehingga kulit tampak lebih cerah.

Isoflavon merupakan salah satu senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase. Isoflavon banyak terdapat dalam tanaman golongan leguminoceae, salah satunya adalah edamame. Terdapat 4 bentuk isoflavon yang ada pada kedelai yaitu aglikon, glikosida, malonil glikosida, dan asetil glikosida. Aktivitas hambatan tirosinase isoflavon aglikon (genistein, daidzein, glisitein) lebih besar daripada bentuk isoflavon lainnya.

Suatu senyawa dapat diambil dari jaringan tanaman melalui proses ekstraksi. Salah satu yang mempengaruhi proses ekstraksi adalah pelarut ekstraksi. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi harus bersifat selektif terhadap senyawa yang ingin diambil. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut ekstraksi terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase. Pelarut yang digunakan adalah pelarut etil asetat dan etanol 70 %.

Penetapan kadar genistein pada penelitian ini menggunakan KLT Densitometri dengan fase diam silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fase gerak toluen : etil asetat : aseton : asam format (20:4:2:1). Hasil menunjukkan kadar genistein tertinggi terdapat pada edamame yang diekstraksi menggunakan etil asetat dengan kadar  $0,0811 \pm$

0,0022 % b/b sedangkan ekstrak etanol 70 % edamame memiliki kadar genistein sebesar  $0,0351 \pm 0,0013$  % b/b.

Hasil uji aktivitas hambatan tirosinase pada masing-masing ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat edamame memberikan hambatan yang lebih besar dibandingkan ekstrak etanol 70%. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etil asetat yaitu  $76,585 \pm 1,799$   $\mu\text{g/ml}$  sedangkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol 70 % adalah  $90,241 \pm 1,266$   $\mu\text{g/ml}$ . Hasil aktivitas hambatan tirosinase yang diperoleh sebanding dengan hasil penetapan kadar genistein pada masing-masing ekstrak. Semakin tinggi kadar genistein dalam ekstrak maka semakin tinggi juga kemampuan hambatan tirosinase yang ditunjukkan dengan semakin kecil nilai  $IC_{50}$ . Penelitian ini memberikan kesimpulan bahwa perbedaan pelarut memberikan pengaruh terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase ekstrak edamame.

## PRAKATA

Bismillahirrohmaanirrohiim

Puji syukur kehadirat ALLAH SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Perbedaan Pelarut Ekstraksi terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase”. 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 sepuh hati penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang 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 Siti Muslichah S.Si., M.Si., Apt selaku dosen pembimbing utama dan Ibu Evi Umayah Ulfa S.Si., M.Si., 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 Budipratiwi Wisudyaningsih, S.Farm., M.Sc., Apt dan Ibu Ayik Rosita Puspaningtyas, S.Farm., M.Farm., Apt yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan dalam skripsi ini;
4. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;

5. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan memperluas ilmu pengetahuan serta wawasan penulis selama menempuh masa kuliah;
6. Kedua orang tua tercinta, Bapak Hariyanto S.Pd, Ibu Sringatin, adik Novita Tri Wahyuni, dan adik Cici Ragil Wulandari yang senantiasa memberikan kasih sayang dan semangat dalam bentuk apapun selama ini;
7. Kakak tercinta Septian Eko Purwanto S.T, terimakasih atas kasih sayang, semangat, dan doa yang diberikan dalam menyelesaikan skripsi ini serta kesabaran menemani selama kuliah di Jember;
8. Mentor kajian Ibu Evi, Mbak Rosa, Mbak Dija, Mbak Oni, dan Mbak Izzah yang telah memberikan banyak pengetahuan tentang islam dan berbagi semangat selama ini serta sahabat mentoring Rara, Prisma, Mia, Kiki, Oliv, dan Yeni yang selalu mengingatkan dalam kebaikan, terimakasih atas persaudaraan selama ini;
9. Sahabat grup edamame dan tirosinase Elisa, Lili, Okta, Estika, Risti, Lintang, dan Defi yang telah memberikan bantuan selama ini;
10. Bu Widi, Mbak Anggra, Mbak Dini, dan Mbak Indri selaku teknisi laboratorium Biologi dan Farmasi Klinik atas bantuannya;
11. Sahabat seperjuangan Risti, Estika, Rara, Prisma, Puspita, Dio, Mia, Orin, Arum, Yazi, Habibi, Indarto, Alan, Vita, Iik, Liza, Liyaz, Zuhro, Tiwi, Yeni, dan Zul yang telah berbagi semangat, kekompakan, dan bantuan selama ini;
12. Penghuni kos Mastrip 1/57B Elisa, Willy, Orin, Mbak Frinda, Lusi, Tiwi, Yeni, Zul, Mbak Ken, Bertha, dan Catur atas kebersamaannya;
13. Seluruh anggota UKKI Asy-syifa', LPMF Lingkar, MPM, KARISMA, SKIFI, dan IAPB yang telah memberikan pembelajaran organisasi;
14. Sahabat dan keluarga Farmasi angkatan 2011 "ASMEF" PASTI BISA!
15. Teman-teman main Lina, Roro, Angga, Vighar, Zaka, Dani, Selly, Tiwi, dan Mentari yang telah berbagi semangat selama ini;

16. 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**

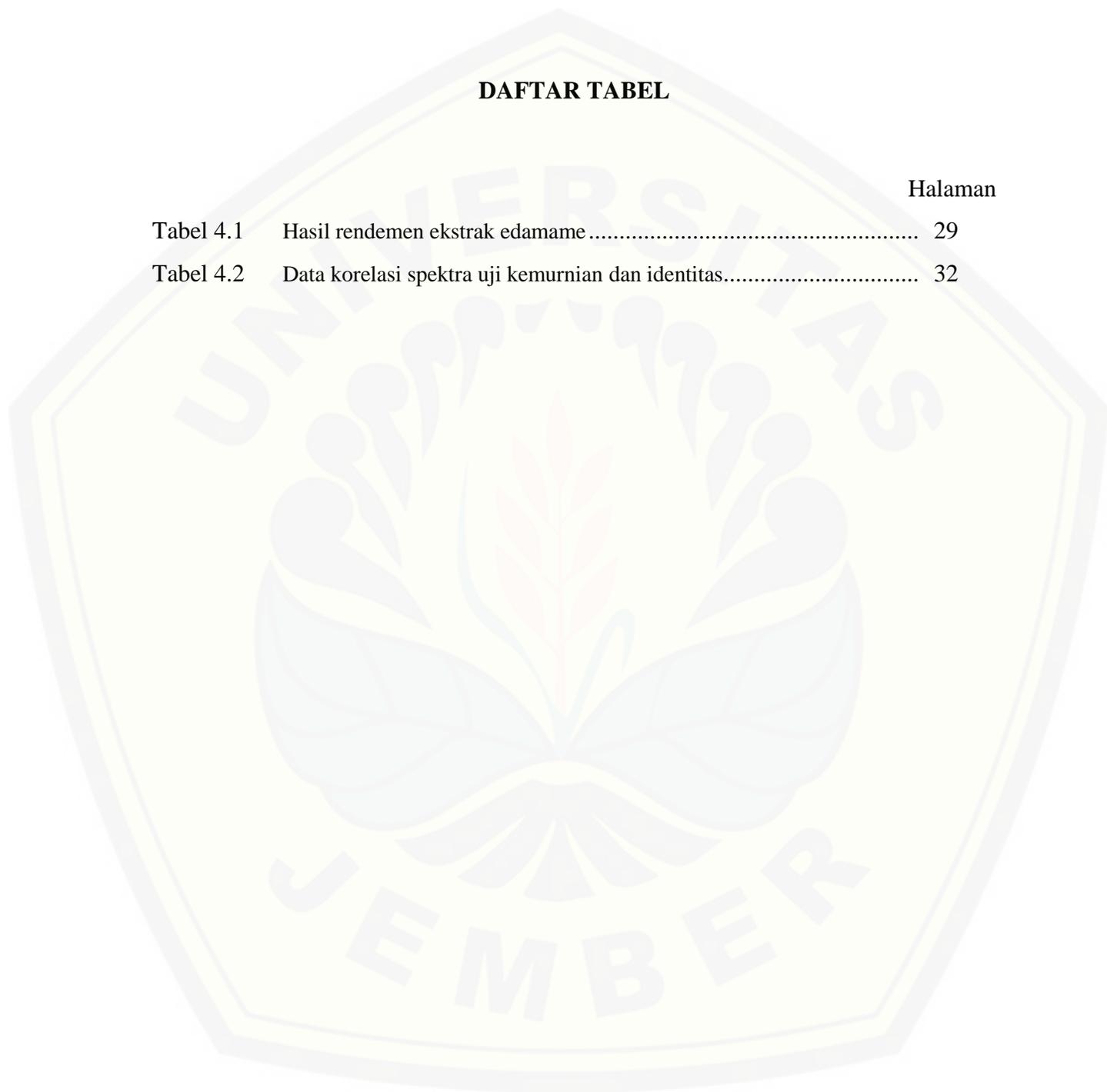
	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN SKRIPSI</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	4
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>1.5 Batasan Masalah</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Tinjauan tentang Kedelai Edamame</b> .....	5
2.1.1 Uraian Tanaman .....	5
2.1.2 Klasifikasi Tanaman Kedelai Edamame.....	5
2.1.3 Morfologi Tanaman .....	6
2.1.4 Kandungan Kimia Kedelai Edamame .....	7

<b>2.2 Tinjauan tentang Metode Ekstraksi .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Isoflavon .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4 Genistein .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5 Penghambatan Enzim Tirosinase .....</b>	<b>12</b>
<b>2.6 Melanogenesis .....</b>	<b>14</b>
<b>2.7 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri.....</b>	<b>16</b>
<b>2.8 Pengujian Aktivitas Hambatan Tirosinase .....</b>	<b>17</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Variabel Penelitian.....</b>	<b>20</b>
3.3.1 Variabel Bebas.....	20
3.3.2 Variabel Terikat .....	20
3.3.3 Variabel Terkendali .....	20
<b>3.4 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>21</b>
3.4.1 Rancangan Operasional .....	21
3.4.2 Definisi Operasional .....	21
3.4.3 Prosedur Penelitian .....	22
<b>3.5 Alat dan Bahan Penelitian .....</b>	<b>22</b>
3.5.1 Alat .....	22
3.5.2 Bahan.....	22
<b>3.6 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>23</b>
3.6.1 Preparasi Bahan.....	23
3.6.2 Penghilangan Lemak ( <i>Defatting</i> ) .....	23
3.6.3 Ekstraksi Biji Kedelai Edamame .....	23
3.6.4 Penetapan Kadar Genistein .....	23
3.6.5 Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase .....	24
3.6.6 Analisis Data .....	26
<b>3.7 Skema Prosedur Penelitian .....</b>	<b>27</b>

<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	28
4.1 Ekstraksi Biji Edamame .....	28
4.2 Hasil Penetapan Kadar Genistein .....	29
4.3 Hasil Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase.....	33
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	37
5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran .....	37
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	38
<b>LAMPIRAN</b> .....	43

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil rendemen ekstrak edamame .....	29
Tabel 4.2 Data korelasi spektra uji kemurnian dan identitas.....	32



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 Biji kedelai edamame .....	6
Gambar 2.2 Struktur kimia dari 12 isoflavon dalam kedelai .....	9
Gambar 2.3 Biosintesis isoflavon .....	11
Gambar 2.4 Struktur genistein .....	12
Gambar 2.5 Proses melanogenesis .....	15
Gambar 3.1 Diagram alir penelitian .....	27
Gambar 4.1 Hasil eluasi lempeng KLT .....	29
Gambar 4.2 kromatogram uji identitas dan kemurnian genistein.....	31
Gambar 4.3 Grafik Kadar Genistein .....	33
Gambar 4.4 Grafik nilai IC <sub>50</sub> aktivitas hambatan tirosinase.....	35

**LAMPIRAN**

	Halaman
A. Rendemen Ekstrak yang Diperoleh .....	43
B. Perhitungan Preparasi Standar Genistein.....	43
C. Hasil Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak.....	44
D. Uji Statistik Kadar Genistein .....	48
E. Perhitungan pembuatan Dapar Fosfat dan Substrat L-tirosin .....	49
F. Pembuatan Standar Genistein Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase .....	50
G. Hasil Uji Hambatan Tirosinase Standar Genistein .....	51
H. Preparasi Sampel untuk Uji Hambatan Tirosinase .....	53
I. Hasil Uji Hambatan Tirosinase Standar Genistein .....	54
J. Hasil Uji Statistik Hambatan Tirosinase.....	60
K. Gambar Penelitian.....	61

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Warna kecoklatan sampai kehitaman pada kulit disebabkan oleh komponen melanin yang ada di kulit. Semakin banyak jumlah melanin maka warna kulit akan semakin coklat. Hal ini terjadi karena adanya proses melanogenesis yang merupakan proses pembentukan melanin di kulit (Gillbro dan Olsson, 2011). Melanin memiliki peran penting dalam perlindungan kulit terhadap paparan radiasi ultraviolet (UV) dari sinar matahari. Namun, akumulasi abnormal dari melanin dapat mengakibatkan kelainan pigmentasi pada kulit seperti melasma, bintik-bintik di daerah berbeda pada kulit dan bentuk lain dari hiperpigmentasi (Chang, 2009). Hiperpigmentasi ini dapat merusak keindahan kulit dan menimbulkan rasa tidak percaya diri pada penderita sehingga dibutuhkan penggunaan agen depigmentasi untuk menghambat proses pigmentasi (Hindritiani, 2013).

Salah satu strategi untuk mencegah hiperpigmentasi adalah dengan cara mengurangi pembentukan melanin melalui penghambatan enzim tirosinase. Enzim ini merupakan enzim yang paling berperan dalam proses sintesis melanin di melanosit (Gillbro dan Olsson, 2011). Enzim tirosinase akan menghidroksilasi L-tirosin menjadi 3,4-dihidrofenilalanin (L-DOPA) dan mengoksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon. Dopakuinon memiliki sifat sangat reaktif sehingga dapat mengalami reaksi secara spontan membentuk dopakrom yang kemudian dikonversi menjadi melanin (Chang, 2009).

Senyawa pemutih kulit seperti hidrokuinon merupakan senyawa yang sering digunakan namun memiliki efek samping yang berbahaya dalam penggunaan jangka panjang. Hidrokuinon bersifat sitotoksik terhadap sel melanosit sehingga untuk menghindari efek tersebut banyak penelitian yang dilakukan untuk mencari alternatif pemutih kulit dari bahan alam (Gillbro dan Olsson, 2011 ; Hindritiani, 2013).

Kandungan flavonoid dalam tanaman dapat menghambat aktivitas enzim tirosinase sehingga dapat digunakan untuk mencegah hiperpigmentasi. Flavonoid adalah salah satu golongan polifenol yang mengandung cincin fenolik dan piran dalam strukturnya. Senyawa ini sebagian besar terdapat pada daun, biji, dan bunga dalam tanaman. Flavonoid sendiri dibagi menjadi 6 kelompok menurut struktur kimianya yaitu flavanol, flavon, flavonol, flavanon, isoflavon, dan antosianidin (Uyama dan Kim, 2005). Contoh senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas penghambatan tirosinase adalah kuersetin dari golongan flavonol, streptogenin dari golongan flavanon, norartokarpetin dari golongan flavon, pelargonidin dari golongan antosianidin, taxifolin dari golongan flavanol, daidzein dan genistein dari golongan isoflavon (Chang, 2009 ; Hanamura *et al.*, 2008).

