

Penentuan Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Kedelai (*Glycine max*) Terfermentasi *Aspergillus oryzae*

(Determination of Genistein Content and Tyrosinase Inhibition Activity of Soybean (*Glycine max*) Fermented with *Aspergillus oryzae*)

ESTIKA YUNINDARWATI*, EVI Umayah Ulfa, Endah Puspitasari,
Mochammad Amrun Hidayat

Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jln. Kalimantan No.37, Jember, Jawa Tengah,
Indonesia 68121.

Diterima 12 Juli 2015, Disetujui 5 November 2015

Abstrak: Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan kadar genistein dan aktivitas hambatan dari ekstrak kedelai terfermentasi dan non-fermentasi. Kedelai difermentasi oleh *Aspergillus oryzae* selama 4 hari dan dimonitor kadar genistein serta aktivitas hambatan tirosinase setiap hari. Kadar genistein ditentukan menggunakan densitometer-KLT sedangkan aktivitas hambatan tirosinase dievaluasi menggunakan metode spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar genistein meningkat pada saat fermentasi hari ke-1 sampai ke-3 (45,645-1256,042 µg/g ekstrak) tetapi pada hari ke-4 kadarnya menurun (54,373 µg/g ekstrak). Aktivitas hambatan tirosinase juga mengalami peningkatan pada saat fermentasi hari ke-1 sampai ke-3 (dilihat pada nilai IC₅₀) dan menurun saat fermentasi hari ke-4. Disimpulkan bahwa kadar genistein berkaitan dengan aktivitas hambatan tirosinase (R² = 0,949).

Kata kunci: fermentasi, kedelai, *Aspergillus oryzae*, kadar genistein, aktivitas hambatan tirosinase.

Abstract: The purpose of this study was to determine the genistein content and tyrosinase inhibition activity of fermented and unfermented soybean extracts. Soybean was fermented by *Aspergillus oryzae* for 4 days, with genistein content and tyrosinase inhibition activity were monitored each day. Genistein content was determined using TLC-densitometer, while the tyrosinase inhibition activity was evaluated using spectrophotometric assay. The result showed that the genistein content was increased during 1-3 days of fermentation (45.645-1256.042 µg/g extract), but it decreased at the 4th day of fermentation (54.373 µg/g extract). Similarly, inhibitor tyrosinase activity (expressed by IC₅₀ value) was also increased for 1-3 days of fermentation, but it decreased at the 4th day of fermentation. It was known that genistein content was correlated with tyrosinase inhibition activity (R² = 0.949).

Keywords: fermentation, soybean, *Aspergillus oryzae*, genistein content, tyrosinase inhibition activity.

PENDAHULUAN

ISOFLAVON merupakan golongan flavonoid yang banyak ditemukan pada tanaman kacang-kacangan terutama pada kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.)⁽¹⁾. Kedelai memiliki kandungan total isoflavon sebesar

1,2-4,2 mg/g sampel kering⁽²⁾. Isoflavon yang terdapat pada kedelai memiliki struktur aglikon (misal: daidzein, genistein, glisitein), glikosida (misal: daidzin, genistin, glisitin), malonil glikosida dan asetil glikosida⁽³⁾. Sebagian besar isoflavon kedelai memiliki struktur glikosida⁽⁴⁾. Meski demikian, isoflavon dengan struktur aglikon memiliki bioaktivitas yang lebih baik daripada bentuk glikosidanya⁽⁵⁾, misalnya aktivitas hambatan tirosinase⁽⁶⁾.

* Penulis korespondensi, Hp. 081331117900
e-mail: amrun.farmasi@unej.ac.id

Penghambatan tirosinase merupakan salah satu strategi untuk mencegah hiperpigmentasi kulit⁽⁷⁾. Tirosinase merupakan enzim yang berperan dalam biosintesis melanin⁽⁸⁾. Enzim ini mengkatalisis reaksi hidroksilasi tirosin menjadi L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), yang kemudian dikonversi menjadi senyawa reaktif dopakuinon. Dopakuinon akan dikonversi melalui beberapa tahap transformasi menjadi melanin (pigmen warna pada kulit)⁽¹⁾. Hiperpigmentasi, ditandai dengan jumlah melanin yang berlebihan, dapat direduksi dengan menghambat aktivitas tirosinase⁽⁷⁾. Hal ini dapat menyebabkan kulit tampak menjadi tampak lebih cerah. Kulit yang cerah dan bersinar merupakan dambaan wanita Asia⁽⁹⁾.

