

**UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN ENZIM TIROSINASE
OLEH EKSTRAK ETANOL DAUN KELADI TIKUS
(*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) SECARA *In Vitro***

NAMA : WAHYUNINGTYAS

NPM : 17330710

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
INSTITUT SAINS DAN TEKNOLOGI NASIONAL
JAKARTA
AGUSTUS 2019**



**UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN ENZIM TIROSINASE
OLEH EKSTRAK ETANOL DAUN KELADI TIKUS
(*Typhonium flagelliforme* Lodd. Blume) SECARA *In Vitro***

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**NAMA : WAHYUNINGTYAS
NPM : 17330710**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
INSTITUT SAINS DAN TEKNOLOGI NASIONAL
JAKARTA
AGUSTUS 2019**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Wahyuningtyas

NPM : 17330710

Tanggal : Agustus 2019



HALAMAN PERNYATAAN NON PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Wahyuningtyas

NPM : 17330710

Mahasiswa : Fakultas Farmasi Institut Sains Dan Teknologi Nasional

Tahun Akademik : 2019

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan kegiatan plagiat dalam penulisan Tugas Akhir yang berjudul **“UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN ENZIM TIROSINASE OLEH EKSTRAK ETANOL DAUN KELADI TIKUS (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) SECARA *In Vitro*”**

Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian Surat Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Jakarta, Agustus 2019

METERAI
TEMPEL
E82B1AFF998174481
6000
ENAM RIBURUPIAH
Wahyuningtyas

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Wahyuningtyas

NPM : 17330710

Program Studi : Farmasi

Judul Skripsi : “ Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) Secara *In Vitro* ”

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Institut Sains Dan Teknologi Nasional.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : Munawarohthus Sholikha, M.Si ()

Pembimbing 2 : Lia Puspitasari, S.Farm, M.Si., Apt ()

Penguji 1 : Prof. Dr. Amlius Thalib ()

Penguji 2 : Erwi Putri Setyaningsih, M.Si., Apt ()

Penguji 3 : Rosario Trijuliamos Manalu, SP.,M.Si ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : Agustus 2019

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Wahyuningtyas

NPM : 17330710

Tanggal : Agustus 2019

HALAMAN PERNYATAAN NON PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Wahyuningtyas

NPM : 17330710

Mahasiswa : Fakultas Farmasi Institut Sains Dan Teknologi Nasional

Tahun Akademik : 2019

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan kegiatan plagiat dalam penulisan Tugas Akhir yang berjudul **“UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN ENZIM TIROSINASE OLEH EKSTRAK ETANOL DAUN KELADI TIKUS (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) SECARA *In Vitro*”**

Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian Surat Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Jakarta, Agustus 2019

Wahyuningtyas

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Wahyuningtyas

NPM : 17330710

Program Studi : Farmasi

Judul Skripsi : “ Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) Secara *In Vitro* ”

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Institut Sains Dan Teknologi Nasional.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : Munawarohthus Sholikha, M.Si ()

Pembimbing 2 : Lia Puspitasari, S.Farm, M.Si., Apt ()

Penguji 1 : Prof. Dr. Amlius Thalib, APU ()

Penguji 2 : Erwi Putri Setyaningsih, M.Si., Apt ()

Penguji 3 : Rosario Trijuliamos Manalu, SP.,M.Si ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : Agustus 2019

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT atas karunia dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul : **“Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) Secara *In Vitro*”**. Skripsi ini dibuat untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Institut Sains Dan Teknologi Nasional .

Pada kesempatan ini saya sampaikan rasa hormat dan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu **Munawarohthus Sholikha, M.Si.** sebagai pembimbing 1 dan Ibu **Lia Puspitasari, S.Farm, M.Si. Apt** sebagai pembimbing 2 yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Pada kesempatan kali ini ucapkan terimakasih tidak lupa disampaikan kepada :

1. Dr. Refdanita, M.Si.,Apt. Selaku Dekan Fakultas Farmasi ISTN.
2. Jenny Pontoan, M.Farm.,Apt. Selaku Kepala Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi ISTN.
3. Putu Rika Veryanti, S.Farm, M.Farm Klin.,Apt.
4. Bapak dan ibu dosen serta staff ISTN, atas bantuan dan dukungannya selama perkuliahan.
5. Orang tua saya Bapak Suwarni, S.T dan ibu Sulasmiati serta adik saya Wulan Rahmadani yang selalu mendo'akan dan memberikan dukungan baik secara moral maupun materi hingga penulisan ini dapat terselesaikan dengan baik.
6. Sahabat-sahabatku tersayang yang telah memberiku pelajaran dari sifat-sifat unik yang mereka miliki dan selalu memberikan dukungan, Nita, Titin, Pandala, Wahyu, Lia, Yurika, Pipit, Ika, Kiki, kak stevany, kak fiki, ulfa, umul, nurul, yando.
7. Untuk almamater Institut Sains dan Teknologi Nasional.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga Skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak khususnya bagi sivitas akademika Institut Sains Dan Teknologi Nasional serta semua pihak yang berminat dalam penulisan dan pengembangan dibidang kefarmasian.

Jakarta, Agustus 2019

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Institut Sains Dan Teknologi Nasional, saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Wahyuningtyas

NPM : 17330710

Program Studi : Farmasi

Fakultas : Farmasi

Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Institut Sains Dan Teknologi Nasional Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty- Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

“Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) Secara *In Vitro*”.

Beserta pangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Institut Sains dan Teknologi Nasional berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*) *soft copy* dan *hard copy*, merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/ pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : Agustus 2019

Yang menyatakan

(Wahyuningtyas)

ABSTRAK

Nama : Wahyuningtyas
Program Studi : Farmasi
Judul : Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) Secara *In Vitro*

Hiperpigmentasi merupakan peristiwa yang terjadi akibat produksi pigmen kulit yang berlebihan. Warna kulit sangat dipengaruhi oleh keberadaan melanin, dimana keberadaan melanin sangat dipengaruhi oleh enzim tirosinase. Daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) merupakan salah satu tanaman yang memiliki senyawa flavonoid yang bermanfaat sebagai antioksidan dan inhibitor tirosinase. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas ekstrak etanol daun keladi tikus sebagai inhibitor tirosinase. Daun keladi tikus pada penelitian ini diperoleh melalui proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96 % dengan metode maserasi. Ekstrak etanol kental daun keladi tikus diuji penapisan fitokimia, kadar flavonoid total, dan uji aktivitas tirosinase. Metode yang digunakan untuk uji penghambatan tirosinase yaitu metode enzimatis secara *in vitro*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat kandungan senyawa flavonoid total sebanyak 0,7378 % (b/b) dan aktivitas inhibitor dapat dilihat dari nilai IC_{50} untuk reaksi difenolasi (substrat L-DOPA) yaitu 13,307 mg/mL. Nilai tersebut lebih besar jika dibandingkan asam kojat difenolasi 0,093 mg/mL, sehingga ekstrak etanol daun keladi tikus berpotensi untuk menghambat aktivitas tirosinase.

Kata Kunci :

Daun keladi tikus, IC_{50} , inhibitor tirosinase

ABSTRACT

Name : Wahyuningtyas
Study program : Pharmacy
Title : Tyrosinase Enzyme Inhibition Activity Test by Ethanol Extract of Leaf Taro (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) *In Vitro*

Hyperpigmentation is an event that occurs due to excessive production of skin pigment. Skin color is strongly influenced by the presence of melanin, where the presence of melanin is strongly influenced by the enzyme tyrosinase. Rodent tuber leaves (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) are one of the plants have flavonoid compounds used as antioxidants and tyrosinase inhibitors. The aim of this study was to test the ethanol extract of rat taro leaves as a tyrosinase inhibitor. The taro leaves of rats in this study were obtained through an extraction process using 96% ethanol solvent by maceration method. The thick ethanol extract of rat taro leaves was tested for phytochemical screening, total flavonoid levels, and tyrosinase activity test. The method used for tyrosinase inhibition test is enzymatic method in vitro. The results of this study indicate that there is a total flavonoid compound content of 0.7378% (b/b) and the inhibitor activity can be seen from the IC₅₀ value for the dipenolation reaction (L-DOPA substrate) which is 13.307 mg / mL. This value is greater when compared with 0.093 mg / mL of phenolic acid, so that the ethanol extract of rat taro leaves has the potential to inhibit tyrosinase activity.

Keyword :

Typhonium flagelliforme (Lodd.) Blume, IC₅₀, tyrosinase inhibitors

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PERNYATAAN NON PLAGIAT	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kulit	5
2.1.1 Pengertian	5
2.1.2 Struktur Kulit	5
2.1.2.1 Lapisan Epidermis	6
2.1.2.2 Lapisan Dermis	7
2.1.2.3 Lapisan Subkutan	8
2.1.3 Warna Kulit	8
2.1.4 Melanosit	9
2.1.5 Melanin	10
2.1.6 Melanogenesis	10
2.1.7 Hiperpigmentasi	11
2.2 Enzim	12
2.3 Tirosinase	12
2.4 Penghambatan Tirosinase	13
2.5 Tanaman Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume)	15
2.5.1 Deskripsi Tanaman	15
2.5.2 Klasifikasi Tanaman	15
2.5.3 Morfologi Tanaman	16
2.5.4 Kandungan Senyawa	16
2.5.5 Efek Farmakologi	16
2.6 Ekstrak	17
2.7 Ekstraksi	18
2.7.1 Cara Dingin	18
2.7.2 Cara Panas	19

2.8 Skrining Fitokimia	22
2.8.1 Flavonoid	22
2.8.2 Alkaloid	22
2.8.3 Saponin	22
2.8.4 Steroid.....	22
2.8.5 Tanin	23
2.9 Asam Kojat	23
2.10 Spektrofotometri UV-Visibel	23
2.11 Microplate Reader ELISA	27
3 METODE PENELITIAN	28
3.1 Tempat Dan Waktu Penelitian	28
3.2 Sampel Uji	28
3.3 Prinsip Penelitian	28
3.4 Bahan Dan Alat Penelitian.....	29
3.4.1 Bahan	29
3.4.2 Alat.....	29
3.5 Metode Dan Tahap Penelitian	29
3.5.1 Determinasi Bahan	29
3.5.2 Pengumpulan Bahan	29
3.5.3 Ekstraksi Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume).....	29
3.5.4 Penapisan Fitokimia Serbuk Dan Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume)	30
3.5.4.1 Identifikasi Senyawa Flavonoid	30
3.5.4.2 Identifikasi Golongan Alkaloid	30
3.5.4.3 Identifikasi Golongan Steroid.....	31
3.5.4.4 Identifikasi Golongan Saponin	31
3.5.4.5 Identifikasi Golongan Tanin	31
3.5.5 Penentuan Kadar Flavonoid Total.....	31
3.5.6 Pembuatan Larutan Uji Penghambatan Enzim Tirosinase.....	33
3.5.6.1 Pembuatan Larutan Buffer Kalium Fosfat 50 Mm Ph 6,5.....	33
3.5.6.2 Pembuatan Larutan DMSO 10 %	33
3.5.6.3 Pembuatan Substrat L-DOPA 2 Mm	33
3.5.7 Pembuatan Larutan Enzim Tirosinase	33
3.5.8 Uji Penghambatan Enzim Tirosinase	34
3.5.8.1 Uji Larutan Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume).....	34
3.5.8.2 Uji Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Asam Kojat	34
3.6 Skema Penelitian	37
3.7 Analisis Data.....	38
4 HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Determinasi Bahan Uji	39
4.2 Pengumpulan Dan Pengolahan Bahan.....	39
4.3 Ekstraksi Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume)	39
4.4 Penapisan Fitokimia.....	41
4.5 Penetapan Kadar Total Flavonoid	43
4.6 Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol	

96 % Daun Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume)	46
5 KESIMPULAN DAN SARAN	50
5.1 Kesimpulan	50
5.2 Saran	50
DAFTAR REFERENSI	51
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

TABEL

Tabel 3.1 Komposisi Uji Penghambatan Enzim Tirosinase	35
Tabel 3.2 Peletakan Bahan Pada Sumur Plate Uji Inhibitor Tirosinase.....	35
Tabel 4.1 Rendemen Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume)	40
Tabel 4.2 Penapisan Fitokimia Serbuk Dan Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume).....	41
Tabel 4.3 Penetapan Kadar Flavonoid Total % (b/b) Pada Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume).....	44
Tabel 4.4 Interpretasi Hasil Koefisien Korelasi	45
Tabel 4.5 Uji Penghambatan Inhibitor Tirosinase Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume) Substrat L-DOPA (Difenolasi).....	48

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Lapisan Kulit.....	5
Gambar 2.2 Skema Reaksi Terbentuknya Melanin.....	10
Gambar 2.3 Daun Keladi Tikus	15
Gambar 2.4 Skema Kerja Spektrofotometri UV-VIS	25
Gambar 4.1 Kurva Kalibrasi Kuersetin Pada Panjang Gelombang Maksimum 425 mn.....	43
Gambar 4.2 Kurva Kalibrasi Difenolasi (Substrat L-DOPA) Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus	47
Gambar 4.3 Kurva Inhibisi Difenolasi (Substrat L-DOPA) Asam Kojat	47

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Determinasi	57
Lampiran 2 Surat Izin Penelitian.....	58
Lampiran 3 Surat Izin Penelitian Biofarmaka IPB	59
Lampiran 4 Alat Yang Digunakan Dalam Penelitian	60
Lampiran 5 Bahan Yang Digunakan Dalam Penelitian	61
Lampiran 6 Hasil Uji Skrining Fitokimia	63
Lampiran 7 Hasil Uji Skrining Kontrol Positif	65
Lampiran 8 Hasil Rendemen Daun Keladi Tikus	67
Lampiran 9 Hasil Perhitungan Uji Analisis Kadar Flavonoid Total.....	68
Lampiran 10 Hasil Perhitungan Penghambatan (%) Aktivitas Tirosinase Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (Typhonium flagelliforme (Lodd.) Blume) Substrat L-DOPA.....	71
Lampiran 11 Hasil Perhitungan Penghambatan (%) Asam Kojat Aktivitas Tirosinase Substrat L-DOPA	74
Lampiran 12 Hasil Perhitungan Nilai IC ₅₀ Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus	77
Lampiran 13 Hasil Perhitungan Nilai IC ₅₀ Asam Kojat	78

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara yang berada di sekitar garis ekuator memiliki iklim tropis yang dikarakterisasi dengan suhu tinggi dan radiasi sinar ultraviolet (UV) pada level tertinggi (Arifianti *et al*, 2017). Kulit merupakan bagian tubuh paling banyak terkena radikal bebas dari sinar ultraviolet (UV) yang berasal dari paparan sinar matahari dan dapat menyebabkan hiperpigmentasi (Kurniasari *et al.*, 2018). Hiperpigmentasi merupakan peristiwa yang terjadi akibat produksi pigmen kulit yang berlebihan. Proses tersebut dapat terjadi karena peningkatan proses melanogenesis yang memberikan warna coklat atau coklat kehitaman sehingga kulit menjadi gelap.

Warna kulit sangat dipengaruhi oleh keberadaan melanin, melanin merupakan zat yang memberikan warna coklat atau coklat kehitaman pada kulit, berperan sebagai pelindung kulit terhadap paparan radiasi ultra violet. Keberadaan melanin sangat dipengaruhi oleh enzim tirosinase, tirosinase adalah enzim pembatas laju yang terkait dengan sintesis melanin dalam melanosit. Enzim ini dapat mengkatalisis dua reaksi biosintesis melanin yaitu Ohidroksilasi dari asam amino L-tirosin menjadi L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), dan oksidasi subsekuen dari L-DOPA menjadi dopakuinon. Senyawa dopakuinon mempunyai kereaktifan yang sangat tinggi sehingga dapat mengalami polimerisasi secara spontan membentuk dopakrom yang kemudian menjadi melanin. Inhibitor tirosinase dibutuhkan dan berperan penting sebagai penghambat produksi melanin pada lapisan epidermis dan membuat kulit tampak lebih cerah. Pengujian inhibitor tirosinase dapat dilakukan dengan mengukur kemampuan ekstrak inhibitor tirosinase dengan mengukur kemampuan ekstrak untuk menghambat fase monofenolase (substrat L-Tirosin) dan difenolase (substrat L-DOPA) dengan menggunakan asam kojat sebagai kontrol positif (Mawaddah, Susilawati 2018).

Wanita-wanita Asia secara umum lebih menyukai kulit putih dari pada kulit coklat sehingga produk pencerah kulit menjadi segmen terbesar dan terus berkembang pada pasar perawatan kulit karena kulit yang cerah diasumsikan dengan indikasi terlihat lebih muda dan cantik, sehingga dibutuhkan agen depigmentasi pada produk pencerah kulit (Arifianti *et al*, 2017). Beberapa bahan pemutih seperti asam askorbat, arbutin, asam kojat, merkuri dan hidrokuinon telah banyak digunakan sebagai zat aktif dalam produk kosmetik. Sejak tahun 2008, BPOM melarang penggunaan sejumlah bahan pemutih dalam produk kosmetika, termasuk hidrokuinon dan merkuri karena bahan-bahan tersebut merupakan racun bagi melanosit. Dari beberapa senyawa tersebut, asam kojat memiliki efek inhibisi dan kestabilan paling besar dalam produk kosmetik, akan tetapi penggunaan asam kojat secara berlebihan dapat menyebabkan alergi dan bersifat karsinogenik pada kulit manusia. Oleh karena itu, penggunaan bahan kimia sintetis dalam sediaan pemutih dihindari. Penggunaan asam kojat sebagai kontrol positif dikarenakan asam kojat memiliki tingkat kestabilan yang tinggi dibandingkan dengan bahan yang lainnya. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dicari agen-agen depigmentasi kulit lain yang bersifat alami dengan efek samping kecil (Juwita, *et. al.*, 2011).

