UJI AKTIVITAS PENGHAMBAT TIROSINASE PADA EKSTRAK ETANOL RIMPANG KUNYIT HITAM (*Curcuma caesia* Roxb.) DENGAN VARIASI KONSENTRASI PELARUT

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

OLEH :
Della Puspita Sari
22482011357

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN SAMARINDA
SAMARINDA
2025-2026

HALAMAN PERSETUJUAN SEMINAR SKRIPSI II

Judul Skripsi	: Uji Aktivitas Penghambat Tirosinase Pada Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam (*Curcuma caesia* Roxb.). Dengan Variasi Konsentrasi Pelarut
Nama	: Della Puspita Sari
NIM	: 22482011357
Program Studi	: Sarjana Farmasi

Seminar Skripsi II telah diperiksa dan disetujui oleh :

Samarinda, Senin 8 Juni 2026

PEMBIMBING

Henny Nurhasnawati, S.Si., M.Si
NIDN. 1103067801

MOTO DAN PERSEMBAHAN

MOTO

"Maka sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan" (Q.S. Al-Insyirah: 5-6)

"Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya"
Q.S Al-Baqarah : 286

"Don't compare your life to others. There's no comparison between the sun and moon, they shine when it's their time"
(Denzel Washington)

PERSEMBAHAN:

Dengan rasa syukur kepada Allah Subhanahu wa Ta'ala, skripsi ini saya persembahkan kepada: Ibu Sumiati, sosok yang selalu menjadi sumber kekuatan, doa, dan kasih sayang dalam hidup saya. Terima kasih atas segala pengorbanan, dukungan, dan perjuangan yang tidak pernah berhenti mengiringi langkah saya hingga sampai pada titik ini. Karya ini adalah bentuk rasa cinta dan terima kasih saya untuk Ibu. Kepada Bapak Alm. Syaiful Anwar, meskipun tidak lagi hadir secara fisik di sisi saya, akan senantiasa hidup dalam doa dan kenangan. Semoga Allah Subhanahu wa Ta'ala menempatkan Bapak pada tempat terbaik di sisi-Nya.

Untuk diri saya sendiri, Terima kasih karena telah bertahan sampai sejauh ini. Kamu sudah sampai pada titik ini di tengah berbagai kesulitan, tekanan, dan kelelahan yang pernah terasa begitu berat, kamu tetap memilih untuk melanjutkan langkahmu. Terima kasih karena tidak menyerah, karena tetap berjuang ketika keadaan tidak berpihak, dan karena terus percaya bahwa semua usaha yang dilakukan akan menemukan jalannya. Skripsi ini bukan hanya tentang sebuah gelar, tetapi juga tentang bukti bahwa kamu mampu bertahan, tumbuh, dan menyelesaikan apa yang telah kamu mulai.

KATA PENGANTAR

Dengan penuh rasa syukur ke hadirat Allah Subhanahu wa Ta'ala atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi berjudul "Uji Aktivitas Penghambat Tirosinase pada Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam (*Curcuma caesia* Roxb.)" tepat pada waktunya. Karya ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi sekaligus sebagai wujud penerapan ilmu yang telah diperoleh selama masa studi.

Penyusunan skripsi ini juga menjadi sarana pembelajaran berharga untuk memperluas wawasan dan pengalaman dalam penelitian farmasi. Penulis menyadari bahwa proses ini tidak mungkin tercapai tanpa bimbingan, dukungan, dan doa dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih yang mendalam kepada*:*

1. Allah Subhanahu wa Ta'ala, atas segala rahmat, karunia, kesehatan, kekuatan, dan kemudahan yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
2. Bapak Apt. Supomo, M.Si., selaku Ketua Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Samarinda.
3. Ibu Henny Nurhasnawati, M.Si., Selaku Dosen Pembimbing, dengan penuh kesabaran telah memberikan bimbingan, arahan, masukan, serta membagikan ilmu dan pengalaman yang sangat berharga selama proses penyusunan skripsi ini.
4. Kepada kedua orang tua, Bapak Alm. Syaiful Anwar dan Ibu Sumiati, serta kakak-kakak saya, Sri Wahyuni, Zulkifli Ardiansyah, dan Abdul Malik, beserta saudara ipar, Fitria Nabila dan Akbar Novaliansyah, dan tante, Syarifah Seha, atas doa, dukungan, kasih sayang, dan pengorbanan yang senantiasa mengiringi setiap langkah dalam penyusunan skripsi ini. Tidak lupa, apresiasi yang sebesar-besarnya diberikan kepada keponakan tercinta, Aqila, Asyifa, dan Anindya, yang telah menghadirkan kebahagiaan serta semangat selama proses penyusunan skripsi ini.

5. Para dosen dan staf STIKSAM atas dedikasi dalam mendidik serta bantuan yang diberikan sepanjang masa perkuliahan penulis.
6. Sahabat saya, Nur Ida dan Syarifah Nurul, terima kasih telah menjadi tempat berkeluh kesah yang paling nyaman selama proses penulisan skripsi dan perkuliahan, setia menemani dan menyemangati dengan celetukan-celetukan hangat yang selalu memberi energi baru, serta selalu menyediakan waktu di tengah kesibukan kalian.
7. Sahabat perkuliahan saya, Deandra, Delvi, Puput, Deswita Amaliah, Jey, dan Alfi, terima kasih telah hadir dan mewarnai hari-hari perantauan ini sejak langkah pertama perkuliahan hingga detik ini. Semoga perjalanan yang telah kita lalui bersama menjadi bagian yang selalu dikenang, dan selamat menjalani tangga-tangga kehidupan baru yang menanti di depan.
8. Sahabat Ngangkringan: Deandra, Marisa, Sigit, Devin, dan Ilham, terima kasih telah hadir pada perjuangan ini, berbagi solusi di saat buntu, dan mengubah setiap kegelisahan skripsi menjadi tawa yang tak terlupakan.
9. Terakhir, saya ingin berterima kasih kepada diri sendiri, yang telah memilih untuk tetap melangkah meski dihadapkan pada berbagai kesulitan. Terima kasih karena telah bertahan, berjuang, dan tidak menyerah, sehingga setiap langkah kecil akhirnya membawa saya sampai pada titik ini.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan semua pihak yang telah memberikan bantuan, dukungan, dan doa dalam proses penyusunan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan serta menjadi kontribusi kecil yang berarti bagi masyarakat luas.

Samarinda Juni 2026

Della Puspita Sari

ABSTRAK

Nama : Della Puspita Sari

Program studi : Sarjana Farmasi

Judul : Uji Aktivitas Penghambat Tirosinase Pada Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) DenganVariasi Konsentrasi Pelarut

Pembimbing : Henny Nurhasnawati, M.Si.

Kulit manusia berfungsi sebagai pelindung utama tubuh dari paparan sinar ultraviolet (UV). Intensitas UV yang tinggi sering memicu hiperpigmentasi akibat produksi melanin berlebih yang dikatalisis oleh enzim tirosinase. Penghambatan tirosinase menjadi salah satu upaya mencegah gangguan pigmentasi melalui pemanfaatan bahan alami, salah satunya kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.). Perbedaan konsentrasi pelarut dalam ekstraksi berpotensi memengaruhi aktivitas penghambatan tirosinase yang dihasilkan. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi aktivitas penghambatan enzim tirosinase dari ekstrak etanol 70% dan etanol 95% rimpang *Curcuma caesia* Roxb. dengan pembanding asam kojat. Tahapan penelitian meliputi determinasi tumbuhan, pembuatan simplisia, penetapan susut pengeringan dan kadar air, pembuatan ekstrak, skrining fitokimia, serta pengujian aktivitas penghambatan tirosinase secara in vitro menggunakan *microplate reader*. Hasil penelitian menunjukkan susut pengeringan simplisia sebesar 8,71 ± 0,35%, rendemen ekstrak etanol 70% sebesar 16,60% dan etanol 95% sebesar 8,44%, serta kadar air masing-masing sebesar 10,955 ± 0,30% dan 9,59 ± 0,34%. Skrining fitokimia menunjukkan ekstrak etanol 70% mengandung alkaloid, flavonoid, dan tanin, sedangkan ekstrak etanol 95% mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, dan triterpenoid. Uji penghambatan enzim tirosinase menunjukkan ekstrak etanol 70% pada konsentrasi 500 dan 1000 ppm memberikan persentase penghambatan sebesar 7,04 ± 0,17% dan 13,70 ± 0,09%, sedangkan ekstrak etanol 95% sebesar 10,29 ± 0,21% dan 15,06 ± 0,40%, jauh lebih rendah dibandingkan kontrol positif asam kojat sebesar 69,97 ± 0,21% dan 75,88 ± 0,23%. Hasil uji Two Way ANOVA dan Post Hoc Tukey HSD menunjukkan semua kelompok perlakuan berbeda secara signifikan ($p=0,000 < 0,05$).

Kata Kunci: Kulit, Hiperpigmentasi, Penghambat Tirosinase, *Curcuma caesia* Roxb., Persentase penghambat

ABSTRACT

Name : Della Puspita Sari

Study Program: Sarjana Farmasi

Title : Tyrosinase Inhibitory Activity Test of Ethanol Extract of Black Turmeric Rhizome (*Curcuma caesia* Roxb.)

Counsellor : Henny Nurhasnawati, M.Si.

The human skin serves as the body's primary protective barrier against ultraviolet (Human skin serves as the body's primary defense against ultraviolet (UV) radiation exposure. High UV intensity frequently triggers hyperpigmentation due to excessive melanin production catalyzed by the tyrosinase enzyme. Tyrosinase inhibition has emerged as one approach to preventing pigmentation disorders through the utilization of natural materials, one of which is black turmeric (*Curcuma caesia* Roxb.). Differences in solvent concentration during extraction potentially influence the resulting tyrosinase inhibitory activity. This study aimed to evaluate the tyrosinase enzyme inhibitory activity of 70% and 95% ethanol extracts of *Curcuma caesia* Roxb. rhizomes with kojic acid as a comparator. The research stages included plant determination, simplicia preparation, determination of drying shrinkage and moisture content, extract preparation, phytochemical screening, and in vitro tyrosinase inhibitory activity testing using a microplate reader. The results showed a simplicia drying shrinkage of 8.71 ± 0.35%, extract yield of 16.60% for the 70% ethanol extract and 8.44% for the 95% ethanol extract, and moisture content of 10.955 ± 0.30% and 9.59 ± 0.34%, respectively. Phytochemical screening revealed that the 70% ethanol extract contained alkaloids, flavonoids, and tannins, while the 95% ethanol extract contained alkaloids, flavonoids, tannins, and triterpenoids. The tyrosinase enzyme inhibition assay showed that the 70% ethanol extract at concentrations of 500 and 1000 ppm produced inhibition percentages of 7.04 ± 0.17% and 13.70 ± 0.09%, while the 95% ethanol extract yielded 10.29 ± 0.21% and 15.06 ± 0.40%, both substantially lower than the positive control kojic acid at 69.97 ± 0.21% and 75.88 ± 0.23%. Two-Way ANOVA and Post Hoc Tukey HSD analysis indicated that all treatment groups differed significantly ($p = 0.000 < 0.05$).

Keywords: Skin, Hyperpigmentation, Tyrosinase Inhibitor, *Curcuma caesia* Roxb, inhibitor percentage

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL ..... **i**
HALAMAN PERSETUJUAN SEMINAR SKRIPSI II ..... **ii**
MOTO DAN PERSEMBAHAN ..... **iii**
KATA PENGANTAR ..... **iv**
ABSTRAK ..... **vi**
ABSTRACT ..... **vi**
DAFTAR ISI ..... **viii**
DAFTAR GAMBAR ..... **x**
DAFTAR TABEL ..... **xi**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **xii**

BAB I PENDAHULUAN **1**
A. Latar Belakang 1
B. Rumusan Masalah 3
C. Hipotesis 4
D. Tujuan Penelitian 4
E. Manfaat penelitian 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA **5**
A. Tumbuhan Kunyit Hitam 5
B. Simplisia 7
C. Ekstrak Dan Ekstraksi 8
D. Etanol 9
E. Skrining Fitokimia 10
F. Kulit 11
G. Hiperpigmentasi 13
H. Melanin 13
I. Enzim Tirosinase 15
J. Inhibitor Tirosinase 15
K. Asam Kojat 15

L. *Microplate Reader* 16
M. Persentase Inhibisi 17

BAB III METODE PENELITIAN 18
A. Rancangan Penelitian 18
B. Objek penelitian 18
C. Sampel dan Teknik Sampling 18
D. Variabel Penelitian 19
E. Definisi Operasional 19
F. Teknik Pengumpulan Data 20
G. Analisis Data 30

BAB IV PEMBAHASAN 31
A. Determinasi Tumbuhan 31
B. Pembuatan Simplisia 31
C. Penetapan Susut Pengeringan Simplisia 32
D. Ekstraksi Rimpang Kunyit Hitam 33
E. Penetapan Kadar Air Ekstrak 35
F. Skrining Fitokimia 36
G. Uji Aktivitas Penghambat EnzimTirosine Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam 41

BAB V PENUTUP 45
A. Kesimpulan 45
B. Saran 45

DAFTAR PUSTAKA 46
LAMPIRAN 55

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

1. Rimpang Kunyit Hitam (*Curcuma caesia* Roxb)..... 5
2. Perbedaan jalur melanogenesis .....14**Error! Bookmark not defined.**
3. *Microplate Reader*..... 16

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

1. Perlakuan Sampel Uji..... 28
2. Hasil Penetapan Susut Pengeringan Simplisia Rimpang Kunyit Hitam 32
3. Hasil Rendemen Ekstrak Rimpang Kunyit Hitam 34
4. Hasil Kadar Air Ekstrak Rimpang Kunyit Hitam 35
5. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Rimpang Kunyit Hitam 37
6. Hasil Uji Enzim Tirosinase 42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran **Halaman**

1. Alur Penelitian 55
2. Surat determinasi kunyit hitam 56
3. Tahapan Pembuatan Simplisia 57
4. Perhitungan Susut Pengeringan dengan Metode Gravimetri 58
5. Penetapan Susut Pengeringan 60
6. Tahapan Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam 61
7. Perhitungan Rendemen Ekstrak 62
8. Penetapan Rendemen Ekstrak Kunyit Hitam 63
9. Perhitungan Kadar Air Ekstrak 65
10. Penetapan Kadar Air Ekstrak 68
11. Skrining Fitokimia..... 70
12. Perhitungan Larutan Enzim dan Kontrol Positif..... 71
13. Perhitungan Larutan Uji Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam 72
14. Uji Aktivitas Anti tirosinase Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam 73
15. Perhitungan Persen Inhibisi Asam Kojat..... 75
16. Perhitungan Persen Inhibisi Ekstrak Etanol Kunyit Hitam..... 77
17. Hasil Uji Statistika % Inhibisi Tirosinase 81

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kulit merupakan bagian tubuh manusia terluar yang berperan sebagai pelindung utama dari berbagai faktor eksternal, termasuk radiasi sinar ultraviolet (UV). Indonesia, yang berada disekitar garis khatulistiwa, memiliki iklim tropis yang ditandai dengan suhu tinggi dan radiasi UV pada tingkat tertinggi (Sholikha *et al*., 2023). Paparan sinar UV dalam jangka waktu lama dan frekuensi tinggi dapat menyebabkan gangguan pada kulit, seperti hiperpigmentasi (Furi et al., 2022; Muslihin *et al*., 2024). Pigmen utama yang menentukan warna kulit adalah melanin, yaitu molekul pigmen yang berperan penting dalam melindungi kulit dari radiasi sinar UV dan menghilangkan bahan kimia beracun (Jayantie *et al*., 2022). Pembentukan melanin merupakan faktor penting bagi perkembangan warna kulit manusia (Hijayanti & Rahmati, 2023). Akumulasi melanin yang berlebihan dan distribusi yang tidak merata dapat memicu munculnya gangguan pigmentasi seperti melasma, bintik-bintik gelap, dan tanda-tanda penuaan dini, yang sering menimbulkan masalah estetika pada kulit (Imanullah, 2024).