Edamame (*Glycine max*) merupakan tanaman yang satu spesies dengan kedelai, namun memiliki biji lebih besar, rasa lebih manis, dan tekstur lebih lembut (Miles *et al.*, 2000). Seperti halnya kedelai, edamame juga memiliki kandungan isoflavon diantaranya genistein, daidzein, dan glisitein. Kandungan rata-rata isoflavon pada edamame sebesar 92,81  $\mu\text{g/g}$  (Mebrahtu *et al.*, 2004). Isoflavon dalam kedelai edamame dapat memperkuat sistem imun tubuh, mengurangi resiko kanker, mencegah penyakit jantung, dan mengurangi gangguan pada saat menopause (Widati dan Iteu, 2012). Chang *et al.*, (2005) menunjukkan bahwa isoflavon kedelai tersebut memiliki aktivitas hambatan terhadap enzim tirosinase tetapi penelitian hambatan tirosinase pada edamame belum pernah dilakukan.

Suatu senyawa dapat terambil dari jaringan tanaman melalui proses ekstraksi. Beberapa hal yang mempengaruhi jumlah senyawa yang terambil ketika ekstraksi adalah metode ekstraksi, jenis pelarut, dan bagian tanaman yang digunakan (Tiwari *et al.*, 2011). Penelitian kali ini dilakukan ekstraksi biji kedelai edamame menggunakan dua pelarut ekstraksi yang berbeda yaitu etanol 70% dan etil asetat dengan metode sonikasi. Metode sonikasi dipilih berdasarkan penelitian yang dilakukan Luthria *et al.*, (2007 ). Pada penelitian tersebut menunjukkan bahwa metode ekstraksi sonikasi merupakan metode yang menghasilkan total isoflavon

kedelai terbanyak kedua setelah metode PLE (*Pressurized Liquid Extraction*). Sonikasi dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel dan menghasilkan kavitas sehingga pelarut mudah berdifusi ke dalam sel tumbuhan (Tiwari *et al.*, 2011). Efek mekanik dari metode ini dapat meningkatkan transfer massa analit sehingga waktu yang dibutuhkan untuk pemecahan sel lebih cepat (Sani, *et al.*, 2014).

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus bersifat selektif yakni mampu mengekstraksi senyawa yang diinginkan. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etil asetat dan etanol 70%. Pemilihan jenis pelarut ini didasarkan pada Andersen dan Markham, (2006) yang menyebutkan bahwa senyawa isoflavon termasuk dalam golongan flavonoid yang kurang polar sehingga dapat diekstraksi menggunakan pelarut yang bersifat semipolar seperti etil asetat. Pada penelitian lain yaitu oleh Rostagno *et al.*, (2004) menunjukkan bahwa pelarut yang optimal untuk mengekstraksi isoflavon dalam kedelai adalah etanol 70% dibandingkan dengan metanol. Penggunaan dua macam pelarut tersebut bertujuan untuk melihat pelarut manakah yang lebih efektif untuk mendapatkan aktivitas penghambatan enzim tirosinase yang lebih besar dan mengekstraksi genistein dalam biji kedelai edamame.

## 1.2 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana perbedaan kandungan genistein ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol 70% edamame ?
2. Bagaimana perbedaan aktivitas hambatan enzim tirosinase ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol 70% edamame ?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah :

1. Mengetahui perbedaan kandungan genistein ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol 70% edamame.
2. Mengetahui perbedaan aktivitas hambatan enzim tirosinase ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol 70% edamame.

### 1.4 Manfaat Penelitian

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

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh perbedaan pelarut ekstraksi terhadap aktivitas edamame sebagai agen pemutih kulit.
2. Uji aktivitas biologi yang dilakukan diharapkan dapat memberikan sumbangsih terhadap pengembangan sediaan pemutih kulit dengan bahan aktif ekstrak edamame.

### 1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagian dari tanaman yang digunakan adalah biji kedelai edamame.
2. Metode yang digunakan untuk mengekstraksi isoflavon adalah metode sonikasi.
3. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etil asetat dan etanol 70%.
4. Penetapan kadar genistein dalam ekstrak edamame menggunakan KLT Densitometri dengan genistein sebagai standar.
5. Penentuan aktivitas penghambatan enzim tirosinase secara *in vitro* menggunakan spektrofotometri.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan tentang Kedelai Edamame

#### 2.1.1 Uraian Tanaman

Edamame adalah tanaman tropis yang berasal dari Jepang dan lebih dikenal sebagai kedelai sayur karena dipanen saat polongnya masih muda dan hijau yaitu pada stadia tumbuh R-6 atau R-7 atau ketika pengisian biji sudah hampir penuh (80-90% pengisian) (Konovsky *et al.*, 1994). Edamame berbeda dengan kedelai lainnya, karena memiliki tekstur yang lebih halus, biji yang lebih besar, rasa yang lebih manis, dan lebih mudah dicerna (Hakim, 2013). Varietas edamame yang pernah dibudidayakan di Indonesia antara lain varietas Ocumani, Tsurunoko, Tsurumidori, Taiso, dan Ryokkoh. Saat ini yang sedang dikembangkan untuk produk edamame beku adalah varietas Ryokkoh. Biji kedelai edamame dibagi menjadi dua kelompok yaitu berbiji sedang dengan bobot berat 100 biji antara 11-13 gram dan berbiji besar bila bobot berat 100 biji lebih dari 13 gram (Samsu, 2001).

#### 2.1.2 Klasifikasi Tanaman Kedelai Edamame

Klasifikasi tanaman kedelai edamame adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Rosidae
Ordo	: Fabales

Keluarga : Fabaceae  
Genus : Glycine  
Spesies : *Glycine max* (L.) Merrill. (USDA, 2010).

### 2.1.3 Morfologi Tanaman

Edamame merupakan tanaman semak rendah, tumbuh tegak, batang yang merambat, berdaun lebat, daun *trifoliolate* dengan anak daun berbentuk *ovate-deltoid*. Bunga edamame berbentuk kupu-kupu berwarna putih atau ungu. Bentuk bunga seperti ini merupakan ciri-ciri tanaman yang termasuk dalam famili Fabaceae. Polong berbentuk bulat agak gepeng berwarna hijau terang hingga hijau tua, biji yang telah tua berbentuk elips dengan warna coklat muda seperti yang terlihat pada gambar 2.1. Edamame memiliki ukuran panjang polong 6-7 cm dengan jumlah biji sebanyak 2 hingga 4 tiap polongnya. Tinggi tanaman berkisar antara 30 cm sampai lebih dari 50 cm dapat bercabang sedikit atau banyak (Widati dan Iteu, 2012 ; Sciarappa *et al.*, 2007).



Gambar 2.1 Biji kedelai edamame (dokumentasi pribadi)

#### 2.1.4 Kandungan Kimia Kedelai Edamame

Edamame mengandung protein 40%, lemak (tanpa kolesterol) 20%, karbohidrat 33%, dan serat 6%. Edamame juga mengandung kalsium, zat besi, kalium, asam askorbat, dan vitamin E (Widati dan Iteu, 2012). Menurut Preedy, (2013) edamame mengandung beberapa macam isoflavon diantaranya genistin, daidzin, genistein, daidzein, dan malonil isoflavon. Isoflavon banyak terdapat di hipokotil pada awalnya kemudian terakumulasi di bagian kotiledon. Kandungan total isoflavon paling tinggi saat dipanen pada awal kematangan biji (Tsukamoto *et al.*, 1995). Kandungan isoflavon aglikon genistein: daidzein: glisitein dalam adalah 1,6:1,0:0,8 (Preedy, 2013).

Kandungan isoflavon dalam edamame dapat memperkuat sistem imun tubuh, mengurangi resiko kanker, mencegah penyakit jantung, dan mengurangi gangguan pada saat menopause. Kandungan protein yang tinggi dan kandungan lemak yang rendah serta asam amino membuat edamame baik untuk dikonsumsi karena dapat mencegah timbunan kolesterol pada dinding pembuluh darah dan memberikan efek yang baik bagi tekanan darah (Widati dan Iteu, 2012). Chang *et al.*, (2005) melaporkan bahwa isoflavon genistein, daidzein, dan glisitein memiliki aktivitas hambatan tirosinase. Menurut Onozawa *et al.*, (1998) Isoflavon genistein telah diteliti dapat mengurangi resiko terjadinya kanker prostat dengan cara mengurangi pertumbuhan sel tumor. Penelitian *in-vitro* terhadap pertumbuhan sel LNCaP, menunjukkan bahwa isoflavon genistein memiliki IC<sub>50</sub> sebesar 40 µM.

## 2.2 Tinjauan tentang Metode Ekstraksi

Ekstraksi bahan obat atau disebut *solid from solid separation* adalah pemisahan komponen atau senyawa padat dari bahan padat. Tipe ekstraksi yang biasa

digunakan adalah ekstraksi padat cair yaitu senyawa aktif diekstraksi menggunakan media cair (pelarut). Proses dari ekstraksi terdiri dari tiga tahap yaitu :

1. Penetrasi pelarut ke dalam sel tumbuhan yang mengakibatkan sel mengembang (*swelling*).
2. Disolusi senyawa target.
3. Difusi senyawa target yang terlarut keluar sel tanaman.

Hal-hal yang mempengaruhi proses ekstraksi adalah bagian tumbuhan yang digunakan, pelarut untuk ekstraksi, metode ekstraksi, dan lama waktu ekstraksi (List dan Schmidt, 1989).

Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi sonikasi yang memanfaatkan gelombang ultrasonik. Prinsip metode sonikasi adalah meningkatkan permeabilitas dinding sel, membentuk kavitasi, dan meningkatkan stres mekanik sel (List dan Schmidt, 1989). Metode sonikasi akan mengakibatkan pelarut mudah berdifusi ke dalam sel tanaman (Tiwari *et al.*, 2011). Efek mekanik dari sonikasi dapat meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam sel bahan serta meningkatkan transfer massa sehingga waktu yang dibutuhkan untuk pemecahan sel lebih cepat (Sani, *et al.*, 2014).

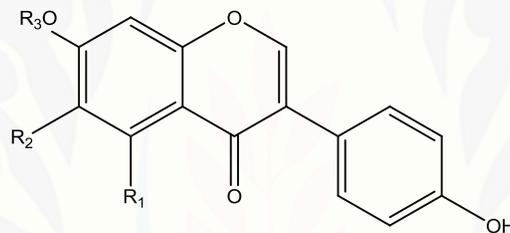
Ekstraksi dapat dikelompokkan berdasarkan jenis pelarutnya yaitu *aqueous phase* dan *organic phase*. *Aqueous phase* dilakukan menggunakan air, sedangkan *organic phase* dilakukan menggunakan pelarut organik (Harbone, 1987). Pelarut organik yang bisa digunakan untuk ekstraksi bahan obat adalah golongan hidrokarbon alifatik, hidrokarbon aromatik, hidrokarbon klorin, alkohol, keton, asam karboksilat, ester, dan eter. Pelarut yang digunakan untuk proses ekstraksi harus mampu melarutkan senyawa yang diinginkan (selektif), mudah penanganannya, murah, dan toksisitas rendah (List dan Schmidt, 1989).

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini ada 2 macam yaitu etil asetat dan etanol 70%. Etil asetat merupakan senyawa organik dengan rumus molekul  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$  yang merupakan ester dari etanol dan asam asetat yang memiliki aroma khas. Etil asetat adalah pelarut semi polar yang *volatile*. Etanol termasuk dalam alkohol primer yang memiliki kepolaran lebih polar dari etil asetat. Etanol

yang biasa digunakan untuk ekstraksi adalah etanol dengan konsentrasi 70% karena lebih polar dari etanol murni sehingga lebih mudah melarutkan senyawa (Tiwari *et al.*, 2011).

### 2.3 Isoflavon

Isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesis oleh tanaman, khususnya pada tanaman golongan Leguminosae. Bagian tanaman yang banyak mengandung isoflavon adalah pada biji khususnya pada bagian hipokotil yang akan tumbuh menjadi tanaman dan pada bagian kotiledon yang akan menjadi daun pertama dari tanaman (Dhaubhadel, 2011).

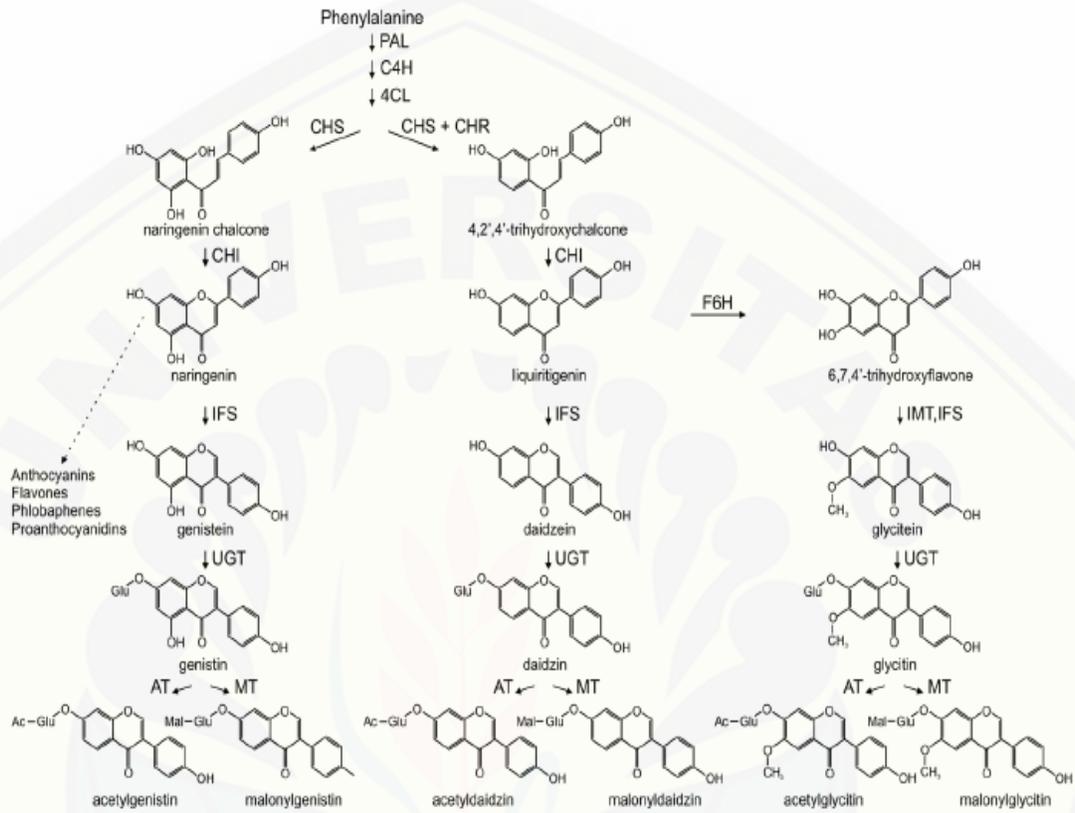


Senyawa	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Daidzein	H	H	H
Glisitein	H	OCH <sub>3</sub>	H
Genistein	OH	H	H
Daidzin	H	H	Glu
Glisitin	H	OCH <sub>3</sub>	Glu
Genistin	OH	H	Glu
Malonil daidzin	H	H	Glu-COCH <sub>2</sub> COOH
Malonil glisitin	H	OCH <sub>3</sub>	Glu-COCH <sub>2</sub> COOH
Malonil genistin	OH	H	Glu-COCH <sub>2</sub> COOH
Asetil daidzin	H	H	Glu-COCH <sub>3</sub>
Asetil glisitin	H	OCH <sub>3</sub>	Glu-COCH <sub>3</sub>
Asetil genistin	OH	H	Glu-COCH <sub>3</sub>

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

Isoflavon secara kimia dapat dikelompokkan berdasarkan gugus fungsinya. Terdapat empat kelompok yaitu malonil glikosida (malonil genistin, malonil daidzin, dan malonil glisitin); asetil glikosida (asetil genistin, asetil daidzin, dan asetil glisitin); aglikon (genistein, daidzein, dan glisitein) dan glikosida (genistin, daidzin, dan glisitin) seperti yang terlihat pada Gambar 2.2 (Dhaubhadel *et al.*, 2011). Senyawa isoflavon biasanya berupa senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa gula membentuk isoflavon glikosida (Andersen dan Markham, 2006). Isoflavon dalam bentuk glukokonjugat ini memiliki aktivitas lebih rendah bila dibandingkan dengan bentuk aglikonnya (Chang, 2009). Isoflavon aglikon merupakan bentuk isoflavon paling aktif dalam tubuh manusia karena telah dihidrolisis dari bentuk glukokonjugatnya. Isoflavon akan ditransport dari saluran cerna menuju darah atau dimetabolisme lebih lanjut dalam saluran cerna. Degradasi isoflavon terjadi dalam hati, kemudian akan berkonjugasi dengan asam glukoronat dan akan diekskresi melalui urin dan empedu (Pilsakova *et al.*, 2010)

Biosintesis isoflavon terjadi melalui jalur fenilpropanoid, kalkon merupakan senyawa pertama yang dibentuk dalam produksi isoflavon seperti yang terlihat pada Gambar 2.3. Kalkon dibentuk oleh enzim *chalcone synthase* (CHS). Pada tanaman kacang-kacangan memproduksi dua macam kalkon yaitu naringenin kalkon dan isolikuiritigenin kalkon. Dua senyawa tersebut kemudian menjadi flavanon dengan bantuan enzim *chalcone isomerase* (CHI). Enzim yang berperan dalam pembentukan isoflavon adalah enzim *isoflavone synthase* (IFS) yang merupakan enzim sitokrom P<sub>450</sub> monooksidase. Aktivitas IFS akan menghasilkan senyawa 2-hidroksiisoflavon yang tidak stabil dan mengalami dehidrasi membentuk genistein dan daidzein (Dhaubhadel, 2011).