Salah satu upaya untuk meningkatkan jumlah isoflavon aglikon dapat dilakukan melalui fermentasi⁽⁹⁾. Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme, seperti bakteri, khamir atau kapang⁽¹⁰⁾. Salah satu kapang yang telah secara luas dimanfaatkan dalam proses fermentasi makanan adalah *Aspergillus oryzae*. Kapang ini mampu menghasilkan enzim β -glukosidase⁽¹¹⁾ yang dapat mengkonversi isoflavon glikosida menjadi aglikon melalui reaksi deglikosilasi⁽¹²⁾. Pada berbagai studi, diketahui terjadi peningkatan isoflavon aglikon pada kedelai terfermentasi^(13, 14). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh fermentasi menggunakan *A. oryzae* terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase kedelai. Genistein merupakan isoflavon aglikon utama pada kedelai⁽²⁾. Oleh karena itu, penetapan kadar genistein dapat mewakili kadar isoflavon aglikon lainnya dalam kedelai.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Kedelai varietas Baluran dipanen saat berumur 70 hari diperoleh dari Desa Pontang, Kecamatan Ambulu, Kabupaten Jember; isolat *A. oryzae* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember; pelarut etanol, *n*-heksana dan metanol kualitas *p.a.* diperoleh dari Fluka; enzim tirosinase (*Mushroom tyrosinase*) dan substrat L-tirosin dari Sigma Aldrich; standar genistein kualitas *p.a.* dari Tocris Bioscience.

Alat. Autoklaf (ALP KT-40 Series); oven (UNB 400, Memert); *soxhlet*; *ultrasonicator* (Elma S180H); alat pemusing atau *centrifuger* (Hermle Z206A); *rotary evaporator* (Heildoph); lempeng silika gel GF₂₅₄ (Merck); bejana kromatografi lapis tipis (KLT) (*TLC chamber*, Camag); *densitometer* (*TLC scanner3*, Camag); sumuran atau *96-microwell plate* (BioOne); *microplate reader* (ELx800, BioTek).

METODE. Pembuatan Kedelai Non-fermentasi dan Fermentasi. Sebanyak 500 g kedelai Baluran dicuci dan direndam dalam air selama 24 jam. Setelah itu, kulit ari kedelai dihilangkan, lalu disterilisasi dan dimatangkan menggunakan autoklaf suhu 121 °C selama 15 menit. Kedelai matang yang diperoleh disebut kedelai non-fermentasi. Proses pembuatan kedelai fermentasi dilakukan dengan cara menambahkan 10 mL inokulum suspensi spora *A. oryzae* 10⁶/mL pada kedelai matang. Kedelai yang telah dicampur dengan inokulum kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 1, 2, 3 dan 4 hari (15). Kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-1, 2, 3 dan 4 masing-masing dikeringkan menggunakan oven suhu 60 °C selama 30 jam, lalu dihaluskan menjadi serbuk. Masing-masing serbuk kedelai diayak menggunakan ayakan mesh 80. Serbuk yang telah diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya.

Ekstraksi. Sebelum diekstraksi, dilakukan proses penghilangan lemak (*defatting*) pada simplisia kedelai non-fermentasi dan fermentasi menggunakan pelarut *n*-heksana (1:5) selama 3 jam pada alat Soxhlet⁽¹⁶⁾. Simplisia yang telah bebas lemak tersebut dikeringkan di oven selama 1 jam. Sebanyak 50 gram simplisia kering tersebut diekstraksi dengan cara ultrasonikasi menggunakan pelarut etanol 70% (1:6) selama 1 jam⁽¹⁶⁾. Ekstrak cair selanjutnya dipisahkan dengan cara sentrifugasi kecepatan rendah (838 x G) selama 10 menit. Residu yang tersisa diekstraksi kembali sebanyak 2 kali menggunakan pelarut yang baru. Seluruh ekstrak cair dikumpulkan dan dipekatkan di *rotary evaporator*⁽¹⁷⁾ hingga didapatkan ekstrak kental kedelai non-fermentasi (H0) dan terfermentasi hari ke-1 (H1), 2 (H2), 3 (H3) dan 4 (H4). Masing-masing ekstrak kental dilakukan perhitungan rendemen ekstrak.