Hiperpigmentasi adalah kondisi ketidakseimbangan warna kulit yang ditandai dengan bercak gelap tidak merata akibat peningkatan produksi melanin (Gazali *et al*., 2024). Proses ini terjadi melalui konversi tirosin menjadi L-Dopa dan dopakuinon yang terpolimerisasi membentuk melanin, sehingga menyebabkan bercak gelap di area tertentu (Wijaya & Noviana, 2022). Secara fisiologis, melanin melindungi kulit dari sinar UV, tetapi produksi yang tidak terkontrol dapat menyebabkan penumpukan pigmen berlebih menghasilkan bercak gelap yang sulit hilang. Salah satu cara mencegah pembentukan melanin adalah dengan menghambat aktivitas tirosinase (Muslihin Nisrina, Rika Hartati, 2024).

Tirosinase adalah enzim yang berperan dalam pembentukan pigmen kulit, atau proses melanogenesis. Enzim ini berkatalis dalam dua tahap utama pembentukan melanin: mengubah L-tirosin menjadi L-Dopa melalui hidroksilasi,

lalu mengubah L-Dopa menjadi Dopakuinon melalui oksidasi (Eden *et al*., 2024). Dopakuinon selanjutnya mengalami autooksidasi membentuk dopakrom, yang kemudian diubah menjadi *dihydroxyindole* (DHI) atau *dihydroxyindole-carboxylic acid* (DHICA) sebagai prekursor melanin (Furi et al., 2022). Paparan UV yang meningkat merangsang aktivitas tirosinase, sehingga produksi melanin berlangsung lebih cepat (Sagala *et al*., 2019). Proses ini bisa diperlambat oleh inhibitor seperti arbutin, merkuri, hidrokuinon, dan asam kojat, yang digunakan sebagai penghilang pigmen. penggunaan inhibitor tersebut berisiko menyebabkan iritasi kulit atau kanker jika berlebihan karena itu, fokus penelitian beralih ke senyawa alami yang lebih aman. (Eden *et al*., 2024).

Tumbuhan menghasilkan berbagai senyawa anti-radikal bebas dari metabolit primer maupun sekunder, salah satunya flavonoid. Flavonoid merupakan metabolit sekunder dari kelompok senyawa fenol dengan struktur cincin benzena yang memiliki gugus -OH . Senyawa ini berfungsi sebagai pewarna tumbuhan, pelindung sel, antiinflamasi, dan antibiotik (Ningsih et *al*., 2020)., serta mampu menghambat aktivitas tirosinase melalui gugus 3-hidroksi yang berperan dalam depigmentasi (Syakri *et al*., 2020). Kuersetin, salah satu jenis flavonoid, bekerja sebagai inhibitor tirosinase melalui pengkhelatan ion tembaga pada sisi aktif enzim dan aktivitas antioksidannya dalam menekan melanogenesis (Abidin *et al*., 2019). Salah satu tanaman yang diketahui mengandung senyawa flavonoid, sehingga berpotensi sebagai inhibitor tirosinase adalah kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.).

Kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.), anggota famili Zingiberaceae, merupakan tanaman tropis dan subtropis yang rimpangnya telah lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional Indonesia untuk gangguan pencernaan, pernapasan, serta mengobati gangguan kulit seperti ruam, kadas, dan kudis (Kholid et al., 2022; Nuraeni et al., 2023). Ekstrak etanol rimpangnya yang diperoleh melalui maserasi mengandung metabolit sekunder berupa alkaloid, tanin, triterpenoid, dan flavonoid (Hasan et al., 2023). Kholid *et al* (2022) melaporkan kandungan flavonoid total 2775,65 mg/100 g pada ekstrak etanol 80%, sedangkan pada penelitian Rohmani *et al* (2024), kadungan flavonoid etanol 96% flavonoid total sebesar 2.219,04 mg/100 g, keduanya menunjukkan potensi sebagai inhibitor tirosinase. Perbedaan hasil

tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi berpengaruh terhadap kandungan senyawa aktif yang terekstraksi. Etanol dipilih sebagai pelarut karena kepolarannya yang tinggi memungkinkan penarikan berbagai senyawa metabolit sekunder secara optimal (Surya & Luhurningtyas, 2021). Etanol 70% memiliki konstanta dielektrik sebesar 41,25, sedangkan etanol 95% sebesar 27,25, sehingga etanol 70% bersifat lebih polar dibandingkan etanol 95% (Setya *et al*., 2025). Dengan demikian, kedua konsentrasi etanol tersebut perlu diuji potensinya sebagai inhibitor enzim tirosinase.

Persentase inhibisi merupakan parameter yang digunakan untuk menggambarkan tingkat aktivitas penghambatan enzim tirosinase, yang dihitung berdasarkan perbandingan nilai absorbansi sampel terhadap nilai absorbansi kontrol. Parameter tersebut diperoleh melalui uji *in vitro* menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). yang memungkinkan pengukuran secara tepat dan sensitif. Reaksi penghambatan oleh ekstrak etanol rimpang *Curcuma caesia* Roxb. berlangsung di dalam *microplate well*, dan perubahan warna akibat reaksi antara enzim dan substrat diukur dengan menggunakan *microplate reader* (ELISA reader). Menurut Aprilliani *et al* (2018) ekstrak etanol dari temu giring (*Curcuma heyneana*) persen penghambat tirosinasenya sebesar 18.85 ±0.11 dan kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) persen penghambat tirosinasenya sebesar 20.75 ± 0.04 menunjukkan bahwa temu giring dan kunci pepet memiliki potensi sebagai penghambat aktivitas tirosinase.

Sejauh ini, belum terdapat laporan ilmiah mengenai aktivitas penghambatan enzim tirosinase dari *Curcuma caesia* Roxb. yang berasal dari Kalimantan Timur, Sehingga dilakukan penelitian terkait penghambatan enzim tirosinase dari ekstrak etanol rimpang *Curcuma caesia* Roxb.

B. Rumusan Masalah

Berapa nilai persentase penghambatan enzim tirosinase dari ekstrak etanol 70% dan etanol 95% rimpang kunyit hitam ?

C. Hipotesis

Ekstrak etanol 70% dan etanol 95 % dari rimpang kunyit hitam memiliki kemampuan untuk menghambat enzim tirosinase.

D. Tujuan Penelitian

Menentukan persentase penghambatan enzim tirosinase dari ekstrak etanol 70% dan etanol 95% rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.).

E. Manfaat penelitian

1. Bagi Peneliti

   Peneliti dapat memperoleh pengetahuan lebih lanjut mengenai potensi dan efektivitas Ekstrak etanol 70% dan etanol 95% dari rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) dalam menghambat enzim tirosinase.

2. Bagi Perguruan Tinggi

   Perguruan tinggi dapat menggunakan informasi ini sebagai acuan untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas penghambat enzim tirosinase dari ekstrak etanol Rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.)

3. Bagi Masyarakat

   Bagi masyarakat dapat memperluas wawasan dan mendapatkan informasi mengenai pemanfaatan rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) sebagai bahan alami yang mampu menghambat enzim tirosinase.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tumbuhan Kunyit Hitam

1. Klasifikasi Kunyit hitam

Menurut hasil determinasi yang dilakukan, Kunyit hitam (*curcuma caesia* Roxb.) diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: Curcuma
Spesies	: *Curcuma caesia* Roxb.



Gambar 1. Rimpang Kunyit Hitam (*Curcuma caesia* Roxb)

(Dokumentasi pribadi, 2025)

2. Morfologi Kunyit hitam

Kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) Termasuk kedalam famili *Zingiberaceae* dengan genus *curcuma* dan bagian yang dimanfaatkan adalah umbi dan rimpangnya. *Curcuma caesia* Roxb. merupakan tanaman herba yang tumbuh tegak, dengan rizoma sebagai organ utama yang berfungsi sebagai batang bawah tanah. Tanaman ini biasanya hidup di dataran tinggi pada ketinggian 200–1000

meter di atas permukaan laut, di tanah lempung berpasir dengan pH agak asam (4,5–6,5) (Pandey *et al*., 2022).

3. Uraian Tumbuhan

Kunyit hitam merupakan tumbuhan dengan tinggi 1–1,5 meter, memiliki rhizoma (rimpang) serta bagian atas tanaman berupa batang semu, daun, dan bunga. Daunnya lebar, panjang, tidak berbulu, dan menampilkan bercak ungu di bagian tengah. Bunganya tersusun dalam bentuk spike, berwarna kuning pucat dengan tepi kemerahan, mekar pada awal musim hujan, sedangkan buah matang pada akhir musim hujan (Pandey *et al*., 2022). Rimpang berbentuk oval memanjang dengan diameter 2–6 cm, berwarna cokelat gelap hingga hitam kebiruan, serta memiliki kerutan melintang dan memanjang yang memperlihatkan zona nodus dan internodus. Rimpang ini berfungsi sebagai tempat penyimpanan cadangan makanan sekaligus organ perbanyakan vegetatif. Secara mikroskopis, daun tersusun atas lapisan epidermis, jaringan mesofil, serta pembuluh dengan rongga minyak. Rimpang terdiri atas epidermis tunggal, korteks berlapis banyak, empulur parenkim berukuran besar, dan jaringan vaskular yang berkembang dengan baik (Nuraeni *et al*., 2023).

4. Kandungan dan manfaat kunyit hitam

Kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) memiliki rimpang yang kaya akan senyawa aktif. Komponen utama yang ditemukan meliputi turmeron, ocimene, borneol, cineole, bornyl asetat, kamper, serta berbagai curcuminoid seperti kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin. Selain itu, rimpang juga mengandung metabolit bioaktif lain, termasuk flavonoid, fenolik, terpenoid, alkaloid, saponin, tanin, glikosida, steroid, antosianin, dan antrakuinon (T. Hasan et al., 2023b). Kombinasi senyawa tersebut mendukung berbagai aktivitas biologis kunyit hitam. Secara ilmiah, ekstraknya terbukti memiliki sifat antioksidan yang kuat dalam menetralisir radikal bebas dan menekan stres oksidatif. Tanaman ini juga bersifat antiinflamasi (Yusniawati & Hasan, 2024), ekstrak kunyit hitam menunjukkan potensi antikanker dengan menghambat pertumbuhan sel, mengecilkan ukuran tumor, serta meningkatkan enzim pertahanan tubuh. Selain itu, kunyit hitam memiliki aktivitas antimikroba dan antifungi, bersifat analgesik

(pereda nyeri), antiasma sekaligus bronkodilator, antikonvulsan, serta antidiabetes yang dapat membantu mengurangi komplikasi seperti neuropati diabetik (Pandey *et al*., 2022).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alami yang telah melalui proses pengeringan dan dimanfaatkan untuk keperluan pengobatan tanpa adanya pengolahan lebih lanjut, kecuali jika secara khusus ditentukan. Proses pengeringan simplisia harus dilakukan dengan hati-hati, di mana suhu tidak boleh melebihi 60°C agar kualitas dan kandungan zat aktif di dalamnya tetap terjaga (Arviani *et al*., 2021).

2. Jenis simplisia

Menurut jenis simplisia dibedakan menjadi 3 yaitu

a. Simplisia Nabati

Simplisia nabati adalah bahan alam yang berasal dari tumbuhan, baik berupa tanaman utuh, bagian tertentu dari tanaman, maupun eksudat tanaman, atau gabungan dari ketiganya. Eksudat tanaman merupakan isi sel yang keluar secara alami atau melalui rangsangan yang sengaja diberikan sehingga dikeluarkan oleh sel (Haerani *et al*., 2023).

b. Simplisia Hewani

Simplisia hewani adalah bahan alam yang berasal dari hewan, baik berupa hewan utuh, bagian tubuh hewan, maupun zat yang dihasilkan oleh hewan yang belum berbentuk senyawa kimia murni (Haerani *et al*., 2023).

c. Simplisia Mineral

Simplisia mineral adalah simplisia yang berasal dari bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau hanya diolah dengan cara sederhana, dan belum berupa senyawa kimia murni (Sapitri et al., 2022).

3. Pembuatan simplisia

Sebelum suatu tanaman diolah menjadi simplisia, terdapat serangkaian tahapan yang harus dilaksanakan untuk membuat simplisia, meliputi sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan pada suhu terkontrol (umumnya dilakukan

dengan memanfaatkan panas matahari selama kurang lebih 24 jam), dilanjutkan dengan sortasi kering, hingga proses penyimpanan. Pada tahap perajangan, simplisia yang memenuhi standar mutu memiliki ketebalan irisan sekitar 3–5 mm. Apabila irisan melebihi ketebalan tersebut, waktu pengeringan akan menjadi lebih panjang dan berpotensi menimbulkan pertumbuhan mikroorganisme atau jamur selama proses berlangsung. Secara umum, kadar air yang dipersyaratkan untuk simplisia tidak boleh melebihi 10% (Kemenkes RI., 2017).

C. Ekstrak Dan Ekstraksi

1. Ekstrak

Menurut BPOM 2023 Ekstrak adalah sediaan berbentuk kering, kental, atau cair yang diperoleh dari proses penyarian simplisia dengan metode yang sesuai, dilakukan tanpa terkena sinar matahari langsung. Berdasarkan konsistensinya, ekstrak dibagi menjadi tiga jenis:

a. Cair

Ekstrak yang masih mengandung pelarut karena belum melalui proses penguapan, sehingga konsistensinya tetap cair pada suhu kamar.

b. Kental

Hasil penyarian yang sudah diuapkan hingga tidak lagi mengandung pelarut, tetapi tetap bertekstur kental pada suhu kamar.

c. Kering

Ekstrak kering Merupakan ekstrak yang telah dikeringkan dengan cara tertentu, bisa dengan atau tanpa penambahan bahan lain.

2. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses isolasi atau pemisahan satu maupun lebih komponen aktif berupa metabolit sekunder dari jaringan tumbuhan maupun hewan dengan menggunakan pelarut yang sesuai, berdasarkan prosedur yang telah ditetapkan (Wahyuningsih *et al*., 2024). Terdapat berbagai metode ekstraksi yang dapat digunakan, antara lain maserasi dan perkolasi sebagai teknik dingin tanpa pemanasan, refluks dan soxhletasi sebagai teknik panas untuk mempercepat proses penarikan senyawa, serta ekstraksi padat–cair dan cair–cair yang memisahkan

komponen berdasarkan perbedaan kelarutan (Haerani *et al*., 2023; Safitri *et al*., 2023).

3. Ekstraksi Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi dengan cara merendam simplisia dalam pelarut pada suhu kamar sehingga senyawa aktif dapat larut ke dalam pelarut. Pada penelitian ini, maserasi dilakukan dengan merendam 100 g serbuk simplisia dalam 1 L pelarut selama 24 jam (6 jam pertama diaduk, lalu didiamkan 18 jam). Proses diulang sekali dengan 500 mL pelarut, kemudian seluruh maserat digabung dan diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental (Kemenkes RI., 2017).

D. Etanol

Etanol (etil alkohol, CH_3CH_2OH) merupakan salah satu senyawa dari golongan alkohol yang ditandai dengan adanya gugus hidroksil (–OH) yang terikat pada atom karbon dalam strukturnya. Karakteristik gugus hidroksil ini menjadikan etanol sebagai pelarut yang bersifat polar, sehingga mampu menarik dan melarutkan berbagai senyawa metabolit sekunder secara optimal (Putu *et al*,. 2020). Tingkat polaritas pelarut etanol sangat dipengaruhi oleh konsentrasi air yang terkandung di dalamnya. Semakin tinggi kandungan air dalam larutan etanol, semakin besar pula nilai polaritasnya dibandingkan dengan etanol absolut. Hal ini dapat ditunjukkan melalui nilai konstanta dielektrik masing-masing konsentrasi, di mana etanol 70% memiliki konstanta dielektrik sebesar 41,25, sedangkan etanol 95% hanya sebesar 27,25. Nilai ini menunjukkan bahwa etanol 70% bersifat lebih polar dibandingkan etanol 95% (Setya *et al*., 2025).