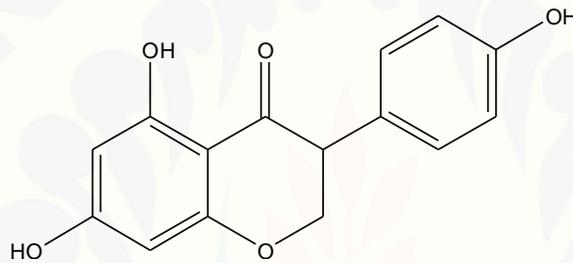
Gambar 2.3 Biosintesis Isoflavon (Dhaubhadel, 2011)

## 2.4 Genistein

Genistein adalah senyawa alam yang tergolong dalam kelompok isoflavon dan merupakan molekul nutrisi yang penting dalam biji kedelai. Selain itu juga merupakan kelompok fitoestrogen. Fitoestrogen adalah hormon estrogen yang berasal dari tanaman. Genistein memiliki berbagai efek farmakologis pada sel hewan, termasuk penghambatan tirosin kinase dan konsumsi genistein memberikan efek menguntungkan bagi kesehatan diantaranya pencegahan penyakit kardiovaskular dan gejala *post-menopause*. Genistein dapat disintesis secara kimia melalui jalur kalkon

sedangkan dalam tumbuhan disintesis dari flavanon naringenin oleh reaksi migrasi cincin yang dikatalis oleh enzim isoflavon sintase sitokrom P<sub>450</sub> (IFS) (Dixon dan Ferreira, 2002).

Genistein memiliki nama IUPAC 5,7-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil) kromen-4-on dengan rumus molekul C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>, berat molekul 270, berbentuk kristal dan titik leleh sebesar 297-298°C. Genistein merupakan senyawa yang larut dalam pelarut etanol, metanol, larutan alkali, dan tidak larut dalam air (O'Neil, 2001 ; Wu *et al.*, 2010)



Gambar 2.4 Struktur genistein

## 2.5 Penghambatan Enzim Tirosinase

Enzim adalah protein yang berfungsi sebagai katalisator yakni 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 (Boyer, 1993). Aktivitas kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti inhibitor, aktivator, kofaktor, koenzim, suhu, pH, dan konsentrasi substrat (Kuchel dan Ralston, 2006).

Tirosinase (EC.1.14.18.1) disebut juga polifenol oksidase adalah enzim monoooksidase yang memiliki gugus ion logam tembaga (Cu<sup>2+</sup>) dengan berat molekul 113.000 dalton (Warrington dan Saville, 1999). Enzim tirosinase bekerja bergantung pada keberadaan substratnya yaitu L-tirosin dan pH 6,5-7. Enzim tirosinase akan

menghidroksilasi L-tirosin menjadi 3,4-dihidrofenilalanin (L-DOPA) dan mengoksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon. Dopakuinon memiliki sifat sangat reaktif sehingga dapat mengalami reaksi secara spontan membentuk dopakrom yang kemudian dikonversi menjadi melanin (Chang, 2007). Penghambatan tirosinase merupakan proses depigmentasi yang paling sering digunakan karena penghambatannya bersifat spesifik dengan target melanogenesis di sel (Chang, 2012).

Agen penghambatan tirosinase dapat dikelompokkan menjadi 5 macam yaitu senyawa polifenol, turunan benzaldehid dan benzoat, steroid dan lipid rantai panjang, agen penghambatan alami dan sintetik, dan agen inaktivator ireversibel. Polifenol merupakan senyawa yang masuk dalam kelompok besar sebagai agen penghambatan enzim tirosinase. Flavonoid termasuk dalam kelompok polifenol. Flavonoid sendiri dibagi menjadi 6 kelompok menurut struktur kimianya yaitu flavanol, flavon, flavonol, flavanon, isoflavon, dan antosianidin (Uyama dan Kim, 2005).

Senyawa flavonoid, termasuk isoflavon, memiliki mekanisme penghambatan dan pengkhelatan tembaga (Cu) enzim tirosinase akibat adanya gugus hidroksil pada cincin A dan B senyawa flavonoid (gugus OH pada C6-C8 dan C2'-C4'). Posisi gugus hidroksil dan jumlah gugus memiliki peranan penting dalam menghambat aktivitas tirosinase. Semakin banyak gugus OH pada cincin benzena maka aktivitas penghambatannya akan semakin tinggi. Adanya gugus metil dan konjugat gula pada cincin benzena dapat menurunkan aktivitas penghambatan (Donghyun, 2006).

Bahan alam yang memiliki aktivitas penghambatan tirosinase telah banyak diteliti diantaranya adalah fraksi *n*-heksana dari tanaman kayu bawang (*Protium javanicum*) mampu menghambat kerja reaksi difenolase pada enzim tirosinase dengan  $IC_{50}$  sebesar 114,2  $\mu\text{g/ml}$  dan fraksi etil asetat mampu menghambat reaksi monofenolase enzim tirosinase dengan  $IC_{50}$  834  $\mu\text{g/ml}$  (Irmanida *et al.*, 2013), ekstrak metanol *Instia palembanica* memiliki  $IC_{50}$  penghambatan tirosinase sebesar 10,4  $\mu\text{g/mL}$  (Batubara *et al.*, 2010).

Banyak tanaman yang memiliki aktivitas penghambatan tirosinase, beberapa diantaranya telah digunakan dalam produk kosmetik pemutih kulit yaitu hesperidin,

arbutin, dan aloesin. Arbutin diperoleh dari tanaman *bearberry* memiliki mekanisme kerja menghambat tirosinase dan DHIC (5,6-dihidroksiindol-2-asam karboksilat) polimerase. Aloesin merupakan senyawa aktif yang diisolasi dari tanaman *aloe vera*. Aloesin terbukti mampu menghambat tirosin hidroksilase dan DOPA oksidase. Hesperidin merupakan bioflavonoid yang terdapat pada kulit buah jeruk, menurut penelitian hesperidin mampu menghambat aktivitas tirosinase pada sel melanosit pada manusia (Gao dan Zhu, 2007; Parvez *et al.*, 2007).

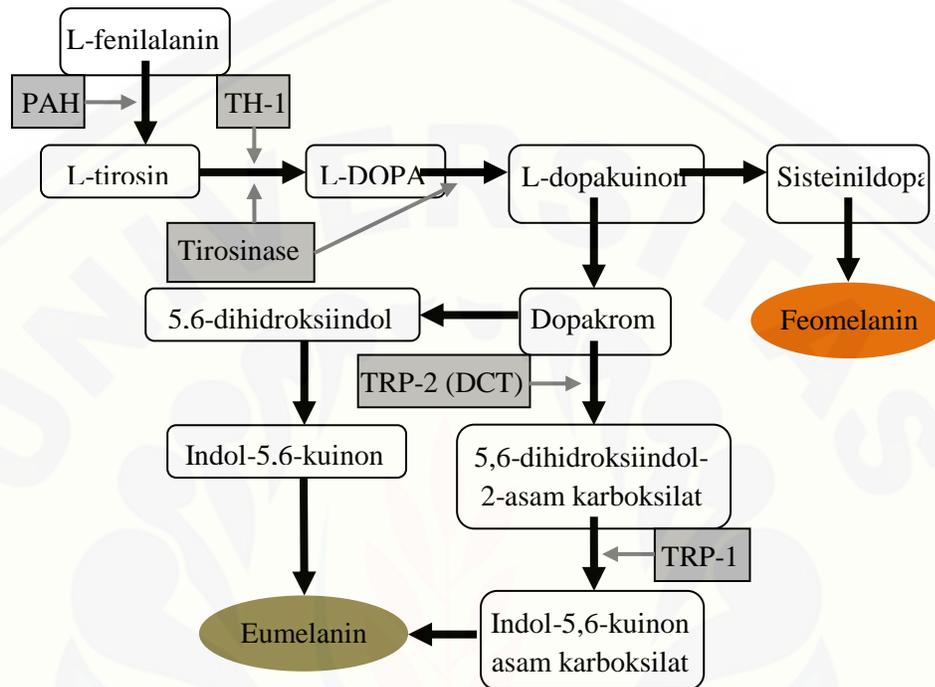
Tipe penghambatan enzim dapat dibedakan menjadi empat yaitu :

1. Inhibitor unkompetitif merupakan inhibitor yang hanya bisa berikatan dengan kompleks enzim-substrat
2. Inhibitor kompetitif adalah inhibitor yang dapat berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga mencegah pembentukan kompleks enzim-substrat
3. Inhibitor campuran (kompetitif dan unkompetitif) adalah inhibitor yang dapat berikatan dengan sisi aktif enzim dan kompleks enzim-substrat
4. Inhibitor non-kompetitif merupakan inhibitor yang dapat berikatan dengan sisi aktif enzim dan kompleks enzim-substrat yang memiliki konstanta keseimbangan yang sama ( $K_1=K_2$ ) (Chang, 2009).

## 2.6 Melanogenesis

Warna kulit dipengaruhi oleh adanya pigmen melanin dalam tubuh yang dihasilkan oleh sel melanosit di bagian epidermis. Selain memberikan warna kulit, melanin juga berperan penting dalam absorpsi radikal dan melindungi kulit dari radiasi seperti radiasi sinar UV (Chang, 2012). Melanogenesis adalah proses pembentukan pigmen melanin yang merupakan kombinasi reaksi katalis enzimatik dan kimia. Melanin yang disintesis dalam melanosom ada dua macam yaitu eumelanin dan feomelanin (Chang, 2012). Eumelanin adalah pigmen melanin berwarna hitam kecoklatan yang berupa polimer tidak larut, sedangkan feomelanin adalah pigmen melanin kuning kemerah-merahan berupa polimer yang tidak larut

(Gillbro dan Olsson, 2011). Feomelanin terbentuk oleh konjugasi sistein atau glutation. Pigmen melanin yang dominan dan lebih efektif untuk proteksi pada kulit manusia adalah jenis eumelanin (Videira *et al.*, 2013).



Gambar 2.5 Proses melanogenesis (Sumber: Gillbro and Olsson, 2011)

Proses melanogenesis dapat dilihat pada Gambar 2.5 yang diawali oleh perubahan asam amino esensial L-fenilalanin oleh fenilalanin hidrosilase (PAH) menjadi L-tirosin, dengan adanya enzim tirosinase L-tirosin akan mengalami hidrosilasi menjadi L-DOPA. L-DOPA akan dioksidasi oleh enzim tirosinase menjadi dopakuinon. Eumelanin dibentuk melalui perubahan dopakuinon menjadi dopakrom yang selanjutnya diubah secara spontan menjadi 5,6-dihidroksiindol atau secara enzimatis diubah oleh *dopachrome tautomerase* (DCT) menjadi asam-5,6-dihidroksiindol-2-karboksilat. Dua senyawa ini akan membentuk suatu polimer indol dengan kuinon yang selanjutnya akan membentuk eumelanin. Pada pembentukan feomelanin sangat bergantung pada keberadaan asam amino sistein yang ditransport

secara aktif melalui membran melanosom. Sistein akan bereaksi dengan dopakuinon membentuk sisteinil-dopa yang akan diubah menjadi kuinolimina, alanin-hidroksil-dihydrobenzotanzina dan polimernya yang akan membentuk feomelanin (Gillbro dan Olsson, 2011).

Bahan pemutih dengan mekanisme penghambatan tirosinase bekerja dengan cara menghambat terjadinya perubahan tirosin menjadi L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) dan L-DOPA menjadi dopakuinon, yang kemudian dikonversi melalui beberapa tahap transformasi menjadi melanin, sehingga melanin tidak akan terbentuk (Chang, 2009).

## 2.7 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri

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

KLT digunakan jika analit tidak mudah menguap atau volatilitasnya rendah; analit sangat polar, polaritas medium, nonpolar; sampel dalam jumlah yang banyak yang harus dianalisis secara simultan, menghemat biaya dan waktu; setelah kromatografi, semua komponen dari sampel harus dapat dideteksi (tetap pada posisi awal atau migrasi ke depan); campuran komponen yang telah dipisahkan harus dideteksi secara individual (Deinstrop, 2007).

Pelaksanaan analisis KLT diawali dengan penotolan sejumlah sampel pada fase diam (lempeng KLT), kemudian sampel dikeringkan. Ujung fase diam yang terdapat titik penotolan dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal maupun campuran) di dalam *chamber*. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, campuran komponen-komponen bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama

pergerakan fase gerak melalui fase diam. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung atau di bawah sinar UV baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang cocok. Setelah deteksi noda pada lempeng KLT dapat dilakukan analisis kualitatif maupun kuantitatif (Wulandari, 2011).

Analisis kualitatif dapat dilakukan dengan cara membandingkan noda analit tersebut dengan noda zat standar yang dikenal dengan *retardation factor* (Rf) (Sherma dan Fried, 2003). Rf adalah parameter yang digunakan untuk menggambarkan migrasi senyawa dalam KLT (Wulandari, 2011). Analisis kuantitatif dapat dilakukan dengan menentukan langsung noda kromatogram dengan cara membandingkan area noda sampel dengan area noda standar pada lempeng KLT menggunakan alat densitometer (Sherma dan Fried, 2003). Densitometer dapat digunakan untuk analisis instrumental penentuan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT. Metode ini biasa disebut metode KLT Densitometri (Wulandari, 2011).