Preparasi Larutan Standar dan Sampel. Preparasi larutan standar genistein dilakukan dengan membuat larutan induk 400 dan 500 μ g/mL (dalam metanol *p.a.*) kemudian diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar yang berada pada rentang 2-40 μ g/mL. Untuk preparasi larutan sampel kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-4 dilakukan dengan menimbang sampel sebanyak 150 mg kemudian dilarutkan dalam metanol *p.a.* sampai volume 5 mL sehingga didapatkan konsentrasi 30.000 μ g/mL. Preparasi larutan sampel kedelai terfermentasi hari ke-1 dilakukan dengan menimbang sebanyak 100 mg dan kedelai terfermentasi hari ke-2 dan ke-3 sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dengan metanol *p.a.* sampai volume 10 mL, sehingga didapatkan konsentrasi 10 dan 5 mg/mL (replikasi 3 kali)⁽¹⁸⁾.

Penetapan Kadar Genistein. Larutan standar dan sampel ditotolkan pada lempeng silika gel GF₂₅₄

sebanyak 6 dan 2 μL , kemudian dimasukkan ke dalam bejana KLT yang telah dijenuhkan dengan eluen yang terdiri dari campuran toluena, etil asetat, aseton, asam format (20:4:2:1)⁽¹⁹⁾ dan dibiarkan tereluasi sampai tanda batas. Lempong dikeringkan dan noda yang terbentuk dipindai pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh dari hasil optimasi. Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan memindai noda analit pada densitometer. Penentuan panjang gelombang optimum dengan melihat spektrum analit yang terbaca pada panjang gelombang maksimal pada area panjang gelombang 200-400 nm⁽²⁰⁾. Pada kromatogram sampel, identitas noda genistein ditetapkan dengan noda genistein kromatogram standar menggunakan uji korelasi spektra dan uji kemurnian puncak⁽²¹⁾. Kadar genistein dalam sampel ditentukan dengan memasukkan nilai area sampel ke dalam persamaan kurva baku standar genistein. Kadar genistein selanjutnya dinyatakan dalam $\mu\text{g/g}$ ekstrak.

Uji Aktivitas Hambatan Tirosinase. Uji aktivitas hambatan tirosinase berdasarkan metode yang dilakukan Batubara⁽²²⁾ dengan modifikasi. Modifikasi tersebut berasal dari hasil optimasi Dewi⁽²³⁾. Masing-masing ekstrak yang telah diperoleh ditimbang sebanyak 15 mg dan 20 mg, kemudian dilarutkan dalam 1 mL DMSO, lalu ditambah dapar fosfat pH 6,5 hingga volume 5 mL, diperoleh konsentrasi 3000 dan 4000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan ekstrak tersebut diencerkan dengan dapar fosfat pH 6,5 hingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 50-300 $\mu\text{g/mL}$. Larutan standar genistein dengan konsentrasi 80-170 $\mu\text{g/mL}$ digunakan sebagai kontrol positif. Pada masing-masing lubang sumuran ditambahkan larutan uji sebanyak 70 μL dan ditambahkan 40 μL enzim tirosinase (250 unit/mL dalam dapar fosfat) dan diinkubasi selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan substrat (L-tirosin 1 mM) sebanyak 110 μL dan diinkubasi pada suhu 26 °C selama 90 menit. Absorbansi masing-masing larutan uji diamati pada panjang gelombang 478 nm untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambat 50% (IC_{50}). Persen inhibisi dihitung dengan cara membandingkan absorbansi sampel tanpa penambahan ekstrak dengan penambahan ekstrak pada panjang gelombang (λ) 478 nm.

Analisis Data. Ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase pada sampel kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-1, 2, 3 dan 4 ditetapkan dengan uji Anova satu arah dan dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD, dengan tingkat kepercayaan 95%. Selain itu, dilakukan uji korelasi menggunakan persamaan regresi untuk mengetahui hubungan antara kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi. Hasil ekstraksi dari masing-masing kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-1, 2, 3 dan 4 dapat dilihat pada Tabel 1. Jumlah kandungan senyawa dalam ekstrak yang berbeda diduga menyebabkan perbedaan rendemen ekstrak yang dihasilkan.

Tabel 1. Hasil ekstraksi kedelai.

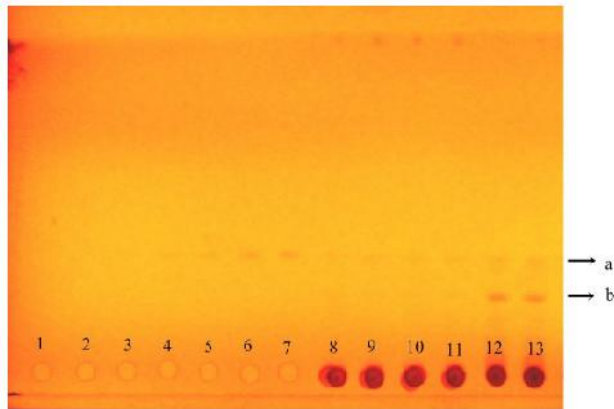
Sampel	Rendemen ekstrak (% b/b)
H0	16,88 %
H1	15,64 %
H2	16,3 %
H3	17 %
H4	16,45 %