Perbedaan tingkat polaritas antar konsentrasi etanol tersebut berpengaruh langsung terhadap kemampuan ekstraksi senyawa bioaktif. Pelarut dengan polaritas yang lebih tinggi memiliki kemampuan mengekstrak senyawa dari rentang polaritas yang lebih luas. Akibatnya, selain senyawa fenolik, senyawa polar non-fenolik seperti karbohidrat dan protein juga ikut terlarut dalam proses ekstraksi, yang pada akhirnya berkontribusi terhadap peningkatan rendemen hasil ekstraksi secara keseluruhan (Supriningrum *et al*., 2024)

E. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah pemeriksaan awal (*preliminary screening*) untuk mendeteksi keberadaan senyawa bioaktif dalam tanaman, khususnya metabolit sekunder (Maheshwaran *et al*., 2024).

1. Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa alami yang mengandung nitrogen, umumnya bersifat basa, dan banyak ditemukan pada tumbuhan sebagai metabolit sekunder. Lebih dari 12.000 jenis alkaloid telah diidentifikasi, menjadikannya salah satu kelompok metabolit alam terbesar. Senyawa ini bisa hadir dalam bentuk bebas, garam, atau N-oksida, dan telah lama dimanfaatkan sebagai obat sejak ribuan tahun lalu. Alkaloid memiliki aktivitas biologis yang kuat, seperti analgesik, antimikroba, antikanker, antiradang, dan sedatif, sehingga menjadi dasar pengembangan banyak obat modern. Contoh alkaloid yang terkenal antara lain morfina, kodein, kafein, berberin, striknin, dan nikotin (Noureddine, 2018).

2. Flavonoid

Flavonoid merupakan metabolit sekunder dari golongan polifenol yang banyak ditemukan pada tanaman maupun bahan pangan, dan dikenal memiliki beragam efek bioaktif seperti antivirus, antiinflamasi, kardioprotektif, antidiabetes, antikanker, antipenuaan, serta antioksidan. Senyawa ini termasuk polifenol dengan kerangka karbon berjumlah 15 atom, tersusun dalam pola C6-C3-C6, yaitu dua cincin benzena tersubstitusi yang dihubungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Flavonoid terdapat hampir di semua tumbuhan hijau sehingga bisa dijumpai pada berbagai ekstrak tanaman (Bustanul Arifin, 2018).

3. Saponin

Saponin merupakan salah satu kelompok penting metabolit sekunder yang banyak dijumpai pada berbagai jenis tumbuhan. Senyawa ini dikenal memiliki struktur kompleks yang terdiri atas dua bagian utama, yaitu aglikon (sapogenin) yang bersifat lipofilik dan bagian gula (glikon) yang bersifat hidrofilik. Keduanya terhubung melalui ikatan glikosidik sehingga menghasilkan molekul amfifilik mirip sabun, yang menjelaskan kemampuan saponin dalam membentuk busa serta menurunkan tegangan permukaan air. Berdasarkan tipe aglikonnya, saponin terbagi

menjadi dua kelompok besar, yakni saponin steroidal dan saponin triterpenoid, yang dibedakan oleh struktur cincin karbonnya (Nguyen *et al*., 2020).

4. Tanin

Tanin adalah senyawa kompleks yang tersebar luas hampir di semua jenis tanaman, terutama pada bagian buah, daun, batang, dan kulit kayu. Pada tumbuhan, tanin berfungsi sebagai pelindung selama masa pertumbuhan, misalnya pada buah muda yang terasa sepat, pahit, dan berbau langu. Dalam bidang kesehatan, tanin memiliki berbagai khasiat, di antaranya sebagai antidiare, antioksidan, antibakteri, dan astringen. Berdasarkan struktur kimianya, tanin dibagi menjadi dua kelompok utama, yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terkondensasi tersusun dari beberapa unit flavonoid (flavan-3-ol) yang diikat oleh atom karbon, dan biasanya terdapat dalam konsentrasi lebih tinggi dibandingkan tanin terhidrolisis (Sunani & Hendriani, 2023).

5. Steroid/terpenoid

Steroid dan terpenoid merupakan kelompok metabolit sekunder yang umum ditemukan dalam tumbuhan dan memiliki berbagai aktivitas biologis. Terpenoid adalah senyawa turunan isoprena yang banyak berperan sebagai minyak atsiri, pigmen, serta senyawa pertahanan dengan aktivitas seperti antiinflamasi dan antimikroba. Sementara itu, steroid yang dimaksud adalah fitosterol, yaitu steroid yang berasal dari tumbuhan dan berfungsi menjaga stabilitas membran sel serta memberikan efek biologis tertentu. Kedua senyawa ini dapat diidentifikasi menggunakan uji Liebermann–Burchard, di mana terpenoid biasanya menghasilkan warna merah atau ungu, sedangkan steroid menunjukkan warna hijau atau biru kehijauan. Dengan demikian, steroid dan terpenoid merupakan senyawa penting yang dianalisis dalam penelitian fitokimia untuk memahami kandungan bioaktif dalam tumbuhan (Novia *et al*., 2021).

F. Kulit

Kulit merupakan organ terbesar sekaligus lapisan terluar tubuh manusia yang memiliki berbagai fungsi penting, salah satunya sebagai organ proteksi karena berinteraksi langsung dengan lingkungan eksternal. Kondisi kulit sering dijadikan

indikator proses penuaan. Penuaan kulit sendiri merupakan fenomena biologis yang tidak dapat dihindari sepanjang kehidupan manusia (Sutanto *et al*., 2023).

Kulit terdiri dari 3 lapisan kulit yaitu:

1. Epidermis

Epidermis adalah lapisan paling luar dari kulit yang tersusun atas epitel pipih berlapis tanpa pembuluh darah, sehingga kebutuhan nutrisinya diperoleh dari kapiler dermis. Lapisan ini terdiri atas lima bagian, yaitu stratum basal yang berisi sel-sel aktif membelah untuk regenerasi, stratum spinosum dengan sel poligonal yang saling terhubung oleh desmosom, stratum granulosum yang mengandung granula keratohialin sebagai awal pembentukan keratin, stratum lusidum yang jernih dan hanya terdapat pada kulit tebal, serta stratum korneum sebagai lapisan terluar yang terdiri dari sel mati berkeratin yang terus mengelupas. Keseluruhan struktur epidermis berfungsi sebagai pelindung utama tubuh terhadap pengaruh lingkungan luar (Yousef & Sharma, 2017).

2. Dermis

Dermis terletak di bawah epidermis dan merupakan lapisan kulit yang kuat, elastis, serta kaya pembuluh darah, saraf, dan struktur kulit lain. Dermis terbagi menjadi dua lapisan: stratum papilaris, yaitu lapisan atas yang longgar dan memiliki papila dermis berisi kapiler serta ujung saraf seperti badan Meissner; dan **s**tratum retikularis, lapisan yang lebih tebal dan padat dengan serat kolagen serta elastin yang memberikan kekuatan dan kelenturan. Dermis juga mengandung folikel rambut, kelenjar keringat, kelenjar sebasea, serta otot arrector pili. Lapisan ini berperan dalam sensasi, termoregulasi, dan dukungan mekanis kulit (Clost & Vomscheid, 2024).

3. Hipodermis

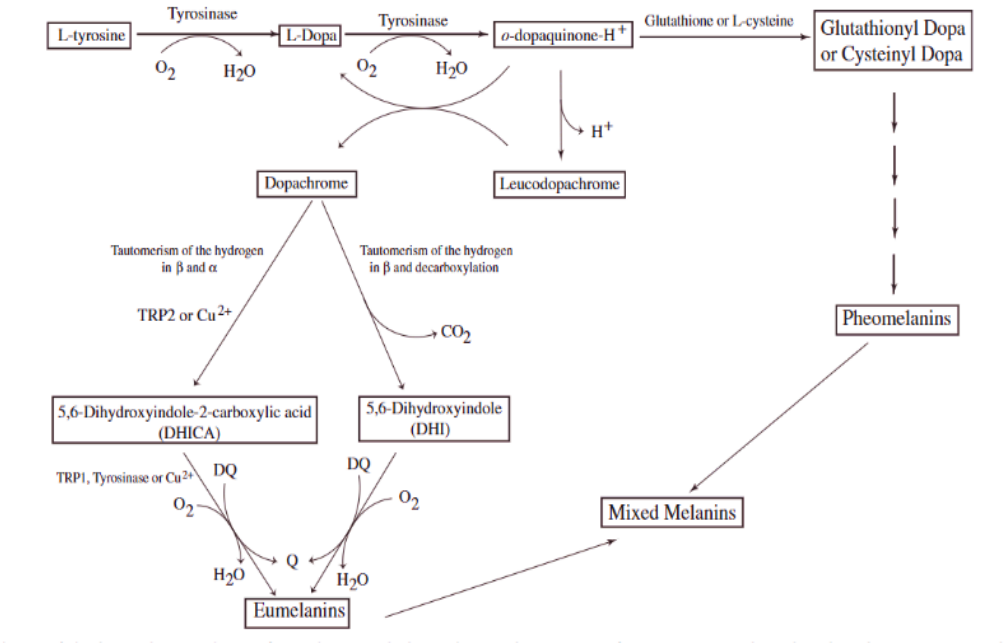
Hipodermis adalah lapisan terdalam kulit, tersusun dari jaringan ikat longgar dan banyak jaringan lemak (*panniculus adiposus*). Lapisan ini berfungsi sebagai bantalan untuk melindungi organ dalam dari tekanan, sebagai penyimpan energi, serta sebagai isolator panas tubuh. Ketebalan hipodermis bervariasi tergantung lokasi tubuh, jenis kelamin, dan status gizi seseorang (Kalangi Bagaian, 2017).

G. Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi merupakan Perubahan warna kulit yang sering dijumpai, Perubahan warna kulit ini dapat disebabkan oleh berbagai faktor internal dan eksternal, termasuk perubahan hormonal, peradangan, cedera, jerawat, eksim, pengobatan tertentu, paparan sinar UV yang meyebabkan produksi pigmen melanin yang berlebihan (Nautiyal & Wairkar, 2021). Prevalensi hiperpigmentasi di Indonesia cukup tinggi, hal ini dikarenakan sebagian besar masyarakat indonesia memiliki tipe kulit kelas 4 dan 5 dalam Fitzpatrick skin phototypes, yaitu tipe kulit yang jarang mengalami *sunburn* (terbakar) tetapi mudah menjadi lebih gelap (tan). Selain itu, Indonesia memiliki iklim tropis dengan paparan sinar matahari yang intens sepanjang tahun, sehingga risiko terjadinya hiperpigmentasi semakin meningkat(Masriono *et al*., 2024). Pigmentasi dan warna kulit diatur oleh proses biologis yang melibatkan produksi pigmen kulit yang disebut melanin, yang diproduksi oleh melanosit di berbagai lapisan kulit. (Nautiyal & Wairkar, 2021)

H. Melanin

Melanin adalah pigmen alami berwarna gelap yang terdapat pada hampir semua organisme hidup. Pigmen ini terbentuk melalui polimerisasi senyawa fenol atau indol dan berfungsi melindungi tubuh dari berbagai faktor lingkungan yang merugikan, terutama sinar ultraviolet. Pada manusia, melanin diproduksi oleh sel melanosit di epidermis dan folikel rambut, berperan dalam menentukan warna kulit, rambut, serta memberikan perlindungan terhadap radiasi mataharin (Guo et al., 2023).



Gambar 2. Perbedaan jalur melanogenesis (Zolghadri *et al*., 2019)

Secara umum, melanin dapat dibedakan menjadi dua jenis utama yaitu ;

1. Eumelanin (hitam/cokelat)

Eumelanin adalah polimer heterogen yang terdiri dari *5,6-dihidroksiindol* (DHI) dan asam *5,6-dihidroksiindol-2-karboksilat* (DHICA) yang termasuk dalam jaringan agregasioligomer. DHI dan DHICA adalah dopakrom yang diperoleh dari oksidasi tirosin atau L-Dopa yang selanjutnya dioksidasi dengan cepat menjadi cyclodopa melalui siklisasi dopakuinon. Rasio relatif DHI dan DHICA bergantung pada aktivitas dopa tautomer isomerase dan ketersediaan ion tembaga, dengan proporsi DHICA yang lebih tinggi secara umum.

2. Feomelanin (merah/kuning)

Pheomelanin berasal dari prekursor umum dopaquinone, sama seperti eumelanin. Namun, L-Dopa berikatan dengan sistein membentuk dopa-sistein (isomer CD), yang kemudian mengalami oksidasi, siklisasi, dan penataan ulang untuk membentuk 1,4-benzotiazina. Pheomelanin dipolimerisasi dari struktur akhir 1,4-benzotiazina tersebut. Dalam pembentukan pheomelanin, L-sistein atau glutathione dapat berikatan pada beberapa posisi cincin dopaquinone, tetapi isomer yang paling dominan terbentuk adalah 5-S-cisteinildopa atau 5-S-glutathione dopa.

I. Enzim Tirosinase

Tirosinase adalah enzim yang tersebar luas di alam, ditemukan pada bakteri, jamur, tumbuhan, dan hewan. Enzim ini berperan penting dalam biosintesis melanin pada mamalia, khususnya dengan mengkatalisis tahap pembatas laju (*rate-limiting step*), yaitu konversi L-tirosin menjadi L-Dopa, serta oksidasi L-Dopa menjadi L-o-dopaquinon. Produk L-o-dopaquinon kemudian menjadi titik awal berbagai jalur pembentukan melanin. Fungsi tirosinase yang abnormal dapat menyebabkan gangguan pigmentasi, baik berupa hiperpigmentasi (produksi melanin berlebihan) maupun hipopigmentasi (produksi melanin berkurang), yang berdampak pada warna kulit, rambut, dan mata (Garcia-Molina *et al*., 2022).

J. Inhibitor Tirosinase

Inhibitor tirosinase adalah senyawa yang berfungsi menghambat kerja enzim tirosinase, enzim utama dalam biosintesis melanin yang mengkatalisis hidroksilasi tirosin menjadi Dopa serta oksidasi Dopa menjadi dopaquinon. Karena tirosinase berperan penting dalam pigmentasi kulit, penghambatannya dapat menurunkan produksi melanin. Oleh sebab itu, inhibitor tirosinase banyak diteliti sebagai kandidat terapi untuk gangguan pigmentasi seperti hiperpigmentasi, melasma, dan flek hitam. Selain bidang medis, senyawa ini juga memiliki peran besar dalam industri kosmetik, khususnya produk pencerah kulit, karena mampu menekan proses melanogenesis secara langsung. Dibandingkan agen pemutih tradisional seperti hidrokuinon yang sering menimbulkan efek samping, inhibitor tirosinase dianggap lebih aman. Saat ini, penelitian terus dilakukan untuk menemukan inhibitor baru, baik dari sumber alami maupun sintetik, yang lebih efektif, selektif, dan aman digunakan dalam jangka panjang (Baber *et al*., 2023)

K. Asam Kojat

Asam kojat adalah senyawa alami hasil fermentasi jamur *Aspergillus* yang memiliki struktur 5-*hidroks*i-2-*hidroksimetil*-4-*piron*. Senyawa ini banyak dimanfaatkan karena sifatnya sebagai inhibitor tirosinase, antioksidan, antibakteri, dan antifungi. Pengunaannya luas,seperti pada kosmetik sebagai pemutih kulit dan

pelindung UV, di bidang pangan sebagai pencegah pencoklatan, dalam pertanian sebagai pengkelat logam dan aktivator insektisida, hingga di bidang medis sebagai agen antiinflamasi, analgesik, dan kandidat antikanker. Meski memiliki kelemahan berupa ketidakstabilan terhadap cahaya dan udara serta potensi sitotoksisitas, pengembangan turunan seperti peptida asam kojat telah dilakukan untuk meningkatkan stabilitas dan mengurangi efek sampingnya (Bashir *et al*., 2021).