Indonesia adalah negara agraris yang kaya dengan berbagai jenis tumbuhan termasuk tumbuhan obat. Penggunaan tumbuhan sebagai obat telah digunakan secara tradisional karena adanya senyawa-senyawa bioaktif dari tanaman tersebut. Salah satu tanaman yang dapat dikembangkan sebagai obat dan kosmetik adalah daun keladi tikus (Hindun *et al.*, 2017). Keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) merupakan tanaman yang termasuk golongan rerumputan yang bentuknya menyerupai talas. Tanaman ini di Indonesia tersebar di sepanjang Pulau Jawa, sebagian Kalimantan, Sumatera dan Papua berkhasiat membunuh atau menghambat pertumbuhan sel kanker, menekan efek negatif dari proses pengobatan modern (kemoterapi) seperti rambut rontok, nafsu makan hilang, rasa mual dan rasa nyeri di tubuh, bersifat antivirus dan anti bakteri. Analisis fitokimia terhadap Keladi tikus menunjukkan bahwa terdapat kandungan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, glikosida, antioksidan, fitol dan asam lemak (*fatty acid*) (Katrin *et al.*, 2012).

Flavonoid merupakan polifenol alami yang banyak ditemukan dalam daun, batang dan bunga. Kemampuan depigmentasi kulit dari flavonoid dengan cara menghambat secara langsung aktivitas tirosinase pada proses melanogenesis. Ikatan flavonoid dengan tembaga serta efek antioksidannya dilaporkan berperan dalam menghambat kerja enzim tirosinase. Penghambatan pada aktivitas tirosinase memberikan efek yang menguntungkan pada beberapa individu, terutama pada kalangan wanita muda karena dengan adanya penghambat tirosinase akan meningkatkan kecerahan kulit dengan mengurangi efek penggelapan kulit. Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut karena merupakan pelarut organik dan tidak bersifat toksik, tidak menyebabkan pembengkakan membran sel, dan mampu mengendapkan albumin, serta menghambat kerja enzim (Charissa *et al.*, 2016).

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas penghambatan enzim tirosinase ekstrak etanol daun keladi tikus secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak etanol daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) mempunyai aktivitas inhibitor tirosinase terhadap substrat L-DOPA?
2. Berapa nilai IC_{50} pada daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* Lodd. Blume) dengan menggunakan substrat L-DOPA?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas inhibitor tirosinase pada ekstrak etanol daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) terhadap substrat L-DOPA.
2. Untuk menentukan nilai IC_{50} aktivitas penghambatan enzim tirosinase yang terdapat pada daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) terhadap substrat L-DOPA.

1.4 Manfaat

1. Dapat memberikan data informasi ilmiah mengenai senyawa kimia dalam daun keladi tikus yang dinilai memiliki aktivitas menghambat enzim tirosinase.
2. Memberikan informasi kepada peneliti lain mengenai bioaktivitas daun keladi tikus sehingga dapat dikembangkan untuk pengujian selanjutnya.
3. Meningkatkan dan mengembangkan produk-produk dari bahan alami.

BAB 2

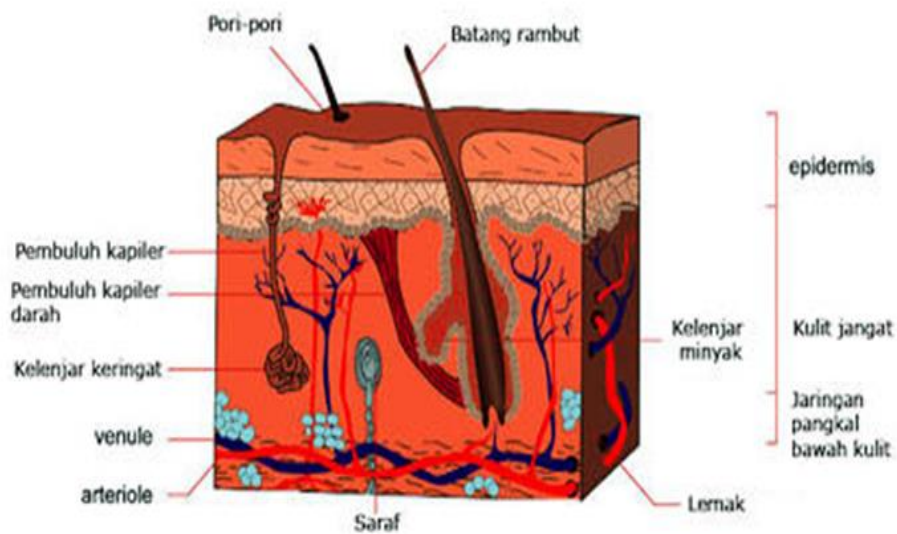
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit

2.1.1. Pengertian

Kulit merupakan organ tubuh terbesar pada manusia yang memiliki fungsi proteksi. Pada manusia dewasa dengan berat 70 kg berat kulit mencapai 5 kg dan melapisi seluruh permukaan tubuh seluas 2 m². Kulit memiliki fungsi sebagai barier fisik, perlindungan terhadap agen infeksius, termoregulasi, sensasi, proteksi terhadap sinar ultraviolet (UV), serta regenerasi dan penyembuhan luka (Murlistyarini, *et al*, 2018)

2.1.2. Struktur Kulit



Gambar 2.1 Struktur Lapisan Kulit
(Sumber : Mescher, 2010)

Secara histopologis kulit tersusun atas 3 lapisan utama yaitu :

2.1.2.1 Lapisan Epidermis

Epidermis merupakan lapisan paling luar kulit dan terdiri atas epitel berlapis gepeng dengan lapisan tanduk. Epidermis hanya terdiri dari jaringan epitel, tidak mempunyai pembuluh darah maupun limf, oleh karena itu semua nutrien dan oksigen diperoleh dari kapiler pada lapisan dermis. Epitel berlapis gepeng pada epidermis ini tersusun oleh banyak lapis sel yang disebut keratinosit. Sel-sel ini secara tetap diperbarui melalui mitosis sel-sel dalam lapis basal yang secara berangsur digeser ke permukaan epitel. Selama perjalanannya, sel-sel ini berdiferensiasi, membesar, dan mengumpulkan filamen keratin dalam sitoplasmanya. Mendekati permukaan, sel-sel ini mati dan secara tetap dilepaskan (terkelupas). Waktu yang dibutuhkan untuk mencapai permukaan adalah 20 sampai 30 hari. Modifikasi struktur selama perjalanan ini disebut sitomorfosis dari sel-sel epidermis. Bentuknya yang berubah pada tingkat berbeda dalam epitel memungkinkan pembagian dalam potongan histologik tegak lurus terhadap permukaan kulit. Epidermis terdiri atas 5 lapisan yaitu, dari dalam ke luar, stratum basal, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lusidum, dan stratum korneum (Kalangi, 2013).

a. Stratum Basal (Lapis Basal, Lapis Benih)

Lapisan ini terletak paling dalam dan terdiri atas satu lapis sel yang tersusun berderet-deret di atas membran basal dan melekat pada dermis di bawahnya. Selselnya kuboid atau silindris. Intinya besar, jika dibanding ukuran selnya, dan sitoplasmanya basofilik. Pada lapisan ini biasanya terlihat gambaran mitotik sel, proliferasi selnya berfungsi untuk regenerasi epitel. Sel-sel pada lapisan ini bermigrasi ke arah permukaan untuk memasok sel-sel pada lapisan yang lebih superfisial. Pergerakan ini dipercepat oleh adalah luka, dan regenerasinya dalam keadaan normal cepat (Kalangi, 2013).

b. Stratum Spinosum (Lapis Tajuk)

Lapisan ini terdiri atas beberapa lapis sel yang besar-besar berbentuk poligonal dengan inti lonjong. Sitoplasmanya kebiruan. Bila dilakukan

pengamatan dengan pembesaran obyektif 45x, maka pada dinding sel yang berbatasan dengan sel di sebelahnya akan terlihat taju-taju yang seolah-olah menghubungkan sel yang satu dengan yang lainnya. Pada taju inilah terletak desmosom yang melekatkan sel-sel satu sama lain pada lapisan ini. Semakin ke atas bentuk sel semakin gepeng (Kalangi, 2013).

c. *Stratum Granulosum* (Lapis Berbutir)

Lapisan ini terdiri atas 2-4 lapis sel gepeng yang mengandung banyak granula basofilik yang disebut granula keratohialin, yang dengan mikroskop elektron ternyata merupakan partikel amorf tanpa membran tetapi dikelilingi ribosom. Mikrofilamen melekat pada permukaan granula (Kalangi, 2013).

d. *Stratum Lusidum* (Lapis Bening)

Lapisan ini dibentuk oleh 2-3 lapisan sel gepeng yang tembus cahaya, dan agak eosinofilik. Tak ada inti maupun organel pada sel-sel lapisan ini. Walaupun ada sedikit desmosom, tetapi pada lapisan ini adhesi kurang sehingga pada sajian seringkali tampak garis celah yang memisahkan *stratum korneum* dari lapisan lain di bawahnya (Kalangi, 2013).

e. *Stratum Korneum* (Lapis Tanduk)

Lapisan ini terdiri atas banyak lapisan sel-sel mati, pipih dan tidak berinti serta sitoplasmanya digantikan oleh keratin. Selsel yang paling permukaan merupakan sisik zat tanduk yang terdehidrasi yang selalu terkelupas (Kalangi, 2013).

2.1.2.2 Lapisan Dermis

Dermis terdiri atas *stratum papilaris* dan *stratum retikularis*, batas antara kedua lapisan tidak tegas, serat antaranya saling menjalin.

a. *Lapisan Papilaris*

Lapisan ini tersusun lebih longgar, ditandai oleh adanya papila dermis yang jumlahnya bervariasi antara 50 – 250/mm². Jumlahnya terbanyak dan lebih dalam pada daerah di mana tekanan paling besar, seperti pada telapak kaki. Sebagian besar papila mengandung pembuluh-pembuluh kapiler yang

memberi nutrisi pada epitel di atasnya. Papila lainnya mengandung badan akhir saraf sensoris yaitu badan Meissner. Tepat di bawah epidermis serat-serat kolagen tersusun rapat (Kalangi, 2013).

b. Lapisan Retikularis

Lapisan ini lebih tebal dan dalam. Berkas-berkas kolagen kasar dan sejumlah kecil serat elastin membentuk jalinan yang padat ireguler. Pada bagian lebih dalam, jalinan lebih terbuka, rongga-rongga di antaranya terisi jaringan lemak, kelenjar keringat dan sebacea, serta folikel rambut. Serat otot polos juga ditemukan pada tempat-tempat tertentu, seperti folikel rambut, skrotum, preputium, dan puting payudara. Pada kulit wajah dan leher, serat otot skelet menyusupi jaringan ikat pada dermis. Otot-otot ini berperan untuk ekspresi wajah. Lapisan retikular menyatu dengan hipodermis/fasia superfisial di bawahnya yaitu jaringan ikat longgar yang banyak mengandung sel lemak (Kalangi, 2013).

2.1.2.3 Lapisan Subkutan

Lapisan subkutan atau hypodermis (fasia superfisal) mengikat kulit secara longgar dengan organ-organ yang terdapat di bawahnya. Lapisan ini mengandung jumlah sel lemak yang beragam, bergantung pada area tubuh dan nutrisi individu, serta berisi banyak pembuluh darah ujung saraf (Sloane, 2004).

2.1.3. Warna Kulit

Warna kulit ditentukan oleh tiga faktor, yaitu: pigmen melanin berwarna coklat dalam stratum basal, derajat oksigenasi darah dan keadaan pembuluh darah dalam dermis yang memberi warna merah serta pigmen empedu dan karoten dalam lemak subkutan yang memberi warna kekuningan. Perbedaan warna kulit tidak berhubungan dengan jumlah melanosit tetapi disebabkan oleh jumlah granul-granul melanin yang ditemukan dalam keratinosit (Kalangi, 2013).

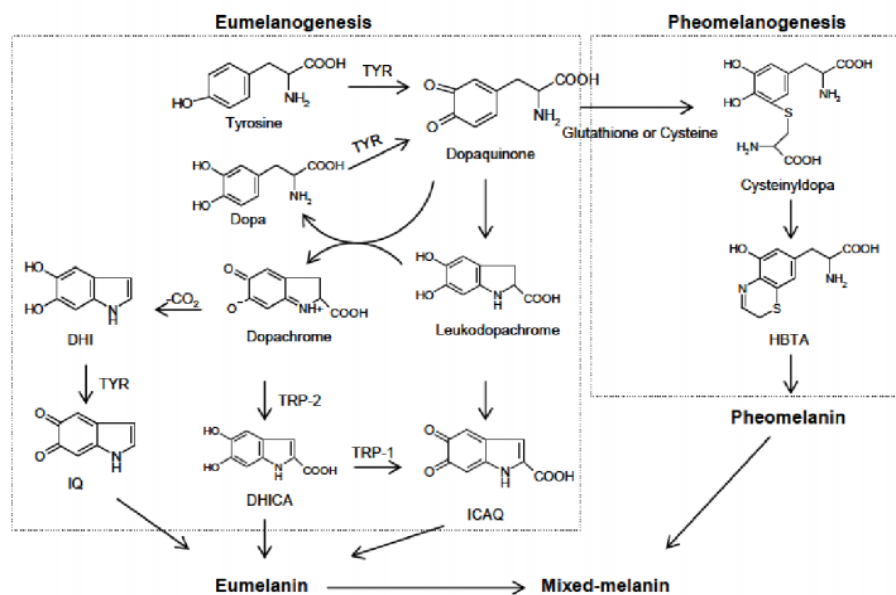
2.1.4. Melanosit

Melanosit adalah sel khusus yang terdapat dalam stratum basal epidermis atau dalam dermis dibawahnya dan menunjukkan banyak cabang sel yang disebut dendrit diantara keratinosit sekitarnya. Melanosit merupakan sel yang dapat mensintesis enzim tirosinase, enzim tersebut jika bergabung dalam melanosom, dapat memulai sintesis dan deposit dari melanin. Oleh sebab itu melanosit adalah komponen penting dalam sistem pigmentasi kulit (Kalangi, 2013).

Cara terbaik untuk mengidentifikasi melanosit adalah menggunakan reaksi DOPA (*Dihidroksyphenylalanine*) yaitu epidermis yang telah dikupas dari dermis kemudian diinkubasi dalam suatu bakal untuk melanin yaitu DOPA. DOPA dioksidasi oleh enzim tirosinase di dalam melanosit untuk menghasilkan melanin coklat tua, sedangkan sitoplasma melanosit terpulas agak kelabu (Mamoto, Kalangi, Karundeng, 2013).

Sebagai komponen suatu sistem jaringan pengatur, melanosit menghasilkan beberapa sitokin antara lain IL-1 (*Interleukin-1*), IL-6 (*Interleukin-6*) dan TNF- α (*Tumor Necrotic Factor- alpha*) yang bekerja menghambat proses melanogenesis melalui penurunan aktivitas enzim tirosinase dan proliferasi melanosit. Melanosit dapat menghasilkan neuropeptida dan neuro-transmitter yang merupakan komponen penting terhadap jalur komunikasi antara kulit dan sistem saraf pusat. Sebagai komponen sistem imun kulit, melanosit mampu mengekspresikan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II, *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-I) dan menghasilkan beberapa sitokin. Melanosit mampu berfungsi sebagai fagositosis dan mempunyai melanosom yang seolaholah bertindak sebagai lisosom (*lysosome like function*) (mamoto *et al.*, 2009).

2.1.5. Melanin



Gambar 2.2 Skema Reaksi Terbentuknya Melanin
(Sumber : Chang, 2012)

Melanin merupakan sel yang menentukan warna kulit, menyerap sinar UV dan menghalangi pembentukan radikal bebas. Sehingga dapat melindungi kulit dari kerusakan akibat sinar matahari dan penuaan dengan cara menyerap sinar matahari UV dan membuang oksigen yang reaktif. Melanin merupakan hasil sintesis yang dihasilkan sel melanosit dalam organel khususnya, yaitu melanosom. Melanosom yang berisi melanin dipindahkan oleh sel melanosit ke kreatinosit yang berdekatan dengan lapisan basal. Dengan bertambahnya usia individu, maka jumlah melanosit yang dihasilkan pun menurun (Charissa, 2016).

2.1.6. Melanogenesis

Melanogenesis merupakan proses biosintesis dari melanin. Proses biosintesis melanin baik eumelanin maupun feomelanin memerlukan enzim yang merupakan prekursor inisiasi tirosin, yaitu tirosinase. Enzim tirosinase bergantung pada tembaga dan berperan dalam proses awal katalis untuk mengkonversi tirosin menjadi L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), dan selanjutnya teroksidasi menjadi dopakuinon. Sistein selanjutnya akan

mengubah dopakuinon menjadi sistein DOPA, dan akan teroksidasi, juga terpolimerisasi menjadi feomelanin yang berwarna kuning kemerahan, dan merupakan melanin yang larut. Jika tidak ada senyawa thiol (sistein dan *glutation* atau *thioredoxin*), dopakuinon akan berlangsung menjadi dopakrom yang berwarna coklat kehitaman. Dopakrom secara spontan akan kehilangan asam karboksilat dan 5,6 *dihydroxyndole* (DHI) yang segera teroksidasi dan terpolimerisasi menjadi coklat kehitaman. Dopakrom tautomerase (TYRP2/DCT) akan mengubah dopakrom menjadi DHI-2-carboxyl acid (DHICA). Selanjutnya tirosinase dan TYRP1 akan mengkonversi menjadi melanin DHICA berwarna coklat terang. Melanin DHI dan melanin berwarna coklat kehitaman yang disebut sebagai eumelanin (Suryaningsih dan Soebono, 2016).