Penetapan Kadar Genistein. Hasil eluasi lempeng KLT pertama dan kedua yang dilihat di bawah sinar UV 254 nm, disajikan pada Gambar 1 dan 2. Pemeriksaan lempeng KLT di bawah sinar UV bertujuan untuk mengetahui noda yang teredam. Hasil penyinaran lempeng di bawah sinar UV menunjukkan terdapat sampel yang memiliki 2 noda yang teredam. Noda genistein pada sampel adalah noda yang memiliki nilai R_f yang hampir sama dengan standar genistein, yang ditunjukkan dengan notasi huruf "a" pada gambar.

Spektra standar genistein hasil optimasi panjang gelombang ditunjukkan pada Gambar 3. Berdasarkan spektra yang dihasilkan, dapat diketahui bahwa intensitas spektrum paling tinggi tercapai pada panjang gelombang (λ) 266 nm dengan sinyal absorbansi 95 AU. Panjang gelombang tersebut selanjutnya digunakan untuk menganalisis kadar genistein dalam ekstrak.

Uji kemurnian dilakukan dengan membandingkan spektra pada posisi awal, tengah dan akhir puncak menunjukkan korelasi $> 0,99$ (Tabel 2). Hal ini dapat dikatakan bahwa noda/puncak kromatogram adalah murni. Hasil uji identitas menunjukkan bahwa analit dalam sampel dan standar adalah identik yang ditunjukkan korelasi $> 0,99$ (Tabel 3)⁽²¹⁾.

Hasil penetapan kadar genistein pada ekstrak kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-1, 2, 3 dan 4 dengan metode KLT densitometri dapat dilihat pada Tabel 4. Hasil penetapan kadar genistein menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar genistein selama proses fermentasi hari ke-1 hingga ke-3, namun terjadi penurunan kadar genistein pada hari ke-4. Kadar genistein pada ekstrak kedelai non-fermentasi adalah $45,645 \pm 3,333 \mu\text{g/g}$ ekstrak, sedangkan kadar genistein pada ekstrak kedelai



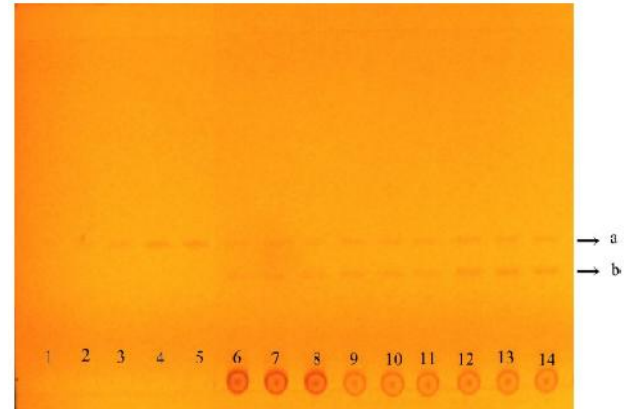
Gambar 1. Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak kedelai non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-4 yang dilihat dengan sinar UV 254 nm (a= genistein; b= tidak diketahui).

Keterangan:

1. Standar genistein 1,968 ng;
2. Standar genistein 1,968 ng
3. Standar genistein 5,904 ng
4. Standar genistein 9,840 ng
5. Standar genistein 19,680 ng
6. Standar genistein 29,520 ng
7. Standar genistein 37,550 ng
8. Sampel H0 (1)
9. Sampel H0 (2)
10. Sampel H0 (3)
11. Sampel H4 (1)
12. Sampel H4 (2)
13. Sampel H4 (3)

terfermentasi hari ke-1, 2, 3 dan 4 berturut-turut adalah $313,985 \pm 13,453$; $804,905 \pm 37,850$; $1256,042 \pm 36,205$; $54,373 \pm 1,755$ $\mu\text{g/g}$ ekstrak. Peningkatan kadar genistein selama fermentasi hari ke-1, 2, 3 dan 4 sebesar 6,88; 17,63; 27,51; 1,19 kali jika dibandingkan kedelai non-fermentasi.