L. *Microplate Reader*



Gambar 2. *Microplate Reader* (Muslihin & Rika , 2024)

Microplate reader adalah instrumen laboratorium yang digunakan untuk menganalisis sampel dalam format microplate, umumnya memiliki 96 atau 384 sumur. Alat ini terdiri dari spektrofotometer *multi-mode* yang mampu mengukur absorbansi atau *optical density* (kekeruhan larutan) serta fluoresensi, dan dilengkapi dengan panggung bergerak otomatis yang memposisikan setiap sumur secara berurutan di atas detektor tunggal. Pemilihan panjang gelombang deteksi dilakukan menggunakan *diffraction grating* atau *dichroic filter*, sedangkan panjang gelombang eksitasi dipilih dengan cara serupa atau menggunakan sumber cahaya monokromatik seperti laser dan LED. Beberapa plate reader juga memiliki port tambahan untuk pemasukan cairan, yang bahkan dapat dimanfaatkan untuk aplikasi lain seperti stimulasi optogenetik (Szymula *et al*., 2017).

M. Persentase Inhibisi

Persentase inhibisi (% inhibisi) adalah nilai yang menggambarkan seberapa besar kemampuan suatu senyawa dalam menghambat aktivitas radikal bebas, enzim, maupun mikroorganisme. Hubungan antara konsentrasi sampel dan % inhibisi bersifat positif atau berbanding lurus, dimana peningkatan konsentrasi sampel akan meningkatkan kemampuan penghambatan senyawa tersebut terhadap aktivitas tirosinase. Oleh karena itu, nilai % inhibisi yang semakin tinggi mencerminkan potensi penghambatan tirosinase yang semakin kuat

Persentase penghambat dapat dihitung menggunakan Rumus berikut (Rumondor *et al*., 2024):

$$\%\ \text{Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \text{x } 100\%$$

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh ekstrak etanol rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb). Penelitian ini meliputi tahapan determinasi tanaman, pembuatan simplisia dari rimpang kunyit hitam, penetapan susut pengeringan, pembuatan ekstrak etanol 95% rimpang kunyit hitam, penetapan rendemen ekstrak, penetapan kadar air ekstrak, skrining fitokimia dan pengujian aktivitas penghambatan enzim tirosinase secara *in vitro* menggunakan alat *microplate reader*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Farmasi dan Kimia Analisis Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Samarinda dan PUI-PT Pusat Riset Rekayasa Molekul Hayati Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur. Penelitian dilakukan Pada bulan Desember 2025 – Mei 2026.

B. Objek penelitian

Objek yang diteliti adalah aktivitas penghambat enzim tirosinase dari ekstrak etanol 70% dan etanol 95% rimpang kunyit hitam.

C. Sampel dan Teknik Sampling

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa rimpang kunyit hitam yang diperoleh dari Desa Loa bakung, Kecamatan Sungai kunjang, Kota Samarinda. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan metode *purposive sampling*, yaitu teknik pemilihan sampel yang didasarkan pada kriteria dan pertimbangan. Pertimbangan dalam pemilihan sampel meliputi ciri fisik rimpang yang khas, yakni kulit rimpang berwarna cokelat gelap hingga hitam kebiruan, sedangkan bagian dalamnya berwarna biru kehitaman dengan aroma khas dan tekstur padat . Pemanenan rimpang kunyit hitam dilakukan pada umur sekitar

10 bulan setelah tanam, ketika daun dan batang semu mulai mengering yang menandakan tanaman telah matang panen (Nuraeni *et al*., 2023)

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas merupakan variabel yang memberikan pengaruh terhadap variabel terikat. Pada penelitian ini, variabel bebas adalah ekstrak etanol rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.)
2. Variabel terikat variabel yang dipengaruhi oleh adanya perubahan pada variabel bebas. Dalam penelitian ini, variabel terikat adalah aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh ekstrak etanol rimpang kunyit hitam.
3. Variabel kontrol variabel yang dikendalikan atau dijaga tetap konstan agar pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat tidak dipengaruhi oleh faktor lain di luar penelitian. Variabel kontrol dalam penelitian ini meliputi L-DOPA sebagai substrat, etanol sebagai pelarut ekstrak, asam kojat sebagai pembanding aktivitas penghambat enzim tirosinase, serta penggunaan *microplate reader* sebagai instrumen pengujian aktivitas penghambatan enzim tirosinase secara *in vitro*.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak Etanol 70% dan etano, 95% Rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) diperoleh melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan etanol 95% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10 hingga menghasilkan ekstrak kental yang mengandung senyawa aktif.
2. Aktifitas penghambat enzim tirosinase merupakan kemampuan senyawa dalam menghambat pembentukan melanin, sehingga dapat mencegah hiperpigmentasi dan munculnya bintik hitam pada kulit.
3. Metode *Enzymatic Analysis* yaitu teknik analisis kimia berbasis enzim yang memanfaatkan kemampuan enzim sebagai katalis spesifik untuk mendeteksi, mengukur, atau menentukan konsentrasi suatu zat dalam campuran, berdasarkan interaksi sinkronisasi antara enzim dan substrat.

4. *Microplate reader* yaitu instrumen analisis digunakan untuk mengukur absoransi pembentukan dopakrom pada panjang gelombang tertentu guna menganalisis aktivitas enzim tirosinase secara presisi dan efisien.
5. IC_{50} yaitu konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat 50% aktivitas enzim tirosinase, yang menunjukkan tingkat efektivitas penghambatan enzim tersebut.
6. Asam kojat merupakan senyawa alami dari jamur yang menghambat enzim tirosinase, mengurangi pembentukan melanin, dan sering digunakan sebagai bahan pencerah kulit serta kontrol positif dalam penelitian.

F. Teknik Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan Penelitian
   a. Alat penelitian

      Alat yang digunakan antara lain blender, maserator, neraca analitik, rotary evaporator, *microplate reader*, pH meter, aluminium foil, ayakan 60, batang pengaduk, corong kaca, eppendorf, kaca arloji, kertas saring, micropipet, penjepit tabung, perangkat gelas, perangkat labu ukur, pipet tetes, pisau, rak tabung, sendok tanduk, spatel logam, tabung reaksi, vial hitam, dan wadah.

   b. Bahan penelitian

      Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu simplisia kunyit hitam, etanol 70%, etanol 95%, aquades, metanol, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendrof, pereaksi Bouchardat, Asam klorida (HCl), Asam klorida pekat (HCl pekat), Asam klorida 2N (HCl 2N), Amil Alkohol ($C_5H_{12}O$), Besi (III) Klorida 10% ($FeCl_3$ 10%), Asam asetat anhidrida ($(CH_3CO)_2O$), Asam sulfat pekat (H_2SO_4 pekat), Disodium fosfat (Na_2HPO_4), Monosodium fosfat (NaH_2PO_4), DMSO (Dimetil Sulfoksida) dan L-Dopa, enzim tirosinase, asam kojat ($C_6H_6O_4$).

2. Prosedur Penelitian
   a. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Konservasi Biodeversitas Hutan Tropis, Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman Samarinda.

b. Pembuatan simplisia kunyit hitam

Pembuatan simplisia terdiri dari beberapa proses yaitu :

1) Pengumpulan bahan baku sampel

Sampel yang digunakan adalah rimpang kunyit hitam yang diperoleh di Desa Loa Bakung, Kecamatan Sungai Kunjang, Kota Samarinda.

2) Pembuatan simplisia

Tahapan pembuatan simplisia yaitu:

a) Pengumpulan bahan baku dilakukan dengan menyiapkan rimpang kunyit hitam sebanyak 2 kg, kemudian dilanjutkan dengan proses sortasi basah.
b) Sortasi basah bertujuan memisahkan bagian tanaman yang diinginkan dari kotoran, bahan asing, serta bagian yang rusak atau tidak layak.
c) Setelah itu, rimpang yang telah terkumpul dicuci menggunakan air mengalir hingga benar-benar bersih, lalu ditiriskan.
d) Rimpang yang sudah bersih kemudian dipotong-potong dengan ketebalan sekitar 3–5 mm dan dihamparkan di atas wadah untuk proses pengeringan.
e) Pengeringan simplisia dilakukan dengan oven pada suhu 50–60°C hingga rimpang benar-benar kering dan mudah dipatahkan.
f) Setelah pengeringan selesai, dilakukan sortasi kering untuk memisahkan simplisia dari kotoran atau benda asing yang mungkin tercampur, serta mengeluarkan bagian yang belum kering sempurna.
g) Simplisia yang telah bersih kemudian dihaluskan menggunakan blender dan disaring dengan ayakan berukuran mesh 40 sehingga diperoleh serbuk dengan ukuran partikel seragam.

c. Penetapan susut pengeringan

Susut pengeringan merupakan penurunan massa bahan setelah dilakukan proses pengeringan sesuai dengan prosedur yang telah ditetapkan. Penetapan susut pengeringan simplisia dilakukan dengan metode gravimetri, yaitu dengan menimbang sebanyak 1 gram simplisia kemudian dimasukkan kedalam krus yang telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit. Krus kemudian diratakan dengan cara menggoyang-goyangkan krus sampai terbentuk lapisan tebal 5-10 mm. Krus kemudian dioven hingga diperoleh bobot tetap. Bobot tetap dinyatakan tercapai apabila perbedaan antara dua kali penimbangan berturut-turut setelah proses pengeringan selama 1 jam tidak melebihi 0,5 mg pada timbangan analitik. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali replikasi, dan hasilnya dinyatakan sebagai persentase susut pengeringan simplisia (Kemenkes RI, 2020).

$$\text{Susut pengeringan simplisia (\%)} = \frac{\text{b} - (\text{c} - \text{a})}{\text{b}} \text{x } 100\%$$

Keterangan:
a = Bobot cawan kosong (g)
b = Bobot simplisia rimpang kunyit hitam sebelum pemanasan (g)
c = Bobot cawan + simplisia rimpang kunyit hitam setelah pemanasan (g)

d. Pembuatan ekstrak etanol kunyit hitam

Ekstrak kunyit hitam (Curcuma caesia Roxb.) dibuat dari serbuk kering simplisia dengan metode maserasi menggunakan dua jenis pelarut, yaitu etanol 70% dan etanol 95%, dengan perbandingan simplisia dan pelarut 1:10. Sebanyak 100 gram serbuk kering simplisia dimasukkan ke dalam wadah maserator, kemudian ditambahkan masing-masing 1 liter pelarut sesuai konsentrasi yang digunakan. Campuran tersebut direndam selama 24 jam (6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian didiamkan 18 jam).

Maserat yang diperoleh dipisahkan menggunakan kertas saring melalui proses filtrasi untuk memisahkan pelarut dari ampas. Proses maserasi diulangi sedikitnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama menggunakan volume pelarut sebanyak setengah dari volume pelarut pada penyarian pertama, yaitu 500 mL. Seluruh maserat yang dihasilkan kemudian digabungkan dan diuapkan menggunakan alat penguap vakum atau *rotary evaporator (rotavapor)* sehingga diperoleh ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 95% kunyit hitam (Kemenkes RI., 2017)

e. Penetapan rendemen ekstrak

Penetapan rendemen ekstrak dilakukan setelah diperoleh ekstrak kental hasil proses penguapan pelarut. Rendemen dinyatakan sebagai persentase perbandingan antara bobot ekstrak kental yang dihasilkan dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan pada proses ekstraksi, dinyatakan dalam satuan persen berat terhadap berat (% b/b), Rendemen harus mencapai angka sekurang kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak (Kemenkes RI., 2017).

$$\%\ \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak yang diperoleh}}{\text{Bobot simplisia yang digunakan}} \text{x } 100\%$$

f. Penetapan kadar air ekstrak

Penetapan kadar air dilakukan terhadap ekstrak etanol rimpang kunyit hitam yang telah diperoleh. Penentuan kadar air ekstrak dilakukan menggunakan metode gravimetri, yaitu dengan menimbang sebanyak 1 gram ekstrak dan memasukkannya ke dalam wadah yang telah ditara sebelumnya. Selanjutnya, ekstrak dikeringkan pada suhu 105°C selama 1 jam, kemudian ditimbang kembali. Proses pengeringan diulang setiap 1 jam hingga selisih dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,5 mg pada timbangan analitik (Kemenkes RI, 2020).

$$\text{Kadar air Ekstrak } (\%) = \frac{\text{b} - (\text{c} - \text{a})}{\text{b}} \text{x } 100\%$$

Keterangan:

a = Bobot cawan kosong (g)
b = Bobot sampel sebelum pemanasan (g)
c = Bobot cawan + sampel setelah pemanasan(g)

g. Skrining fitokimia

Ekstrak yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat di dalamnya. Skrining fitokimia merupakan uji pendahuluan yang bertujuan untuk mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder. Pengujian dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan pereaksi kimia tertentu yang menghasilkan perubahan warna atau endapan sebagai indikator keberadaan senyawa (Oktavia & Sutoyo, 2021). Menurut hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Tahirah, *et al.* (2023) Uji skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak, meliputi pemeriksaan terhadap alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, serta triterpenoid atau steroid.

Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu disiapkan larutan uji dengan cara melarutkan 1 gram ekstrak ke dalam 25 mL air panas dengan antara 60–80°C, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan sebagai sampel untuk tahap pengujian selanjutnya.

1) Uji Alkaloid

Uji alkaloid yang dilakukan oleh Hasan, *et al*. (2023) menggunakan 2 pereaksi yang berbeda.

a) Pereaksi Mayer

Sebanyak 1 mL Filtrat kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,1 ml asam klorida 2 N, kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi mayer. Hasil uji Positif bila terbentuk endapan berwarna kuning

b) Pereaksi Bouchardat

Sebanyak 5 tetes filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 2-3 tetes HCl 2N serta 2 tetes pereaksi bouchardat. Endapan coklat sampai hitam yang terbentuk menandakan adanya senyawa alkaloid.

c) Pereaksi dragendroff

Sebanyak 1 mL Filtrat kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,1 ml asam klorida 2 N, kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi Dragendorff. Hasil uji Positif bila terbentuk endapan berwarna merah.

Hasil uji dikatakan Positif Alkaloid apabila terbentuk minimal 2 endapan dari 3 pereaksi diatas.

2) Uji Flavonoid

Sebanyak 1 ml filtrat ekstrak rimpang kunyit hitam dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diuapkan hingga kering. Residu yang diperoleh kemudian dilarutkan dalam 1–2 mL metanol panas 50%. Selanjutnya, ke dalam larutan ditambahkan serbuk logam magnesium dan 4–5 tetes asam klorida pekat (HCl). Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga pada lapisan amil alkohol (Firmansyah & Jawa La, 2022)

3) Uji Tanin

Sebanyak 1 mL filtrat dimasukan kedalam tabung reaksi. Tambahkan beberapa tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Hasil uji . Hasil positif mengandung tanin ditandai dengan berubah warna menjadi hijau kecoklatan atau warna biru hitam (Alda *et al*., 2025).

4) Uji Saponin

Diambil 1 ml filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan air panas kedalam sampel uji pada tabung reaksi kemudian dikocok selama 10 detik, dinyatakan positif adanya senyawa saponin dapat terbentuknya busa selama 7 menit dan tidak hilang jika ditambahkan 1 tetes HCl 2 N (Wahidah *et al*., 2017).