2.1.7 Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi merupakan kelainan kulit akibat adanya peningkatan deposisi melanin kutaneus baik karena peningkatan sintesis melanin, peningkatan jumlah melanosit, atau gangguan distribusi unit epidermal melanin ke keratinosit. Sebagian besar perubahan warna yang terjadi bergantung pada lokasi deposisi melanin. Salah satu penyebab umum dari hiperpigmentasi adalah paparan sinar matahari yang berlebih dan kerusakan kulit yang disebabkan.

Paparan sinar matahari yang berlebihan akan meningkatkan jumlah melanin di kulit. Hal ini pada akhirnya dapat mengakibatkan bintik-bintik gelap pada bagian kulit yang sering terbuka yakni tangan dan wajah. Penyebab lain hiperpigmentasi adalah usia seseorang. Hal ini dikarenakan saat usia bertambah, kemampuan kulit untuk beregenerasi berkurang. Bercak-bercak ini memiliki warna bervariasi mulai dari coklat terang hingga hitam. Flek berwarna coklat sampai berwarna hitam ini berkembang karena sel-sel kulit memproduksi antioksidan dan mengeluarkan melanin berlebih untuk mencegah kerusakan akibat polutan. Faktor genetik atau keturunan juga sangat mempengaruhi jumlah melanin pada kulit. Selain itu, hiperpigmentasi juga terjadi sebagai akibat dari kerusakan kulit, terutama kerusakan akibat

jerawat/akne. Acne adalah penyakit kulit yang terjadi akibat peradangan menahun folikel pilosebacea yang ditandai dengan adanya komedo, papul, pustul, nodus, pada tempat predileksinya (Fajarini, 2015).

2.2 Enzim

Enzim menyusun sebagian besar total protein dalam sel. Suatu sel dapat memuat 2000 jenis molekul enzim. Enzim berfungsi sebagai katalisator, yaitu mempercepat laju suatu reaksi kimia tanpa ikut terlibat dalam reaksi tersebut. Enzim tidak ikut berubah menjadi produk tetapi akan kembali ke bentuk asalnya setelah reaksi kimia selesai. Enzim mengubah molekul substrat menjadi hasil reaksi (produk) yang molekulnya berada dari substrat. Enzim merupakan katalisator (protein katalitik) untuk reaksi-reaksi kimia didalam sistem biologi. Enzim memiliki ciri khas sebagai berikut :

1. Bersifat tidak diubah oleh reaksi yang dikatalisnya
2. Enzim tidak mengubah kedudukan normal dari kesetimbangan kimia, meskipun enzim mempercepat reaksi.

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya konsentrasi substrat, pH, suhu dan inhibitor (penghambat). Pengaruh tersebut dapat mengganggu stabilitas enzim dan stabilitas merupakan sifat penting enzim dalam aplikasinya sebagai biokatalis (Susanti dan Fibriana, 2017).

2.3 Tirosinase

Tirosinase yang juga dikenal dengan nama polifenol oksidase adalah enzim yang tersebar luas pada tumbuhan dan hewan. Enzim ini telah diisolasi dan dipelajari pada berbagai spesies tumbuhan, hewan dan jamur. Tirosinase dari berbagai spesies memiliki perbedaan pada bentuk struktur primernya, ukuran, pola glikosilasi dan karakteristik aktivasinya. Akan tetapi semua tirosinase memiliki persamaan yaitu mempunyai dua atom tembaga tipe III pada sisi aktifnya yang masing-masing diikat oleh 3 residu histidin (Lukitaningsih, Mustikawaty, Sudarmanto, 2013).

Tirosinase merupakan enzim pembatas laju yang terkait dengan sintesis melanin dalam melanosit. Tirosinase mengandung monooxygenase dan mengkatalisis dua reaksi utama: monophenolase, hidroksilasi L-tirosinase dan difenolase, dan oksidasi L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine). Penghambatan aktivitas tirosinase (monophenolase dan difenolase) akan menurunkan sintesis melanin (Mawadah, 2018). Monofenolase adalah reaksi antara enzim dengan substrat L-tirosin, dimana enzim dapat mengubah L-tirosin menjadi L-DOPA, selanjutnya enzim tersebut mengubah L-DOPA menjadi dopakuinon yang disebut dengan reaksi difenolase. Setelah itu, dopakuinon akan membentuk melanin yang memicu terjadinya pencoklatan pada kulit (Utami, 2014).

Senyawa dopakuinon mempunyai kereaktifan yang sangat tinggi dan dapat dipolimerisasi secara spontan membentuk melanin. Adanya inhibitor tirosinase akan menghambat reaksi pencoklatan atau pembentukan melanin. Berbagai inhibitor tirosinase telah banyak ditemukan dalam bahan kosmetik sebagai pencegah hiperpigmentasi, diantaranya adalah asam askorbat, arbutin, asam kojat, merkuri dan hidrokuinon. Dari beberapa senyawa tersebut, asam kojat memiliki efek inhibisi dan kestabilan paling besar dalam produk kosmetik.

2.4 Penghambatan Tirosinase

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

Agen penghambat tirosinase dikelompokkan menjadi lima golongan yaitu senyawa polifenol, turunan benzaldehid dan benzoat, steroid dan lipid rantai panjang, agen penghambat alami atau sintetik, dan agen inaktivator ireversibel.

Polifenol merupakan senyawa yang termasuk kelompok paling besar sebagai penghambat tirosinase. Flavonoid yang termasuk dalam golongan polifenol banyak tersebar di daun, biji, kayu dan bunga pada tanaman. Isoflavon yang termasuk dalam flavonoid memiliki mekanisme menghambat dan mengkhelat logam tembaga (Cu) pada enzim tirosinase akibat adanya gugus hidroksi pada cincin A dan B (gugus OH pada C6-C8 dan C2-C4). Adanya gugus hidroksi pada cincin benzen memiliki peran penting dalam aktivitas hambatan enzim tirosinase, sedangkan adanya gugus metil dan konjugat gula pada cincin benzen dapat menurunkan aktivitas penghambatan (Chang, 2009).

Penghambatan terhadap aktivitas tirosinase merupakan salah satu cara untuk dapat mencerahkan kulit, karena dengan demikian melanin yang dihasilkan akan berkurang. Untuk mengetahui penghambatan aktivitas tirosinase sebagai pemutih kulit dapat dilakukan dengan tiga cara. Pertama, uji *in vivo* dengan mengukur warna kulit dan jumlah melanin menggunakan instrumen pada kulit yang telah diberikan sediaan. Kedua, uji *ex vivo* dengan menginkubasi kultur epidermis manusia dengan senyawa pemutih lalu mengukur banyaknya dendrit yang terbentuk. Ketiga, uji *in vitro* dengan mengukur produk dopakrom. Cara ketiga merupakan cara yang paling mudah dilakukan karena tidak menggunakan manusia sebagai subyek atau kultur epidermis (Litner dan Sederma, 2010).

Prinsip kerja dari metode *invitro* ini berdasarkan pada adanya produk dopakrom yang merupakan hasil oksidasi L-DOPA oleh enzim tirosinase. Senyawa pemutih kulit akan berkompetisi dengan L-DOPA tersebut untuk berikatan dengan enzim tirosinase. Kompetisi tersebut akan mengurangi jumlah produk dopakrom yang akan dihasilkan sehingga aktivitas penghambatan senyawa pemutih dapat dihitung. Dopakrom yang terbentuk akan berwarna jingga tua hingga merah sehingga dapat diukur serapannya dengan cara kolorimetri dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Litner dan Sederma, 2010).

2.5 Tanaman Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume)

2.5.1 Deskripsi Tanaman

Keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* L) merupakan tanaman herbal dari famili Araceae, tanaman sejenis talas, termasuk tumbuhan semak, menyukai tempat lembab yang tak terkena sinar matahari langsung. Tanaman keladi tikus ini berbatang basah, biasanya tumbuh di tempat terbuka pada ketinggian 1000 meter di atas permukaan laut. Bentuk daun dari tanaman keladi tikus bulat dengan ujung runcing berbentuk jantung, berwarna hijau segar. Umbi tanaman keladi tikus berbentuk bulat rata sebesar buah pala (Zakiyana, Supriatno, Medawati, 2010). Nama lokal keladi tikus, diberikan pada tumbuhan ini mungkin karena suatu proses yang menyerupai ekor tikus pada ujung tongkol bunganya. Tanda pengenal jenis tumbuhan ini di lapangan yang paling mudah terlihat adalah proses tersebut (Rachman, 2009).

2.5.2 Klasifikasi Tanaman



Gambar 2.3 Daun Keladi Tikus

(Sumber : Harfia, 2006)

Kingdom : Plantae
 Sub Kingdom : Tracheobionta
 Super Divisi : Spermatophyta
 Divisi : Angiospermae
 Kelas : Dicotyledonae
 Bangsa : Alismatales
 Suku : Araceae
 Marga : Typhonium
 Jenis : *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume
 Nama Daerah : Keladi tikus, bira kecil, daun panta susu, ki babi, trenggiling mentik, ileus, kalamoyang

2.5.3 Morfologi Tanaman

Morfologi tanaman keladi tikus adalah berdaun tunggal yang muncul dari umbi, berwarna hijau segar dan tersusun roset. Panjang daun 6-16 cm, berbentuk lonjong dengan ujung menajam seperti ombak. Keladi tikus memiliki ciri khas yaitu mahkota bunganya unik mirip keladi (ekor) tikus. Bunganya muncul dari roset akar, bertangkai, panjang 4-8 cm dan kelopak bunga bulat lonjong berwarna kekuning-kuningan. Bagian atas kelopak memanjang 5-21 cm dan ujungnya meruncing menyerupai ekor tikus. Umbi keladi tikus ini berbentuk bulat rata sebesar buah pala. Bagian dalam maupun luar umbi berwarna putih (Iswantini, Syabirin, Affandi, 2009).

2.5.4 Kandungan Senyawa

Senyawa yang berkhasiat dalam tanaman ini adalah alkaloid, saponin, steroid, dan glikosida. Seluruh bagian tanaman keladi tikus mengandung senyawa antikanker yaitu baik pada akar, umbi, batang, maupun daun (Sianipar, Purnamaningsih, Rosaria, 2016).

2.5.5 Efek farmakologi

Keladi tikus bermanfaat dalam mengobati kanker paru-paru dan payudara, hati, leukemia, usus, kelenjar prostat, dan leher rahim. Aktivitas antikanker keladi tikus juga terlihat dalam mencegah kanker payudara dan rahim. Aktivitas biologis

lain yang dimiliki oleh tanaman keladi tikus antara lain efek antibakteri, antioksidan, toksik terhadap *Artemia salina* dan memicu apoptosis (Sianipar, Purnamaningsih, Rosaria, 2016).

2.6 Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia alami dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk tersisa diperlukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Sebagian ekstrak dibuat dengan cara destilasi dengan pengurangan tekanan, agar bahan utama obat sedikit mungkin terkena panas (Farmakope Indonesia IV, 1995).

Ekstrak dikelompokkan atas dasar sifatnya, yaitu :

1. Ekstrak encer adalah sediaan yang memiliki konsistensi semacam madu dan dapat dituang.
2. Ekstrak kental adalah sediaan yang dilihat dalam keadaan dingin dan tidak dapat dituang. Kandungan airnya berjumlah sampai 30%. Tingginya kandungan air menyebabkan ketidakstabilan sediaan obat karena cemaran bakteri.
3. Ekstrak kering adalah sediaan yang memiliki konsistensi kering dan mudah dituang, sebaiknya memiliki kandungan lembab tidak lebih dari 5%.
4. Ekstrak cair, ekstrak yang dibuat sedemikianya sehingga 1 bagian simplisia sesuai dengan 2 bagian ekstrak cair.

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

2.7 Ekstraksi

Ekstraksi atau penyarian merupakan proses pemisahan senyawa dari matriks atau simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Metode ekstraksi yang digunakan tergantung pada jenis, sifat fisik, dan sifat kimia senyawa yang akan diekstraksi. Pelarut yang digunakan tergantung pada polaritas senyawa yang akan disari, mulai dari yang bersifat non polar hingga polar, sering disebut ekstraksi bertingkat. Pelarut yang digunakan dimulai dengan heksana, petroleum eter, lalu kloroform, alkohol, metanol, dan air. (Hanani, 2015). Ada beberapa metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut diantaranya:

2.7.1 Cara Dingin

Ekstraksi cara dingin memiliki keuntungan dalam proses ekstraksi total, yaitu memperkecil kemungkinan terjadinya kerusakan pada senyawa termolabil yang terdapat pada sampel. Sebagian besar senyawa dapat terekstraksi dengan ekstraksi cara dingin, walaupun ada beberapa senyawa yang memiliki keterbatasan kelarutan terhadap pelarut pada suhu ruangan. Terdapat sejumlah metode ekstraksi, yang paling sederhana adalah ekstraksi dingin (dalam labu besar berisi biomasa yang diagitasi menggunakan stirer), dengan cara ini bahan kering hasil gilingan diekstraksi pada suhu kamar secara berturut-turut dengan pelarut yang kepolarannya makin tinggi. Keuntungan cara ini merupakan metode ekstraksi yang mudah karena ekstrak tidak dipanaskan sehingga kemungkinan kecil bahan alam menjadi terurai. Penggunaan pelarut dengan peningkatan kepolaran bahan alam secara berurutan memungkinkan pemisahan bahan-bahan alam berdasarkan kelarutannya (dan polaritasnya) dalam pelarut ekstraksi. Hal ini sangat mempermudah proses isolasi. Ekstraksi dingin memungkinkan banyak senyawa terekstraksi, meskipun beberapa senyawa memiliki pelarut ekstraksi pada suhu kamar.

1. Maserasi

Maserasi adalah cara ekstraksi simplisia dengan merendam dalam pelarut pada suhu kamar sehingga kerusakan atau degradasi metabolit dapat diminimalisasi. Pada maserasi terjadi proses keseimbangan konsentrasi antara

larutan di luar dan didalam sel sehingga diperlukan penggantian pelarut secara berulang.

2. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut yang selalu baru, dengan mengalirkan pelarut melalui simplisia hingga senyawa tersari sempurna. Cara ini memerlukan waktu lebih lama dan pelarut yang lebih banyak. Untuk meyakinkan perkolasi sudah sempurna, perkolat dapat diuji adanya metabolit dengan pereaksi yang spesifik.

2.7.2 Cara Panas

1. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.

2. Soxletasi

Sokletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Biomasa ditempatkan dalam wadah soklet yang dibuat dengan kertas saring, melalui alat ini pelarut akan terus direfluks. Alat soklet akan mengkosongkan isinya kedalam labu dasar bulat setelah pelarut mencapai kadar tertentu. Setelah pelarut segar melawati alat ini melalui pendingin refluks, ekstraksi berlangsung sangat efisien dan senyawa dari biomasa secara efektif ditarik kedalam pelarut karena konsentrasi awalnya rendah dalam pelarut (Depkes RI, 2000).

3. Infus

Infus adalah cara ekstraksi dengan menggunakan pelarut air, pada suhu 96-98°C selama 15-20 menit (dihitung setelah suhu 96°C tercapai). Bejana infusa tercelup dalam tangas air. Cara ini sesuai untuk simplisia yang bersifat lunak, seperti bunga dan daun (Hanani, 2015).

4. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50⁰ C (Depkes RI, 2000).

5. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (suhu lebih dari 30°C) dan temperatur sampai titik didih air (Depkes RI, 2000).

Cara Ekstraksi Lainnya :

1. Ekstraksi Berkesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi (Depkes RI, 2000).

2. Superkritikal Karbondioksida

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel tekanan dan temperatur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak (Depkes RI, 2000).

3. Ekstraksi Ultrasonik

Getaran ultrasonik (>20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelebung spontan (Cavitation) sebagai stres dinamis serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi (Depkes RI, 2000).

4. Ekstraksi energi listrik

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta “*Electric-discharges*” yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelombang tekanan berkecepatan ultrasonik (Depkes RI, 2000).

2.8 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan analisis kualitatif terhadap senyawa-senyawa metabolit sekunder, suatu ekstrak dari bahan alam terdiri atas berbagai macam metabolit sekunder yang berperan dalam aktivitas biologinya. Senyawa-senyawa tersebut dapat diidentifikasi dengan pereaksi-pereaksi yang mampu memberikan ciri khas dari setiap golongan dari metabolit skunder (Feliana, Mursiti, Harjono, 2018).

2.9.1. Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan tinggi seperti bunga, daun, buah, kayu, akar, biji, dan kulit kayu. Flavonoid termasuk senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Manfaat flavonoid antara lain untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, antiinflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik (Feliana, Mursiti, Harjono, 2018).

2.9.2. Alkaloid

Alkaloid merupakan suatu basa organik yang mengandung unsur Nitrogen (N) pada umumnya berasal dari tanaman, yang mempunyai efek fisiologis kuat terhadap manusia. Kegunaan senyawa alkaloid dalam bidang farmakologi adalah untuk memacu sistem syaraf, menaikkan tekanan darah, dan melawan infeksi mikrobial. Ekstraksi senyawa alkaloid dilakukan dengan menggunakan metode maserasi, metode ini dipilih karena pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diperoleh maseratnya, serta proses perendaman yang cukup lama diharapkan dapat menarik lebih banyak zat aktif yang terkandung di dalam simplisia. Tahap selanjutnya yaitu diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi

umum alkaloid dan Kromatografi Lapis Tipis. (Wullur, Schadu, Wardhani. 2012).

2.9.3. Saponin

Kata saponin berasal dari tanaman *Saponaria vaccaria*, yaitu tanaman yang dapat digunakan sebagai sabun dan ternyata mengandung saponin. Saponin termasuk senyawa yang larut dalam air, tidak larut dalam eter, dan jika dihidrolisis akan menghasilkan aglikon. Saponin merupakan senyawa yang bersifat racun karena dapat menyebabkan terjadinya hemolisis darah. Saponin bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa yang stabil dalam air (Hanani, 2016).