Adanya perbedaan kadar genistein dari masing-masing sampel disebabkan adanya aksi dari enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh *A. Oryzae*⁽¹²⁾. Produksi enzim β -glukosidase meningkat sejalan dengan pertumbuhan sel pada fase logaritmik karena berhubungan dengan metabolisme primer dalam sel. Selanjutnya telah terjadi penurunan aktivitas enzim β -glukosidase seiring dengan tercapainya



Gambar 2. Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak kedelai terfermentasi H1,H2 dan H3 yang dilihat dengan sinar UV 254 nm (a= genistein; b= tidak diketahui).

Keterangan:

1. Standar genistein 5,904 ng
2. Standar genistein 19,68 ng
3. Standar genistein 37,55 ng
4. Standar genistein 59,04 ng
5. Standar genistein 78,72 ng
6. Sampel H1(1)
7. Sampel H1 (2)
8. Sampel H1 (3)
9. Sampel H2 (1)
10. Sampel H2 (2)
11. Sampel H2 (3)
12. Sampel H3 (1)
13. Sampel H3 (2)
14. Sampel H3 (3)

fase stasioner yang sudah menunjukkan terjadinya kekurangan nutrisi yang mendukung pertumbuhan sel⁽²⁴⁾. Penyebab penurunan kadar genistein pada hari ke-4 tersebut dimungkinkan adanya penurunan aktivitas enzim β -glukosidase yang terjadi pada fase stasioner *A. oryzae*. Selain itu, menurut Chang⁽²⁵⁾, selama proses fermentasi *A. oryzae* memiliki enzim sitokrom P450 yang dapat mengkatalisis genistein menjadi hidroksi genistein. Penurunan kadar genistein pada hari fermentasi ke-4 kemungkinan dapat disebabkan juga oleh adanya konversi genistein menjadi hidroksi genistein.

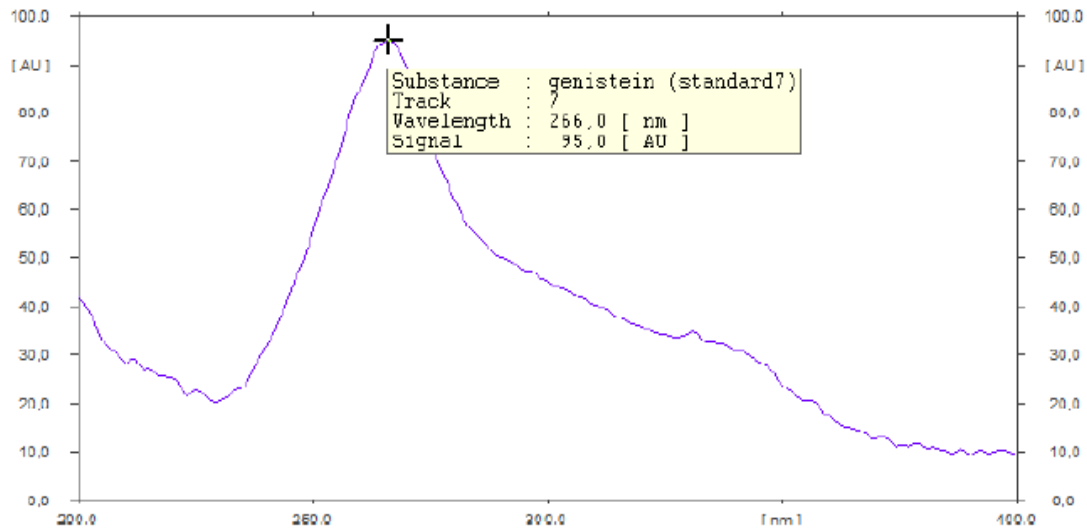
Menurut Nam⁽²⁶⁾, kadar genistein kedelai varietas Aga3 terfermentasi oleh *A. oryzae* NL5 hari ke-1

Tabel 2. Data korelasi spektra uji kemurnian.