## 2.8 Pengujian Aktivitas Hambatan Tirosinase

Pengujian aktivitas hambatan tirosinase pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Daya hambat terhadap tirosinase ditentukan melalui jumlah dopakrom yang terbentuk. Dopakrom merupakan kompleks berwarna yang terbentuk melalui reaksi antara substrat dan enzim tirosinase. Kompleks berwarna yang terbentuk diukur secara kuantitatif menggunakan gelombang UV-Vis dengan membaca nilai absorbansi (Boyer, 1993). Pada penelitian ini instrumen yang digunakan adalah *microplate reader* dengan prinsip metode spektrofotometri UV-Vis.

Metode pengujian hambatan tirosinase lainnya adalah dengan menggunakan *melanoderm*. *Melanoderm* diinkubasi selama 2 atau 3 hari kemudian pada akhir inkubasi dibilas menggunakan dapar fosfat salin. Setelah diinkubasi, *melanoderm*

direndam dengan formalin 10% selama 10 menit dalam suhu ruang kemudian diinkubasi dalam larutan L-DOPA 0,1% selama satu jam. Setelah satu jam melanoderma diinkubasi dalam Larutan L-DOPA 0,1% yang baru selama 16 jam. Kemudian melanin diekstraksi dan konsentrasinya ditentukan pada panjang gelombang 490 nm menggunakan *microplate reader* (Majmudar *et al.*, 1998). Selain itu uji hambatan tirosinase bisa menggunakan sel melanoma manusia. Aktivitas hambatan tirosinase ditentukan dengan memanen sel yang telah diberi perlakuan agen penghambat selama 72 jam dengan tripsin 0,25% dan EDTA kemudian dicuci dua kali menggunakan dapar fosfat salin. Sel yang sudah dicuci diresuspensi menggunakan dapar fosfat pH 6,8 kemudian disonikasi dan disentrifugasi pada suhu 2°C. Sejumlah sel diletakkan dalam *wellplate* dicampur dengan larutan L-DOPA 5 mM dalam dapar fosfat pH 6,8 dan diukur absorbansinya menggunakan *ELISA scanner* pada panjang gelombang 490 nm setiap 5 menit selama 90 menit. Kemampuan aktivitas penghambat tirosinase dinyatakan sebagai persen absorbansi dibandingkan kontrol (Takahashi dan Parson, 1992).

Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pengukuran hambatan tirosinase, yaitu :

a. Panjang gelombang maksimum dopakrom

Panjang gelombang maksimum dopakrom perlu diperhatikan karena dopakrom merupakan hasil akhir dari reaksi tirosinase sehingga daya hambat tirosinase ditentukan dari absorbansi dopakrom yang terbentuk.

b. Waktu inkubasi

Waktu inkubasi menunjukkan waktu yang dibutuhkan reaksi untuk menghasilkan dopakrom secara maksimal ditandai dengan absorbansi yang stabil.

c. Suhu

Suhu yang sesuai untuk pengujian hambatan tirosinase adalah 25 – 30°C.

d. pH

Pengujian hambatan tirosinase harus dikondisikan pada pH 6,5 – 7 karena merupakan pH optimum untuk reaksi katalisis tirosinase.

e. Konsentrasi substrat

Konsentrasi substrat digunakan untuk melihat hubungan antara substrat dan tirosinase serta menentukan aktivitas dan kinetika tirosinase (Boyer, 1993).



## **BAB 3. METODE PENELITIAN**

### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik yang bertujuan mengidentifikasi perbedaan aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh ekstrak etil asetat dan etanol 70 % biji kedelai edamame (*Glycyne max*) dan kandungan isoflavon genisteinnya.

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

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember mulai bulan Februari 2015 sampai selesai.

### **3.3 Variabel Penelitian**

#### **3.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perbedaan pelarut ekstraksi biji kedelai edamame.

#### **3.3.2 Variabel Terikat**

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

#### **3.3.3 Variabel Terkendali**

Biji kedelai edamame, teknik ekstraksi, prosedur penetapan kadar genistein dan prosedur uji hambatan tirosinase.

### 3.4 Rancangan Penelitian

#### 3.4.1 Rancangan Operasional

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap sebagai berikut :

- a. Pembuatan simplisia biji kedelai edamame.
- b. Penghilangan kandungan lemak biji kedelai edamame (*defatting*).
- c. Ekstraksi biji kedelai edamame menggunakan dua jenis pelarut.
- d. Penetapan kadar isoflavon genistein ekstrak etil asetat dan etanol 70 % biji kedelai edamame menggunakan metode KLT Densitometri.
- e. Pengukuran hambatan enzim tirosinase ekstrak etil asetat dan etanol 70 % biji kedelai edamame secara *in-vitro*.

#### 3.4.2 Definisi Operasional

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

- a. Simplisia dibuat dengan cara mengeringkan biji kedelai edamame dan menggilingnya menjadi serbuk.
- b. *Defatting* dilakukan dengan cara menghilangkan kandungan lemak yang ada dalam biji kedelai edamame menggunakan pelarut *n*-heksana.
- c. Ekstraksi adalah proses pengambilan senyawa isoflavon dalam biji kedelai edamame menggunakan pelarut etil asetat dan etanol 70% dengan metode sonikasi.
- d. Penetapan kadar isoflavon genistein menggunakan metode KLT Densitometri dengan genistein sebagai standar.
- e. Pengukuran aktivitas penghambatan enzim tirosinase dilakukan menggunakan alat ELISA *reader*.

### 3.4.3 Prosedur Penelitian

Simplisia dibuat dengan merajang biji kedelai edamame dan dikeringkan dalam oven sampai biji kering. Selanjutnya biji kedelai edamame kering dikecilkan ukurannya dengan cara diserbuk. Serbuk di-*defatting* untuk menghilangkan kandungan lemaknya menggunakan *n*-heksana. Serbuk yang telah bebas lemak diekstraksi menggunakan etil asetat dan etanol 70% dengan metode sonikasi. Ekstrak yang diperoleh dari dua jenis pelarut tersebut ditetapkan kadar isoflavon genistein dan aktivitas penghambatan enzim tirosinase. Penetapan kadar isoflavon genistein dilakukan menggunakan metode KLT Densitometri dengan genistein sebagai standar. Pengukuran aktivitas penghambatan enzim tirosinase dilakukan dengan menginkubasi ekstrak bersama enzim tirosinase selama 5 menit kemudian ditambahkan substrat dan diinkubasi hingga 80 menit, perubahan warna yang terjadi diukur absorbansinya menggunakan alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 478 nm.

## 3.5 Alat dan Bahan Penelitian

### 3.5.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam adalah oven, pisau, timbangan analitik, *blender*, seperangkat alat soxhlet, kertas saring, *ultrasonicator* (Elmasonic), *beaker glass*, *rotavapour* (Strike 2000), ELISA *reader* (Dialab Elx800), *multi well plate*, densitometer (CAMAG TLC 3), lempeng silika KLT, pipa kapiler, *TLC chamber*, vial, sendok ekstrak, gelas ekstrak, pipet volum, labu ukur, mikropipet, mikro tip warna kuning, biru, dan putih, kapas, dan aluminium foil.

### 3.5.2 Bahan

Biji kedelai edamame yang dibeli dari “PT. Mitra Tani Dua Tujuh” kecamatan Mangli kabupaten Jember, *n*-heksana (Smart Lab Indonesia), etil asetat (Smart Lab Indonesia), etanol 70% (Smart Lab Indonesia), dapar fosfat pH 6,5, enzim tirosinase (Sigma-aldrich), L-tirosin (Sigma-aldrich), standar genistein

(Tocris), toluen (Smart Lab Indonesia), aseton (Smart Lab Indonesia), asama asetat (Smart Lab Indonesia), asam format (Smart Lab Indonesia), etanol p.a (Smart Lab Indonesia), metanol p.a (Smart Lab Indonesia), akuades.

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Preparasi Bahan

Biji kedelai edamame yang sudah dikupas ditimbang kemudian diiris tipis-tipis dan diangin-anginkan untuk selanjutnya dioven pada suhu 50° C sampai kering. Biji kedelai edamame yang kering ditimbang dan diblender lalu diayak. Biji kedelai edamame yang sudah halus ditimbang untuk proses selanjutnya.

#### 3.6.2 Penghilangan Lemak (*Defatting*)

Serbuk kedelai edamame di-*defatting* menggunakan metode soxhlet dengan pelarut *n*-heksana selama 3 jam. Serbuk biji kedelai edamame ditimbang sebanyak 40 gram kemudian dibungkus menggunakan kertas saring untuk selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung serangkaian soxhlet dan ditambahkan pelarut *n*-heksana sebanyak 200 ml. Proses *defatting* dilakukan selama 3 jam kemudian diangin-anginkan untuk menguapkan *n*-heksana (Hui *et al.*, 2005)

#### 3.6.3 Ekstraksi Biji Kedelai Edamame

Serbuk biji kedelai edamame yang bebas lemak diekstraksi menggunakan metode ultrasonik dengan dua pelarut yang berbeda yaitu etil asetat dan etanol 70%. Serbuk biji kedelai edamame ditimbang sebanyak 60 gram sebanyak dua kali, masing-masing dimasukkan ke dalam *beaker glass* 500 mL, dan ditambahkan masing-masing pelarut sebanyak 360 ml. Proses ekstraksi dilakukan selama 1 jam menggunakan metode sonikasi. Ekstrak cair disaring untuk memisahkan filtrat dan serbuknya. Filtrat atau ekstrak cair etanol 70 % dipekatkan pada suhu 45°C.

### 3.6.4 Penetapan Kadar Genistein

Kandungan genistein dalam masing-masing ekstrak ditentukan menggunakan metode KLT-densitometri (Dewi, 2015).

#### a. Pembuatan Sampel Uji

Ekstrak yang sudah pekat ditimbang 100 mg dilarutkan dalam etanol p.a. sampai 5 ml sehingga diperoleh konsentrasi 20.000  $\mu\text{g/ml}$ .

#### b. Pembuatan Standar Uji

Larutan induk standar genistein dibuat dengan menimbang 5 mg standar genistein kemudian dilarutkan dalam metanol p.a sampai didapat konsentrasi 500  $\mu\text{g/ml}$ . Larutan induk yang sudah jadi diencerkan hingga didapat konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, dan 70  $\mu\text{g/ml}$ .

#### c. Analisis Genistein dengan Metode KLT-densitometri

Analisis genistein metode KLT-densitometer dilakukan menggunakan fase diam berupa lempeng KLT silika gel GF<sub>254</sub> dan fase geraknya adalah toluen: etil asetat: aseton: asam format (20:4:2:1) (Dewi, 2015). Volume sampel dan standar yang ditotolkan masing-masing sebanyak 2  $\mu\text{l}$ . Noda yang terbentuk hasil eluasi, diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm untuk kemudian *discanning* dengan TLC *scanner* pada panjang gelombang maksimum 266 nm.

### 3.6.5 Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase

Uji aktivitas hambatan tirosinase yang dilakukan merujuk pada metode yang dilakukan oleh Batubara *et al.*, 2010 dengan sedikit modifikasi.

#### a. Preparasi Sampel Uji

Ekstrak yang sudah pekat ditimbang dan dilarutkan dalam metanol sampai diperoleh larutan induk konsentrasi 4000  $\mu\text{g/ml}$ . Larutan induk diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 40-120  $\mu\text{g/ml}$ .

b. Pembuatan Standar Uji Genistein

Larutan standar uji genistein digunakan sebagai kontrol positif dibuat dengan cara menimbang 5 mg genistein kemudian dilarutkan dalam 10 ml metanol p.a sehingga diperoleh larutan induk 500 µg/ml. Larutan induk diencerkan dengan dapar fosfat 50 mM pH 6,5 hingga diperoleh konsentrasi 40-145 µg/ml.

c. Pembuatan Larutan 1 mM L-Tirosin

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

d. Penyiapan Enzim Tirosinase

*Mushroom tyrosinase* 50 KU dilarutkan dengan larutan dapar fosfat pH 6,5 sampai diperoleh konsentrasi 250 unit.

e. Pengujian Aktivitas Hambatan Tirosinase

Sebanyak 70 µl dari masing-masing konsentrasi ekstrak ditambahkan dengan 40 µl enzim tirosinase (Sigma 250 unit/ml dalam buffer fosfat), selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 110 µl substrat (1 mM L-tirosin) ke dalam tiap lubang *multi-well plate*, campuran diinkubasi selama 80 menit pada suhu kamar. Campuran diukur menggunakan *multi-well plate reader* pada panjang gelombang 478 nm untuk menentukan persen penghambatan dan konsentrasi hambat 50% (IC<sub>50</sub>). Nilai IC<sub>50</sub> diperoleh dari persamaan kurva regresi linier antara % penghambatan (sumbu *y*) dan konsentrasi ekstrak (sumbu *x*). Persen penghambatan dihitung dengan cara membandingkan serapan sampel tanpa penambahan ekstrak dan sampel dengan penambahan ekstrak.

Perhitungan kadar hambat enzim tirosinase dilakukan menggunakan rumus berikut :

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

A = laju dari perubahan nilai absorbansi (ΔA/min) tanpa sampel

B = laju dari perubahan nilai absorbansi (ΔA/min) dengan sampel (Batubara *et al.*, 2010 ; Chang *et al.*, 2005)

### 3.6.6 Analisis Data

Data yang dihasilkan dari masing-masing sampel kemudian diuji menggunakan program SPSS. Data pertama adalah hasil penetapan kadar genistein dalam ekstrak etil asetat edamame dan ekstrak etanol 70% edamame. Data kedua adalah data hasil uji aktivitas hambatan tirosinase ekstrak etil asetat edamame dan ekstrak etanol 70% edamame. Masing-masing data diolah menggunakan uji t tidak berpasangan apabila data memiliki sebaran normal. Jika sebaran data tidak normal maka dilakukan transformasi data sehingga diperoleh hasil transformasi dengan sebaran yang normal, namun bila hasil transformasi memiliki sebaran data yang tidak normal, maka dipilih uji *Mann-Whitney* (Dahlan, 2006).

## 3.7 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini melihat pengaruh perbedaan pelarut ekstraksi terhadap kadar isoflavon genistein dan aktivitas hambatan tirosinase biji edamame (*Glycine max*). Tahapan pertama yang dilakukan adalah ekstraksi biji edamame menggunakan pelarut yang berbeda yaitu pelarut polar etanol 70 % dan pelarut semi polar etil asetat. Tahapan kedua adalah penetapan kadar isoflavon genistein dalam masing-masing ekstrak menggunakan KLT-densitometri. Tahapan ketiga adalah penentuan aktivitas hambatan tirosinase menggunakan alat *ELISA-reader*. Tahapan terakhir adalah mengolah data yang dihasilkan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan bermakna kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase masing-masing ekstrak edamame melalui uji t menggunakan *software SPSS statistic 16.0*.