2.9.4. Steroid

Steroid merupakan terpenoid lipid yang dikenal dengan empat cincin kerangka dasar karbon yang menyatu. Struktur senyawanya pun cukup beragam. Perbedaan tersebut disebabkan karena adanya gugus fungsi teroksidasi yang terikat pada cincin dan terjadinya oksidasi cincin karbonya. Steroid berperan penting bagi tubuh dalam menjaga keseimbangan garam, mengendalikan metabolisme dan meningkatkan fungsi organ seksual serta perbedaan fungsi biologis lainnya antara jenis kelamin. Tubuh manusia memproduksi steroid secara alami yang terlibat dalam berbagai proses metabolisme. Sebagai contoh steroid dari garam empedu, seperti garam deoksikolik, asam kholik dan glisin serta konjugat taurin yang berfungsi memperlancar proses pencernaan.

Berdasarkan sumbernya steroid dibedakan atas steroid sintetis dan alami. Steroid sintetis yang umum digunakan adalah glukokortikosteroid, estrogen, metilprednisolon, kortikosteroid, androgen, squalamine dan hydrocortisone. Senyawa ini juga digunakan untuk pengobatan penyakit akibat kelebihan atau kekurangan hormon, penyakit berbahaya serta penyakit lainnya seperti radang sendi dan alergi. Sterol tumbuhan yang telah lama dikenal adalah campesterol, stigmasterol dan β -sitosterol. Sterol ini menunjukkan efek menurunkan kolesterol dan antikarsinogenik. Efek antiangiogenik diduga melibatkan aksi senyawa tersebut sebagai antikanker. Stigmasterol dimungkinkan untuk mencegah penyakit

kanker tertentu, misalnya kanker ovarium, prostat, payudara dan kanker usus besar karena mempunyai potensi antioksidan, hipoglikemik dan mampu menghambat tiroid (Nasrudin *et al*, 2017).

2.9.5 Tanin

Tanin merupakan suatu senyawa polifenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan karboksil. Senyawa tanin terdiri dari dua jenis yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis (Sari, Rita, Puspawati, 2015). Tanin mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, antidiare, antibakteri dan antioksidan. Selain itu tanin juga bermanfaat sebagai pelindung tanaman ketika masa pertumbuhan dari bagian tertentu tanaman, misalnya pada bagian buah, saat masih muda akan terasa pahit dan sepat (Mukhriani, Nonci, Mumang, 2014).

2.9 Asam kojat

Asam kojat adalah turunan jamur yang bersifat hidrofilik yang digunakan sebagai bahan untuk mengatasi gangguan hiperpigmentasi. Pada sediaan krim reans, konsentrasi maksimum asam kojat yang digunakan adalah 2%. Efektivitas krim asam kojat dapat ditingkatkan, dengan menambahkan zat penetrasi untuk membantu penetrasi dari asam kojat Asam kojat banyak digunakan sebagai bahan dasar untuk produksi pemutih kulit, lotion pelindung kulit, sabun pemutih hingga pemutih gigi. Kemampuan asam kojat mampu menahan pembentukan melanin melalui penghambata tirosinase dengan memperlambat aktivitas difenolase tirosinase. Hasil penelitian telah dilaporkan bahwa asam kojat mampu mereduksi eumelanin dengan menghambat melanogenesis dan hiperpigmentasi yang disebabkan oleh paparan sinar UV. Saat ini asam kojat digunakan sebagai bahan dasar untuk pencerah kulit yang sangat baik pada kosmetik. Disisi lain penggunaan hidrokuinon telah dilarang, sehingga terjadi peningkatan dalam penggunaan asam kojat sebagai pengganti hidrokuinin (Nisa, et. Al, 2013).

2.10 Spektrofotometri UV-Visibel

Spektrofotometri Ultraviolet visibel adalah metode analisa yang didasarkan atas pengukuran intensitas cahaya pada panjang gelombang yang sesuai.

Spektrofotometri UV dan visibel digunakan untuk tujuan analisis kualitatif dan kuantitatif. Spektrofotometri UV mempunyai kisaran sinar dengan panjang gelombang 200-400 nm, sedangkan sinar visible (tampak) adalah pada panjang gelombang 400-900 nm. Pada metode spektrofotometri UV materi menyerap cahaya ultra ungu (ultraviolet = UV). Dengan cara ini larutan tak berwarna dapat diukur. Berupa senyawa organik yang mengandung gugus kromofor yaitu diene terkonjugasi ($C=C-C=C$) dan enon (ketena) ($C=C-C=O$). Spektrofotometri visible (tampak) adalah untuk analisis senyawa berwarna. Senyawa tak berwarna dapat dibuat berwarna dengan mereaksikannya dengan pereaksi yang menghasilkan senyawa berwarna. Contohnya, ion Fe^{3+} dengan ion CNS^- menghasilkan larutan berwarna merah (Ibrahim, 2013).

Prinsip kerja Spektrofotometer UV-Vis yaitu apabila cahaya monokromatik melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya tersebut diserap (I), sebagian dipantulkan (I_r), dan sebagian lagi dipancarkan (I_t). Aplikasi rumus tersebut dalam pengukuran kuantitatif dilaksanakan dengan cara komparatif menggunakan kurva kalibrasi dari hubungan konsentrasi deret larutan alat untuk analisa suatu unsur yang berkadar rendah baik secara kuantitatif maupun secara kualitatif, pada penentuan secara kualitatif berdasarkan puncak-puncak yang dihasilkan spektrum dari suatu unsur tertentu pada panjang gelombang tertentu, sedangkan penentuan secara kuantitatif berdasarkan nilai absorbansi yang dihasilkan dari spektrum dengan adanya senyawa pengompleks sesuai unsur yang dianalisisnya. Adapun yang melandasi pengukuran spektrofotometer ini dalam penggunaannya adalah hukum Lambert-Beer yaitu bila suatu cahaya monokromatis dilewatkan melalui suatu media yang transparan, maka intensitas cahaya yang ditransmisikan sebanding dengan tebal dan kepekaan media larutan yang digunakan berdasarkan persamaan berikut :

$$A = \log I/I_0 \text{ atau } A = a.b.c(I) \dots\dots\dots (1)$$

Dimana :

A = absorbansi

a = koefisien serapan molar

b = tebal media cuplikan yang dilewati sinar

c = konsentrasi unsur dalam larutan cuplikan

I_0 = intensitas sinar mula-mula

I = intensitas sinar yang diteruskan

$$Y = ax - b \dots\dots\dots (2)$$

Dimana :

Y = absorbansi

a = konstanta

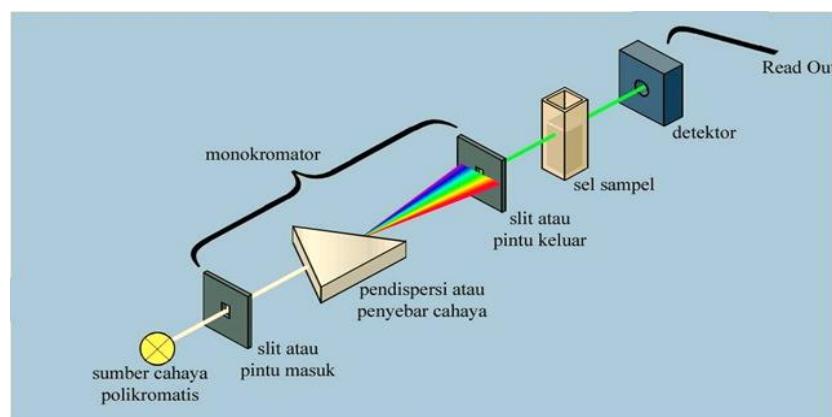
x = konsentrasi

b = kemiringan/slope

Hukum beer hanya berlaku monokromatis dan hukum beer telah terpenuhi bila hubungan antara serapan dan konsentrasi adalah linier. Penyimpangan dalam hukum lambert-beer dapat disebabkan oleh beberapa faktor :

1. Cahaya tidak monokromatis
2. Cahaya simpangan mengenai detektor
3. Kepekaan detektor berubah
4. Intensitas sumber cahaya dan amplifier dari detektor tidak berubah-ubah
5. Pada isolasi – asosiasi keseimbangan berubah misalnya pada perubahan pH larutan
6. Larutan berfluorosensi
7. Suhu larutan berubah selama pengukuran

(Yanlinastuti & Fatimah, 2016)



Gambar 2.2 Skema Kerja Spektrofotometri UV-VIS (Suharti, 2017)

Instrumen spektrofotometri UV- VIS :

1. Sumber Sinar

Untuk senyawa-senyawa yang menyerap di spektrum daerah ultraviolet, digunakan lampu deuterium. Lampu deuterium merupakan sumber energi tinggi yang mengemisi sinar pada panjang gelombang 200-370 nm.

2. Monokromator

Pada kebanyakan pengukuran kuantitatif, sinar harus bersifat monokromatik, yaitu sinar dengan suatu panjang gelombang tertentu. Hal ini dicapai dengan melewati sinar polikromatik (sinar dengan beberapa panjang gelombang) melalui suatu monokromator. Alatnya dapat berupa prisma ataupun grating yang berfungsi untuk mendispersikan radiasi yang masuk ke monokromator.

3. Kuvet

Kuvet spektrofotometer adalah suatu alat yang digunakan sebagai tempat contoh atau cuplikan yang akan dianalisis. Kuvet biasanya terbuat dari kwarsa, *plexiglass*, kaca, plastik dengan bentuk tabung empat persegi panjang 1x1 cm dan tinggi 5 cm. Pada pengukuran didaerah UV dipakai kuvet kwarsa atau *plexiglass*, sedangkan kuvet dari kaca tidak dapat dipakai untuk pengukuran didaerah sinar tampak (*visibel*).

4. Detektor

Setelah sinar melalui sampel, maka penurunan intensitas apapun yang disebabkan oleh absorpsi diukur dengan suatu detektor. Detektor biasanya merupakan kepingan elektronik yang disebut dengan tabung pengganda foton, yang bereaksi untuk mengubah intensitas berkas sinar ke dalam sinyal elektrik yang dapat diukur dengan mudah, dan juga bereaksi sebagai suatu pengganda untuk meningkatkan kekuatan sinyal.

5. Rekorder

Sistem yang membaca besarnya isyarat listrik. Sistem pencatatan yang dapat menunjukkan besarnya sinar listrik. Spektrum absorpsi digambarkan sebagai absorban atau serapan terhadap panjang gelombang (Gandjar & Rohman, 2012)

2.11 Microplate Reader ELISA

Microplate reader dikenal juga sebagai ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), yaitu spektrofotometer khusus yang dirancang untuk dapat membaca keberadaan antibodi atau antigen spesifik dalam sampel. Tekniknya didasari dengan mendeteksi antigen atau antibodi yang ditangkap substrat dan menghasilkan reaksi, produk yang terbentuk dapat dibaca oleh spektrofotometer (WHO, 2008).

Platmikro adalah standar untuk tes biokimia dan berbasis sel yang terkait dengan penemuan obat. Dalam setiap plat mikro terdapat sumur 2D dengan volume terbatas dan jumlah sumur dalam satu plat umumnya terdapat 96, 384 dan 1536 sumur dengan ukuran dan penempatan sumur telah distandarisasi oleh ANSI (*American National Standards Institute*) dan SLAS (*Society for Laboratory Automation and Screening*). Untuk mendeteksi dan mengukur reaksi biologis atau kimia dapat terukur dengan *microplate reader*. *Mikroplate reader* umum digunakan dalam uji laboratorium sains pada tanaman dan umumnya digunakan untuk mendukung metode spektrofotometri.

Panjang gelombang yang digunakan dalam ELISA umumnya antara 400 hingga 750 nm, karena pada mikroplate reader terdapat kisi yang membatasi rentang panjang gelombang tersebut. Sistem optik yang digunakan berupa serat optik sebagai sumber cahaya yang diteruskan ke sumur platmikro berisi sampel. Sinar yang melewati sampel berdiameter sekitar 1 hingga 3 mm, umumnya mikroplate reader menggunakan sumber sinar *double beam* (WHO, 2008).

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan bulan Agustus 2018. Tempat penelitian yaitu Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi Institut Sains Dan Teknologi Nasional dan Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka, Institut Pertanian Bogor (IPB).

3.2 Sampel Uji

Sampel uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) yang diperoleh dari koleksi Materia Medika Batu Malang, Jawa Timur yang sudah dideterminasi.

3.3 Prinsip Penelitian

Serbuk daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) dilakukan proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Filtrat yang dihasilkan dari proses maserasi diuapkan dengan menggunakan *ratory vacuum evaporator* (pada suhu 45° C) sampai diperoleh ekstrak kering. Ekstrak etanol kering diuji penapisan fitokimia, uji kadar total flavonoid dan uji aktivitas penghambatan tirosinase. Metode yang digunakan pada pengujian kadar flavonoid total dan penghambatan enzim yaitu spektrofotometri menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan *microplate reader* (ELISA) secara *in vitro*. Persentase penghambatan tirosinase dinyatakan dengan nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi larutan inhibitor yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas tirosinase.

3.4 Bahan dan Alat Penelitian

3.4.1 Bahan

Etanol 96% (C_2H_5OH), aquadest, L-DOPA (Sigma), enzim tirosinase (Sigma), larutan buffer fosfat, amoniak 25% (NH_3) (Mallinckrodt AR), kloroform, asam klorida, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, pereaksi bouchardart, natrium nitrat 5% ($NaNO_3$) (Merck), aluminium klorida 10% ($AlCl_3$) (Merck), natrium hidroksida 1 N ($NaOH$) (Merck), ferri (III) klorida ($FeCl_3$) (Merck), eter (C_2H_5O), asetat anhidrat (CH_3COOH) (Ajax chemicals), asam sulfat pekat (H_2SO_4) (Mallinckrodt AR), kuersetin ($C_{15}H_{10}O_7$), dimetil sulfoksida (DMSO).

3.4.2. Alat

Timbangan analitik digital, Blender, Wadah maserasi, *Rotary vacuum evaporator* (Buchi), Spektrofotometer UV-VIS (Labomed Inc), *Multiplate well reader* / ELISA (Epoch), Cawan penguap, Inkubator (Mettler), Oven, Corong kaca (Pyrex), Batang pengaduk, Tabung reaksi (Pyrex), Kertas saring, Cawan penguap, Penjepit kayu, Pipet mikro (1000 μ l) (Thermo), Pipet tetes, Bunsen, Erlenmeyer (Pyrex), Aluminium foil, Kain flanel.

3.5 Metode Dan Tahapan Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimental laboratorium yang dilakukan dengan tahapan penelitian sebagai berikut :

3.5.1 Pengumpulan Bahan Uji

Serbuk daun keladi tikus diambil dari UPT Materia Medika, Batu – Malang, Jawa Timur.

3.5.2 Determinasi Bahan Uji

Determinasi daun keladi tikus dilakukan di laboratorium UPT Materia Medika, Batu – Malang, Jawa Timur.

3.5.3 Ekstraksi Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume)

Ekstrak etanol 96% daun keladi tikus dibuat dengan cara maserasi, yaitu serbuk daun keladi tikus ditimbang sebanyak 300 gram. Lalu dimasukkan ke dalam bejana maserasi yang telah dilapisi aluminium foil pada bagian dinding

luar dan direndam dengan 3 liter pelarut etanol 96% (perbandingan 1 : 10), lalu bejana ditutup rapat dan didiamkan selama 3 x 24 jam dan sesekali dilakukan pengadukan. Agar senyawa yang terkandung didalamnya tertarik sempurna tiap harinya pelarut diganti. Hasil ekstraksi disaring menggunakan corong kaca yang dilapisi kertas saring untuk memisahkan serbuk simplisia yang mungkin masih terbawa. Ekstrak yang diperoleh ditampung dalam botol yang tertutup rapat kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental. Setelah itu diuapkan diatas penangas air untuk mendapatkan ekstrak kering (Syafuruddin *et al.*, 2018)

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot serbuk yang diekstraksi}} \times 100\%$$

3.5.4 Penapisan Fitokimia Serbuk Dan Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume)

3.5.4.1 Identifikasi Senyawa Flavonoid

Sebanyak 10 gram serbuk dan ekstrak ditambahkan 10 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, kedalam 5 mL filtrat ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1995).

3.5.4.2 Identifikasi Golongan Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram serbuk dan ekstrak ditimbang, ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL aquadest, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut :

1. Diambil 0,5 mL filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, akan terbentuk endapan berwarna putih/kuning
2. Diambil 0,5 mL filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat, akan terbentuk endapan berwarna coklat sampai kehitaman.
3. Diambil 0,5 mL filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, akan terbentuk endapan coklat atau jingga kecoklatan.

Alkaloid positif jika terjadi endapan atau kekeruhan paling sedikit dua dari tiga percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

3.5.4.3 Identifikasi Golongan Steroid Dan Triterpenoid

Sebanyak 1 gram sampel uji dimaserasi selama 2 jam dengan 20 mL n-heksana, lalu disaring. Filtrat diuapkan ke dalam cawan penguap. Pada sisa ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Buchard. Timbulnya warna biru atau biru hijau menandakan adanya steroid, sedangkan warna merah, merah muda atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Depkes RI, dalam Mayasari 2018).

3.5.4.4 Identifikasi Golongan Saponin

Sebanyak 0,5 gram serbuk dan ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas dan disaring. Larutan atau filtratnya diambil, masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang mantap setinggi 1 – 10 cm selama tidak kurang dari 10 menit dan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N, buih tidak hilang menandakan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

3.5.4.5 Identifikasi Golongan Tanin

Sebanyak 1 gram serbuk dan ekstrak ditimbang, dididihkan selama 3 menit dalam 10 mL air suling lalu didinginkan dan disaring. Larutan diambil 2 mL ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1 % jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes RI, 1995).