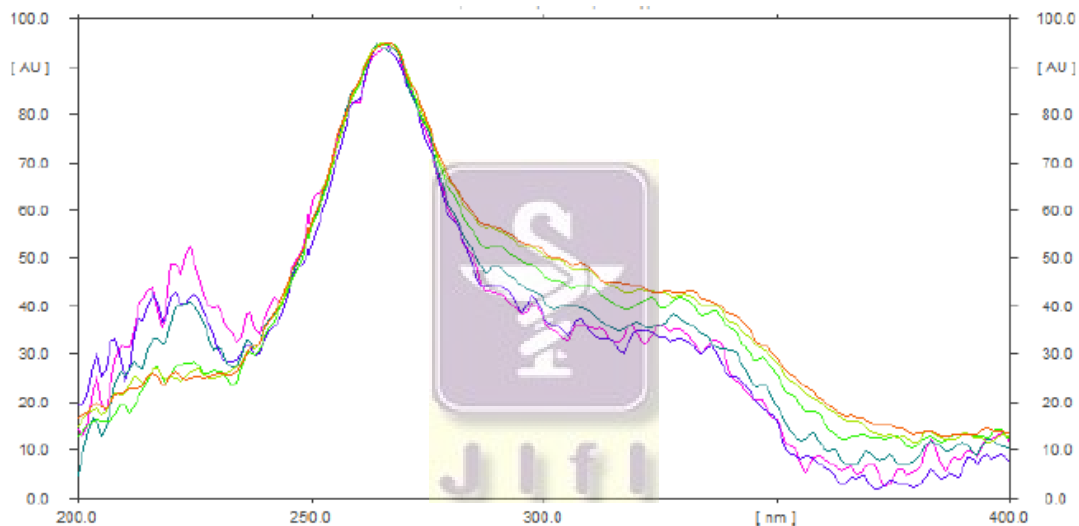
	r(s,m)	r(m,e)	kemurnian
Standar genistein	0,999888	0,999036	ok
Sampel H0	0,999894	0,999849	ok
Sampel H1	0,999942	0,999738	ok
Sampel H2	0,999943	0,999269	ok
Sampel H3	0,999851	0,999552	ok
Sampel H4	0,999904	0,999362	ok

Tabel 3. Data korelasi spektra uji identitas.

	r(s,s)	r(s,a)	identitas
Standar genistein	0,999678		N/A
Sampel H0	0,999678	0,993652	ok
Sampel H1	0,999678	0,997207	ok
Sampel H2	0,999678	0,998741	ok
Sampel H3	0,999678	0,997262	ok
Sampel H4	0,999678	0,998163	ok



Gambar 3. Spektra genistein (diperoleh panjang gelombang maksimal 266 nm).



Gambar 4. Spektra uji kemurnian dan identitas genistein pada standar dan sampel.

hingga ke-6 meningkat sebesar 1,414; 2,302; 2,414; 3,391; 3,884 dan 1,06 kali dari kedelai non-fermentasi, sedangkan pada hari ke-7 mengalami penurunan

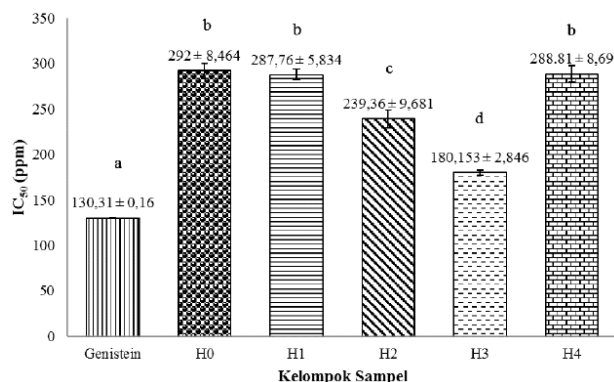
Tabel 4. Hasil penetapan kadar genistein.

Sampel	Kadar genistein (µg/g ekstrak)	Peningkatan genistein*
H0	45,645±3,333 ^(a)	-
H1	313,985±13,453 ^(b)	6,88 x
H2	804,905±37,850 ^(c)	17,63 x
H3	1256,042±36,205 ^(d)	27,51 x
H4	54,373±1,755 ^(e)	1,19 x

Keterangan:
Data disajikan dalam rata-rata ± SD, n=3, notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna antar sampel menurut LSD (p<0,05); *: data kadar genistein dari masing-masing ekstrak kedelai terfermentasi dihitung relatif terhadap non-fermentasi.

sebesar 0,837 kali dari kedelai non-fermentasi. Kadar isoflavon pada kedelai bervariasi, bergantung pada beberapa faktor yakni varietas, kualitas biji, masa panen dan lokasi penanaman⁽⁴⁾. Adanya perbedaan hasil penelitian ini dengan sebelumnya kemungkinan disebabkan oleh adanya perbedaan varietas kedelai dan varietas kapang yang digunakan akan menyebabkan perbedaan genistein yang terkandung didalamnya.