5) Uji Terpenoid/Steroid

Sebanyak 1 mg sampel padat etanol ditempatkan pada cawan porselen kemudian dimaserasi dengan 10 ml n-heksan selama 1 jam kemudian disaring, Filtrat yang diperoleh diuapkan dalam cawan penguap dan kemudian ditambahkan enam tetes asam asetat anhidrat dan diaduk hingga larut. Setelah itu, ditambahkan satu tetes H_2SO_4 pekat. Terbentuknya warna ungu hingga jingga menunjukkan adanya senyawa triterpenoid, sedangkan warna biru atau hijau menandakan keberadaan steroid (Oktavia & Sutoyo, 2021).

h. Uji aktivitas inhibisi tirosinase secara in vitro

Berdasarkan penelitian Furi, *et al*. (2022) prosedur pengujian inhibitor enzim tirosinase secara in vitro yaitu sebagai berikut:

1) Pembuatan larutan uji

a) Pembuatan larutan dapar fosfat 0,1M Dengan pH 6,5

Pembuatan larutan dapar fosfat dilakukan melalui beberapa tahap. Pertama, sebanyak 2,84 gram Natrium Hidrogen Fosfat (Na_2HPO_4) dilarutkan dalam 100 mL aquades untuk menghasilkan larutan 1. Selanjutnya, 2,72 gram Kalium Dihidrogen Fosfat (KH_2PO_4) dilarutkan dalam 100 mL aquades dan disebut sebagai larutan 2. Kedua larutan tersebut kemudian dicampurkan hingga homogen. Setelah itu, pH campuran diukur menggunakan pH meter untuk menentukan tingkat keasamannya. Jika nilai pH belum sesuai dengan yang diinginkan, dilakukan penyesuaian dengan menambahkan larutan NaOH 1 M secara bertahap sampai diperoleh pH yang sesuai.

b) Pembuatan larutan enzim tirosinase 250 unit/mL

Untuk membuat larutan enzim tirosinase dengan konsentrasi 250 unit/ml, ambil 1 gram serbuk enzim tirosinase yang memiliki aktivitas 25.000 unit. kemudian dilarutkan dalam 100 ml larutan dapar fosfat. sehingga diperoleh enzim dengan konsentrasi 250 unit/ml.

c) Pembuatan larutan L-Dopa 2,5 mM

Pembuatan larutan L-Dopa 2,5 mM dilakukan dengan menimbang 24,64 mg L-Dopa, kemudian memasukkannya ke dalam labu ukur 50 mL. Selanjutnya, larutan dapar fosfat ditambahkan sedikit demi sedikit sambil dikocok hingga homogen. Proses pengocokan dilakukan selama 20 menit untuk memastikan larutan tercampur sempurna.

d) Pembuatan larutan kontrol positif (asam kojat)

Larutan asam kojat dengan konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan menimbang 10 mg asam kojat, kemudian dilarutkan dalam 10 mL larutan dapar fosfat, Setelah larut sempurna, larutan tersebut diencerkan menjadi 500 ppm.

e) Pembuatan larutan uji ekstrak etanol kunyit hitam

Sebanyak 10 mg ekstrak etanol kunyit hitam, kemudian dilarutkan dalam 10 mL DMSO (dimetil sulfoksida) hingga terbentuk larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, larutan tersebut diencerkan menjadi konsentrasi 500 ppm.

f) Penentuan aktivitas penghambatan enzim tirosinase

(1) Blanko (B1) dan Blanko Kontrol (B0)

Pembuatan larutan blanko dilakukan dengan mencampurkan beberapa komponen secara berurutan. Pertama, sebanyak 30 µL larutan dapar fosfat ditambahkan ke dalam sumuran. Selanjutnya, dimasukkan 30 µL enzim tirosinase, kemudian 20 µL substrat L-Dopa, dan terakhir 20 µL larutan DMSO. Semua bahan tersebut dicampur hingga homogen untuk membentuk larutan blanko.

Sementara itu, blanko kontrol disiapkan dengan mengikuti langkah yang sama seperti pada pembuatan blanko. Perbedaannya terletak pada bagian enzim, di mana 30 µL enzim tirosinase digantikan dengan 30 µL larutan dapar fosfat. Tujuan pembuatan blanko kontrol

adalah untuk memastikan hasil pengujian tidak dipengaruhi oleh aktivitas enzim.

(2) Sampel Uji (S1) dan Kontrol Uji (S0)

Pengujian sampel dilakukan dengan mengambil larutan yang telah diencerkan sesuai konsentrasi yang diinginkan, yaitu 1000 ppm dan 500 ppm. Setiap larutan sampel diambil sebanyak 20 µL, kemudian dicampurkan dengan 30 µL larutan dapar fosfat, 30 µL enzim tirosinase, dan 20 µL substrat L-DOPA.

Sementara itu, kontrol sampel disiapkan dengan prosedur yang sama seperti pengujian sampel. Perbedaannya terletak pada bagian enzim, di mana 30 µL enzim tirosinase digantikan dengan 30 µL larutan dapar fosfat.

(3) Larutan Asam Kojat (A1) dan Larutan Kontrol Asam Kojat

Pengujian kontrol positif asam kojat dilakukan dengan menggunakan larutan asam kojat dengan kosnetrasi 500 ppm dan 1000 ppm. Dari masing-masing konsentrasi, diambil 20 µL larutan dan dicampurkan dengan 30 µL larutan dapar fosfat, 30 µL enzim tirosinase, serta 20 µL substrat L-Dopa. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan untuk selanjutnya digunakan dalam pengujian aktivitas enzim.

Pengujian kontrol asam kojat dilakukan dengan prosedur yang sama seperti pengujian sampel, tetapi dengan penggantian 30 µL larutan enzim tirosinase menggunakan 30 µL larutan dapar fosfat.

Tabel 1. Perlakuan Sampel Uji

Bahan	Volume (µL)					
	B_0	B_1	S_0	S_1	A_0	A_1
Ekstrak etanol rimpang kunyit hitam			20	20		
Dapar fosfat	60	30	60	30	60	30
Enzim Tirosinase		30		30		30

L-Dopa	20	20	20	20	20	20
DMSO	20	20				
Asam kojat					20	20

Keterangan :B1 : Blanko
B0 : Kontrol Blanko
S1 : Sampel (1000 dan 500)
S0 : Kontrol Sampel
A1 : Asam Kojat(500 dan 1000 ppm)
A0 : Kontrol Asam Kojat

Penelitian ini menggunakan microplate sebagai media penempatan larutan uji, yang terdiri dari baris A hingga H, dengan masing-masing baris memiliki 12 kolom (total 96 sumuran). Namun, dalam pengujian ini, hanya 6 kolom pertama yang digunakan dapat dilihat pada tabel 1. Setiap baris pada mikroplate diisi dengan jenis larutan uji yang berbeda, sedangkan larutan blanko dibuat dengan mengganti sampel menggunakan DMSO.

Larutan pada baris A merupakan blanko yang berfungsi sebagai pembanding untuk kalibrasi alat. Baris B berisi larutan sampel 1000 ppm sebagai standar tertinggi dan baris C 500 ppm sebagai konsentrasi terendah.

Prosedur yang sama diterapkan pada uji asam kojat dengan konsentrasi 1000 ppm dan 500 ppm. Masing-masing konsentrasi ditempatkan berurutan pada kolom B hingga C dalam *plate* untuk mempermudah identifikasi dan perbandingan hasil. Seluruh sampel diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C untuk mengoptimalkan reaksi antara enzim tirosinase dan substrat L-Dopa. Setelah proses inkubasi, nilai serapan tiap sumuran diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 475 nm (*visible*), yang dipilih karena menunjukkan serapan tertinggi dan menandakan terbentuknya dopakrom dalam jumlah terbesar.

Penghambatan aktivitas tirosinase oleh ekstrak etanol rimpang kunyit hitam ditentukan berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dari hasil pengujian. Perhitungan dilakukan menggunakan rumus persentase inhibisi. Menurut Ripaldo (2020), persentase inhibisi diperoleh dengan membanding

kan selisih antara absorbansi larutan blanko dan absorbansi sampel terhadap absorbansi blanko.

$$\text{Persen Inhibisi (\%)} = \frac{A_{\text{Blanko}} - B_{\text{Sampel}}}{A_{\text{Blanko}}} \text{x } 100\%$$

Perhitungan aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh asam kojat dilakukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Persen Inhibisi (\%)} = \frac{A_{\text{Blanko}} - B_{\text{Asam kojat}}}{A_{\text{Blanko}}} \text{x } 100\%$$

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini terdiri atas data kualitatif dan data kuantitatif, yang seluruhnya dianalisis secara deskriptif serta disajikan dalam bentuk narasi dan tabel. Data kualitatif diperoleh melalui uji skrining fitokimia terhadap ekstrak etanol rimpang kunyit hitam, sedangkan data kuantitatif diperoleh dari hasil pengukuran persentase penghambat aktivitas enzim tirosinase. Data hasil pengujian selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan uji *Two Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan aktivitas penghambatan tirosinase berdasarkan variasi konsentrasi sampel dan variasi jenis pelarut yang digunakan. Sebelum uji tersebut dilakukan, data terlebih dahulu diuji normalitas dan homogenitasnya sebagai prasyarat analisis statistik parametrik.

BAB IV

PEMBAHASAN

A. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tanaman merupakan tahap awal yang penting sebelum pengumpulan sampel penelitian. Determinasi bertujuan untuk memastikan keaslian dan ketepatan identitas spesies tanaman yang akan digunakan sebagai bahan uji. Melalui determinasi tumbuhan dapat meminimalkan risiko kesalahan dalam pengambilan sampel serta mencegah tercampurnya sampel dengan spesies lain yang memiliki kemiripan morfologi (Happy *et al*., 2021). Determinasi tumbuhan rimpang kunyit hitam dilakukan di Laboratorium Anatomi dan Sistematika Tanaman, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Mulawarman Samarinda Kalimantan Timur. Hasil dari determinasi yaitu rimpang kunyit hitam termasuk dalam famili *Zingiberaceae* yang memiliki nama ilmiah *Curcuma caesia* Roxb. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 2.

B. Pembuatan Simplisia

Rimpang kunyit hitam yang digunakan berasal dari hasil budidaya masyarakat di Desa Loa Bakung, Kecamatan Sungai Kunjang, Kota Samarinda, Kalimantan Timur. Bagian tanaman yang dimanfaatkan adalah rimpang dengan berat total 2 kg. Rimpang yang telah dikumpulkan terlebih dahulu melalui tahap sortasi basah untuk memisahkan kotoran serta bagian tanaman yang rusak (Maslahah, 2024). Tahap berikutnya adalah pencucian menggunakan air bersih yang mengalir hingga rimpang benar-benar terbebas dari kotoran maupun bahan pengotor lain, kemudian dilakukan penirisan untuk meminimalisir kandungan air pada permukaan simplisia (Fitriani *et al*., 2026). Setelah itu, rimpang diiris tipis dengan ketebalan sekitar 3–5 mm menggunakan pisau, dengan tujuan mempercepat proses pengeringan (Handayani, 2023). Proses pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 50°C. Penggunaan oven dipilih karena metode ini terbukti memberikan hasil yang lebih optimal selain waktu pengeringan yang relatif

singkat, oven juga mampu menjaga kualitas organoleptik bahan, mempertahankan kestabilan suhu selama proses berlangsung, serta menghindarkan bahan dari pengaruh kondisi cuaca yang tidak menentu (Handoyo *et al*., 2024; Lady *et al*., 2020)

Simplisia yang telah kering kemudian disortasi untuk memisahkan pengotor yang mungkin masih tertinggal selama proses pengeringan. Selanjutnya, simplisia dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan pengayak mesh 40. Berdasarkan Farmakope, penggunaan mesh 40 menunjukkan bahwa serbuk yang dihasilkan termasuk dalam kategori *serbuk agak kasar* dengan ukuran partikel rata-rata sekitar 425 µm (Kemenkes RI, 2017). Pembuatan serbuk bertujuan memperkecil ukuran partikel sehingga memudahkan proses ekstraksi, sedangkan pengayakan dilakukan agar serbuk yang dihasilkan memiliki ukuran yang seragam (Ikhrom, 2018).

C. Penetapan Susut Pengeringan Simplisia

Proses penetapan susut pengeringan dilakukan setelah serbuk simplisia diperoleh. Tujuan dari uji ini adalah untuk mengetahui kadar air yang masih tersisa serta kandungan senyawa volatil dalam simplisia(Setyani *et al*., 2021).

Tabel 2. Hasil Penetapan Susut Pengeringan Simplisia Rimpang Kunyit Hitam

Sampel	**Replikasi (%)**			**Rata-rata(%)**
	1	**2**	**3**	
Simplisia Rimpang Kunyit Hitam	8,22	8,92	8,77	8,71 ± 0,35

Berdasarkan hasil penelitian, nilai rata-rata susut pengeringan simplisia rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) sebesar 8,71%. Nilai ini masih berada di bawah batas susut pengeringan simplisia yang ditetapkan tidak lebih dari 10% (Kemenkes RI, 2017), sehingga menunjukkan bahwa simplisia yang dihasilkan memenuhi persyaratan mutu. Susut pengeringan yang rendah mengindikasikan kadar air yang kecil, sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan meningkatkan stabilitas serta masa simpan simplisia (Maryam dan Taebe, 2020). Menurut Rakhmad *et al*., (2025) kunyit (*Curcuma longa*) memiliki

nilai susut pengeringan sebesar 7,96%, sedangkan hasil penelitian pada kunyit hitam menunjukkan nilai 8,72% juga masih berada di bawah batas tersebut. Perbedaan keduanya relatif kecil, sehingga keduanya dapat dikategorikan memiliki mutu simplisia yang baik.

D. Ekstraksi Rimpang Kunyit Hitam

Proses ekstraksi rimpang kunyit hitam dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan 95%. Metode maserasi dipilih karena cocok untuk senyawa yang bersifat termolabil seperti seperti flavonoid dan fenolik, yaitu mudah rusak pada suhu di atas 60°C (Firdaus *et al*., 2024). Selain itu, maserasi memungkinkan waktu kontak yang lebih lama antara simplisia dan pelarut, yaitu selama 24 jam pada suhu kamar, sehingga proses penarikan senyawa aktif menjadi lebih optimal. Selama perendaman berlangsung, terjadi penguraian dinding sel dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara bagian luar dan dalam sel, yang menyebabkan metabolit sekunder dari sitoplasma pecah dan larut ke dalam pelarut (Rokhmah *et al*., 2026).

Pembuatan ekstrak menggunakan pelarut etanol 70% dan etanol 96% (perbandingan 1:10), dilakukan dengan menimbang masing-masing 100 gram serbuk simplisia kunyit hitam. Proses maserasi berlangsung secara terpisah untuk setiap jenis pelarut, menggunakan 1000 mL etanol, dengan pengadukan selama 6 jam, pengadukan bertujuan untuk menjamin semua permukaan serbuk dapat kontak dengan pelarut secara sempurna dan dilanjutkan perendaman selama 18 jam pada suhu kamar. Setelah itu, campuran disaring untuk memisahkan ampas dari maserat. Ampas hasil maserasi etanol 70% maupun etanol 96% kemudian diremaserasi dengan pelarut baru melalui rangkaian prosedur yang sama (Tri dan Minarsih, 2023; Yunita & Khodijah, 2020). Etanol termasuk kedalam pelarut polar, penggunaan etanol sebagai pelarut memiliki sejumlah keuntungan kepolaran etanol yang tinggi memungkinkan penarikan berbagai senyawa metabolit sekunder dengan sempurna (Surya & Luhurningtyas, 2021). Etanol 70% memilki konstanta dielektrik 41,25 sedangkan etanol 95% memilki konstanta dielektrik 27,25 sehingga etanol 70% lebih polar dibandingkan dengan etanol 95% (Setya *et al*., 2025).

Filtrat hasil maserasi dan remaserasi kemudian digabungkan, selanjutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* yang dilengkapi dengan *vacuum pump* hingga diperoleh ekstrak pekat (Liskaa *et al*., 2020) setelah itu diuapkan kembali di *waterbath* pada suhu 60°C Sehingga diperoleh ekstrak kental berwarna coklat kehitaman. Suhu ekstraksi sebaiknya tidak melebihi titik didih pelarut, titik didih etanol murni memiliki titik didih 78℃ sehingga penguapan ekstrak dengan suhu 60^{o}C diharapkan dapat menguapkan seluruh pelarut yang terkandung pada ekstrak (Maria *et al*., 2022).

Tujuan penguapan adalah untuk memisahkan pelarut dari ekstrak sehingga diperoleh ekstrak kental (Makalunsenge *et al*., 2022). Perhitungan rendemen ekstrak rimpang kunyit hitam dilakukan berdasarkan data hasil ekstraksi yang tercantum pada tabel. Nilai rendemen dihitung dengan membandingkan berat ekstrak kering yang diperoleh terhadap berat simplisia awal kemudian dikalikan 100%.

Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak Rimpang Kunyit Hitam

Sampel	Rendemen (%)
Ekstrak Etanol 70% Rimpang Kunyit Hitam	16,6
Ekstrak Etanol 95% Rimpang Kunyit Hitam	8,44

Hasil penelitian menunjukkan adanya variasi rendemen ekstrak rimpang kunyit hitam yang diperoleh melalui metode maserasi dengan pelarut etanol pada konsentrasi berbeda. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Yusniawati & Hasan, 2024 rendemen ekstrak etanol 70% diperoleh sebesar 28,08%, sedangkan pada penelitian ini rendemen ekstrak etanol 70% sebesar 16,6%. Perbedaan nilai rendemen yang diperoleh dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor selama proses ekstraksi, antara lain waktu perendaman, suhu ruangan, homogenitas serbuk simplisia, serta berat simplisia yang digunakan. Rendemen yang lebih tinggi pada penelitian ini menunjukkan bahwa proses maserasi dengan etanol 70% mampu mengekstraksi senyawa aktif lebih optimal(Pujiastuti & El'Zeba, 2021).

Sementara itu, penelitian lain Kartini *et al*., 2023 dengan etanol 96% hanya memperoleh rendemen 5,457%, namun pada penelitian ini etanol 95% justru

mencapai 8,44%. Rendemen etanol 95% lebih rendah dibandingkan etanol 70% karena perbedaan kepolaran etanol 70% yang mengandung air lebih banyak bersifat lebih polar sehingga lebih mampu menarik senyawa polar seperti flavonoid dan fenolik dalam jumlah yang lebih besar, sedangkan etanol 95% yang lebih nonpolar kurang efektif dalam melarutkan senyawa polar tersebut, sehingga rendemen ekstrak yang dihasilkan menjadi lebih rendah (Pradana *et al*., 2023).

Dengan demikian, konsentrasi pelarut berpengaruh signifikan terhadap besarnya rendemen. Etanol 70% terbukti lebih efisien dibandingkan etanol 95% maupun 96%, sesuai dengan sifat senyawa bioaktif kunyit hitam yang sebagian besar bersifat polar. Perbedaan hasil antar penelitian juga dapat dipengaruhi faktor lain, seperti jenis pelarut, rasio pelarut-bahan, waktu ekstraksi, suhu, serta ukuran partikel simplisia (Kartini *et al*., 2023; Pradana *et al*., 2023).

E. Penetapan Kadar Air Ekstrak

Penetapan kadar air pada ekstrak dilakukan sebagai upaya untuk mengetahui dan menetapkan nilai batas kandungan air yang masih dapat diterima dalam suatu ekstrak (Ni'am *et al*, 2023). Penetapan kadar air ekstrak dilakukan dengan metode gravimetri Cawan kosong dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C penggunaan suhu 105ºC karna air menguap pada suhu 100ºC dengan suhu 105ºC maka kandungan air dalam sel sebagian besar telah menguap (Wandira, *et al* ., 2023), dioven selama 1 jam kemudian didinginkan selama 30 menit dalam desikator, lalu ditimbang untuk memperoleh bobot awal. Sebanyak 1 gram ekstrak dimasukkan ke dalam cawan, kemudian dipanaskan kembali pada suhu 105°C selama 1 jam, didinginkan, dan ditimbang hingga mencapai bobot konstan. Hasil penimbangan dapat dilihat pada tabel

Tabel 4. Hasil Kadar Air Ekstrak Rimpang Kunyit Hitam

Sampel	**Replikasi (%)**		**Rata-rata(%)**
	1	**2**	
Ekstrak Etanol 70% Kunyit Hitam	11,02	10,68	10,85 ± 0,24
Ekstrak Etanol 95% Kunyit Hitam	9,27	9,72	9,5 ± 0,32

Hasil penetapan kadar air ekstrak dalam penelitian ini menunjukkan nilai yang tidak jauh berbeda dengan penelitian terdahulu, meskipun terdapat variasi antar studi. Penelitian oleh Leela (2024) melaporkan kadar air ekstrak kental kunyit hitam sebesar 9,7%, sedangkan Chaturvedi *et al*., (2020) memperoleh nilai sebesar 8,0% ± 0,5%. Perbedaan antar penelitian tersebut dapat dipengaruhi oleh metode ekstraksi, jenis pelarut, serta suhu dan waktu pengeringan yang digunakan (Wandira *et al*., 2023). Pada penelitian ini, kadar air ekstrak etanol 95% kunyit hitam yang diperoleh sebesar 9,5%, sedangkan ekstrak etanol 70% menunjukkan nilai yang lebih tinggi, yaitu 10,85 %.

Perbedaan kadar air antara kedua ekstrak dalam penelitian ini terutama dipengaruhi oleh tingkat polaritas pelarut yang digunakan. Etanol 70% mengandung 30% air sehingga bersifat lebih polar dibandingkan etanol 95% yang hanya mengandung 5% air. Kepolaran yang lebih tinggi ini menyebabkan etanol 70% lebih banyak menarik dan membawa air ke dalam ekstrak selama proses ekstraksi, sehingga menghasilkan kadar air yang lebih tinggi dibandingkan etanol 95%. Kadar air yang relatif rendah (<10%) menunjukkan bahwa ekstrak memiliki stabilitas yang baik dan lebih tahan terhadap pertumbuhan mikroba maupun jamur selama penyimpanan. Dengan demikian, pengendalian kadar air merupakan faktor penting dalam menjaga mutu ekstrak kunyit hitam (Rachma & Saptawati, 2022).

F. Skrining Fitokimia

Tujuan dari skrining fitokimia pada adalah untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder yang ditandai dengan adanya perubahan warna pada uji reagen tertentu. Perubahan warna yang muncul menjadi indikator keberadaan senyawa bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, maupun terpenoid. Hasil ini penting karena memberikan informasi awal untuk mengetahui keberadaan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak (Larasati *et al*., 2023)

Tabel 5. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Rimpang Kunyit Hitam

Senyawa	Pereaksi	Hasil Reaksi		Hasil	
		Etanol 70%	Etanol 95%	Etanol 70 %	Etanol 95%
Alkaloid	Mayer	Endapan kuning	Endapan kuning	++	++
	Dragendorf	Endapan merah bata	Endapan merah bata	+	+
	Bouchardat	Endapan coklat	Tidak terbentuk Endapan coklat	+	-
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl pekat + amil alkohol	Terbentuk warna merah pada lapisan amil alkohol	Terbentuk warna jingga pada lapisan amil alkohol	++	+
Tanin	$FeCl_3$ 1%	Terbentuk warna hijau kecoklatan	Terbentuk warna hijau kecoklatan	++	+
Saponin	Sampel + aquades dikocok kuat + HCl 2N	Tidak Terbentuk busa 1-10 cm yang tidak hilang	Tidak Terbentuk busa 1-10 cm yang tidak hilang	-	-
Terpenoid/Steroid	n-Heksan + $(CH_3CO)_2O$ + H_2SO_4 (p)	Terbentuk kuning	Terbentuk warna merah - ungu	-	++

Keterangan:
(-) = negatif mengandung senyawa
(+) = positif mengandung senyawa
(++) = positif mengandung senyawa dengan intensitas warna lebih pekat

Skrining fitokimia pada ekstrak etanol 70% dan 95% rimpang kunyit hitam menunjukkan adanya senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, dan Terpenoid. Hasil ini sebagian besar sejalan dengan penelitian Hasan *et al*., (2023) dan Kartini *et al*., (2024) yang menunjukkan bahwa ekstrak rimpang kunyit hitam dengan pelarut etanol 70% maupun 95% positif mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, serta terpenoid. Sementera itu penelitian Rai *et al*., (2019) juga menunjukkan bahwa kunyit hitam positif mengandung steroid.

Perbedaan hasil skrining fitokimia pada penelitian ini diduga dipengaruhi oleh perbedaan asal bahan, umur panen dan kondisi lingkungan (Hasan *et al*., 2017). Penelitian oleh Hasan *et al*., (2023) menggunakan rimpang kunyit hitam yang berasal dari Luwu Utara dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan 250 g simplisia dan 500 mL etanol 70% sebagai pelarut. Sementara itu, penelitian oleh Kartini *et al*., (2024) menggunakan kunyit hitam asal Pekanbaru dengan metode maserasi terhadap 500 g serbuk simplisia menggunakan 2,5 L etanol 96% dengan rasio bahan terhadap pelarut sebesar 1:4. Sedangkan pada penelitian Rai *et al*., (2019) sampel yang digunakan adalah kunyit hitam yang berasal dari India Timur. Adapun pada penelitian ini, sampel yang digunakan berupa kunyit hitam hasil budidaya dari Kalimantan Timur yang dipanen pada umur 10 bulan. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan masing-masing 100 g simplisia yang direndam dalam 1 L pelarut etanol 70% dan etanol 95%.

Pengujian alkaloid pada ekstrak dilakukan menggunakan tiga pereaksi, yaitu Mayer, Dragendorff, dan Bouchardat. Suatu ekstrak dinyatakan positif mengandung alkaloid apabila menghasilkan endapan pada paling sedikit dua pereaksi (Kemenkes RI, 2017). Pada penelitian ini, ekstrak etanol 70% menunjukkan endapan kuning pada pereaksi Mayer, endapan merah bata pada pereaksi Dragendorff, dan endapan coklat pada pereaksi Bouchardat. Sedangkan ekstrak etanol 95% menghasilkan endapan kuning pucat pada pereaksi Mayer dan endapan merah bata pada pereaksi Dragendorff, namun tidak terbentuk endapan pada pereaksi Bouchardat. Dengan demikian, kedua ekstrak dinyatakan positif mengandung alkaloid karena menghasilkan endapan pada minimal dua pereaksi.

Ketiga pereaksi tersebut bekerja melalui mekanisme yang serupa, yaitu nitrogen pada alkaloid yang memiliki elektron bebas (*lone pair electrons*) bertindak sebagai basa Lewis dan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam pada masing-masing pereaksi. Pereaksi Mayer yang terdiri dari K_2HgI_4 dalam KI jenuh bereaksi dengan nitrogen alkaloid melalui ion K^+, membentuk kompleks kalium-alkaloid yang tidak larut dan mengendap berwarna putih hingga kuning. Pereaksi Dragendorff yang terdiri dari $KBiI_4$ dalam asam sitrat, dibuat dari reaksi bismut nitrat dengan kalium iodida berlebih dimana bismut nitrat dilarutkan dalam

HCl untuk mencegah hidrolisis ion Bi^{3+} menjadi ion bismutil (BiO^{+}). Ion Bi^{3+} kemudian bereaksi dengan nitrogen alkaloid membentuk kompleks bismut-alkaloid yang tidak larut dan berwarna merah bata hingga oranye. Adapun pereaksi Bouchardat yang terdiri dari I_2 dalam KI jenuh bereaksi dengan nitrogen alkaloid membentuk kompleks iodin-alkaloid yang tidak larut dan berwarna coklat hingga coklat kehitaman (Arviani et al., 2021; Yasser et al., 2022).

Pengujian flavonoid pada ekstrak rimpang kunyit hitam dengan pereaksi HCl pekat dan serbuk Mg menunjukkan hasil positif, ditandai dengan terbentuknya warna jingga atau merah (Firmansyah & Jawa La, 2022). Pada ekstrak etanol 70% terbentuk warna merah pada lapisan amil alkohol sedangkan ekstrak ekstrak etanol 95% terbentuk warna jingga pada lapisan amil alkohol. Mekanisme reaksi terjadi karena penambahan Mg dan HCl pekat mereduksi inti benzopiron dalam struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium berwarna jingga/merah sebagai indikator positif (Hasan *et al*., 2022). Perbedaan intensitas warna ini dapat dikaitkan dengan sifat pelarut. Etanol 70% memiliki polaritas lebih tinggi dibandingkan etanol 95%, sehingga senyawa flavonoid yang bersifat polar cenderung lebih banyak terlarut dalam etanol 70%. Perbedaan intensitas warna ini tidak hanya menunjukkan variasi kandungan flavonoid, tetapi juga menegaskan pentingnya pemilihan konsentrasi pelarut dalam optimasi ekstraksi senyawa bioaktif (Supriningrum *et al*., 2024).

Pengujian tanin pada ekstrak rimpang kunyit hitam dilakukan menggunakan pereaksi $FeCl_3$ 1%, di mana ekstrak dinyatakan positif mengandung tanin apabila menghasilkan warna hijau kecoklatan(Alda *et al*., 2025). Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% menghasilkan warna hijau kecoklatan yang lebih terang, sedangkan ekstrak etanol 95% menghasilkan warna hijau kecoklatan yang lebih pudar, namun kedua ekstrak dinyatakan positif mengandung tanin. Perbedaan intensitas warna tersebut mengindikasikan adanya perbedaan kadar tanin yang terekstrak, yang berkaitan erat dengan sifat kepolaran masing-masing pelarut. Tanin merupakan senyawa polifenol yang bersifat polar sehingga lebih mudah larut dalam pelarut polar, sesuai dengan kaidah *like dissolves like*. Etanol 70% yang memiliki kandungan air lebih tinggi bersifat lebih polar sehingga

lebih efektif mengekstrak tanin, sedangkan etanol 95% yang bersifat lebih nonpolar kurang efektif dalam mengekstrak tanin sehingga intensitas warna yang dihasilkan lebih pudar (Mukhriani et al., 2023). Mekanisme reaksi $FeCl_3$ 10% terhadap tanin terjadi melalui pembentukan kompleks koordinasi Fe^{3+}-tanin. Ion Fe^{3+} berperan sebagai atom pusat, sedangkan atom O pada gugus hidroksil tanin bertindak sebagai ligan donor elektron bebas yang membentuk ikatan kovalen koordinat. Ion Fe^{3+} berikatan dengan gugus hidroksil pada asam galat hasil hidrolisis tanin, menghasilkan warna hijau kecoklatan (Arviani *et al*., 2021; Yasser *et al*., 2022).

Pengujian saponin pada ekstrak rimpang kunyit hitam dilakukan dengan mengocok ekstrak dalam air kemudian ditambahkan HCl 2N. Ekstrak dinyatakan positif mengandung saponin apabila terbentuk busa yang stabil dan tidak hilang setelah penambahan HCl 2N (Kartini et al., 2023). Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% maupun 95% tidak membentuk busa yang stabil selama 7 menit, sehingga kedua ekstrak dinyatakan negatif mengandung saponin. Saponin memiliki struktur amfifilik dengan bagian polar dan non-polar sehingga bersifat surfaktan. Ketika dikocok dengan air, saponin menurunkan tegangan permukaan sehingga terbentuk busa yang stabil akibat kombinasi rantai sapogenin (non-polar) dengan rantai samping polar yang terlarut dalam air. Penambahan HCl 2N bertujuan untuk menguji stabilitas busa dalam suasana asam, di mana saponin akan terhidrolisis membentuk aglikon spesifik berupa sapogenin atau saraponin. Tidak terbentuknya busa yang stabil pada kedua ekstrak mengindikasikan bahwa saponin tidak terekstrak secara optimal dengan pelarut etanol 70% maupun 95% (Arviani *et al*., 2021; Yasser *et al*., 2022).