3.5.5 Penentuan Kadar Flavonoid Total (BPOM, 2004)

1. Pereaksi

Larutan HMT	:	Larutan heksametilenteramin
Larutan HCl	:	Larutan HCl 25%
Larutan AlCl ₃	:	Larutan AlCl ₃ 2% dalam larutan asam asetat glasial
Larutan asam asetat glasial :		Larutan asam asetat glasial 5% v/v dalam metanol

2. Pembuatan Larutan Sampel

Ekstrak sebanyak 300 mg dimasukkan kedalam labu alas bulat, ditambah dengan 1 mL larutan HMT, 20 mL aseton dan 2 mL larutan HCl, dihidrolisis dengan cara direfluks selama 30 menit. Campuran disaring menggunakan kertas saring, filtrat dimasukkan kedalam labu tentukur 100 mL. Residu direfluks kembali dengan 20 mL aseton selama 30 menit, disaring dan filtrat dicampur ke dalam labu tentukur 100 mL. Campuran filtrat dalam labu tentukur ditambah dengan aseton sampai 100 mL. Diambil 20 mL filtrat dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambah 20 mL air dan diekstraksi 3 kali masing-masing dengan 15 mL etil asetat sampai 50 mL dalam labu tentukur.

Diambil 10 mL larutan induk, ditambah dengan larutan AlCl_3 dan larutan asam asetat glasial sampai 25 mL dalam labu tentukur.

3. Larutan Blanko

Diambil 10 mL larutan induk, ditambah dengan larutan asam asetat glasial 25 mL dalam labu tentukur.

4. Larutan Standar Kuersetin

Ditimbang 2,5 mg baku standar kuersetin dan dilarutkan dalam 25 mL asam asetat glasial untuk 100 bpj, dari larutan standar kuersetin 100 bpj, dibuat beberapa seri konsentrasi yakni 20 ; 15 ; 10 ; 5 ; 1 bpj, dari masing-masing konsentrasi larutan ditambahkan 1 mL AlCl_3 dan ditambahkan larutan asam asetat glasial 10 mL.

5. Pengukuran Absorbansi

Pengukuran dilakukan dengan waktu 30 menit setelah penambahan AlCl_3 menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 425 nm dengan pembanding kuersetin.

6. Cara perhitungan (Azizah, Kumolowati, Faramayuda, 2014)

$$F = \frac{C \times V \times fp \times 10^{-6}}{m} \times 100$$

Keterangan :

C = Konsentrasi yang diperoleh dari kurva standar (bpj)

V = Volume contoh (mL)

fp = Faktor pengenceran (mL)

m = Bobot Ekstrak (g)

F = Kadar flavonoid total (% b/b)

3.5.6 Pembuatan Larutan Uji Penghambatan Enzim Tirosinase (Batubara, *et. al*, 2010).

3.5.6.1 Pembuatan Larutan Buffer Kalium Fosfat 50 mM Ph 6,5

Untuk membuat larutan buffer kalium fosfat sebanyak 200 mL, kalium hidrogen fosfat (BM 136,09) ditimbang seksama sebanyak 1,36 gram, lalu dilarutkan dengan aquadest 100 mL. Sebanyak 11 mL larutan NaOH 0,2 N ditambahkan kedalam larutan tersebut dan ditambahkan aquadest hingga hampir mencapai 200 mL , pH larutan diukur dan ditetaskan NaOH hingga pH mencapai 6,5.

3.5.6.2 Pembuatan Larutan DMSO 10 %

Pembuatan larutan *dimethylsulfoxide* atau DMSO 10 % yaitu sebanyak 10 mL DMSO ditambahkan dengan aquadest sebesar 90 mL.

3.5.6.3 Pembuatan Substrat L-DOPA 2 mM

Pembuatan substrat L-DOPA dilakukan dengan menimbang sebanyak 10 mg substrat L-DOPA dan kemudian dilarutkan kedalam 25 mL buffer kalium phosphat.

3.5.7 Pembuatan Larutan Enzim Tirosinase

Tirosinase ditimbang sebanyak 1,40 mg kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat (pH 6,5) dalam labu ukur sampai 10,0 mL. Tirosinase yang terlarut memiliki aktivitas 333 unit/mL. Setelah preparasi hingga uji penghambatan tirosinase, larutan disimpan dalam suhu rendah (2-8°).

3.5.8 Uji Penghambatan Enzim Tirosinase (Batubara *et. al.*, 2010)

3.5.8.1 Uji Larutan Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume)

Ekstrak ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan pelarut DMSO (*dimethylsulphoxide*) untuk mendapatkan konsentrasi akhir sebesar 10 mg/mL. Larutan stok kemudian diencerkan pada 50 mM buffer kalium fosfat (PH 6,5).

Ekstrak diuji pada konsentrasi mulai dari 1 ; 2,5 ;5 ;7,5 dan 10 mg/mL. Pada 96 sumuran plate, yang berisi 70 μ L. Setiap ekstrak diencerkan dan digabungkan dengan 30 μ L enzim tirosinase (sigma 333 unit mL⁻¹ pada bufer fosfat). Plate disimpan didalam ruangan inkubasi yang bertemperatur 37°C selama 5 menit. Sebanyak 110 μ L substrat (2 mM L-DOPA) ditambahkan pada masing-masing *well plate*, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Kerapatan optik pada plate sumuran diukur dengan panjang gelombang 492 nm dengan menggunakan *multi-well plate reader*.

3.5.8.2 Uji Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Asam Kojat

Serbuk asam kojat ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan dapat fosfat (6,5) dalam labu ukur 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/mL. Kemudian ditambahkan larutan dapar fosfat 6,5 hingga tanda batas, sehingga diperoleh variasi konsentrasi.

Asam kojat sebagai kontrol positif diuji mulai konsentrasi 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,01563, dan 0,00781 mg/mL dalam plat tetes 96 sumur. Sebanyak 70 μ L ekstrak pengenceran ini masing-masing digabungkan dengan 30 μ L enzim tirosinase (sigma, 333 unit/mL dalam buffer fosfat). Pelat diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit, kemudian ditambahkan 110 μ L substrat L-DOPA 2 mM dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu kamar. Larutan pada setiap sumur diukur dengan menggunakan *multiwell plate reader* pada panjang gelombang 492 nm untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambat 50% (IC₅₀).

Tabel 3.1 Komposisi Uji Penghambatan Enzim Tirosinase

Bahan	Volume (µl)					
	KB	KB+e	Blanko	KS	KS+e	Sampel
Pelarut	70	70	70	-	-	-
Sampel	-	-	-	70	70	70
Enzim	-	30	30	-	30	30
Substrat	-	-	110	-	-	110
Buffer	140	110	-	140	110	-
Total	210	210	210	210	210	210

Keterangan :

KB : Kontrol Blanko

KB+e : Kontrol Banko + Enzim

KS : Kontrol Sampel

KS+e : Kontrol Sampel + Enzim

Tabel 3.2 Peletakan Bahan Pada Sumur Plate Uji Inhibitor Tirosinase

Konsentrasi (mg/ml)	Bahan				
			L-DOPA		
	1	2	3	4	5
1	KS	KS+e	S _{u1}	S _{u2}	S _{u3}
2,5	KS	KS+e	S _{u1}	S _{u2}	S _{u3}
5	KS	KS+e	S _{u1}	S _{u2}	S _{u3}
7,5	KS	KS+e	S _{u1}	S _{u2}	S _{u3}
10	KS	KS+e	S _{u1}	S _{u2}	S _{u3}
0	KB	KB+e	B _{Ld}	B _{Ld}	B _{Ld}

Keterangan :

KB : Kontrol Blanko

KB+e : Kontrol Banko + Enzim

KS : Kontrol Sampel

KS+e : Kontrol Sampel + Enzim

B_{Ld} : blanko ditambah dengan substrat L-DOPA

S_{U1} : Pengulangan sampel pertama

S_{U2} : pengulangan sampel kedua

S_{U3} : pengulangan sampel ketiga

Persentase aktifitas inhibisi tirosinase dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi Tirosinase} = \frac{(Ab - AKb) - (As - AKs)}{(Ab - AKb)} \times 100 \%$$

Keterangan :

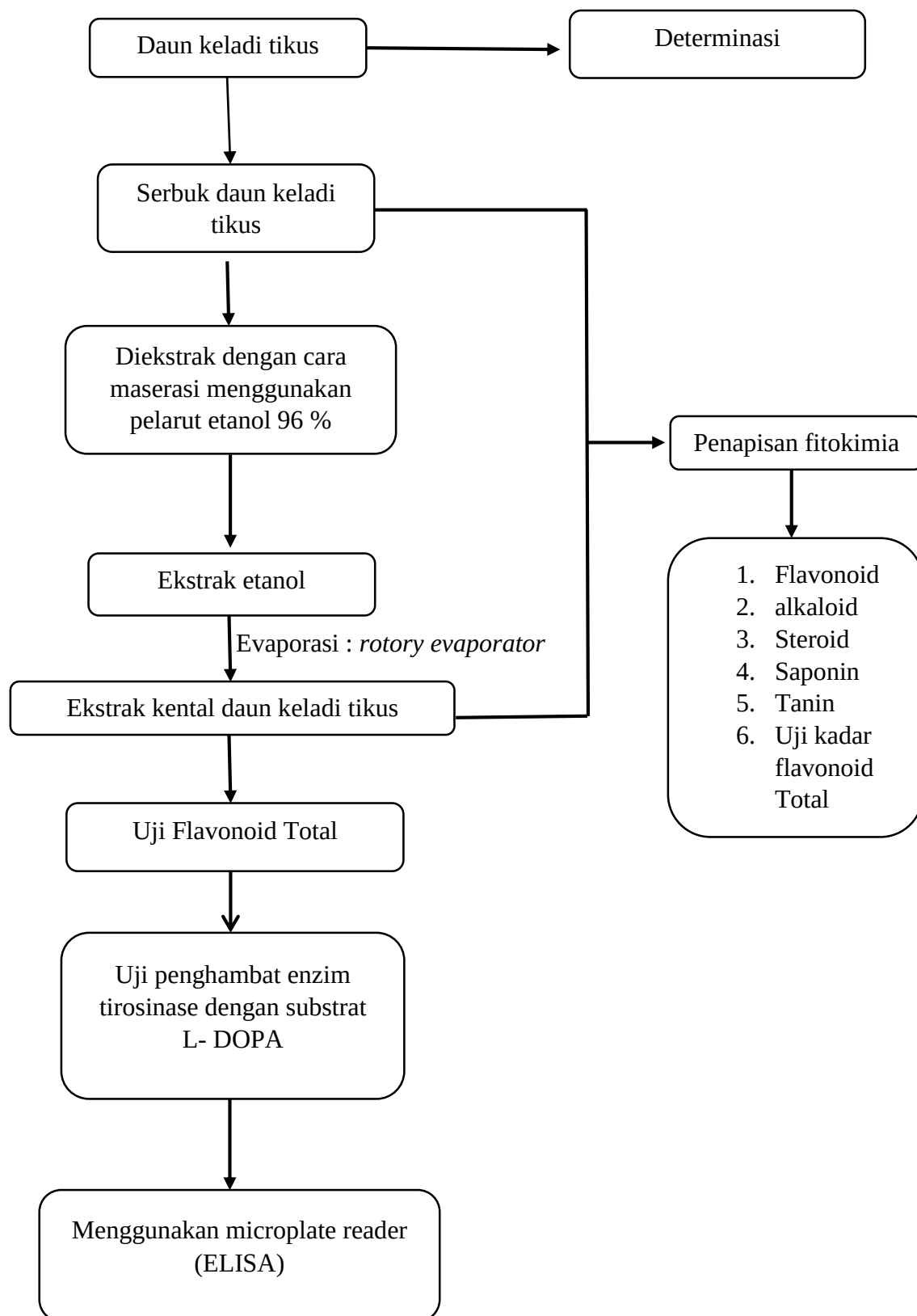
Ab = serapan larutan blanko

Akb = serapan larutan kontrol

As = serapan larutan sampel

Aks = serapan larutan kontrol sampel

3.6 Skema Penelitian



3.7 Analisis Data

Persentase aktivitas inhibisi tirosinase daun keladi tikus dan asam kojat dihitung dengan rumus berikut :

$$\% \text{ Inhibisi Tirosinase} = \left[\frac{(Ab - AKb) - (As - AKs)}{(Ab - AKb)} \right] \times 100 \%$$

Keterangan :

Ab = Serapan larutan blanko

Akb = Serapan larutan kontrol blanko

As = Serapan larutan sampel

Aks = Serapan larutan kontrol sampel

Hasil dari pengukuran konsentrasi ekstrak daun keladi tikus akan memperoleh absorbansi, hasil absorbansi tersebut dihitung untuk memperoleh persentase inhibisi. Kemudian, nilai IC_{50} dapat dihitung dengan memasukkan angka kemampuan hambat, yaitu 50 pada persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier tersebut berupa :

$$y = bx + a$$

dimana,

y = nilai kemampuan hambat 50

x = ln (Konsentrasi)

a = slope (kemiringan dari garis regresi linier)

b = intersep (garis potong)

Dengan memasukkan nilai 50 pada nilai y, sehingga memperoleh nilai konsentrasi IC_{50} .

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Determinasi Bahan Uji

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun keladi tikus yang diperoleh dari Balai Materia Medica Kota Batu – Malang, Jawa Timur. Hal ini dilakukan untuk membuktikan identitas dari tanaman yang akan diambil, untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta mencegah kemungkinan tercampurnya dengan tanaman lain. Hasil determinasi menunjukkan bahwa bahan uji yang digunakan adalah daun keladi tikus jenis *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume dari suku *Araceae* (Lampiran 1).

4.2 Pengumpulan dan Pengolahan Bahan

Hasil pengumpulan bahan uji yaitu serbuk daun keladi tikus yang diambil dari perkebunan Balai Materia Medica. Serbuk daun keladi tikus yang diperoleh sebanyak 500 gram.

4.3 Ekstraksi Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume)

Proses ekstraksi serbuk daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) menggunakan pelarut etanol 96%. Pemilihan pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan proses ekstraksi, penggunaan pelarut etanol pada ekstraksi ini tidak memperlihatkan perubahan warna yang tidak merusak komponen dari daun, terbukti dengan melarutkan etanol dalam ekstraksi daun keladi tikus warnanya tidak berubah atau tetap berwarna hijau daun. Dalam pemilihan jenis pelarut faktor yang perlu diperhatikan antara lain adalah daya melarutkan senyawa – senyawa yang terdapat di dalam daun keladi tikus, titik didih, sifat racun, mudah tidaknya terbakar dan pengaruh terhadap peralatan ekstraksi. Etanol juga mempunyai titik didih yang rendah dan cenderung aman, tidak beracun dan tidak berbahaya. Pelarut etanol memiliki dua sisi yang terdiri dari gugus -OH yang bersifat polar dan gugus CH₂CH₃ yang bersifat non polar, sifat non polar inilah yang membuat etanol mampu mengekstrak kandungan minyak atsiri, dan alkaloid di dalam daun keladi tikus secara optimal (Aziz, Febrizky, Mario, 2014).

Pemilihan metode ekstraksi dimaksudkan untuk memudahkan dalam pengaturan bentuk sediaan, dosis atau takaran yang tepat mudah dalam penyimpanan, praktis dalam penyajian dan menjaga keawetan bahan tersebut untuk jangka waktu yang lebih lama dibandingkan dengan disimpan dalam bentuk mentah. Pemilihan metode maserasi ini karena memiliki keunggulan, yaitu alat dan cara yang digunakan sangat sederhana, dapat digunakan untuk analit baik yang tahan terhadap pemanasan maupun yang tidak tahan terhadap pemanasan (Leba, 2017).

Pengadukan dilakukan dengan tujuan agar dapat terjadi keseimbangan konsentrasi golongan senyawa aktif yang lebih cepat didalam cairan. Pemekatan dilakukan dengan menggunakan *rotary vaccum evaporator*, tujuannya agar golongan senyawa yang terdapat dalam daun keladi tikus tidak mudah rusak. Pada proses ekstraksi menggunakan metode maserasi diperoleh rendemen 9,76 %. Penentuan rendemen berfungsi untuk mengetahui kadar metabolit sekunder yang terbawa oleh pelarut tersebut namun tidak dapat menentukan jenis senyawa yang terbawa tersebut. Rendemen ekstrak meningkat seiring dengan meningkatnya kepolaran pelarut. Etanol merupakan pelarut yang menghasilkan rendemen yang baik karena diduga kepolaran etanol mendekati kepolaran senyawa yang diekstrak. Kelarutan suatu zat ke dalam suatu pelarut sangat ditentukan oleh kecocokan sifat antara zat pelarut dengan zat terlarut yaitu sifat *like dissolve like* diantaranya disebabkan oleh polaritasnya (Leba, 2017).