### 4.1 Ekstraksi Biji Edamame

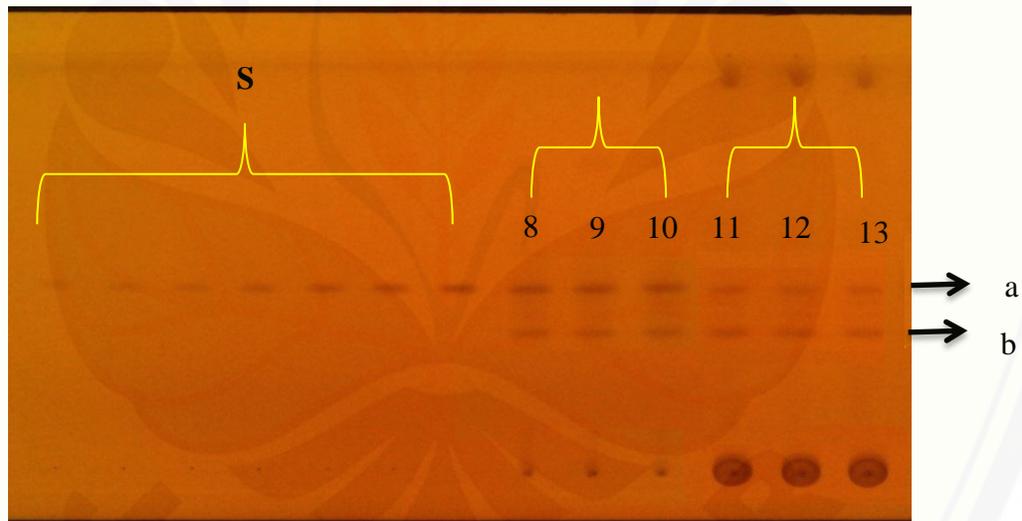
Ekstraksi dilakukan menggunakan metode sonikasi, kandungan lemak dalam serbuk edamame dihilangkan (*defatting*) menggunakan pelarut n-heksana sebelum ekstraksi (Hui *et al.*, 2005). Penghilangan lemak bertujuan untuk mengoptimalkan proses ekstraksi sehingga jumlah isoflavon yang didapatkan maksimal. Ekstrak cair yang dihasilkan kemudian dipekatkan dan diperoleh rendemen yang dapat dilihat pada tabel 4.1 dan perhitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada lampiran A. Perbedaan rendemen yang dihasilkan dari pelarut yang berbeda diduga karena jumlah dan jenis kandungan senyawa yang terekstraksi oleh masing-masing pelarut berbeda. Warna ekstrak etanol 70% lebih pekat (coklat tua) dibandingkan dengan ekstrak etil asetat karena menurut Luthria *et al.*, (2007) dalam pelarut etanol 70% mengandung lebih banyak komponen gula (isoflavon glikosida) sehingga saat penguapan ekstrak cair terdapat panas yang menyebabkan warna ekstrak lebih pekat.

Tabel 4.1. Hasil rendemen ekstrak edamame

No.	Pelarut	Rendemen Ekstrak (%b/b)	Warna Ekstrak
1.	Etil asetat	6,975	Hijau kecoklatan
2.	Etanol 70 %	8,683	Coklat tua

#### 4.2 Hasil Penetapan Kadar Genistein

Penetapan kadar genistein dalam ekstrak edamame dilakukan menggunakan KLT-densitometri. Standar untuk membuat kurva baku yang digunakan ada 6 konsentrasi yaitu 11,468  $\mu\text{g/ml}$ , 20,852  $\mu\text{g/ml}$ , 31,278  $\mu\text{g/ml}$ , 41,704  $\mu\text{g/ml}$ , 52,13  $\mu\text{g/ml}$ , dan 72,982  $\mu\text{g/ml}$ . Perhitungan preparasi standar dapat dilihat pada lampiran B. Nilai area yang didapatkan diplotkan dengan massa genistein yang ditotolkan sehingga diperoleh persamaan regresi.



Gambar 4.1 Hasil eluasi lempeng KLT di bawah sinar UV 254 nm untuk noda standar (s) dan noda sampel yang diekstraksi menggunakan etil asetat (8,9,10) dan etanol 70% (11,12,13).

Gambar 4.1 merupakan gambar lempeng KLT di bawah sinar UV 254 nm. Deteksi lempeng KLT di bawah sinar UV bertujuan untuk melihat noda yang dapat

meredam sinar UV. Noda genistein yang tampak pada sampel ekstrak etil asetat dan etanol 70 % edamame memiliki Rf yang hampir sama dengan noda standar genistein ditunjukkan oleh huruf “a” pada Gambar 4.1 yaitu sebesar 0,42. Hal ini dapat menjadi salah satu parameter bahwa sampel ekstrak etanol 70 % dan etil asetat edamame mengandung genistein. Sedangkan noda “b” pada sampel kemungkinan merupakan noda daidzein seperti yang disebutkan dalam penelitian Yuan *et al.*, (2006).

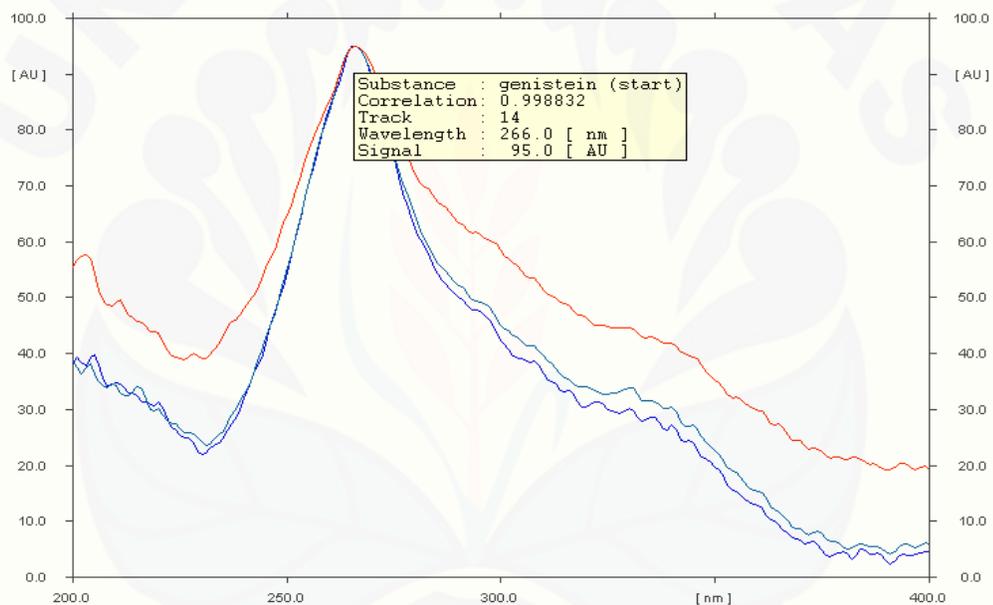
Selain dilihat dari parameter Rf, perlu dilakukan uji identitas untuk mengetahui ada tidaknya genistein dalam ekstrak dan uji kemurnian untuk mengetahui kemurnian genistein yang ada pada sampel maupun standar. Spektra hasil uji identitas dan kemurnian dapat dilihat pada Gambar 4.2. Kemurnian genistein dalam sampel dilihat berdasarkan nilai  $r(s,m)$  dan  $r(m,e)$ . Nilai  $r(s,m)$  menunjukkan korelasi antara spektra pada posisi awal/*start* (s) puncak dengan spektra pada puncak/*maximum* (m) *peak*. Sedangkan nilai  $r(m,e)$  menunjukkan korelasi antara spektra yang diambil dari posisi puncak/*maximum* (m) *peak* dengan spektra pada posisi akhir/*end* (e) puncak. Suatu analit dikatakan murni bila nilai  $r(s,m)$  dan nilai  $r(m,e)$  lebih dari 0,99 (Indrayanto dan Tuwono, 2003). Uji identitas ditentukan dengan cara melihat nilai  $r(s,s)$  dan nilai  $r(s,a)$ . Nilai  $r(s,s)$  menunjukkan korelasi antar spektra standar sedangkan nilai  $r(s,a)$  menunjukkan korelasi spektra standar dengan sampel. Hasil uji dikatakan identik dengan standar bila nilai korelasinya lebih dari 0,99 (Indrayanto dan Tuwono, 2003).

Data korelasi uji kemurnian dan uji identitas dapat dilihat pada Tabel 4.2. Tabel 4.2 menunjukkan bahwa nilai korelasi spektra genistein pada sampel lebih dari 0,99. Ini menunjukkan bahwa analit dalam standar dan sampel adalah murni serta analit dalam sampel identik dengan standar genistein.

Persamaan kurva baku yang diperoleh digunakan untuk menghitung kadar genistein dalam sampel. Berdasarkan kurva baku yang dibuat diperoleh persamaan sebagai berikut  $Y = 416,7 + 23x$  dengan nilai  $r = 0,999$ . Hasil penetapan kadar genistein dalam ekstrak dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan perhitungannya dapat dilihat pada lampiran C. Terdapat perbedaan kandungan genistein antara ekstrak etil

asetat dengan ekstrak etanol 70 % edamame. Ekstrak etil asetat edamame memiliki kandungan genistein sebesar  $0,0811 \pm 0,0022$  % b/b sedangkan ekstrak etanol 70% memiliki kandungan genistein sebesar  $0,0351 \pm 0,0012$  % b/b.

Genistein merupakan senyawa semi polar dengan nilai log P 2,94 (Chadha, 2009). Kandungan genistein dalam ekstrak etil asetat lebih besar dibandingkan dalam ekstrak etanol 70 % karena genistein merupakan isoflavon aglikon yang semi polar sehingga lebih mudah tertarik pada pelarut etil asetat yang bersifat semi polar dibandingkan etanol 70% yang lebih polar (Kusumaningsih *et al.*,2006).



Gambar 4.2 kromatogram uji identitas dan kemurnian genistein dalam standar dan sampel

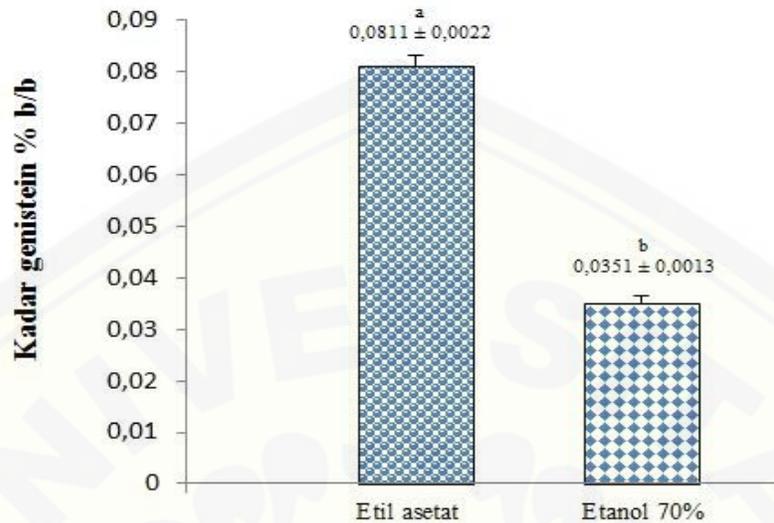
Keterangan : ■ Spektra standar genistein  
■ Spektra ekstrak etanol 70 % edamame  
■ Spektra ekstrak etil asetat edamame

Tabel 4.2. Data korelasi kromatogram uji kemurnian dan identitas

sampel	r(s,m)	r(m,e)	kemurnian	r(s,s)	r(s,a)	identitas
Standar genistein	0,999973	0,999837	Murni	0,999982		N/A
Ekstrak etanol 70 %	0,999997	0,999980	Murni	0,999994	0,999918	identik
Ekstrak etil asetat	0,999995	0,999985	murni	0,999994	0,990209	Identik

Kadar genistein yang diperoleh dari masing-masing ekstrak dianalisis menggunakan uji t tidak berpasangan. Sebelum dilakukan uji t tidak berpasangan, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah sebaran data yang dimiliki normal atau tidak. Uji normalitas *Shapiro-Wilk* yang dilakukan memberikan nilai signifikansi atau nilai  $p = 0,754$  untuk ekstrak etil asetat dan  $0,163$  untuk ekstrak etanol 70 %. Hasil uji normalitas menunjukkan sebaran data yang diperoleh adalah normal karena nilai  $p$  lebih besar dari  $0,05$ .

Dua kelompok data tersebut kemudian dibandingkan menggunakan uji t tidak berpasangan. Uji t tidak berpasangan memberikan nilai  $p = 0,00$ , karena nilai  $p$  kurang dari  $0,05$  maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna kadar genistein pada ekstrak edamame yang diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dan etanol 70 %. Data hasil uji normalitas dan uji t tidak berpasangan dapat dilihat pada lampiran D .



Gambar 4.3. Grafik kadar genistein ekstrak etil asetat dan etanol 70%. Data yang disajikan berupa nilai rata-rata kadar genistein  $\pm$  SD (% b/b) (n=3). Notasi huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar sampel ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3. Hasil Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase

Enzim tirosinase merupakan enzim yang paling berperan dalam proses sintesis melanin di melanosit (Gillbro dan Olsson, 2011). Hambatan terhadap aktivitas enzim ini dapat menyebabkan terhambatnya proses pembentukan melanin, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai salah satu mekanisme bahan pemutih kulit (Chang, 2009). Metode spektrofotometri merupakan salah satu metode yang bisa digunakan untuk melakukan uji aktivitas hambatan tirosinase (Boyer, 1993).

Proses pengujian hambatan tirosinase telah disesuaikan dengan kondisi yang direkomendasikan agar hasilnya optimal. Suhu inkubasi yang digunakan adalah suhu ruang yaitu  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ . Suhu yang dianjurkan dalam pustaka adalah  $25 - 30^\circ\text{C}$ . Larutan dapar fosfat yang digunakan adalah pH 6,5 dan selalu diamati ketika akan digunakan. Nilai pH yang disarankan untuk pengujian aktivitas hambatan tirosinase adalah 6,5-7,0 sehingga reaksi katalisis tirosinase pada penelitian ini sudah berjalan sesuai dengan kondisi suhu dan pH yang disarankan Boyer (1993). Perhitungan dapar dan

substrat yang digunakan dapat dilihat pada lampiran E. Waktu inkubasi dilakukan selama 80 menit sesuai dengan hasil optimasi yang dilakukan oleh Dewi (2015). Hasil penelitian uji hambatan tirosinase dinyatakan dalam bentuk  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% tirosinase.

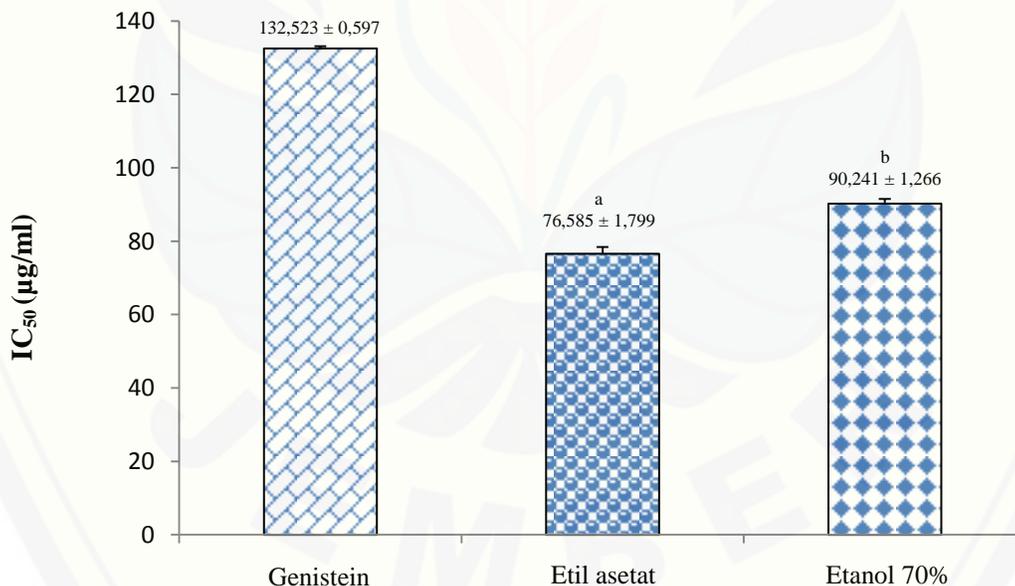
Penelitian ini menggunakan standar genistein sebagai pembanding antara aktivitas hambatan tirosinase ekstrak edamame dengan standar genistein. Uji aktivitas hambatan tirosinase oleh genistein dilakukan dengan preparasi standar genistein hingga diperoleh konsentrasi 41,544  $\mu\text{g/ml}$ , 62,316  $\mu\text{g/ml}$ , 83,088  $\mu\text{g/ml}$ , 124,632  $\mu\text{g/ml}$ , dan 145,404  $\mu\text{g/ml}$ . Penimbangan dan perhitungan standar genistein untuk uji hambatan tirosinase dapat dilihat pada lampiran F. Nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai % hambatan. Nilai % hambatan yang diperoleh dibuat kurva dengan sumbu x adalah konsentrasi standar genistein ( $\mu\text{g/ml}$ ) dan sumbu y adalah % hambatan, sehingga akan diperoleh persamaan regresi yang digunakan untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  standar genistein. Nilai  $IC_{50}$  standar genistein berdasarkan hasil perhitungan adalah 132,523  $\mu\text{g/ml}$ . Perhitungan % hambatan standar genistein dapat dilihat pada lampiran G.