Pengujian senyawa terpenoid pada ekstrak rimpang kunyit hitam dilakukan menggunakan uji Liebermann-Burchard dengan maserasi n-heksana, kemudian ditambahkan anhidrat asetat ($(CH_3CO)_2O$) dan H_2SO_4 pekat. H_2SO_4 pekat mendehidrasi terpenoid membentuk ikatan rangkap terkonjugasi, sementara anhidrat asetat mengoksidasi senyawa tersebut sehingga terbentuk kation karboksi terkonjugasi yang menghasilkan perubahan warna (Arviani *et al*., 2021; Yasser et *al*., 2022). Hasil positif terpenoid ditandai dengan warna merah hingga ungu, sedangkan hasil positif steroid ditandai dengan warna hijau hingga biru

(Firmansyah & Jawa La, 2022). Pada penelitian ini, ekstrak etanol 70% menghasilkan warna kuning, sedangkan ekstrak etanol 95% menghasilkan warna ungu, yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol 95% positif mengandung senyawa triterpenoid sedangkan etanol 70% tidak mengandung senyawa terpenoid. Perbedaan yang terbentuk diduga dipengaruhi oleh perbedaan polaritas pelarut yang digunakan. Etanol 70% memiliki kepolaran lebih tinggi dibandingkan etanol 95%, sedangkan senyawa terpenoid cenderung bersifat nonpolar sehingga lebih mudah terekstraksi pada pelarut degan kadar etanol yang lebih tinggi. Oleh karena itu, ekstrak etanol 95% diduga melarutkan senyawa terpenoid lebih optimal sehingga terbentuk warna ungu. Selain itu, beberapa senyawa terpenoid memiliki struktur siklik dengan gugus hidroksil yang menyebabkan sifatnya menjadi semipolar, sehingga masih dapat tertarik oleh pelarut polar maupun semipolar (Putri *et al*.,2023). Perbedaan antara ekstrak etanol 70% dan 95% diduga berkaitan dengan perbedaan polaritas pelarut. Etanol 95% yang lebih nonpolar cenderung lebih sesuai untuk melarutkan senyawa terpenoid yang bersifat relatif nonpolar, sehingga menghasilkan warnamerha-ungu yang lebih jelas dibandingkan etanol 70% (Supriningrum *et al*., 2024)

G. Uji Aktivitas Penghambat EnzimTirosine Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam

Uji penghambat enzim tirosinase dilakukan untuk mengukur kemampuan senyawa bioaktif dalam ekstrak etanol 70% dan 96% rimpang kunyit hitam dalam menekan aktivitas enzim tirosinase menggunakan L-DOPA sebagai substrat. Enzim tirosinase berperan penting dalam proses melanogenesis, yaitu mengatur biosintesis melanin dengan cara menghidroksilasi L-tirosin menjadi L-DOPA, kemudian mengoksidasi L-DOPA menjadi DOPA kuinon. Selanjutnya, DOPA kuinon diubah menjadi dopakrom melalui reaksi autooksidasi hingga terbentuk *dihydroxy-indole* (DHI) atau *dihydroxy-indole-carboxylic acid* (DHICA), yang pada akhirnya menghasilkan melanin sebagai pigmen berwarna coklat (Furi et al., 2022b; Jayantie et al., 2022; Simamora et al., 2026).

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam kojat, yang dikenal sebagai inhibitor enzim tirosinase yang sangat efektif. Asam kojat bekerja dengan menghambat sisi aktif enzim tirosinase secara kompetitif melalui pembentukan kelat tembaga pada sisi aktif enzim. Mekanisme ini terjadi karena asam kojat mampu mengkelat ion logam transisi seperti Fe^{2+} dan Cu^{2+}, sehingga dapat berikatan dengan sisi aktif enzim tirosinase yang mengandung ion Cu^{2+} dan menghalangi kedudukan tirosin sebagai substrat. Asam kojat umumnya digunakan sebagai standar positif karena memiliki kekuatan inhibisi yang baik serta kestabilan yang tinggi (Dzikir *et al* ., 2024; Furi *et al*., 2022).

Aktivitas inhibitor tirosinase dilakukan secara in vitro berdasarkan penurunan jumlah dopakrom yang merupakan hasil oksidasi L-DOPA oleh enzim tirosinase. Warna jingga hingga merah menunjukkan adanya dopakrom yang terbentuk. Jika aktivitas tirosinase terhambat maka intensitas warna dopakrom akan menurun sehingga absorbansi dapat diukur menggunakan *microplate reader*. Pengujian aktivitas inhibitor enzim tirosinase menggunakan *microplate reader* karena mempunyai sifat sensitifitas yang tinggi, kecepatan deteksi yang tinggi, serta sangat akurat (Jayantie *et al*., 2022).

Hasil pengujian dinyatakan dalam bentuk persentase penghambatan, yang dihitung dengan membandingkan nilai absorbansi sampel terhadap nilai absorbansi kontrol, sehingga dapat menggambarkan tingkat aktivitas penghambatan yang terjadi. Pengujian tirosinase diawali dengan tahap skrining awal pada dua konsentrasi, yakni 500 ppm dan 1000 ppm, sebagai prosedur standar laboratorium untuk melihat seberapa besar persentase penghambatan yang dihasilkan oleh sampel. Apabila nilai yang diperoleh melebihi 50%, maka pengujian dapat dilanjutkan ke tahap penentuan nilai IC_{50}.

Hasil uji inhibisi enzim tirosinase menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% pada konsentrasi 500 ppm memberikan persentase penghambatan sebesar 7,04%, sedangkan pada konsentrasi 1000 ppm meningkat menjadi 13,70%. Adapun ekstrak etanol 95% pada konsentrasi 500 ppm menunjukkan persentase penghambatan sebesar 10,28%, dan pada konsentrasi 1000 ppm meningkat menjadi 15,06%. Nilai persentase penghambatan yang dihasilkan oleh kedua ekstrak tersebut masih

rendah (Zakri et al., 2025). Meskipun demikian, ekstrak etanol 95% secara konsisten menunjukkan persentase penghambatan yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol 70% pada setiap konsentrasi yang diujikan. Apabila dibandingkan dengan kontrol positif berupa asam kojat, perbedaan aktivitas inhibisi terlihat cukup signifikan, dengan asam kojat pada konsentrasi 500 ppm memberikan persentase penghambatan sebesar 69,96%, dan pada konsentrasi 1000 ppm meningkat menjadi 75,88%. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas inhibisi enzim tirosinase pada kedua ekstrak etanol rimpang kunyit hitam masih jauh di bawah persentase inhibisi asam kojat sebagai standar pembanding.

Tabel 6. Hasil Uji Enzim Tirosinase

No	Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi
1	Ekstrak etanol 70% Kunyit Hitam	500	7,04 ± 0,17
2	Ekstrak etanol 70% Kunyit Hitam	1000	13,70 ± 0,09
3	Ekstrak etanol 95% Kunyit Hitam	500	10,2859 ± 0,21
4	Ekstrak etanol 95% Kunyit Hitam	1000	15,06 ± 0,40
5	Asam Kojat (kontrol positif)	500	69,97 ± 0,21
6	Asam Kojat (kontrol Positif)	1000	75,88 ± 0,23

Perbedaan aktivitas inhibisi antara kedua ekstrak tersebut dapat dikaitkan dengan perbedaan polaritas pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Etanol 95% dengan kandungan air hanya 5% lebih mampu mengekstrak senyawa kurkuminoid yang bersifat nonpolar atau lipofilik, dibandingkan etanol 70% yang mengandung 30% air. Kurkuminoid yang terkandung dalam rimpang kunyit hitam, meliputi kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin, diketahui berperan dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase. Selain kurkuminoid, kandungan metabolit sekunder lainnya seperti terpenoid juga turut berperan terhadap aktivitas inhibisi yang lebih tinggi pada ekstrak etanol 95% (Paudel *et al*., 2024; Rocchitta *et al*., 2022; Syakri *et al*., 2020).

Faktor lain yang turut mempengaruhi lemahnya aktivitas penghambatan tirosinase pada ekstrak etanol 70% dan 95% kunyit hitam (*Curcuma caesia*) adalah kondisi ekstrak yang telah disimpan dalam jangka waktu cukup lama. Kunyit hitam

diketahui mengandung senyawa kurkuminoid dan flavonoid yang bersifat tidak stabil terhadap cahaya, oksigen, dan suhu, sehingga senyawa-senyawa tersebut rentan mengalami oksidasi dan degradasi selama penyimpanan, yang pada akhirnya menyebabkan penurunan aktivitas inhibisi terhadap enzim tirosinase *(Lailatusy et al*., 2023).

Aktivitas inhibisi enzim tirosinase yang ditunjukkan oleh kedua ekstrak tersebut berkaitan dengan kandungan senyawa bioaktif yang memiliki kemampuan menghambat enzim tirosinase, di antaranya senyawa flavonoid dan senyawa fenolik lainnya. Senyawa flavonoid diketahui mampu menghambat enzim tirosinase melalui mekanisme inhibisi kompetitif, yaitu dengan meniru substrat tirosinase dan mengkelat sisi aktif enzim. Sementara itu, senyawa dengan gugus fenol lainnya seperti alkaloid, kuinon, dan terpenoid juga memiliki kemampuan mengkelat ion tembaga Cu^{2+} atau Fe^{2+} yang merupakan kofaktor pada sisi aktif enzim tirosinase. Hilangnya kofaktor tersebut menyebabkan enzim tirosinase tidak dapat berikatan dengan substratnya, sehingga proses pembentukan melanin dapat terhambat (Dzikir *et al*., 2024; Furi *et al*., 2022).

Nilai % inhibisi tirosinase kemudian dianalisis menggunakan statistik dengan uji Two-Way ANOVA dengan prasyarat normalitas dan homogenitas varians yang telah terpenuhi dapat dilihat pada lampiran 17. Hasil menunjukkan bahwa jenis sampel, konsentrasi, serta interaksi keduanya berpengaruh signifikan terhadap % inhibisi tirosinase ($p = 0{,}000 < 0{,}05$). Pertama, perbandingan antara Etanol 70% dan Etanol 95% menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p = 0{,}000 < 0{,}05$), dengan Etanol 95% memiliki % inhibisi tirosinase lebih tinggi dibandingkan Etanol 70%. Kedua, perbandingan antara Etanol 70% dan Asam Kojat menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p = 0{,}000 < 0{,}05$), dengan Asam Kojat memiliki % inhibisi tirosinase jauh lebih tinggi dibandingkan Etanol 70%. Ketiga, perbandingan antara Etanol 95% dan Asam Kojat menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p = 0{,}000 < 0{,}05$), dengan Asam Kojat juga memiliki % inhibisi tirosinase jauh lebih tinggi dibandingkan Etanol 95% (Maresti *et al*., 2025; Sahda, 2025).

BAB

KESIMPULAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) memiliki aktivitas penghambatan enzim tirosinase dengan nilai % inhibisi ekstrak etanol 70% pada konsentrasi 500 ppm sebesar 7,04% dan 1000 ppm sebesar 13,70%, sedangkan ekstrak etanol 95% pada konsentrasi 500 ppm sebesar 10,28% dan 1000 ppm sebesar 15,06%. Peningkatan konsentrasi dari 500 ppm menjadi 1000 ppm berbanding lurus dengan peningkatan % inhibisi tirosinase pada semua sampel. Nilai % inhibisi tersebut menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan kontrol positif asam kojat, yang memiliki nilai % inhibisi sebesar 69,96% pada konsentrasi 500 ppm dan 75,88% pada konsentrasi 1000 ppm, mengindikasikan bahwa kemampuan ekstrak etanol rimpang kunyit hitam dalam menghambat enzim tirosinase masih jauh lebih lemah dibandingkan asam kojat.

B. Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk melakukan pengujian lebih lanjut terkait aktivitas penghambatan enzim tirosinase dengan menggunakan pelarut yang berbeda serta metode ekstraksi yang berbeda guna mengetahui perbedaan aktivitas penghambatan tirosinase pada rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia* Roxb.).

DAFTAR PUSTAKA

Abidin, Z., Khaeriah, U., Pratama, M., & Baits, M. (2019). Penentuan Aktivitas Penghambat Tirosinase Dari Ekstrak Kasar Dan Ekstrak Terpurifikasi Daun Kelor (*Moringa Oleifera* L .). *Indonesian Journal Of Pharmaceutical Science And Technology*, *1*(1).

Alda, N., Novi, K., Elfira, A., Nur, A., & Abubakar, F. (2025). Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Lotion Ekstrak Daun Lahuna (*Chromolaena Odorat*a) Terhadap Bakteri Staphylococcus Aureus. *CERATA Jurnal Ilmu Farmasi*, *12*(1), 31–39.

Anas, D., Hajrah, V. (2024). Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase Kombinasi Ekstrak Bunga Mawar (*Rosa Damascena Mill*) Dengan Fraksi Umbi Bengkuang (*Pachyrizus Erosus*). Journal Syntax Idea, *6*(06), 2640–2654.

Angel, N,. Diba, M., Hermin M,. (2021). Identifkasi Senyawa Terpenoid Dan Steroid Pada Beberapa Tanaman Menggunkan Pelarut N-Heksan. *Jurnal Health Sains*, *4*(1), 734–740.

Aprilliani, A,. Asep G,. (2018). Uji Inhibisi Aktivitas Enzim Tirosinase Beberapa Jenis Tumbuhan Zingiberaceae. *Jurnal Ilmiah Farmasi 14(1)*. *4*, 46–58.

Arviani, Ardinata, I. P. R., Wardani, T. K., Mahbub, K., Setiawan, P. Y. B., Niiah, R., Erlyn, P., Febrianti, D. R., Hasnawati, Mahfur, & Issusilaningtyas, E. (2021). *Famasi Bahan Alam. In Hei Publishing Indonesia.*

Avian, T. M. (2023). Indonesian Journal Of Pharmacy And Natural Product. *Indonesian Journal Of Pharmacy And Natural Product*, *06*(1), 191–201.

Ayu, W,. Jihan, R,. Riswanti, F,. (2023). Menganalisis Pengujian Kadar Air Dari Berbagai Simplisia Bahan Alam Menggunakan Metode Gravimetri. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, *9*(9), 190–193.

Baber, M. A., Crist, C. M., Devolve, N. L., & Patrone, J. D. (2023). Tyrosinase Inhibitors: A Perspective. *Molecules*, *28*(15). Https://Doi.Org/10.3390/Molecules28155762

Bashir, F., Sultana, K., Khalid, M., Rabia, H., & Khan, H. (2021). Kojic Acid : A Comprehensive Review. *Ajahas*, *06*(01), 13–17.

Bustanul, A,. (2018). Struktur , Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, *6*(1), 21–29.

Chaturvedi, M., Rani, R., Sharma, D., & Yadav, J. P. (2020). Effect Of Temperature And Pressure On Antimycobacterial Activity Of *Curcuma Caesia* Extract By Supercritical Fluid Extraction Method. *International Journal Of Mycobacteriology* |, *14*, 296–302. Https://Doi.Org/10.4103/Ijmy.Ijmy

Clost, M., & Vomscheid, A. (2024). Main Characteristics Of The Skin Dermis.

European Journal Of Medical Genetics And Clinical Biology, *9*(3), 89–91.

Diren, H., Ernie, H, K. (2023). Standarisasi Mutu Simplisia Rimpang Kunyit Dan Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit (*Curcuma Longa Linn*). *PHARMACY GENIUS*, *02*(01), 43–59.

Eden, W. T., Salshabila, C., Rakainsa, S. K., & Mursiti, S. (2024). Identifikasi Senyawa Aktif Eceng Gondok (*Eichhornia Crass*ipes (Mart.) Solms) Sebagai Inhibitor Tirosinase. *JPSCR: Journal Of Pharmaceutical Science And Clinical Research*, *9*(2), 301– 312. Https://Doi.Org/10.20961/Jpscr.V 9i2.73653

Fadillah, M., Burhanuddin, T,. (2020). Pengukuran Parameter Spesifik Dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Daun. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, *6*(1), 1–12.

Fardyansjah, H., Sandra, A,. (2017). Perbedaan Waktu Panen Daun Terhadap Produksi Dan Kadar Flavonoid Tempuyung (*Sonchus Arvensis* L.) Effect Of Leaf Harvesting Time On Production And Flavonoid Content Of Perennial. *J. Hort. Indonesia*, *8*(2), 136–145.

Fatma, E., Andarini, D,. (2023). Jurnal Teknologi Dan Industri Pertanian Indonesia. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pertanian Indonesia Open*, *15*(01).

Firdaus, S. M., Rosyidah, M., Permadi, A., Sulistiawati, E., & Setya, B. (2024). Optimasi Proses Ekstraksi Maserasi : Analisis Terhadap Variabel Yang Berpengaruh. *SMENASINTEK*, *55*(November), 138–143.