Tabel 4.1. Rendemen Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus Daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume)

Ekstrak Etanol 96 %	Sampel	Daun keladi tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume)
	Bobot Ekstrak (g)	29,3
	Rendemen (%)	9,76
	Warna	Hijau tua kecoklatan

4.4 Penapisan Fitokimia

Identifikasi golongan senyawa kimia dilakukan pada ekstrak etanol daun keladi tikus yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung pada ekstrak dan diduga dapat menghambat aktifitas enzim tirosinase. Adapun pemeriksaan yang dilakukan terhadap serbuk dan ekstrak etanol daun keladi tikus adalah golongan senyawa flavonoid, alkaloid, steroid/triterpenoid, saponin, tanin. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia pada ekstrak dan serbuk daun keladi tikus dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Penapisan Fitokimia Serbuk dan Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume)

No	Pemeriksaan	Hasil	
		Serbuk	Ekstrak
1	Flavonoid	Positif (+)	Negatif (-)
2	Alkaloid	Positif (+)	Positif (+)
3	Steroid	Positif (+)	Negatif (+)
4	Saponin	Positif (+)	Positif (+)
5	Tanin	Negatif (-)	Negatif (-)

Keterangan :

Positif (+) : Mengandung senyawa metabolit sekunder

Negatif (-) : Tidak mengandung senyawa metabolit sekunder

Kuersetin adalah salah satu senyawa flavonoid yang dapat digunakan sebagai pembanding pada sediaan serbuk. Uji flavonoid menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol. Pada ekstrak menunjukkan hasil yang negatif kemungkinan kadar dalam ekstrak daun keladi tikus terlalu kecil sehingga tidak teridentifikasi dengan metode kualitatif, selain itu menurut Carissa (2016) proses pemanasan dapat mengakibatkan penurunan kadar total flavonoid sebesar 15-78 %. Pada penelitian sebelumnya daun keladi tikus mengandung senyawa flavonoid (Farida, *et, al.*, 2010). Sehingga dilakukan uji kuantitatif untuk menghitung kadar total flavonoid.

Pada pengujian alkaloid serbuk dan ekstrak daun keladi tikus digunakan kafein sebagai baku pembanding dengan tujuan penggunaan kafein sebagai baku pembanding dikarenakan kafein mengandung alkaloid heterosiklik yang termasuk ke dalam golongan metilxantin (Pratita, 2017). Pada pengujian ini diperoleh hasil yang positif dengan terbentuknya endapan dari penggantian ligan atau penggantian molekul sederhana yang dalam senyawa kompleks bertindak sebagai donor pasangan elektron pada pereaksi Dragendorff, Mayer, dan Bouchardat. Penelitian sebelumnya (Wimpy & Harningsih, 2017).

Pada uji steroid dan triterpenoid digunakan daun teh sebagai uji kontrol positif (Martono dan Stiyono, 2014). Pada hasil uji steroid sediaan serbuk dan ekstrak daun keladi tikus menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau. Pada uji triterpenoid serbuk dan ekstrak menunjukkan hasil negatif.

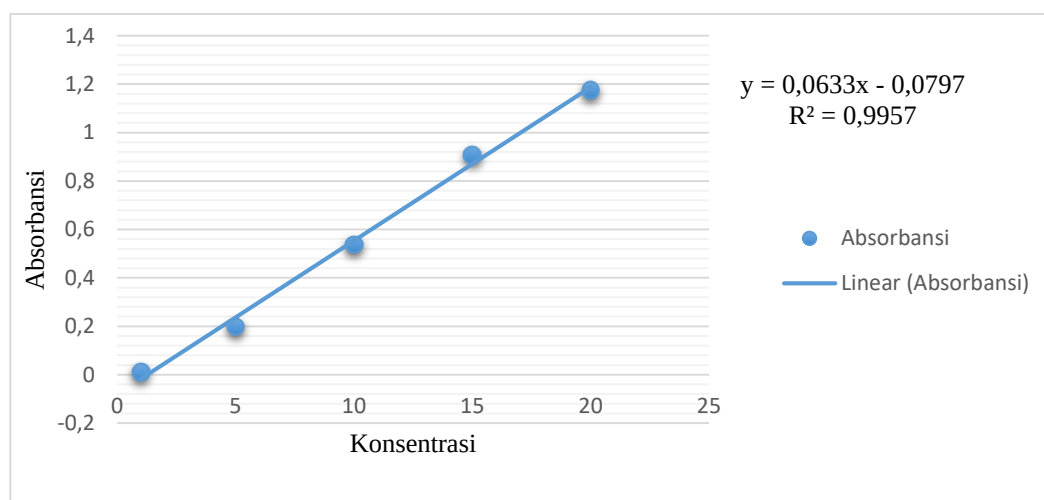
Saponin mempunyai gugus hidrofilik dan hidrofobik, ketika dikocok akan membentuk buih karena gugus hidrofilik menghadap ke dalam dan gugus hidrofobik menghadap ke luar. Penambahan HCl 2 N akan berikatan dengan gugus hidrofil sehingga buih yang terbentuk lebih stabil. Hasil pengujian pada serbuk dan ekstrak menunjukkan hasil positif.

Pereaksi besi III klorida digunakan secara luas untuk identifikasi tanin, hasil yang diperoleh pada serbuk dan ekstrak daun keladi tikus menunjukkan hasil negatif dengan tidak terbentuknya warna hijau kehitaman karena tanin akan membentuk senyawa kompleks (Setyowati, 2014).

Pada pengujian skrining fitokimia pada ekstrak etanol daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) uji flavonoid, steroid dan tanin mendapatkan hasil yang negatif kemungkinan dikarenakan kandungan senyawa dalam daun keladi tikus berkurang hal ini bisa disebabkan karena proses pemanasan dapat mengakibatkan penurunan kadar total flavonoid sebesar 15-78 %, selain itu kemungkinan keberadaannya dalam daun dipengaruhi oleh adanya proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid (Charissa, Djajadisastra, Elya, 2016).

4.5 Penetapan Kadar Flavonoid Total

Pada penelitian ini untuk menentukan kadar total flavonoid digunakan kuersetin sebagai larutan standar dengan konsentrasi 1, 5, 10, 15 dan 20 bpj. digunakan deret konsentrasi karena metode yang digunakan adalah metode yang menggunakan persamaan kurva standar. Untuk membuat kurva standar, terlebih dahulu dibuat konsentrasi untuk mendapatkan persamaan linear yang dapat digunakan untuk menghitung persen kadar. Pada pembuatan kurva kalibrasi digunakan kuersetin sebagai pembanding dimana kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keto pada C-4 dan memiliki gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol. Pada penetapan kadar flavonoid penambahan kalium asetat dan alumunium klorida bertujuan untuk membentuk senyawa kompleks sedangkan perlakuan inkubasi selama 30 menit yang dilakukan sebelum pengukuran dimaksudkan agar reaksi berjalan sempurna, sehingga memberikan intensitas warna yang maksimal (Supriningrum, Nurhasnawati, Putri, 2017).



Gambar 4.1 Kurva Kalibrasi Kuersetin Pada Panjang Gelombang Maksimum 425 mn

Tabel 4.3 Penetapan Kadar Flavonoid Total % (b/b) Pada Ekstrak Etanol 96 %
Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume)

Nama sampel	Bobot sampel	abs	Rata-rata kadar flavonoid		
			Bpj	% (b/b)	Rata-rata % (b/b)
Daun Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume)	0,3007	0,195	4,3396	0,9019	0,7378 %
	0,3007	0,195	2,7598	0,5736	

Pada pengukuran tersebut, dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka semakin tinggi pula absorbansi yang diperoleh. Hasil baku kuersetin diperoleh diplotkan antara kadar absorbansinya, sehingga diperoleh persamaan linear yaitu $y = 0,0633x - 0,0797$ dengan nilai R^2 yang diperoleh sebesar 0,9957. Nilai Y adalah serapan dan nilai X adalah konsentrasi sampel, nilai a adalah slope (kemiringan) dan nilai b adalah *intercept*. Nilai r yang mendekati 1 menunjukkan hubungan yang kuat antara dua variabel dan nilai r yang mendekati 0 mengindikasikan lemahnya hubungan antara dua variabel, nilai r (korelasi pearson) menunjukkan ada atau tidaknya hubungan antara X dengan variabel Y dan juga untuk mengetahui seberapa besar hubungan antara dua variabel bebas (X) dan variabel terikat (Y). Untuk itu dilakukan uji linearitas melalui pembuatan kurva kalibrasi standar dan pengukuran absorbansi deret larutan standar dengan spektrofotometri UV-Vis. Kurva kalibrasi menyatakan hubungan antara berkas radiasi yang diabsorpsi dengan konsentrasi dari serangkaian zat standar yang telah diketahui konsentrasinya, dimana semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi pula absorbansi yang didapat, begitupun sebaliknya konsentrasi semakin rendah maka semakin rendah juga absorbansinya yang dihasilkan. Pada gambar 4.1 dapat dilihat bahwa kurva kalibrasi standar tersebut mempunyai garis yang linear. Bentuk kurva kalibrasi yang didapat mengikuti hukum Lambert-Beer yaitu dengan meningkatnya konsentrasi maka absorbansi yang dihasilkan semakin tinggi (Rohman, 2012).

Respon yang diberikan oleh alat terhadap konsentrasi analit telah memenuhi syarat. Nilai $r = 0,9957$ yang diperoleh telah memenuhi syarat yang ditetapkan oleh interpretasi hasil koefisien korelasi pada tabel 4.4

Tabel 4.4 Interpretasi Hasil Koefisien Korelasi

Interval Koefisien	Tingkat Hubungan
0,00 – 0,199	Sangat rendah
0,20 – 0,399	Rendah
0,40 – 0,599	Cukup
0,60 – 0,799	Kuat
0,80 – 1,00	Sangat kuat

(Widiowati, W.S, 2016)

Hasil tersebut menunjukkan alat yang digunakan mempunyai respon yang baik terhadap sampel. Alat dapat memberikan hubungan yang linier antara absorbansi dan konsentrasi larutan yang diukur, dengan demikian dapat dikatakan alat dalam kondisi baik dan persamaan garis lurus yang diperoleh dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel. Kadar flavonoid dalam sampel ekstrak etanol daun keladi tikus diperoleh dengan cara memasukkan nilai absorbansi pada kurva standar kuersetin, sehingga hasil dari rata-rata penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun keladi tikus yaitu 0,7378 % (b/b). Proses pemanasan ini dapat mengakibatkan penurunan kadar total flavonoid sebesar 15-78 %. Selain itu, kemungkinan keberadaannya dalam daun dipengaruhi oleh adanya proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid (Charissa, Djajadisastra, Elya, 2016).

Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa yang aktif sebagai penghambat tirosinase. Sehingga uji kadar total flavonoid dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kandungan kadar flavonoid total yang terdapat didalamnya. sehingga dapat menentukan besarnya nilai inhibisi IC_{50} yang terdapat di dalam daun keladi tikus setelah dilakukan pengujian, sehingga dapat dengan jelas menyimpulkan hasil seberapa besar daun keladi tikus untuk dapat menghambat enzim tirosinase (Chang, 2009).

4.6 Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume)

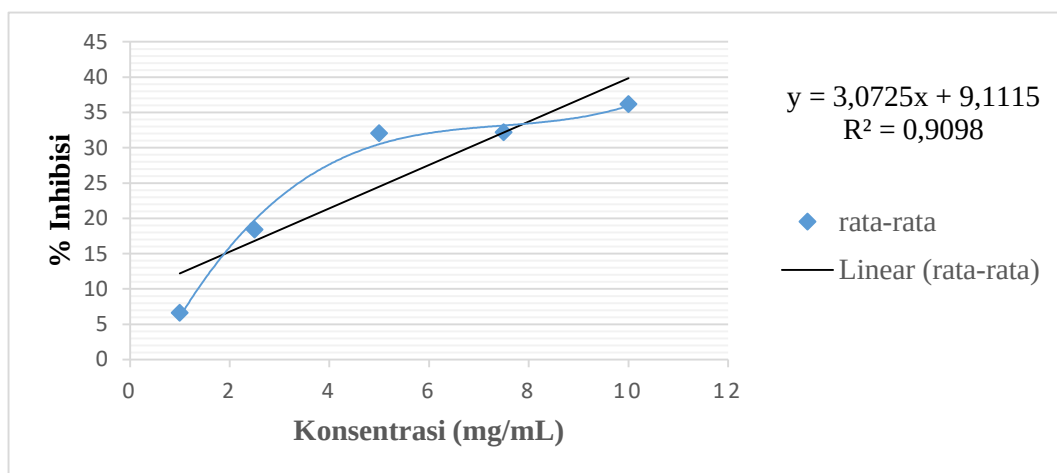
Pengujian aktivitas penghambatan tirosinase ditujukan untuk mengetahui potensi dari sampel ekstrak daun keladi dalam kemampuannya menghambat tirosinase pada mekanisme pembentukan eumelanin. Penentuan penghambatan tirosinase dilakukan dengan menggunakan mushroom tirosinase sebagai enzim dan L-DOPA sebagai substrat serta asam kojat sebagai kontrol positif. Adanya senyawa fenolik maupun flavonoid yang telah dilaporkan seperti flavonol, stilben, asam fenolik, dan kuersetin memberikan kontribusi dalam menghambat aktivitas tirosinase sehingga mencegah terjadinya depigmentasi kulit (Nur, Rumiati, Lukitaningsih, (2017). Asam kojat merupakan inhibitor kompetitif dalam reaksi monofenolase dan inhibitor campuran pada reaksi L-DOPA. Penggunaan asam kojat sebagai kontrol positif sangat disarankan sebagai pembanding kekuatan penghambatan tirosinase baik dengan bahan baru yang ditemukan ataupun dengan kekuatan penambahan bahan lain (Kurniasari, *et al.*, 2018).

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode enzimatik secara *in vitro*. Pengujian dilakukan menggunakan *microplate reader* karena mempunyai keuntungan yaitu hasil yang didapat relatif cepat, jumlah sampel yang digunakan relatif sedikit, spesifikasi dan sensitivitasnya tinggi. Pengujian aktivitas inhibitor tirosinase dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya daya penghambatan senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak kasar etanol pada daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) (Kurniasari, *et al.*, 2018).

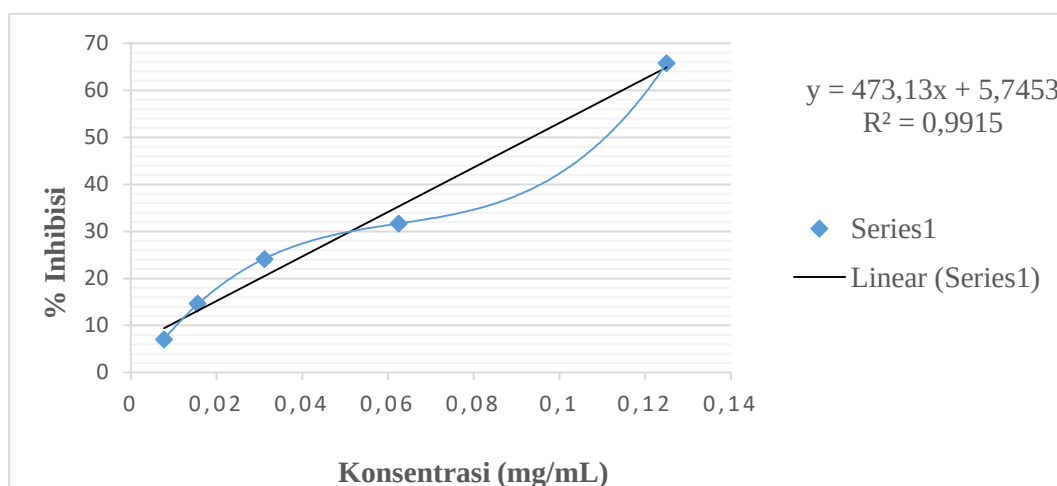
Semakin kecil nilai IC₅₀ maka berperan dalam mengkatalisis konversi L-tirosin menjadi L-DOPA dan oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon dan oksidasi 5,6 Dihidroksiindol menjadi Indol-6,6 Kuinon selanjutnya membentuk melanin. Enzim tirosinase berperan dalam reaksi pigmentasi kulit atau perubahan warna kulit menjadi lebih coklat. Senyawa yang dapat menghambat proses pembentukan melanin yaitu inhibitor tirosinase, mekanisme kerjanya mereduksi bahan yang dapat menyebabkan oksidasi dopakuinon dan bekerja secara kompetitif dan non kompetitif dengan substrat tirosinase yaitu L-DOPA serta secara spesifik akan berikatan kovalen dengan enzim tirosinase sehingga enzim menjadi tidak aktif selama reaksi katalik berlangsung. Inhibitor tirosinase banyak digunakan dalam

produk kosmetik dan farmasi sebagai penghambat produksi melanin berlebih pada lapisan epidermis dan membuat kulit tampak lebih cerah (Hindun, Rusdiana, Abdasah, Hindritiani, 2017).

4.6.1 Uji Penghambatan Inhibitor Tirosenase Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) Substrat L-DOPA (Difenolasi)



Gambar 4.2 Kurva Kalibrasi Difenolasi (Substrat L-DOPA) Ekstrak Etanol 96 % Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume)



Gambar 4.3 Kurva inhibisi difenolasi (substrat L-DOPA) Asam Kojat (Kontrol Positif)

Tabel 4.5 Uji Penghambatan Inhibitor Tirosinase Ekstrak Etanol 96% Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) Substrat L-DOPA (Difenolasi)

Bahan Uji	Konsentrasi (mg/mL)	Rata – rata (% inhibisi) ± Standar Deviasi	IC ₅₀ (mg/mL)
Ekstrak Etanol 96% Daun Keladi Tikus	1	6,617 ± 1,047	13,307
	2,5	18,401 ± 0,963	
	5	32,059 ± 2,296	
	7,5	32,201 ± 3,491	
	10	36,164 ± 0,221	
Kontrol Positif (Asam Kojat)	0,00781	7,042 ± 7,802	0,093
	0,01563	14,685 ± 10,795	
	0,03125	24,133 ± 7,479	
	0,0625	31,706 ± 4,332	
	0,125	65,747 ± 1,433	

Pengukuran IC₅₀ dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi ekstrak etanol daun keladi tikus 1 – 10 mg/mL, kemudian pengukuran serapan dan persentase penghambatan dihitung. Konsentrasi ekstrak diplotkan terhadap persen penghambatan dan diperoleh persamaan linear. Berdasarkan persamaan linear tersebut dapat dihitung nilai IC₅₀. *Inhibitory Concentration* 50 atau IC₅₀ adalah konsentrasi yang mampu menghambat 50% aktivitas enzim tirosinase. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ untuk ekstrak etanol daun keladi tikus dari reaksi difenolasi yaitu 13,307 mg/mL dan nilai IC₅₀ asam kojat dari reaksi difenolasi yaitu 0,093 mg/mL. Nilai IC₅₀ tersebut menunjukkan bahwa aktivitas inhibitor tirosinase ekstrak etanol daun keladi tikus tidak lebih baik dari asam kojat. Hal ini dikarenakan asam kojat yang digunakan dalam bentuk senyawa murni, sedangkan ekstrak daun keladi tikus bukanlah senyawa murni, akan tetapi ekstrak etanol yang masih memiliki aktivitas penghambatan tirosinase namun sangat kecil potensinya. Karena semakin kecil

nilai IC_{50} maka kemampuan menghambat enzim tirosinase semakin besar (Wahyuningsih, 2013).

Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96 % daun keladi tikus termasuk kategori antioksidan lemah, menurut Kurniasari (2017) nilai IC_{50} sangat bergantung pada metode ekstraksi dan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi serta substrat yang digunakan saat reaksi aktivitas inhibitor tirosinase. Pelaksanaan pereaksi enzimatis, pemilihan substrat menjadi hal yang sangat penting karena dapat mempengaruhi hasil pengukuran. Selain itu, kadar flavonoid total menunjukkan hasil yang sedikit, sehingga hal ini dapat mempengaruhi nilai IC_{50} yang dihasilkan.

Pengujian aktivitas penghambatan enzim tirosinase pada daun keladi tikus dilakukan untuk mengetahui nilai inhibisi dari ekstrak daun keladi tikus dibandingkan dengan asam kojat dalam menghambat enzim tirosinase. Pada keladi tikus menunjukkan adanya kandungan alkaloid, steroid, flavonoid dan glikosida. Golongan senyawa yang diduga memiliki aktivitas sebagai antioksidan serta inhibitor tirosinase adalah flavonoid (Katrin, 2012). flavonoid sebagai salah satu golongan senyawa yang aktif sebagai penghambat tirosinase. Kemampuan depigmentasi kulit dari flavonoid dengan cara menghambat secara langsung aktivitas tirosinase pada proses melanogenesis. Ikatan flavonoid dengan tembaga serta efek antioksidannya dilaporkan berperan dalam menghambat kerja enzim tirosinase (Charissa *et al.*, 2016).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Ekstrak etanol 96% daun keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd). Blume) memiliki kemampuan untuk menghambat enzim tirosinase.
2. Pada penghambatan substrat L-DOPA menghasilkan nilai IC_{50} 13,307 mg/mL. Nilai tersebut lebih besar jika dibandingkan dengan kontrol positif asam kojat yaitu 0,0935 mg/mL untuk substrat L-DOPA.

5.2 Saran

Perlu dilakukan perbandingan pengujian ekstrak etanol daun keladi tikus menggunakan pelarut lain, misalnya metanol, n-heksana, etil asetat dan air.

DAFTAR REFERENSI

- Anonim. (2004). *Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia*. Volume 1 ; Hal. 45-46
- Arifianti, A.E., Anwar, E., Nurjanah. (2017) Aktivitas Penghambatan Tirosinase Dan Antioksidan Serbuk Rumput Laut Dari *Sargassum Plagiphyllum* Segar Dan Kering. Jphpi. Vol. 20, No. 03.
- Aziz, T., Febrizky. S., Mario, A.D. (2014) *Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Persen Yield alkaloid Dari Daun Salam India (Murraya Koenigii)*. Jurnal Teknik Kimia No. 2, Vol. 20, April 2014, Hal 4.
- Azizah, D.N., Kumolowati, E., Faramayuda, F. (2014). *Penetapan Kadar Flavonoid Metode Alcl₃, Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (Theobroma Cacao L.)* Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi. Desember, 2(2), 45-49.
- Batubara, I., Darusman, I.K., Mitsunaga, T., Rahminiwati, M., Djauhari, E. (2010) *Potency of Indonesia Medicinal Plants as Tyrosinase Inhibitor and Antioxidant Agent*. Journal of Biological Science. Vol. 10 (2) : 138-144.
- Chang, T.,S. (2009). *An Update Review Of Tyrosinase Inhibitor*. J Mol Sci 10:24402473. Doi : 10.3390/Ijms10062440.
- Charissa, M., Djajadisastra, J., Elya, Berna. (2016). *Uji Aktivitas Antioksidan Dan Penghambatan Tirosinase Serta Uji Manfaat Gel Ekstrak Kulit Batang Taya (Nauclea Subdita) Terhadap Kulit*. Jurnal Kefarmasian Indonesia. Vol.6 No.2-Agustus. 2016:98-107.
- Chiari, M.E., Vera, D.M., Palacios, S.M., Carpinella, M.C (2011). *Tyrosinase Inhibitory Activity Og A 6-Isoprenoidsubstituted Flavanone Isolate From Dalea Elegans*. Bioorg. Med Chem., Vol. 19 No. 11 : 3474-3482.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat Dan Makanan, (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Departemen Kesehatan Ri : Jakarta.
- Direktorat Jendrai.Pengawasan Obat Dan Makanan. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan Ri, Jakarta.
- Djamal, R, (1988). *Tumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat*. Pusat Penelitian Universitas Andalas.

- Fajarini, M.N. (2015). Pengaruh Masker Mentimun Terhadap Pengurangan Hiperpigmentasi Pada Kulit Wajah. Vol 8 No 8.
- Farida, Y., Martati. T., Musir. A., Edward. B. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. Volume 8. Nomor. 2.
- Feliana, K., Mursiti, S., Harjono. (2018). *Isolasi dan Elusidasi Senyawa Flavonoid dari Biji Alpukat (Persea americana Mill.)*. Indonesian Journal of Chemical Science 7 (2).
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A. (2012). *Analisis Obat Secara Spektrofotometri Dan Kromatografi*. Pustaka Pelajar. Jakarta.
- Gandjar, I.G., Dan Rohman,. A. (2007) *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta; Pustaka Pelajar. Hal 43-48.
- Hanani, Prof. Dr. E, Ms, Apt. (2016) *Analisis Fitokimia*.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. Terbitan Kedua*. Terwajujemahan Kosasih Padmawinata Dan Iwang Soediro. Itb : Bandung.
- Hindun, S., Rusdiana, T., Abdasah, M., Hindritiani, R. (2017). *Potensi Limbah Kulit Jeruk Nipis (Citrus Auronfolia) Sebagai Inhibitor Tirosinase*. Ijpst. Volume 4, Nomor 2. Juni.
- Hindun, S., Rusdiana, T., Abdasah, M., Hindritiani, R. (2017). *Potency Of Lemon Peel (Citrus Auronfolia) Waste As Tirosinase Inhibitor*. IJPST. Volume 4, Nomor 2, Juni.
- Ibrahim, Sanusi M., Marham Sitorus. (2013). *Teknik Laboratorium Kimia Organik*. Yogyakarta: Graha Ilmu. ISBN 978-979-756-925-9.
- Iswantini, D., Syabirin, G., Affandi S, Y. (2009). *Inhibition Capacities of Water and Ethanol Extracts from Rodent Tuber (Typhonium flagelliforme) to In Vitro Tyrosine Kinase Activity*. Prosiding Seminar Nasional Sains 2 : Bogor, 14 November.
- Juwita, N,K., Djajadisastra., Azizahwati. (2011). *Uji Penghambatan Tirosinase Dan Stabilitas Fisik Sediaan Krim Pemutih Yang Mengandung Ekstrak Kulit Batang Nangka (Artocarpus heterophyllus)*. Majalah Ilmu Kefarmasian. Vol.8 No.3 Desember, 127-164.

- Kalangi, S., J., R. (2013). *Histologi Kulit*. Jurnal Biomedik (Jbm), Volume 5, Nomor 3, Suplemen, November 2013, Hlm S12-20.
- Katrin, E., Novagusda F.N., Susanto., Winarno, H. (2012). *Characteristics And Efficacy Of Irradiated Keladi Tikus (Typhonium Divaricatum (L.) Decne) Leaves*. Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop Dan Radiasi Vol. 8, No. 1 Juni.
- Kurniasari, A., Anwar, E., Djajadisastra, J. (2018). *Potensi Ekstrak Biji Coklat (Theobroma Cacao Linn) Sebagai Inhibitor Tirosinase Untuk Produk Pencerah Kulit*. Jurnal Kefarmasian Indonesia. Vol.8 No. 1-Februari 2018: 34-43.
- Kurniasari, A., Anwar, E., Djajadisastra, J. (2018). *The Potency of Cocoa Bean (Theobroma cacao Linn) Extract as Tyrosinase Inhibitory for Skin Lightening Product*. Jurnal Kefarmasian Indonesia Vol.8 No.1-Februari 2018:34-43 p-ISSN: 2085-675X e-ISSN: 2354-8770.
- Leba, M.A.U. (2017) *Buku ajar : Ekstraksi dan Real Kromatografi*. Yogyakarta. Penerbit Deepublish, Desember 2017. X, 112 hlm.; Uk: 14x20 cm.
- Lintner, Karl & Sederma France. (N.D). (2012). *Substantion Of Skin Whitening Claims*. Diambil dari [Www.Incosmeticsasia.Com/Files/Pres Wkshp1 Substantion Of Skin Whaitening Claims.Pdf](http://www.Incosmeticsasia.Com/Files/Pres_Wkshp1_Substantion_Of_Skin_Whaitening_Claims.Pdf) Diakses Pada Tanggal 17 Januari.
- Lukitaningsih, E., Mustikawaty, A.A., Sudarmanto, A. (2013). *Homology Modeling Dan Molecular Docking Senyawa Aktif Dari Bengkoang (Pachyrrhizus Erosus) Sebagai Inhibitor Tirosinase Pada Homo Sapiens*. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. September 2013, Hlm. 134-141. Vol. 11, No.2.
- Mamoto, N.F.E., Kalangi Sonny J.R., Karundeng. R. (2009). *Peran Melanokortin Pada Melanosit*. Jurnal Biomedik. Volume 1, Nomor 1, Maret 2009, 1-11.
- Markham, K.R.,. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavanoid*. Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung.
- Mawadah, M., Susilawati, Y. (2018). *Potensi Tumbuhan Sebagai Whitening Agent*. Farmaka. Volume 16, Nomor 2, Suplemen, Agustus 2018.

- Mukhriani, Nonci, F.Y., Mumang. (2014). *Penetapan Kadar Tanin Total Ekstrak Biji Jintan Hitam (Nigella Sativa) Secara Spektrofotometri Uv-Vis*. Jf Fik Uinam Vol.2 No.4.
- Mutschler, E. *Dinamika Obat*. Fakultas Biokimia, Farmasi Dan Kimia Bahan Makanan Universitas Johann-Wolfgang-Goethe Frankfurt/Main. Edisi Ke-5. Penerbit Itb.
- Nasrudin, Wahyono, Mustofa, Susidarti, R.A. (2017). *Isolasi Senyawa Steroid Dari Kukit Akar Senggugu (Clerodendrum Serratum L.Moon)*. Pharmaconjurnal Ilmiah Farmasi – Unsrat Vol. 6 No. 3 Agustus 2017 Issn 2302 – 2493.
- Murlistyarini, S., Prawitasari, S., Setyowatie, L. (2018) *Intisari Ilmu Kesehatan Kulit Dan Kelamin*. Penerbit UB Press.
- Nisa, M., R, R., Gani, S.A., Fatima., F, Aisyah., Nursamsiar. (2013). *Uji Efektifitas Beberapa Senyawa Sebagai Peningkat Penetrasi Terhadap Laju Difusi Krim Asam Kojat Tipe Minyak Dalam Air Secara In Vitro*. Pharmacy, Vol.10.01 Juli.
- Nur, S., Rumiyati, Lukitaningsih, E. (2017). *Screening Of Antioxidants, Anti-Aging And Tyrosinase Inhibitory Activities Of Ethanolic And Ethyl Acetate Extracts Of Fruit Flesh And Fruit Peel Langsung (Lansium Domesticum Corr) In Vitro*. Trad. Med. J., January - April 2017 Vol. 22(1), p 63-72 ISSN-p : 1410-5918 ISSN-e : 2406-9086.
- Rachman, E. (2009). *Biologi Perbungaan Keladi Tikus (Typhonium Flageliforme) : Seludang Bunga Menghambat Penyerbukan*. Jurnal Natur Indonesia 11 (2), April : 83-88.
- Sari et al. 2015. *Aktivitas Antioksidan dan Inhibitor Tirosinase Ekstrak Metanol Mangium (Acacia mangium) (Antioxidant and Tyrosinase Inhibitor Activities of Methanol Extracts of Acacia mangium)*. J. Ilmu Teknol. Kayu Tropis Vol. 13 No. 1 Januari.
- Sari, P.P., Rita, W.S., Puspawati, N.M. (2015). *Identifikasi Dan Uji Aktivitas Senyawa Tanin Dari Ekstrak Daun Trembesi (Samanea Saman (Jacq.) Merr) Sebagai Antibakteri Escherichia Coli (E. Coli)*. Jurnal Kimia 9 (1), Januari 2015: 27-34.
- Sianipar, N.F., Purnamaningsih, R., Rosaria. (2016). *Pengembangan Tanaman Keladi Tikus (Typhonium Flagelliforme Lodd.) Asal Indonesia Sebagai*

Obat Antikanker. Jurnal Penelitian dan Pengabdian Masyarakat: 65-74.
ISSN 1693-699X | EISSN 2502-065X. Vol 4, No.1, Januari.

- Sloane Ethel. (2004). *Anatomi Dan Fisiologi*. Penerbit Kedokteran: Egc.
- Suharti, T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri Uv-Vis Dan Spektrometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Penerbit AURA CV. Anugrah Utama Raharja Anggota IKAPI No.003/LPU.
- Sulistyaningrum, M.D. (2019). *Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase Oleh Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) Secara In Vitro*. Institut Sains Dan Teknologi Nasional Jakarta.
- Supriningrum, R., Nurhasnawati, H., Putri, M. 2017. *Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Umbi Bawang Tiwai (Eleutherine Palmifolia (L.) Merr) Berdasarkan Ukuran Serbuk Simplisia*. Jurnal Media Sains, Volume 10 Nomor 1, April 2017. ISSN ELEKTRONIK 2355-9136.
- Suryaningsih, B.E., Soebono, H. *Biologi Melanosit*. Mdvi, Volume. 43 No. 2 Tahun 2016; 78-82.
- Susanti, R Dan Fibriana, F. (2017). *Teknologi Enzim*. Ed. 1. Yogyakarta; Andi Offset. Hal 2.
- Syafruddin., Suriani., Nahdawati., Pakadang.S.R. (2018). *Pengaruh Ekstrak Daun Keladi Tikus (Typhonium Flagelliforme) Terhadap Aktivitas Antimutagenik Pada Mencit (Mus Musculus) Dengan Menggunakan Metode Mikronukleus Assay*. Media Farmasi Vol. Xiv. No. 1. April.
- Utami, Rahmi. (2014). *Inhibitor Tirosinase Ekstrak Metanol Berbagai Bagian Pohon Jabon Dan Mangium*. Departemen Hasil Hutan Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor Bogor.
- Wimpy, Harningsih.T. (2017). *Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Sarang Semut Dan Ekstrak Keladi Tikus Dengan Metode DPPH*. Jurnal kesehatan kusuma husada. Januari.
- Word Healt Organization. (2008). *Maintenance Manual For Laboratory Equipment* (2nd Ed). Geneva, Switzerland: Who Press. Pages 19-25.
- Wullur, A., Schadu, J., Wardhani, A. 2012. *Identifikasi Alkaloid Pada Daun Sirsak (Annona Muricata L.)*. Jurnal Ilmiah Farmasi Poltekes Manado.

- Yanlinastuti, Fatimah, S. 2016. *Pengaruh Konsentrasi Pelarut Untuk Menentukan Kadar Zirkonium Dalam Paduan U-Zr Dengan Menggunakan Metode Spektrofotometri Uv-Vis*. No. 17/Tahun IX. Oktober 2016. ISSN 1979-2409.
- Zakiyana, Y., Supriatno., Medawati. A. 2010. *Effects of Ethanol Extracts of Leaves Keladi Tikus (Typhonium flagelliforme Lodd.) on Human Tongue Cancer Cell Invasion (SP-C1) in vitro*. Jurnal Mutiara Medika Vol. 10 No. 2: 160 - 166, Juli.