Sampel ekstrak yang akan dianalisis hambatan tirosinasenya, dilakukan preparasi terlebih dahulu sehingga diperoleh beberapa seri konsentrasi yang dapat dilihat pada lampiran H. Preparasi untuk uji hambatan tirosinase seluruhnya menggunakan dapar fosfat pH 6,5 dan konsentrasi sampel ekstrak divariasikan dari 40 – 120  $\mu\text{g/ml}$ . Sampel yang akan dianalisis ditimbang 3 kali (replikasi 3 kali) untuk masing-masing ekstrak. Perhitungan % hambatan ekstrak dapat dilihat pada lampiran I. Data hasil pengujian aktivitas hambatan tirosinase dapat dilihat pada Gambar 4.4. Gambar 4.4 menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% dan ekstrak etil asetat edamame memiliki aktivitas hambatan tirosinase.

Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai aktivitas hambatan tirosinase ( $IC_{50}$ ) pada masing-masing ekstrak berbeda. Ekstrak etanol 70 % memiliki  $IC_{50}$  sebesar  $90,241 \pm 1,266 \mu\text{g/ml}$  sedangkan ekstrak etil asetat memiliki  $IC_{50}$  sebesar  $76,585 \pm 1,799 \mu\text{g/ml}$ . Nilai aktivitas hambatan tirosinase yang diperoleh kemudian

dianalisis menggunakan uji t. Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* memberikan nilai signifikansi atau nilai p lebih dari 0,05, hasil ini menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji t tidak berpasangan dan diperoleh nilai signifikansi kurang dari 0,05, sehingga dapat disimpulkan bahwa  $IC_{50}$  aktivitas hambatan tirosinase antara ekstrak etil asetat dan etanol 70 % edamame memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil analisis statistik uji aktivitas hambatan tirosinase dapat dilihat pada lampiran J.

Dilihat dari kadar genistein dari masing-masing pelarut, peningkatan kadar genistein berbanding lurus dengan peningkatan aktivitas hambatan tirosinase. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kadar genistein berpengaruh terhadap aktivitas hambatan tirosinase. Semakin tinggi kadar genistein maka semakin tinggi aktivitas hambatannya yang ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  semakin rendah.



Gambar 4.4. Grafik nilai  $IC_{50}$  aktivitas hambatan tirosinase dari masing-masing ekstrak. Data disajikan dalam bentuk rata-rata  $IC_{50} \pm SD$  (µg/ml). Notasi huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar sampel ( $p < 0,05$ ).

Aktivitas hambatan yang diperoleh dalam penelitian ini dibandingkan dengan standar genistein untuk melihat efektifitas ekstrak edamame dalam menghambat aktivitas tirosinase. Berdasarkan hasil penelitian, nilai  $IC_{50}$  ekstrak etil asetat dan etanol 70% lebih kecil dari  $IC_{50}$  standar genistein atau ekstrak etil asetat dan etanol 70% edamame memberikan hambatan tirosinase yang lebih besar dibandingkan standar genistein. Hal ini menunjukkan bahwa tidak hanya genistein yang memberikan hambatan tirosinase, tetapi isoflavon lain yang ada dalam ekstrak juga memberikan hambatan tirosinase. Penelitian Chang *et al.*, (2005) menunjukkan bahwa isoflavon aglikon genistein, daidzein, dan glisitein memiliki aktivitas hambatan tirosinase. Selain itu isoflavon glikosida seperti daidzin dan genistin juga memberikan aktivitas hambatan tirosinase meskipun hambatannya lebih kecil dibandingkan dengan isoflavon aglikon (Chang *et al.*, 2007).

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa :

1. Kadar genistein dalam ekstrak etil asetat edamame adalah  $0,081 \pm 0,00235$  % b/b sedangkan dalam ekstrak etanol 70% edamame adalah  $0,035 \pm 0,00129$  % b/b. Terdapat perbedaan bermakna kadar genistein antar kedua jenis ekstrak.
2. Nilai  $IC_{50}$  hambatan tirosinase ekstrak etil asetat edamame adalah  $76,585 \pm 1,799$   $\mu\text{g/ml}$  sedangkan ekstrak etanol 70% edamame adalah  $90,241 \pm 1,266$   $\mu\text{g/ml}$ . Terdapat perbedaan bermakna aktivitas hambatan tirosinase antar kedua jenis ekstrak.

### 5.2 Saran

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

1. Perlu dilakukan standarisasi ekstrak kemudian dilakukan pengembangan formulasi sediaan pemutih kulit dengan bahan ekstrak edamame.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Andersen, M., dan Markham, K. R. 2006. *Flavonoids*. New York : Taylor & Francis Group.
- Batubara I., Darusma L.K., Mitsunaga T., Rahminiwati M., dan Djauhari E. 2010. Indonesian Medical Plants as Tyrosinase Inhibitor and Antioxidant Agent. *Journal of Biological Sciences*. 10(2): 138–144.
- Boyer, R.F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*, 2nd edition. California: The Benjamin/ Cumming Publishing Co.
- Chadha, G.S. 2009. Transdermal Delivery of Genistein as A Chemoprotective Drug for Menaloma. Thesis. Auburn University.
- Chang, T.S., Ding, H.Y., Tai, S.S.K., dan Wu, C.Y. 2007. Mushroom tyrosinase inhibitor effects of isoflavone isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. *Food Chemistry*. 105 (2007): 1430–1438.
- Chang, T. S. 2009. An update review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 10: 2440-2475.
- Chang, T. S. 2012. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-regulation of Tyrosinase Activity. *Materials*. 5: 1661–1685.
- Chang, T. S., Ding, H. Y., dan Lin, H. C. 2005. Identifying 6,7,4'-trihydroxyisoflavone as A Potent Tyrosinase Inhibitor. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 69 (10): 1999-2001.
- Dahlan, M. S. 2004. *Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Arkans
- Deinstrop, E.H. 2007. *Applied Thin-Layer Chromatography : Best Practice and Avoidance of Mistakes Second, Revised and Enlarged Edition*. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Dewi, E. N. A. 2015. Pengaruh perbedaan metode ekstraksi terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase edamame (*Glycine max*) *in vitro*. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Dhaubhadel, S. 2011. *Regulation of Isoflavonoid Biosynthesis in Soybean seeds in* Ng, T.-B. (ed.) - Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology, InTech, Open Access Publisher, Chapter 15: 243-258.

- Dixon, R.A. dan Ferreira, D. 2002. Molecules of Interest Genistein. *Phytochemistry*. 60: 205-211.
- Donghyun K., Jiyeoun P., Jinhee, Cheolkyu H., Jeonghyeok Y., Namdoo K., Jinho S., dan Choongwan L. 2006. Flavonoids as Mushroom Tyrosinase Inhibitors: a Fluorescence Quenching Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (3): 935-941.
- Gao J. dan Zhu W. 2007. The Use of Botanical Extracts as Topical Skin-Lightening Agents for the Improvement of Skin Pigmentation Disorders. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceeding*. 13: 20-24
- Gillbro, J. M. dan Olsson, M. J. 2011. The Melanogenesis and Mechanisms of Skin-lightening Agents - Existing and New Approaches: Melanogenesis and Skin-lightening Agents. *International Journal of Cosmetic Science*. 33 (3): 210-221.
- Hakim, N.A. 2013. Perbedaan Kualitas dan Pertumbuhan Benih Edamame Varietas Ryoko yang Diproduksi di Ketinggian Tempat yang Berbeda di Lampung. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. 13 (1): 8-12.
- Hanamura, T., Uchida, E., dan Aoki, H. 2008. Skin-Lightening Effect of a Polyphenol Extract from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Fruit on UV-Induced Pigmentation. *Biochem*. 72(12): 3211-3218.
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Cetakan II. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB-Press.
- Hindritiani, R., Sutedja, E., Dhianawaty, D., Sujatno, M., dan Setiawan. 2013. Penurunan Aktivitas Tirosinase dan Jumlah Melanin oleh Fraksi Etil Asetat Buah Malaka (*Phyllatus embica*) pada *Mouse Melanoma B16 Cell-Line*. *Majalah Kedokteran Berkala*. 45(2):118-124.
- Hui, M., Tiansheng dan Zhao H. 2005. Methods For Extracting, Separating, Identifying and Quantifying Daidzein and Genistein. *Chinese Journal of Applied and Enviromental Biology*. 03:55-61.
- Indrayanto, G. dan Yuwono, M. 2003. *Validation of TLC Analysis in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya:Airlangga University Indonesia
- Irmanida, B., dan Adfa, M. 2013. Potensi daun Kayu Bawang (*Protium javanicum*) Sebagai Penghambat Kerja Enzim Tirosinase. *Sains & Matematika*. 1 (2): 52-56.

- Konovsky, J., Thomas, A. L., dan Dean M. 1994. *Edamame : Vegetable Soybean. Perspective on New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA. 385-388.
- Kubo, I. dan Hori, I.K. 1999. Flavonols from Saffron Flower : Tyrosinase Inhibitor Activity and Inhibition Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (10) : 4121-4125.
- Kuchel, P., dan Ralston, G.B. 2006. *Schaum's Easy Outlines Biokimia*. penerjemah; Safitri A, editor. Jakarta: Erlangga
- Kurnianingsih, T., Widiastuti A., Ariani, S.R.D. 2006. Profil Kandungan Daidzein dan Genistein pada Tempe Gembus Selama Proses Fermentasi. *Journal of Alchemy*. 5(1) : 45-53.
- List, P.H., dan Schmidt, P.C. 1989. *Phytopharmaceutical Technology*. Germany: CRC Press
- Luthria, D. L., Biswas, R., dan Natarajan, S. 2007. Comparison of Extraction Solvents and Techniques Used for The Assay of Isolavones from Soybean. *Food Chemistry*. 105(2007): 325-333.
- Majmudar, G., Jacob, G., Laboy, Y., dan Fisher, L. 1998. An In Vitro Method for Screening Skin-Whitening Products. *Journal of Cosmetic Science*. 49: (361-367)
- Mebrahtu, T., Mohamed, A., Wang, C. Y., dan Andebrhan, T. 2004. Analysis of Isoflavone Contents in Vegetable Soybeans. *Plant Foods for Human Nutrition*. 59: 55-61
- Miles, C.A., Lumpkin, T.A., dan Zenz, L. 2000. *Edamame*. Washington State University: A Pasific Northwest Extension Publication
- O'Neil, M. J. 2001. *The merck index; An encyclopedia of chemicals, drugs, and biological*. (Edisi Ketiga belas) . Whitehouse Station; Merck.
- Onozawa M., Fukuda K., Ohtani M., Akaza H., Sugimura T., dan Wakabayashi K. 1998. Effects of Soybean Isoflavones on Cell Growth and Apoptosis of The Human Prostatic Cancer Cell Line LNCaP. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 28 (6): 360-363.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S., dan Bae, H. 2007. Naturally Occuring Tyrosinase Inhibitors : Mechanism and Application in Skin Health, Cosmetic and Agriculture Industries. *Phytoterapy Research*. 21: 805-816.

- Pilsakova, L., Riecanaky, I., dan Jagla, F. 2010. The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. *Physiology Research*. 59: 651–664.
- Preedy, V.R. 2013. *Isoflavones Chemistry, Analysis, Function and Effect*. London : RSC Publishing.
- Rostagno, M. A., Palma, M., dan Barroso, C. G. 2004. Pressurized liquid Extraction of Isoflavones from Soybeans. *Analytica Chimica Acta*. 52: 169 – 177.
- Samsu, H. S. 2001. *Membangun Agroindustri Bernuansa Ekspor : Edamame (Vegetable soybean)*. Jember: Graha Ilmu dan Florentina
- Sani, R.S., Nisa, F.C., Andriani, R.D., dan Maligan, J.Y. 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2 (2): 121-126.
- Sciarappa, W. J., Hunsberger, L. K., Shen, D., Wu, Q.-L., Simon, J. dan Hulme, B. 2007. *Evaluation of Edamame Cultivars in New Jersey and Maryland*. p.223–227.
- Sherma, J. dan Fried, B. 2003. *Handbook of Thin Layer Chromatography 3rd Edition, Revised and Expanded*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Takahashi, H. dan Parsons, P.G. 1992. Rapid and Reversible Inhibition of Tyrosinase Activity by Glucosidase Inhibitors in Human Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 98: 481-487.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., dan Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and Extraction. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1 (1): 98-106.
- Tsukamoto, C., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokobun, M., Kazuyoshi, O. dan Kitamura, K. 1995. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds: Changes in Isoflavones, Saponins, and Composition of Fatty Acids at Different Temperatures during Seed Development. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 43 (5): 1184–1192.
- USDA. 2010. URL: [www.plants.usda.gov](http://www.plants.usda.gov).
- Uyama, H. dan Kim, Y.J. 2005. Tyrosinase Inhibitors from Natural and Synthetic Sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62 (15): 1707-1723.
- Videira, I. F. dos S., Magina, S. dan Moura, D. F. L. 2013. Mechanisms Regulating Melanogenesis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88 (1) : 76-83.

Widati, F. dan Iteu M.H. 2012. Kedelai Sayur (*Glycine max* L. Merrill) sebagai Tanaman Pekarangan. *Iptek hortikultura*.08 : 25-28.

Warrington, J.C., dan Saville, B.A. 1999. Tyrosinase Inactivation in Organic Solvent. *Biotechnology and Bioengineering*. 65 (3): 325–333.

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. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 55 (11) : 5286-5288.

Wulandari L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember : PT. Taman Kampus Presindo.

Yuan, D., Chena, Y., Baia, X., Pana, Y. dan Kanob, Y. (2006). TLC and HPLC Analysis of Soy Isoflavones in Semen Sojae Praeparatum. *Asian Journal of Traditional Medicine*. 1: 3–4.