Aktivitas Hambatan Tirosinase. Aktivitas hambatan tirosinase ditunjukkan dengan nilai IC₅₀. Data hasil pengujian aktivitas hambatan tirosinase genistein dari masing-masing ekstrak dapat dilihat pada Gambar 5. Gambar tersebut menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas penghambatan tirosinase selama proses fermentasi. Nilai penghambatan tirosinase tertinggi dengan nilai IC₅₀ terendah pada sampel fermentasi hari ke-3 yakni pada konsentrasi 180,153±2,846 µg/mL. Namun pada fermentasi hari ke-4 mengalami penurunan aktivitas penghambatan tirosinase. Jika dibandingkan dengan



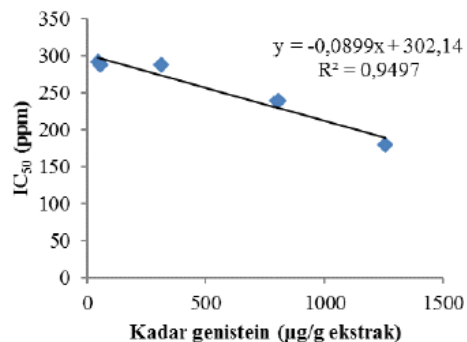
Gambar 5. Hasil uji aktivitas hambatan tirosinase. Data disajikan dalam rata-rata IC₅₀ ± SD, n=3, notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna antar sampel menurut LSD (p<0,05).

nilai IC₅₀ genistein sebagai kontrol positif, aktivitas penghambatan tirosinase dari masing-masing ekstrak lebih rendah.

Menurut Chang⁽²⁷⁾, ekstrak metanol kedelai yang difermentasi dengan *A. oryzae* BCRC 32288 memiliki aktivitas hambatan tirosinase dengan nilai IC₅₀ sebesar 5000 µg/mL. Adanya perbedaan daya hambatan antara penelitian ini dengan Chang diduga disebabkan oleh perbedaan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi. Adanya perbedaan pelarut dapat menyebabkan perbedaan jenis atau senyawa bioaktif yang terkandung dalam masing-masing ekstrak⁽²⁸⁾. Hal ini berpengaruh terhadap aktivitas hambatan tirosinase. Aktivitas hambatan tirosinase ekstrak etanol kedelai Baluran terfermentasi *A. oryzae* ternyata memiliki aktivitas yang lebih tinggi. Berdasarkan hal tersebut, dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang senyawa bioaktif lainnya yang terdapat dalam kedelai Baluran terfermentasi *A. oryzae*.

Korelasi antara Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase. Berdasarkan uji korelasi diketahui bahwa kadar genistein memiliki peranan penting dalam aktivitas hambatan tirosinase. Hubungan antara kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase mempunyai koefisien korelasi (R²) = 0,949 (Gambar 6). Hasil ini menunjukkan bahwa 94,9% aktivitas hambatan tirosinase akibat kontribusi senyawa genistein⁽²⁸⁾. Sisanya sebesar 5,1% ditentukan oleh senyawa lain.

Aktivitas hambatan tirosinase tidak hanya ditentukan oleh genistein, namun dapat juga berasal dari senyawa isoflavon glikosida daidzein maupun glisitein⁽⁹⁾. Meski demikian, genistein merupakan isoflavon yang kadarnya tertinggi dalam kedelai⁽²⁾. Aglikon isoflavon umumnya memiliki aktivitas hambatan tirosinase yang lebih tinggi daripada senyawa glikosidanya⁽⁶⁾. Oleh karenanya, peningkatan kadar genistein pada kedelai terfermentasi diikuti pula



Gambar 6. Uji korelasi antara aktivitas hambatan tirosinase IC₅₀ (y) dan kadar genistein (x).

dengan peningkatan aktivitas hambatan tirosinasenya.

SIMPULAN

Profil kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase kedelai meningkat selama fermentasi hari ke-1-3, namun mengalami penurunan pada hari ke-4. Adanya aktivitas hambatan tirosinase dari kedelai terfermentasi *A. oryzae* membuktikan bahwa kedelai terfermentasi *A. oryzae* berpotensi dikembangkan sebagai bahan baku pemutih kulit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chang TS. An update review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2009. 10:2440-75.
2. Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone composition in America and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J Agri Food Chem.* 1996. 42:1964-67.
3. Dhaubhadel S. Soybean biochemistry chemistry and physiology. Regulation of isoflavonoid biosynthesis in soybean seeds. Canada: Southern crop protection and food research center. 2011. 243-58.
4. Teekachunhatean S, Hanprasertpong N, Teekachunhatean T. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds grown in Thailand. *Int J Agronomy.* 2013. 163573:1-11.
5. Pandit NT, Patravale VB. Design and optimization of a novel method for extraction of genistein. *Indian J Pharma Scie.* 2011. 73(2):184-92.
6. Chang TS, Ding HY, Lin HC. Identifying 6,7,4'-trihydroxyisoflavone as a potent tyrosinase inhibitor. *Biosc Biotech Biochem.* 2005. 69(10):1999-2001.
7. Nerya O, Musa R, Khatib S, Tamir S, Vaya J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochem.* 2004. 65:1389-95.
8. Seo SY, Sharma VK, Sharma N. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J Agri Food Chem.* 2003. 51:2837-53.
9. Widyaningsih D. Pengaruh atribut produk terhadap sikap konsumen muda dalam menggunakan pemutih wajah pond's white beauty [skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Ekonomi Universitas Muhammadiyah