LAMPIRAN 1

Hasil Determinasi



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074 / 389A / 102.7 / 2019
 Sifat : Biasa
 Perihal : Determinasi Tanaman Keladi Tikus

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : WAHYUNINGTYAS
 NPM : 17330710
 Program Studi : JURUSAN FARMASI, INSTITUT SAINS DAN TEKNOLOGI NASIONAL

- Perihal determinasi tanaman keladi tikus

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Angiospermae/ Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Dicotyledonae/ Magnoliopsida (Berkeping dua)
Bangsa	: Alismatales
Suku	: Araceae
Marga	: Typhonium
Jenis	: <i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume
Nama Daerah	: Keladi tikus, bira kecil, daun panta susu, ki babi, trenggiling mentik, ileus, kalamoyang.
- Kunci determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208a-209a-1b-2.
- Morfologi : Tanaman keladi tikus adalah tanaman sejenis talas setinggi 25 cm hingga 30 cm, termasuk tumbuhan semak, menyukai tempat lembab yang tidak terkena sinar matahari langsung. Bentuk daun bulat dengan ujung runcing berbentuk jantung dan berwarna hijau segar. Umbi berbentuk bulat rata sebesar buah pala.
- Nama Simplesia : *Typhonii flagelliformii* Folium / Daun Keladi Tikus.
- Kandungan kimia : Kandungan senyawa bioaktif pada tanaman keladi tikus yaitu alkaloid, saponin, glikosida, flavonoid, terpenoid, steroid, dan flavonoid glikosida. Komponen flavonoid glikosida yang terkandung dalam ekstrak daun tanaman keladi tikus fraksi etil asetat adalah 6-glucosyl apigenine yang dikenal dengan isovitexin.
- Penggunaan : Penelitian.
- Daftar Pustaka
 - Farida, Y., Wahyudi, P.S., Wahono, S., & Hanafi, M. 2012. Flavonoid glycoside from the ethyl acetate extraction of Keladi Tikus *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) blume leaves. *Asian Journal of Natural & Applied Sciences* 1 (4): 16-21.
 - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 14 Mei 2019
 Kepala UPT Lab. Herbal Materia Medica Batu



Dr. Husein R. M. Drs., Apt., M.Kes.
 NIP.19611102-199103 1 003

LAMPIRAN 2

Surat Izin Penelitian ISTN



YAYASAN PERGURUAN CIKINI
INSTITUT SAINS DAN TEKNOLOGI NASIONAL

Jl. Moh. Kahfi II, Bhumi Srengseng Indah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640 Telp. (021) 727 0090, 767 4645, 767 4647 Fax. (021) 796 6955
<http://www.istn.ac.id> E-mail: rektorat@istn.ac.id

Nomor : 198 /03.1-Hsf/VII/2019.
Lamp. : -
Perihal : **Permohonan Izin Penelitian Lab.**

Kepada Yth :
Kepala Lab. Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi
Institut Sains dan Teknologi Nasional
Di - Tempat.

Dengan hormat,

Dalam rangka pelaksanaan Tugas Akhir / Skripsi mahasiswa Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi - Institut Sains dan Teknologi Nasional (ISTN), bersama ini kami mengajukan permohonan izin penelitian atas nama :

Nama	: Wahyuningtyas
Nomor Pokok	: 17330710
Bidang	: Farmasi Sains dan Industri

Dengan judul " **Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typonium Flagelliforme* Iodd. Blume) Secara *In Vitro*** " Sehubungan dengan hal tersebut, kami mengharapkan bantuan Bapak/Ibu agar dapat memberikan izin untuk melaksanakan izin penelitian pada Laboratorium **Fitokimia** yang Bapak/Ibu pimpin.

Demikian kami sampaikan, atas perhatian dan bantuannya diucapkan terima kasih.

Jakarta, 01 Juli 2019

Hormat kami,
Kepala Program Studi Farmasi FF-ISTN



Jenny Pontoan, M.Farm., Apt

Tembusan :
1. Arsip

Kalab. Kimia Farmasi
Dr. Herdini, M.Si., Apt

LAMPIRAN 3

Surat Izin Penelitian Biofarmaka IPB



YAYASAN PERGURUAN CIKINI
INSTITUT SAINS DAN TEKNOLOGI NASIONAL

Jl. Mh. Kahlil II, Bumi Srengeng Indah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640 Telp. (021) 727 0090, 787 4845, 787 4847 Fax. (021) 786 6955
<http://www.istn.ac.id> E-mail: rektorat@istn.ac.id

Nomor : 770 /03.1-H/VII/2019.
Lamp. : -
Hal : Permohonan Pengambilan Data / Penelitian

Kepada Yth,
Laboratorium Biofarmaka IPB
Jl. Taman Kencana No.3, Bogor, Babakan
Kec. Bogor Tengah, Jawa Barat 16128

Dengan hormat,

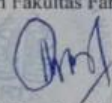
Salam sejahtera kami sampaikan semoga kita semua dalam keadaan sehat wal'afiat dan selalu dalam lindungan Allah SWT (Tuhan Yang Maha Esa).

Dalam rangka pelaksanaan Tugas Akhir (TA) Mahasiswa Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Institut Sains dan Teknologi Nasional (FF-ISTN) Jakarta, bersama ini kami mengajukan permohonan untuk mendapatkan izin pengambilan Data/Penelitian Tugas Akhir atas nama dibawah ini :

Nama Mahasiswa	: Wahyuningtyas
No.Induk Mahasiswa	: 17330710
Prog.Studi / Fakultas	: Farmasi / Farmasi
Pembimbing I-ISTN	: Munawarohthus Sholikhah, M.Si.
Pembimbing II-ISTN	: Lia Puspitasari, S.Farm.,M.Si.,Apt.
Tempat Penelitian	: Pusat Studi Laboratorium Biofarmaka Tropika, IPB Bogor
Judul Tugas Akhir	: “ Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (<i>Typonium Flagelliforme</i> lodd. Blume) Secara <i>In Vitro</i> “

Demikian permohonan ini kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

Jakarta, 01 Juli 2019.
Dekan Fakultas Farmasi ISTN

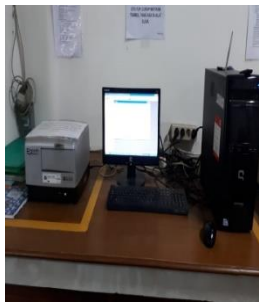


Dr. Refdanita, M.Si., Apt.
NIK : 01.91827

Tembusan Yth :
1. Arsip

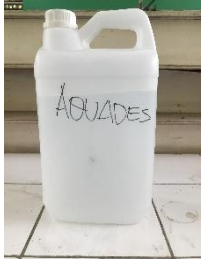
LAMPIRAN 4

Alat Yang Digunakan Dalam Penelitian

Nama	Gambar	Nama	Gambar
Mikropipet (Thermo Scientific)		Mikropipet (Eppendorf)	
Tip Mikropipet		Mikroplates Reader/ ELISA	
Beaker Glas		Gelas Ukur	

LAMPIRAN 5

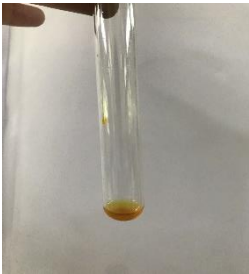
Bahan Yang Digunakan Dalam Penelitian

Nama	Gambar	Nama	Gambar
Daun Keladi Tikus		Ekstrak Etanol daun keladi tikus	
Daun Keladi Tikus Kering		Etanol 96 %	
Serbuk Daun Keladi Tikus		Aquadest	

Maserasi daun keladi tikus		L-DOPA	
L-Tirosin		Kuersetin	

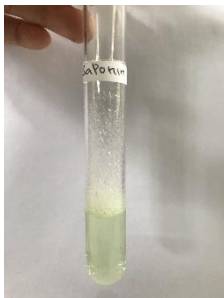
LAMPIRAN 6

Hasil Uji Skrining Fitokimia

No	Jenis Identifikasi	Hasil Serbuk	Hasil Ekstrak
1.	Alkaloid A. Mayer B. Dragendrof C. Bouchadart	 A = Positif (+)  B = Positif (+)  C = Positif (+)	 A = Positif (+) B = Negatif (-) C = Positif (+)

2.	Flavonoid		
3.	Saponin		
4.	Steroid		
5.	Tanin		

LAMPIRAN 7**Hasil Uji Skrining Kontrol Positif**

No	Jenis Identifikasi	Hasil Identifikasi
1.	Alkaloid (Kafein)	
2.	Flavonoid (Kuersetin)	
3.	Saponin (Sabun)	
4.	Steroid (Daun Teh)	

5.	Tanin (Daun Teh)	
----	---------------------	--

LAMPIRAN 8

Hasil Rendemen Daun Keladi Tikus

Ekstrak Etanol 96 %	Sampel	Daun keladi tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> (Lodd.) Blume)
	Bobot Ekstrak (g)	29,3
	Rendemen (%)	9,76
	Warna	Hijau tua kecoklatan

Perhitungan Rendemen :

$$\% \text{ Rendemen} : \frac{\text{Bobot ekstrak kental}}{\text{Bobot simplisia yang diekstraksi}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} : \frac{29,3}{300} \times 100\% = 9,76 \%$$

LAMPIRAN 9**Hasil Perhitungan Uji Analisis Kadar Flavonoid Total**

Nilai Absorbansi Larutan Standar Kuersetin :

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (y)
1	0,012
5	0,199
10	0,538
15	0,907
20	1,175

Perhitungan mencari nilai a,b,r :

Panjang Gelombang	X	Y	X²	Y²	X.Y
425 nm	1	0,012	1	0,000144	0,012
	5	1,199	25	1,437601	5,995
	10	0,538	100	0,289444	5,38
	15	0,907	225	0,822649	13,605
	20	1,175	400	1,380625	23,5
Total	51	3,831	751	3,930463	48,492

Keterangan : y = Serapan

X = Konsentrasi

a = Konstanta

b = Slope (Kemiringan)

n = Perlakuan

(Lanjutan)

Hasil nilai a,b,r yaitu :

a : -0,0797

b : 0,0633

r : 0,9957

Persamaan Linear : $y = bx + a$ $y = 0,0633 x - 0,0797$ $R^2 = 0,9957$

Nama Sampel	Bobot Sampel (g)	Abs	Kadar Flavonoid (bpj)	Kadar Flavonoid % (b/b)	Rata-rata
Daun Keladi Tikus (<i>Typhonium flagelliforme</i> Lodd. Blume)	0,3007	0,195	4,3396	0,9019	0,7378 %
	0,3007	0,195	2,7598	0,5736	

Perhitungan % Flavonoid :

$$F = \frac{C \times V \times fp \times 10^{-6}}{m} \times 100 \%$$

(Lanjutan)

1. Sampel Daun Keladi Tikus Ulangan Pertama

$$y = bx + a$$

$$0,195 = 0,0633 x - 0,0797$$

$$0,195 + 0,0797 = 0,0633 x$$

$$0,2747 = 0,0633 x$$

$$x = 4,3396 \mu\text{g/mL}$$

$$\begin{aligned} F &= \frac{4,3396 \times 100 \times 6,25 \times 10^{-6}}{0,3007} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00271225}{0,3007} \times 100 \% \\ &= 0,00901978 \times 100 \% \\ &= 0,9019 \% (b/b) \end{aligned}$$

2. Sampel Daun Keladi Tikus Ulangan Kedua

$$y = bx + a$$

$$0,195 = 0,0633 x - 0,0797$$

$$0,195 + 0,0797 = 0,0633 x$$

$$0,2747 = 0,0633 x$$

$$x = 4,3396 \mu\text{g/mL}$$

$$\begin{aligned} F &= \frac{2,7598 \times 100 \times 6,25 \times 10^{-6}}{0,3007} \times 100 \% \\ &= \frac{0,0017245}{0,3007} \times 100 \% \\ &= 0,00573495 \times 100 \% \\ &= 0,5735 \% (b/b) \end{aligned}$$

Keterangan :

 10^{-6} : Angka konversi nilai suatu bobot yang diambil dari μg menjadi gram.

LAMPIRAN 10

**Hasil Perhitungan Penghambatan (%) Aktivitas Tirosinase Ekstrak
Etanol Daun Keladi Tikus (*Typhonium Flagelliforme* (Lodd.) Blume)
Substrat L-Dopa**

**1. Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus Dengan Substrat L-DOPA
Ulangan Pertama (U1)**

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi				% Penghambatan $\frac{[(Ab - AKb) - (As - AKs)]}{(Ab - AKb)} \times 100 \%$
	Blanko (Ab)	Kontrol Blanko (A _{kb})	Sampel (As)	Kontrol Sampel (A _{ks})	
1	0,992	0,05	0,988	0,097	5,414
2,5	0,992	0,05	0,984	0,219	18,790
5	0,992	0,05	0,956	0,34	34,607
7,5	0,992	0,05	1,109	0,495	34,820
10	0,992	0,05	1,213	0,614	36,412

**2. Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus Dengan Substrat L-DOPA
Ulangan Kedua (U2)**

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi				% Penghambatan $\frac{[(Ab - AKb) - (As - AKs)]}{(Ab - AKb)} \times 100 \%$
	Blanko (Ab)	Kontrol Blanko (A _{kb})	Sampel (As)	Kontrol Sampel (A _{ks})	
1	0,992	0,05	0,97	0,097	7,325
2,5	0,992	0,05	0,998	0,219	17,304
5	0,992	0,05	0,986	0,34	31,423
7,5	0,992	0,05	1,121	0,495	33,546
10	0,992	0,05	1,216	0,614	36,093

(Lanjutan)

**3. Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus Dengan Substrat L-Dopa
Ulangan Ketiga (U3)**

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi				% Penghambatan $\frac{[(Ab - AKb) - (As - AKs)]}{(Ab - AKb)} \times 100 \%$
	Blanko (Ab)	Kontrol Blanko (A _{kb})	Sampel (A _s)	Kontrol Sampel (A _{ks})	
1	0,992	0,05	0,972	0,097	7,113
2,5	0,992	0,05	0,981	0,219	19,108
5	0,992	0,05	0,998	0,34	30,149
7,5	0,992	0,05	1,171	0,495	28,238
10	0,992	0,05	1,217	0,614	35,987

**4. Rata-rata ekstrak etanol daun keladi tikus dengan substrat
L-DOPA (U1, U2, U3)**

Konsentrasi (mg/mL)	% Penghambatan			Rata-rata % Penghambatan	IC ₅₀ mg/mL ⁻¹
	U1	U2	U3		
1	5,414	7,325	7,113	6,617	13,307
2,5	18,790	17,304	19,108	18,401	
5	34,607	31,423	30,149	32,059	
7,5	34,820	33,546	28,238	32,201	
10	36,412	36,093	35,987	36,164	

(Lanjutan)

Persamaan Linear :

$$y = bx + a$$

$$y = 3,0725 x + 9,1115$$

$$R^2 = 0,9098$$

LAMPIRAN 11

**Hasil Perhitungan Penghambatan (%) Asam Kojat Aktivitas
Tirosinase Substrat L-DOPA**

1. Asam Kojat Dengan Substrat L-DOPA Ulangan Pertama (U1)

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi				% Penghambatan $\frac{[(Ab - AKb) - (As - AKs)]}{(Ab - AKb)} \times 100 \%$
	Blanko (Ab)	Kontrol Blanko (A _{kb})	Sampel (As)	Kontrol Sampel (A _{ks})	
0,00781	0,992	0,05	0,905	0,049	9,130
0,01563	0,992	0,05	0,797	0,048	20,488
0,03125	0,992	0,05	0,707	0,049	30,149
0,0625	0,992	0,05	0,656	0,048	35,456
0,125	0,992	0,05	0,373	0,049	65,711

2. Asam Kojat Dengan Substrat L-DOPA Ulangan Kedua (U2)

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi				% Penghambatan $\frac{[(Ab - AKb) - (As - AKs)]}{(Ab - AKb)} \times 100 \%$
	Blanko (Ab)	Kontrol Blanko (A _{kb})	Sampel (As)	Kontrol Sampel (A _{ks})	
0,00781	0,992	0,05	0,863	0,049	13,588
0,01563	0,992	0,05	0,789	0,048	21,338
0,03125	0,992	0,05	0,742	0,049	26,433
0,0625	0,992	0,05	0,682	0,048	32,696
0,125	0,992	0,05	0,359	0,05	67,197

(Lanjutan)

3. Asam Kojat Dengan Substrat L-DOPA Ulangan Ketiga (U3)

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi				% Penghambatan $\frac{[(Ab - AKb) - (As - AKs)]}{(Ab - AKb)} \times 100 \%$
	Blanko (Ab)	Kontrol Blanko (A _{kb})	Sampel (A _s)	Kontrol Sampel (A _{ks})	
0,00781	0,992	0,05	1,006	0,049	-1,592
0,01563	0,992	0,05	0,969	0,048	2,229
0,03125	0,992	0,05	0,842	0,049	15,817
0,0625	0,992	0,05	0,736	0,048	26,964
0,125	0,992	0,05	0,386	0,05	64,331

4. Rata-Rata Asam Kojat Dengan Substrat L-DOPA (U1, U2, U3)

Konsentrasi (mg/mL)	% Penghambatan			Rata-rata % Penghambatan	IC ₅₀ mg/mL ⁻¹
	U1	U2	U3		
0,00781	9,130	13,588	-1,592	7,042	0,0935
0,01563	20,488	21,338	2,229	14,685	
0,03125	30,149	26,433	15,817	24,133	
0,0625	35,456	32,696	26,964	31,706	
0,125	65,711	67,197	64,331	65,747	

(Lanjutan)

Persamaan Linear :

$$y = bx + a$$

$$y = 473,13 x + 5,7453$$

$$R^2 = 0,9915$$

LAMPIRAN 12**Hasil Perhitungan Nilai IC₅₀ Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus**

Dari grafik hubungan konsentrasi (mg/ml) dan persentase penghambatan (%) didapatkan persamaan garis linear $bx + a$, dimana x adalah konsentrasi, sedangkan y adalah persentase penghambatan IC_{50} = konsentrasi yang memberikan penghambatan sebesar 50%.

Jadi, $y = 50$, $x = IC_{50}$

Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus Substrat L-DOPA

$$y = bx + a$$

$$50 = 3,0725 x + 9,1115$$

$$50 - 9,1115 = 3,0725 x$$

$$40,8885 = 3,0725 x$$

$$x = 13,308 \text{ mg/mL}$$

$$= 13.308 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

LAMPIRAN 13**Hasil Perhitungan Nilai IC₅₀ Asam Kojat****Asam Kojat Substrat L-DOPA**

$$y = bx + a$$

$$50 = 473,13 x + 5,7453$$

$$50 - 5,7453 = 473,13 x$$

$$44,2547 = 473,13 x$$

$$x = 0,0935 \text{ mg/mL}$$

$$= 93,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$$