**LAMPIRAN**

**LAMPIRAN A : Rendemen Ekstrak yang Diperoleh**

- a. Ekstrak etil asetat edamame

Bobot serbuk kering = 50,28 gram

Ekstrak kental = 3,507 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu

$$\frac{3,507 \text{ gram}}{50,363 \text{ gram}} \times 100 \% = 6,975 \%$$

- b. Ekstrak etanol 70% edamame

Bobot serbuk kering = 50,363 gram

Ekstrak kental = 4,373 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu

$$\frac{4,373 \text{ gram}}{50,363 \text{ gram}} \times 100 \% = 8,683 \%$$

**LAMPIRAN B : Perhitungan Preparasi Standar Genistein untuk KLT-Densitometri**

Massa genistein = 5,213 mg

Volume = 10 ml

$$\text{Konsentrasi genistein} = \frac{\text{massa (mg)}}{\text{volume (L)}} = \frac{5,213 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ ml/L} = 512,3 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran larutan standar induk

- a.  $\frac{20 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 512,3 \text{ } \mu\text{g/ml} = 11,468 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- b.  $\frac{40 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 512,3 \text{ } \mu\text{g/ml} = 20,852 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- c.  $\frac{60 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 512,3 \text{ } \mu\text{g/ml} = 31,278 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- d.  $\frac{80 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 512,3 \text{ } \mu\text{g/ml} = 41,704 \text{ } \mu\text{g/ml}$

- e.  $\frac{100\mu\text{l}}{1000\mu\text{l}} \times 521,3 \mu\text{g/ml} = 52,13 \mu\text{g/ml}$
- f.  $\frac{140\mu\text{l}}{1000\mu\text{l}} \times 521,3 \mu\text{g/ml} = 72,982 \mu\text{g/ml}$

### LAMPIRAN C : Hasil Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak

a. Pembuatan larutan sampel ekstrak etil asetat

i. Replikasi 1

$$\frac{100,5 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 20100 \mu\text{g/ml}$$

ii. Replikasi 2

$$\frac{102,4 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 20480 \mu\text{g/ml}$$

iii. Replikasi 3

$$\frac{100,3 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 20060 \mu\text{g/ml}$$

b. Pembuatan larutan sampel ekstrak etanol 70%

i. Replikasi 1

$$\frac{109,1 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 21820 \mu\text{g/ml}$$

ii. Replikasi 2

$$\frac{100,3 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 20060 \mu\text{g/ml}$$

iii. Replikasi 3

$$\frac{104,3 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 20860 \mu\text{g/ml}$$

c. Pembuatan fase gerak

- i. Fase gerak = toluen : etil asetat : aseton : asam format (20 : 4 : 2 : 1) (Yuan *et al.*, 2006) dibuat sebanyak 20 ml

- ii. Perhitungan masing-masing komposisi fase gerak

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

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

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

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

## d. Penetapan kadar

## i. Standar genistein

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Rf	Massa (ng)	Area
Standar 10,426	0,44	20,85	980,20
Standar 20,852	0,43	41,70	1339,89
Standar 31,278	0,43	62,56	1840,24
Standar 41,704	0,43	83,41	2355,79
Standar 52,13	0,42	104,26	2796,66
Standar 71,722	0,42	143,44	3785,34

$$\text{Persamaan regresi : } Y = 416,7 + 23X$$

$$r = 0,999$$

## ii. Sampel ekstrak etil asetat

Sampel	Replikasi	Rf	Area
Ekstrak etil asetat	1	0,42	3491,38
	2	0,42	3485,75
	3	0,42	3320,29

## iii. Sampel ekstrak etanol 70 %

Sampel	Replikasi	Rf	Area
Ekstrak etanol 70 %	1	0,42	1499,07
	2	0,42	1347,11
	3	0,42	1445,11

## e. Perhitungan kadar

## i. Sampel ekstrak etil asetat

Replikasi 1

$$Y = 416,7 + 23X$$

$$3485,75 = 416,7 + 23X$$

$$X = 133,45 \text{ ng (dalam } 8 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} &= \frac{133,45 \text{ ng}}{8 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ &= 0,08341 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Penimbangan esktrak} = 100,5 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,08341 \text{ mg}}{100,5 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,08299 \% \end{aligned}$$

Replikasi 2

$$Y = 416,7 + 23X$$

$$3491,38 = 416,7 + 23X$$

$$X = 133,70 \text{ ng (dalam } 8 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} &= \frac{133,70 \text{ ng}}{8 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ &= 0,08356 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Penimbangan esktrak} = 102,4 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,08356 \text{ mg}}{102,4 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,08160 \% \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$Y = 416,7 + 23X$$

$$3320,29 = 416,7 + 23X$$

$$X = 126,26 \text{ ng (dalam } 8 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} &= \frac{126,26 \text{ ng}}{8 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ &= 0,07891 \text{ mg} \end{aligned}$$

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

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

$$= \frac{0,07891 \text{ mg}}{100,3 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,07867 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein rata-rata} &= \frac{0,08299+0,08160+0,07867}{3} \times 100 \% \\ &= 0,08109 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \sqrt{\frac{(0,08299-0,08109)^2 + (0,08160-0,08109)^2 + (0,07867-0,08109)^2}{3-1}} \\ &= 0,0022 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CV} &= \frac{\text{SD}}{\% \text{ b/b}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,0022}{0,08109} \times 100 \% = 2,72 \% \end{aligned}$$

ii. Sampel ekstrak etanol 70 %

Replikasi 1

$$Y = 416,7 + 23X$$

$$1499,07 = 416,7 + 23X$$

$$X = 47,07 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} &= \frac{47,07 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ &= 0,03923 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Penimbangan ekstrak} = 109,1 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,03923 \text{ mg}}{109,1 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,03595 \% \end{aligned}$$

Replikasi 2

$$Y = 416,7 + 23X$$

$$1347,11 = 416,7 + 23X$$

$$X = 40,46 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} &= \frac{40,46 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ &= 0,03371 \text{ mg} \end{aligned}$$

Penimbangan ekstrak = 100,3 mg

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,03371 \text{ mg}}{100,3 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,03361 \% \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$Y = 416,7 + 23X$$

$$1445,11 = 416,7 + 23X$$

$$X = 44,72 \text{ ng (dalam } 6 \mu\text{l)}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa genistein dalam } 5 \text{ ml} &= \frac{44,72 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{l} \\ &= 0,03727 \text{ mg} \end{aligned}$$

Penimbangan ekstrak = 104,3 mg

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein (b/b)} &= \frac{\text{massa genistein}}{\text{massa ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,03727 \text{ mg}}{104,3 \text{ mg}} \times 100 \% = 0,03573 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar genistein rata-rata} &= \frac{0,03595 + 0,03361 + 0,03573}{3} \times 100 \% \\ &= 0,03509 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \sqrt{\frac{(0,03595 - 0,03509)^2 + (0,03361 - 0,03509)^2 + (0,03573 - 0,03509)^2}{3 - 1}} \\ &= 0,0013 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CV} &= \frac{\text{SD}}{\% \text{ b/b}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,0013}{0,03509} \times 100 \% = 3,67 \% \end{aligned}$$

#### LAMPIRAN D : Uji Statistik Kadar Genistein

##### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statisti	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
c						

etac	.226	3	.	.984	3	.754
etoh	.355	3	.	.820	3	.163

#### Independent Samples Test

t-test for Equality of Means						
t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
-29.037	4	.000	-.04599333	.00158398	-.05039115	-.04159551
-29.037	3.055	.000	-.04599333	.00158398	-.05098366	-.04100300

#### LAMPIRAN E : Perhitungan pembuatan Dapar Fosfat dan Substrat L-tirosin

##### a. Pembuatan dapar fosfat pH 6,5

##### i. Pembuatan $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,2 M

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

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

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

##### ii. Pembuatan NaOH 0,2 M

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

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

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

- iii. Dapar fosfat pH 6,5 sebanyak 500 ml dibuat dengan cara menambahkan 125 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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.

- b. Pembuatan substrat L-tirosin 1 mM

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

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

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

### LAMPIRAN F : Pembuatan Standar Genistein Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase

- a. Pembuatan larutan standar induk genistein 519,3 µg/ml:

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

- b. Pembuatan larutan standar uji:

- i. Larutan standar genistein 41,544 ppm

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

- ii. Larutan standar genistein 62,316 ppm

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

- iii. Larutan standar genistein 83,088 ppm

$$80 \frac{\mu\text{l}}{500 \mu\text{l}} \times 519,3 \text{ µg/ml} = 83,0889 \text{ µg/ml}$$

- iv. Larutan standar genistein 124,632 ppm

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

- v. Larutan standar genistein 145,404 ppm

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

**LAMPIRAN G : Hasil Uji Hambatan Tirosinase Standar Genistein**

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

**Standar/sampel**

Replikasi 1 (standar genistein)

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 %	

\*) :  $A_k$  = absorbansi plate kosong $A_{478}$  = absorbansi sampel/standart pada 478 nm $A_{hit}$  =  $A_{478} - A_k$ 

$$\begin{aligned} \text{Hambatan tirosinase} &= \frac{A_{\text{hit kontrol negatif}} - A_{\text{hit sampel/standar}}}{A_{\text{hit kontrol negatif}}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,344 - 0,14}{0,344} \times 100 \% \\ &= 8,721 \% \end{aligned}$$

$$\text{Persamaan } Y = 0,4706X - 12,644$$

$$50 = 0,4706X - 12,644$$

$$X = 133,115 \mu\text{g/ml} \rightarrow IC_{50}$$

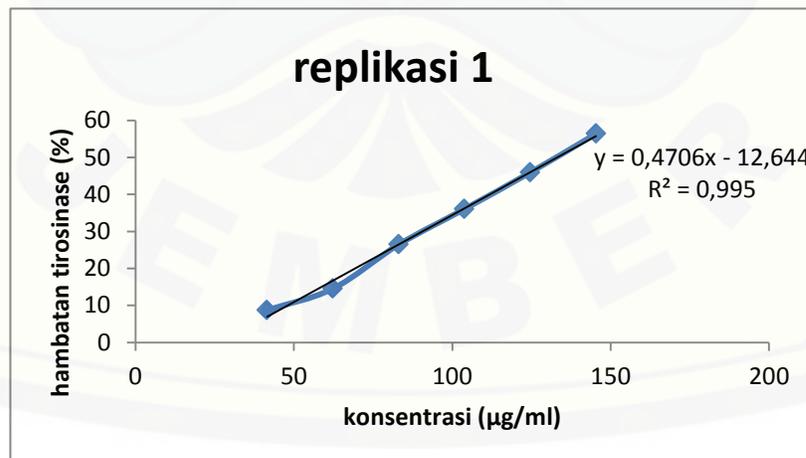
Replikasi 2 (standar genistein)

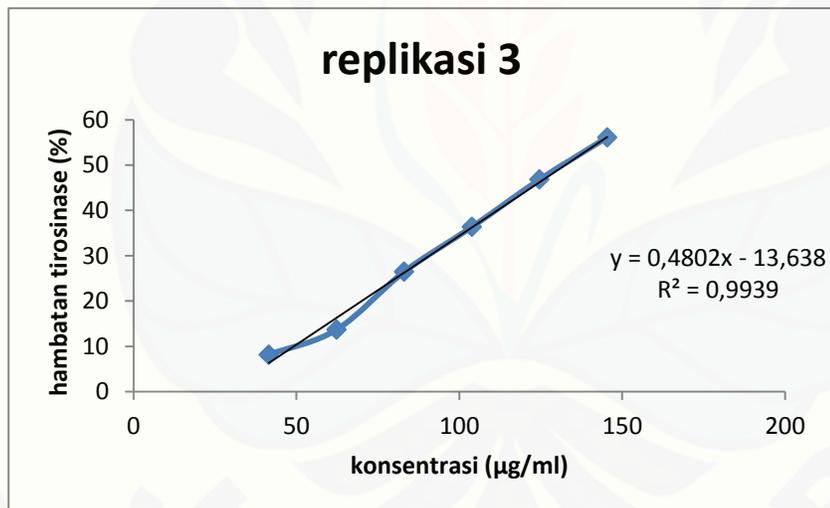
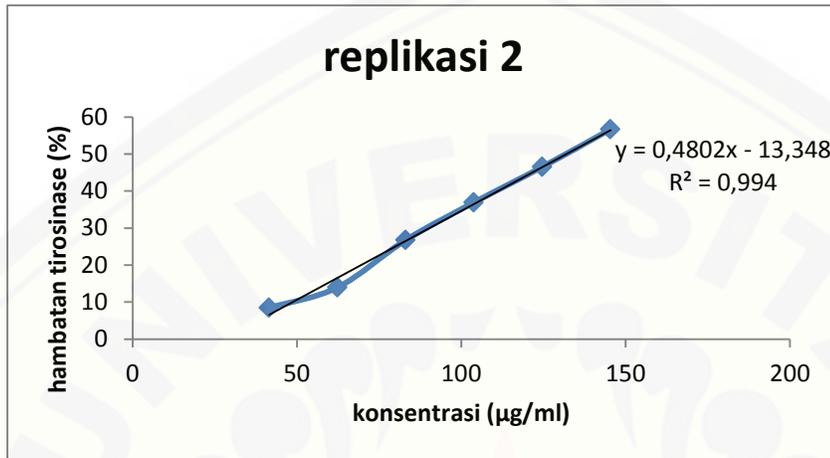
Konsentrasi (µg/ml)	A <sub>k</sub> *	A <sub>478</sub> *	A <sub>hit</sub> *	Hambatan tirosinase	IC <sub>50</sub>
41,544	0,055	0,37	0,315	8,430 %	131, 920 µg/ml
62,316	0,062	0,358	0,296	13,953 %	
83,088	0,06	0,312	0,252	26,744 %	
103,86	0,062	0,279	0,217	36,919 %	
124,632	0,063	0,247	0,184	46,512 %	
145,404	0,056	0,205	0,149	56,686 %	

Replikasi 3 (standar genistein)

Konsentrasi (µg/ml)	A <sub>k</sub> *	A <sub>478</sub> *	A <sub>hit</sub> *	Hambatan tirosinase	IC <sub>50</sub>
41,544	0,055	0,371	0,316	8,139 %	132, 524 µg/ml
62,316	0,058	0,355	0,297	13,663 %	
83,088	0,061	0,314	0,253	26,453 %	
103,86	0,056	0,275	0,219	36,337 %	
124,632	0,055	0,238	0,182	46,802 %	
145,404	0,058	0,209	0,151	56,105 %	

IC<sub>50</sub> rata-rata = 132,519 µg/ml  
 SD = 0,596  
 RSD = 0,451 %





### LAMPIRAN H: Preparasi Sampel untuk Uji Hambatan Tirosinase

#### a. Penimbangan sampel

Sampel	Replikasi	Penimbangan
Ekstrak etil asetat	1	40,99 mg
	2	41,20 mg
	3	41,18 mg

Ekstrak etanol 70 %	1	42,30 mg
	2	41,40 mg
	3	41,10 mg

b. Pembuatan larutan sampel induk :  $\frac{40,99 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4099 \text{ } \mu\text{g/ml}$

c. Pembuatan larutan sampel uji:

- Larutan sampel 40,99 ppm

$$\frac{4 \text{ } \mu\text{l}}{400 \text{ } \mu\text{l}} \times 4099 \text{ } \mu\text{g/ml} = 40,99 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan sampel 51,237 ppm

$$\frac{5 \text{ } \mu\text{l}}{400 \text{ } \mu\text{l}} \times 4099 \text{ } \mu\text{g/ml} = 51,237 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan sampel 66,135 ppm

$$\frac{6 \text{ } \mu\text{l}}{400 \text{ } \mu\text{l}} \times 4099 \text{ } \mu\text{g/ml} = 66,135 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan sampel 71,732 ppm

$$\frac{7 \text{ } \mu\text{l}}{400 \text{ } \mu\text{l}} \times 4099 \text{ } \mu\text{g/ml} = 71,732 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan sampel 81,980 ppm

$$\frac{8 \text{ } \mu\text{l}}{400 \text{ } \mu\text{l}} \times 4099 \text{ } \mu\text{g/ml} = 81,980 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Larutan sampel 92,227 ppm

$$\frac{9 \text{ } \mu\text{l}}{400 \text{ } \mu\text{l}} \times 4099 \text{ } \mu\text{g/ml} = 92,227 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