- Yogyakarta; 2012. 1.
10. Suprihatin. Teknologi fermentasi. Surabaya: Penerbit UNESA; 2010. 1-43.
 11. Barbesgaard P, Hheldt-Hansen H, Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *App Micro Biotech*. 1992. 36:569-72.
 12. Punjaisee C, Chaiyasut C, Chansakaow S, Tharata S, Visessanguan W, Punjaisee S. 8-hydroxygenistein formation of soybean fermented with *Aspergillus oryzae* BCC 3088. *Afr J Agric Res*. 2011. 6(4):785-89.
 13. Lee IH, Chou CC. Distribution profiles of isoflavone isomers in black bean kojis prepared with various filamentous fungi. *J Agri Food Chem*. 2006. 54(4):1309-14.
 14. Lee SH, Seo MH, Oh DK. Deglycosylation of isoflavones in isoflavone-rich soy germ flour by *Aspergillus oryzae* KACC 40247. *J Agri Food Chem*. 2013. 61(49):12101-10.
 15. Lee IH, Hung YH, Chou CC. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic, and antocyanin contents of black bean. *Int J Food Micro*. 2008. 121:150-6.
 16. Hui M, Tiansheng Q, Hai Z. Methods for extracting, separating, identifying and quantifying daidzein and genistein. *Chinese J App Envi Bio*. 2005. 3:2-5.
 17. Luthria DL, Biswas R, Natarajan S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chem*. 2007. 105:325-33.
 18. Rahman L, Warnida H, Djide N. Pengaruh fermentasi sari kedelai dengan *Lactobacillus sp.* terhadap kadar dan profil kromatografi lapis tipis genistein serta formulasinya dengan granul efervesen. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2012. 10(2):127-31.
 19. Yuan D, Chen Y, Bai X, Pan Y, Kano Y. TLC and HPLC analysis of soy isoflavones in semen sojae praeparatum. *Asia J Tradisional Med*. 2006. 1:3-4.
 20. CAMAG. Basic equipment for modern thin-layer chromatography. Switzerland ; CAMAG. [Serial online]. 2012: diambil dari URL: <http://www.camag.com/downloads/free/brochures/CAMAG-basic-equipment-08.pdf>. diakses 15 Maret 2015.
 21. Wulandari L, Retnaningtyas Y, Mustafidah D. Pengembangan dan validasi metode kromatografi lapis tipis densitometri untuk penetapan kadar teofilin dan efedrin hidroklorida secara simultan pada sediaan tablet. *KTI*. 2013. 15(1):15-21.
 22. Batubara I, Darusma LK, Mitsunaga T, Rahminiwati M, Djauhari E. Indonesian medical plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. *J Bio Scie*. 2010. 10(2):138-144.
 23. Dewi ENA. Pengaruh perbedaan metode ekstraksi terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase edamame (*Glycine max*) *in vitro* [skripsi]. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember; 2015. 45-7.
 24. Setyaningsih D, Tresnawati K, Soehartono MT, Apriyantono A. Pengaruh aktivitas β -glukosidase eksternal dari kapang terhadap kadar vanilin buah vanili. *J Tek Industri Pertanian*. 2006. 16(1):28-35.
 25. Chang TS. Isolation, bioactivity, and production of ortho-hydroxydaidzein and ortho-hydroxygenistein. *Inter J Mol Scie*. 2014. 15:5699-716.
 26. Nam DH, Kim HJ, Lim J S, Kim KH, Park CS, Kim JH, *et al.* Simultaneous enhancement of free isoflavone content and antioxidant potential of soybean by fermentation with *Aspergillus oryzae*. *J Food Sci*. 2011. 76(8):194-200.
 27. Chang TS, Ding HY, Tai SSK, Wu CY. Mushroom tyrosinase inhibitor effects of isoflavone isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. *Food Chem*. 2007. 105:1430-8.
 28. Ghazali M, Zamani NP, Batubara I. Potensi limbah kulit buah nyirih *Xylocarpus granatum* sebagai inhibitor tirosinase. *Depok*. 2014. 3(3):187-94.