#### LAMPIRAN I : Hasil Uji Hambatan Tirosinase Ekstrak

a. Ekstrak etanol 70 %

Kontrol negatif

$A_k^*$	$A_{478}^*$	$A_{hit}^*$
0,05	0,402	0,352
0,05	0,399	0,349
0,05	0,405	0,355
Rata-rata		0,352

## Replikasi 1

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	$A_k^*$	$A_{478}^*$	$A_{hit}^*$	Hambatan tirosinase	$IC_{50}$
42,30	0,055	0,272	0,217	38,352 %	90,707 $\mu\text{g/ml}$
63,45	0,056	0,258	0,203	42,330 %	
84,60	0,056	0,237	0,181	48,580 %	
105,75	0,055	0,216	0,161	54,261 %	
126,80	0,057	0,202	0,145	58,807 %	

## Replikasi 2

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	$A_k^*$	$A_{478}^*$	$A_{hit}^*$	Hambatan tirosinase	$IC_{50}$
41,4	0,056	0,273	0,217	38,352 %	91,208 $\mu\text{g/ml}$
62,1	0,053	0,259	0,206	41,477 %	
82,8	0,055	0,239	0,184	47,443 %	
103,5	0,053	0,213	0,160	54,545 %	
124,2	0,053	0,202	0,149	57,670 %	

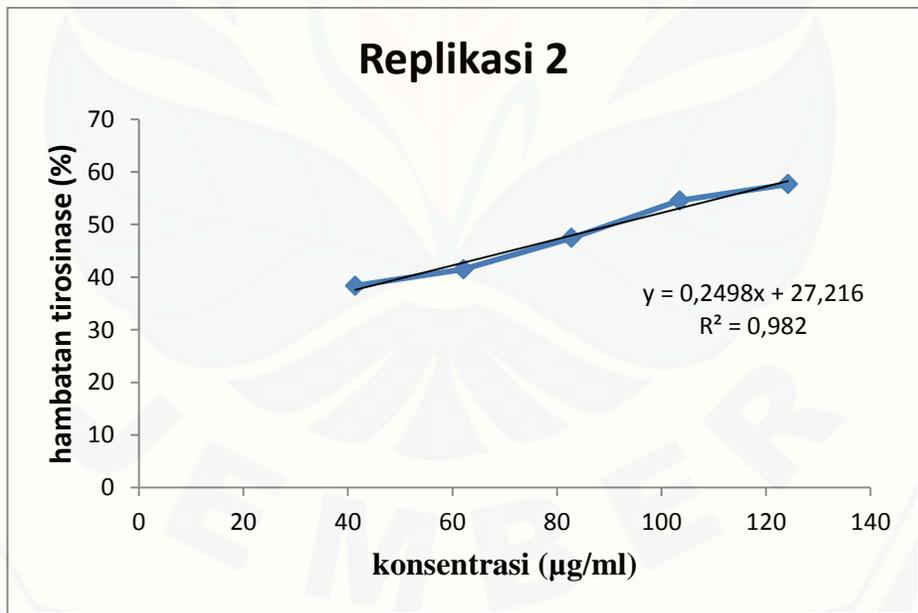
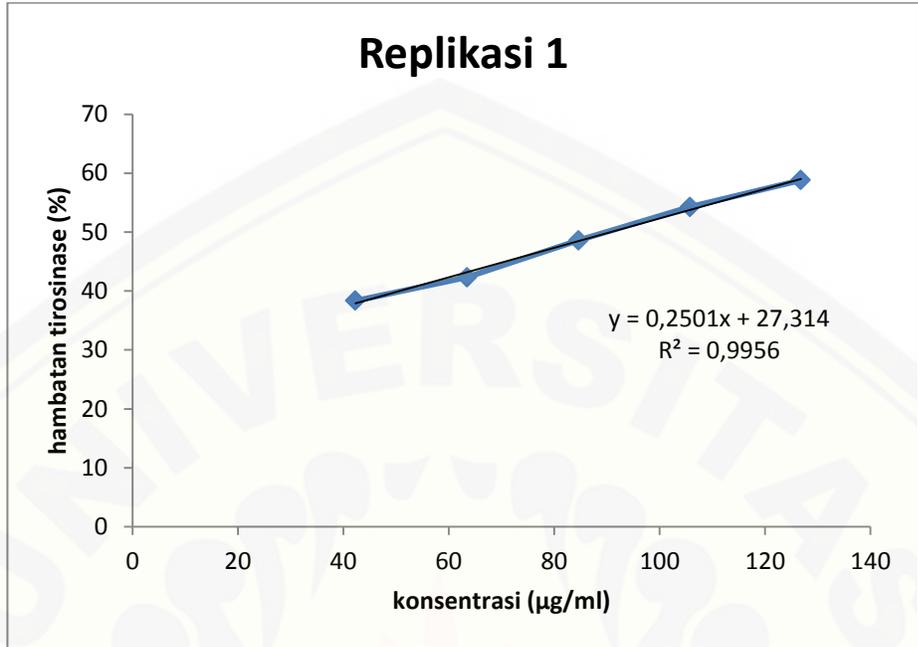
## Replikasi 3

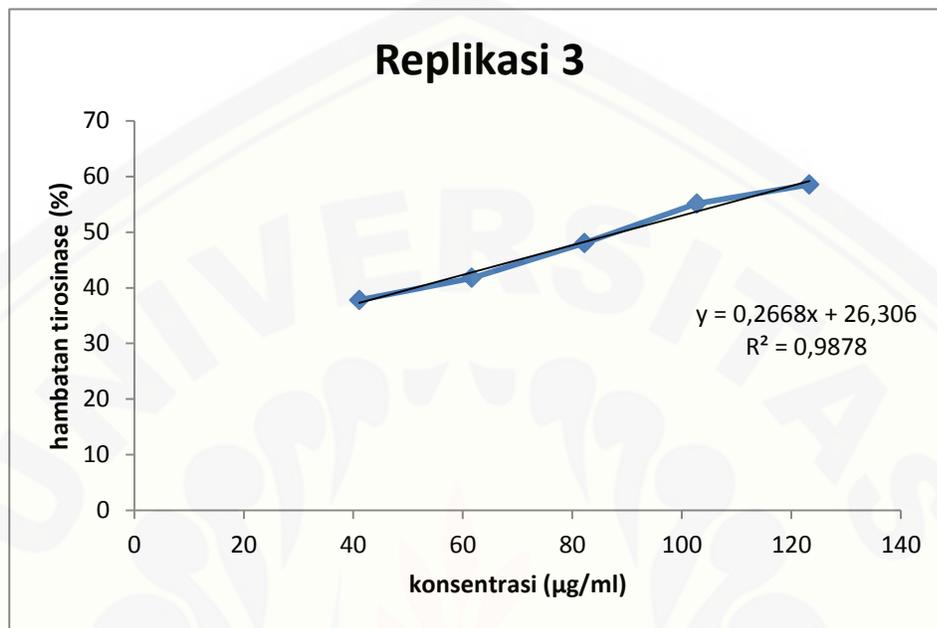
Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	$A_k^*$	$A_{478}^*$	$A_{hit}^*$	Hambatan tirosinase	$IC_{50}$
41,10	0,053	0,272	0,219	37,784 %	88,808 $\mu\text{g/ml}$
61,65	0,055	0,26	0,205	41,761 %	
82,20	0,053	0,236	0,183	48,011 %	
102,75	0,056	0,214	0,158	55,114 %	
123,30	0,057	0,203	0,146	58,523 %	

$IC_{50}$  rata-rata = 90,241  $\mu\text{g/ml}$

SD = 1,266

RSD = 1,426





b. Ekstrak etil asetat

Kontrol negatif

$A_k^*$	$A_{478}^*$	$A_{hit}^*$
0,05	0,402	0,352
0,05	0,399	0,349
0,05	0,405	0,355
Rata-rata		0,352

Replikasi 1

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	$A_k^*$	$A_{478}^*$	$A_{hit}^*$	Hambatan tirosinase	$IC_{50}$
40,900	0,055	0,283	0,228	35,227 %	78,467 $\mu\text{g/ml}$
51,237	0,055	0,271	0,216	38,636 %	
66,135	0,053	0,254	0,201	42,898 %	

71,732	0,055	0,243	0,188	46,591 %
81,980	0,056	0,227	0,171	51,420 %
92,227	0,056	0,207	0,151	57,102 %

## Replikasi 2

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	$A_k^*$	$A_{478}^*$	$A_{hit}^*$	Hambatan tirosinase	$IC_{50}$
41,2	0,053	0,276	0,223	36,648	
51,5	0,053	0,267	0,214	39,205	
61,8	0,055	0,253	0,198	43,750	76,407
72,1	0,053	0,238	0,185	47,443	$\mu\text{g/ml}$
82,4	0,053	0,218	0,165	53,125	
92,7	0,053	0,205	0,152	56,818	

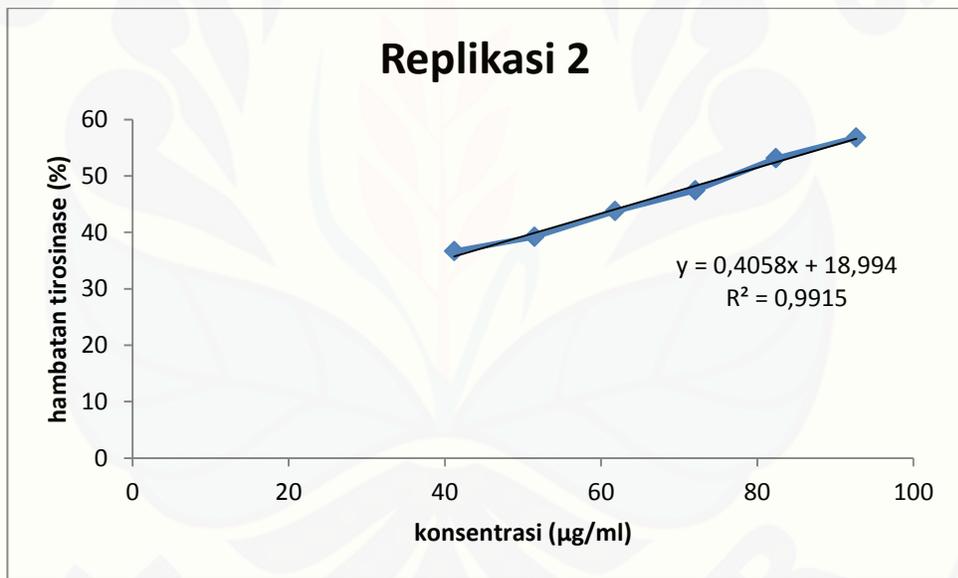
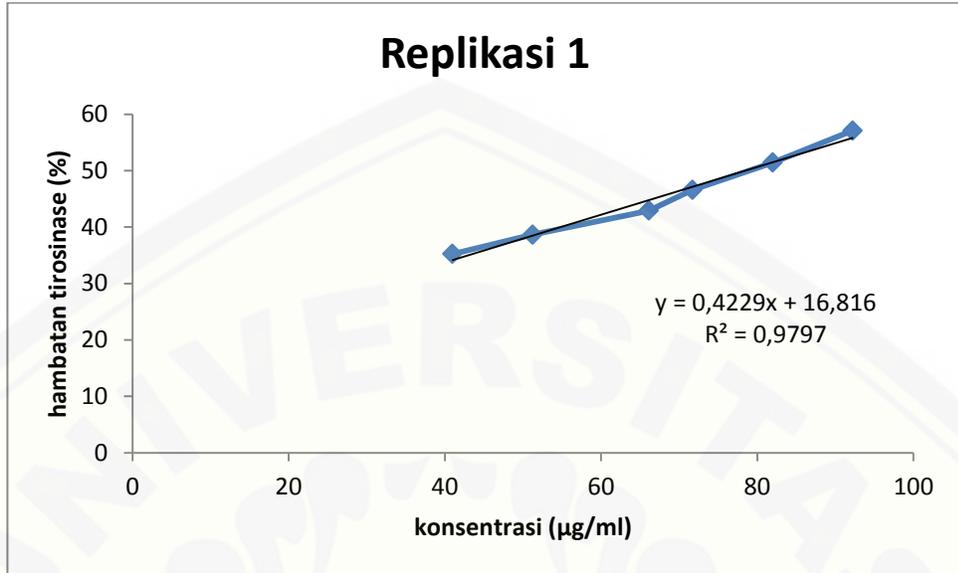
## Replikasi 3

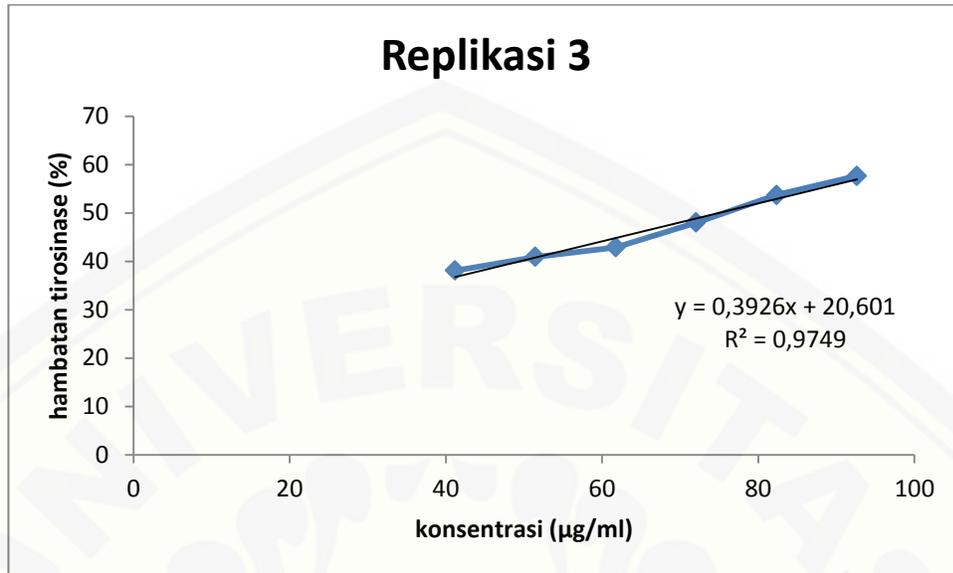
Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	$A_k^*$	$A_{478}^*$	$A_{hit}^*$	Hambatan tirosinase	$IC_{50}$
41,180	0,053	0,271	0,218	38,068	
51,475	0,055	0,263	0,208	40,909	
61,770	0,053	0,254	0,201	42,898	74,882
72,065	0,056	0,239	0,183	48,011	$\mu\text{g/ml}$
82,360	0,053	0,216	0,163	53,693	
92,655	0,057	0,206	0,149	57,670	

$IC_{50}$  rata-rata = 76,858  $\mu\text{g/ml}$

SD = 1,799

RSD = 2,349





**LAMPIRAN J : Hasil Uji Statistik Hambatan Tirosinase**

**Tests of Normality**

pelarut	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IC50 etac	.206	3	.	.993	3	.836
etoh	.310	3	.	.898	3	.380

a. Lilliefors Significance Correction

**Independent Samples Test**

t-test for Equality of Means						
T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
-10.751	4	.000	-13.655667	1.270141	-17.182144	-10.129190
-10.751	3.591	.001	-13.655667	1.270141	-17.346482	-9.964851

**LAMPIRAN K : Gambar Penelitian**



Biji edamame yang sudah dirajang



Biji edamame



Proses ekstraksi serbuk edamame



Proses inkubasi sampel uji hambatan tirosinase



Proses eluasi lempeng KLT