Firmansyah, T., & Jawa La, E. O. (2022). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Putih *Curcuma Zedoaria* (Christm.) Roscoe. *Acta Holistic Pharmaciana*, *4*(1), 2024. Https://Doi.Org/10.62857/Ahp.V4i1.49

Fitriani, A. R., Yunitasari, N., & Trikurniadewi, N. (2026). Kualitas Simplisia Daun Pepaya (*Carica Papaya* L.) Dari Hasil Variasi Metode Pengeringan : Para meter Spesifik Dan Non-Spesifik. *PHARMASIPHA : Pharmaceutical Journal Of Islamic Pharmacy*, *10*(1), 12–22.

Furi, M., Ainun, A., Rahma, D., Armon, F., Fina, A., Rahayu, U., Septi, M,. Husnawati, Wira, N., & Melzi O. (2022). Uji Inhibitor Enzim Tirosinase Ekstrak Dan Fraksi Daun Kedabu (Sonneratia Ovata Backer) Secara In-Vitro. *Jurnal Ilmiah Manuntung: Sains Farmasi Dan Kesehatan*, *8*(2), 201–214. Https://Doi.Org/10.51352/Jim.V8i2.529

Garcia-Molina, P., Garcia-Molina, F., Teruel-Puche, J. A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canovas, F., & Muñoz-Muñoz, J. L. (2022). The Relationship Between The IC50 Values And The Apparent Inhibition Constant In The Study Of Inhibitors Of Tyrosinase Diphenolase Activity Helps Confirm The Mechanism Of Inhibition. *Molecules*, *27*(10).

Gazali, M., Suhardani, M. N., Husni, A., Nurjanah, N., Zuriat, Z., Hasanah, U., & Syafitri, R. (2024). Aktivitas Inhibisi Tirosinase Ekstrak Etanol Rumput

Laut *Ulva Lactuca* Secara In Vitro. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, *27*(7), 564–585. Https://Doi.Org/10.17844/Jphpi.V27i7.53399

Guo, L., Li, W., Gu, Z., Wang, L., Guo, L., Ma, S., Li, C., Sun, J., Han, B., & Chang, J. (2023). Recent Advances And Progress On Melanin: From Source To Application. *International Journal Of Molecular Sciences*, *24*(5). Https://Doi.Org/10.3390/Ijms24054360

Haerani, A., Syahfitri, S., Puji, R., Raden, H., Nursamtari, A., Hamidah, M., David, S., Gabriela, M., & Litaay, W. (2023). *Farmakoknosi Dan Fitokima* (M. F. Apt. Ellen Stephanie Rumaseuw & Desain (Eds.); 1st Ed.). *Cv. Eureka Media Aksara.*

Happy, M., Klau, C., & Hesturini, R. J. (2021). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Dandang Gendis (*Clinacanthus Nutans* (Burm F) *Lindau*) Terhadap Daya Analgesik Dan Gambaran Makroskopis Lambung Mencit. *JURNAL FARMASI & SAINS INDONESIA*, *4*(1), 6- 12. Https://Doi.Org/10.52216/Jfsi.V4i1.59

Hasan, H., Thomas, N. A., Hiola, F., Ramadhani, F. N., Anggun, P., & Ibrahim, S. (2022). Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Kulit Batang Matoa (*Pometia Pinnata*) Dengan Metode 1 , 1-Diphenyl-2 Picrylhidrazyl (DPPH). *Indonesian Journal Of Pharmaceutical Education*, *2*(1), 67–73. Https://Doi.Org/10.37311/Ijpe.V2i1.10995

Hasan, T., Ida, N., & Qifni, Z. F. (2023). Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam (*Curcuma Caesia* Roxb .) Asal Luwu. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, *5*(3), 437–457.

Hijayanti, R., & Deni Rahmat1, R. D. (2023). Analisis Senyawa Fitokimia, Organoleptik, Uji Aktivitas Inhibisi Enzim Tirosinase Minyak Biji Argan (*Argan Spinosa* L.) Dan Ekstrak Akar Murbei (*Morus Alba* L.) Sebagai Whitening Agent Pada Kulit. *Ghidza : Jurnal Gizi Dan Kesehatan*, *7*(1), 157–165.

Hoki Masriono Manik, Ahmad Hambali, & Tira Sovia Ningsih. (2024). Analisis Faktor-Faktor Penyebab Hiperpigmentasi Pada Masa Kehamilan. *Prosiding Semnasbo Universitas Negeri Padang*, *4*(2), 1–14.

Jahe, P. R., Evania, M. K., Ananingsih, V. K., Soedarini, B., Tonggak, P., & Pontianak, E. (2024). Kajian Pustaka Optimasi Kondisi Proses Berbagai Metode Pengeringan. *Innovative: Journal Of Social Science Research*, *4*, 5483–5496.

Jayantie, D. D., Farida, Y., & Taurhesia, S. (2022). Aktivitas Antioksidan Dan Inhibisi Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Buah Gandaria (*Bouea Macrophylla Griff*.) Secara In Vitro. *Pharmacoscript*, *5*(1), 1–12.

Kalangi, S. J. R. (2017). Histofisiologi Kulit. *Jurnal Biomedik (JBM)*, *5*(3), 12–20.

Karol, S., Michael, S., Andrew, S. G., & Mannickarottu, B. Y. C. (2017). An Open-

Source Plate Reader Karol. *Biochemistry*, *176*(1), 139–148. Https://Doi.Org/10.1016/J.Physbeh.2017.03.040

Kartini, S., Susanti, P., Marshanda, I. M., Pratiwi, D., & Mardhiyani, D. (2023). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Dan Metanol Kunyit Hitam (*C . Caesia*) Dengan Menggunakan DPPH. *Jurnal Proteksi Kesehtan*, *12*(2), 163–168.

Kemenkes, R. (2017). Farmakope Herbal Inodnesia. In *Kementrian Kesehatan Indonesia*. Https://Doi.Org/10.1201/B12934-13

Kemenkes, R. (2020). Farmakope Indonesia Edisi VI. In *British Medical Journal* (Vol. 2, Issue 5096). Https://Doi.Org/10.1136/Bmj.2.5096.601

Kholid, K., Mudarris, M., & Masdar, M. (2022). Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Alkaloid, Flavonoid Dan Tanin) Pada Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam (*Curcuma Caesia* Roxb.). *Jurnal Pendidikan Tambusai*, *6*(1), 2088–2093.

Lady, D., Handoyo, Y., & Pranoto, M. E. (2020). Pengaruh Variasi Suhu Pengeringan Terhadap Pembuatan Simplisia Daun Mimba (*Azadirachta Indica*). *Jurnal Farmasi Tinctura*, *1*(2), 45–54.

Lailatusy, A., Retnowati, R., Melani, C., & Muda, B. (2023). Pengaruh Temperatur Penyimpanan Terhadap Kadar Kurkumin Simplisia Rimpang Temugiring (*Curcuma Heyneana* Val .). *Pharmademica : Jurnal Kefarmasian Dan Gizi*, *3*(1), 2–11.

Larasati, D., Marwati, F., & Putri, S. (2023). Skrining Fitokimia Dan Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Limbah Kulit Pisang (*Musa Acuminata Colla*). *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia (JMPI)*, *9*(1), 125–131. Https://Doi.Org/10.35311/Jmpi.V9i1.330

Leela, & K, & A. P. (2024). *Curcuma Caesia* Roxb. - Update Of Phytochemicals And Pharmacological Properties Leela. *Journal Of Spices And Aromatic Crops*, *33*(1), 1–22.

Liskaa, Shindi, N,. (2020). Skrinig Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Daun Bitangur (*Calophyllum Inophyllum* L). *Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat*, 93–95.

Maheshwaran, L., Nadarajah, L., Senadeera, S., Ranaweera, C. B., Chandana, A. K., & Pathirana, R. N. (2024). Phytochemical Testing Methodologies And Principles For Preliminary Screening/ Qualitative Testing. *Asian Plant Research Journal*, *12*(5), 11– . Https://Doi.Org/10.9734/Aprj/2024/V12i5267

Makalunsenge, M. O. (2022). Antioxidant Activity Test Ofextracts And Fractions Of Callyspongia Aerizusa Obtained From Manado Tua Island. *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia*, *11*(November), 1679–1684.

Maresti, F. A., Rahman, M. A., & Anisah, S. N. (2025). Analisis *Anova Two-Way* :

Pengaruh Kesehatan Mental Dan Tahun Akademik Terhadap Nilai Ipk Mahasiswa Dengan Bahasa Pemrograman Python. *Jurnal Itscience*, *4*(2), 126–136.

Maria, U., Emelda, E., Munir, M. A., & Sulistyani, N. (2023). Pengaruh Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Standardisasi Parameter Spesifik Dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Biji Pepaya (*Carica Papaya* L.). *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, *6*(1), 1– 12. Https://Doi.Org/ 10.36387/Jifi.V6i1.1387

Maslahah, N. (2024). Standar Simplisia Tanaman Obat Sebagai Bahan Sediaan Herbal. *Bsip Troa*, *2*(2), 1–4.

Musfirotun N,. (2023). Standarisasi Parameter Spesifik Dan Non-Spesifik Ekstrak Daun Binahong Merah (*Anredera Cordifolia*). *Indonesian Journal Of Health Science*, *3*(2), 431–437.

Muslihin, N., Rika, H,. (2024). Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Buah Kecombrang (*Etlingera Elatior*) Dengan Metode KLT Bioautografi. *Jurnal Kebidanan, Keperawatan Dan Kesehatan (J-BIKES)*, *4*(2), 174–181. Https://Doi.Org/10.51849/J-Bikes.V

Mutu, A. P., Rahmat, D., Made, N., & Sandhiutami, D. (2025). Quality Parameter Analysis , Antioxidant Activity , And FTIR Profile Of Turmeric (*Curcuma Longa* L .) From Medan , Sumba , And Papua. *Indonesian Journal Of Pharmaceutical Education*, *5*(1), 119– 131. Https://Doi.Org/10.37311/Ijpe .V5i1.30494

Nautiyal, A., & Wairkar, S. (2021). Management Of Hyperpigmentation: Current Treatments And Emerging Therapies. *Pigment Cell And Melanoma Research*, *34*(6), 1000–1014. Https://Doi.Org/10.1111/Pcmr.12986

Nguyen, L. T., Fărcaș, A. C., Socaci, S. A., Tofană, M., Diaconeasa, Z. M., Pop, O. L., & Salanță, L. C. (2020). An Overview Of Saponins – A Bioactive Group. *Bulletin Of University Of Agricultural Sciences And Veterinary Medicine Cluj- Napoca. Food Science And Technology*, *77*(1), 25– 36. Https://Doi. Org/10.15835/Buasvmcn-Fst:2019.0036

NiPutu, E., Sofia, F,. (2020). The Effect Of Ethanol Concentrations As The Extraction Solvent On Antioxidant Activity Of Katuk (*Sauropus Androgy nus* (L .) Merr .). *Purpose- Led- Publishing*, *1*(2), 190– 199. Https://Doi.O rg/10.1088/1755-1315/755/1/012060

Nikmatul, I,. H. O. H. D. (2018). Standarisasi Simplisia Daun Tempuyung (*Sonchi Folium*) Hasil Budidaya Di Ubaya Training Center Trawas Mojokerto. *Journal Of Pharmacy Science And Technology*, *1*(1), 68–79.

Ningsih, I. S., & , Moralit, V,. (2020). Flavonoid Active Compounds Found In Plants Senyawa Aktif Flavonoid Yang Terdapat Pada Tumbuhan. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*, *8*(2), 61.

Noureddine. (2018). Pharmacological Activity Of Aporphinoid Alkaloids. A Review. *Asian Journal Ofbotany*, *60*(5), 387– 412. Https://Doi.Org/10.63019/Ajb.V1i2.467

Nuraeni, S., Raihandhany, R., Suparman, U., Warsono, W., & Winajat, U. (2023). Ulasan Botani Dan Potensi Kunyit Hitam (*Curcuma Caesia* Roxb.) Sebagai Program Pengelolaan Keanekaragaman Hayati Dan Pembinaan Kelompok Tani Cianjur Oleh PT. Tirta Investama Cianjur. *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, *25*(1), 1–10. Https://Doi.Org/10.14710/Bioma.25.1.1-10

Oktavia, F. D., & Sutoyo, S. (2021). Skrining Fitokimia, Kandungan Flavonoid Total, Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Tumbuhan *Selaginella Doederleini*i. *Jurnal Kimia Riset*, *6*(2), 141. Https://Doi.Org/10.20473/Jkr.V6i2.30904

Pandey, S., Pandey, S., Mishra, M., & Tiwari, P. (2022). Morphological, Phytochemical, And Pharmacological Investigation Of Black Turmeric (*Curcuma Caesia* Roxb.). *Journal Of Medicinal Herbs*, *13*(2), 1–6.

Paudel, A., Khanal, N., Khanal, A., Rai, S., & Adhikari, R. (2024). Pharmacological Insights Into *Curcuma Caesia* Roxb . , The Black Turmeric : A Review Of Bioactive Compounds And Medicinal Applications. *Discover Plants*. Https://Doi.Org/10.1007/S44372-024-00076-1

Pradana, A. R., Wahyudi, H., & Lestari, M,. (2023). Rendemen Ekstrak Etanol Herba Rumput Akar Wangi (*Polygala Paniculata* L) Pada Perbandingan Pelarut. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, *5*(3), 373–383.

Pujiastuti, E., & El'Zeba, D. (2021). Perbandingan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 70% Dan 96% Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus Polyrhizus*) Dengan Spektrofotometri. *Cendekia Journal Of Pharmacy*, *5*(1), 28–43. Https://Doi.Org/10.31596/Cjp.V5i1.131

Rachma, F. A., & Saptawati, T. (2022). Penetapan Parameter Spesifik Dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Biji Buah Trembesi (S *Amanea Saman*). *Pharmaceutical Scientific Journal*, *01*(02), 46–58.

Rai, N., Chouksey, R., & Tyagi, C. K. (2019). Phytochemical Screening Of Successively Extracted Rhizomes Of Different Curcuma Species. *International Journal Of Research And Analytical Reviews*, *6*(2), 499–509.

Rinoa Sahda Rahayu1, C. W. (2025). Aktivitas Antioksidan Daun Sirsak (*Annona Muricate* L.): A Systematic Review. *Journal Syifa Sciences And Clinical Research (JSSCR)*, *7*, 6–17.

Rocchitta, G., Rozzo, C., Pisano, M., Fabbri, D., Dettori, M. A., Ruzza, P., Honisch, C., Dallocchio, R., Dess, A., Migheli, R., Serra, P., & Delogu, G. (2022). Tyrosinase Activity And Melanogenesis. *Molecules Article*, *27*(7942), 1–24.

Rohmani, S., Astirin, O. P., Marliyana, S. D., & Handayani, N. (2024). Analysis Of

Flavonoid Content And Antioxidant Activity Of *Curcuma Caesia* Roxb Grown In Different Geographical Areas. *Journal Of Advanced Pharmacy Education & Research*.

Rokhmah, M., Modesty, A. R., Putri, A. I., Delia, W., Bria, A. G., Ndun, M. D., Tectona, E., Agustin, R. S., Bria, P. P., & Hisbiah, A. Y. (2026). Artikel Review Fitokimia : Efektivitas Maserasi Soxhletasi Sebagai Metode Ekstraksi. *Obat: Jurnal Riset Ilmu Farmasi Dan Kesehatan*, *November 2025*.

Rumondor, E. M., Yudistira1, A., & Wewengkang, D. S. (2024). Penentuan Nilai IC 50 Karang Lunak *Lobophytum* Sp . Dan *Sarcophyton* Sp . *Pharmacy Medical Journal*, *7*(2), 78–83.

Sagala. Z., Pratiwi. W. R., & Azmi. U. N. (2019). Uji Aktivitas Inhibisi Terhadap Enzim Tirosinase Dari Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica Papaya* L.) Secara In Vitro. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, *7*(2), 34–38.

Sapitri, A., Asfianti, V., & Marbun, E. D. (2022). Pengelolahan Tanaman Herbal Menjadi Simplisia Sebagai Obat Tradisional. *Jurnal Abdimas Mutiara*, *3*(1), 94–102.

Sefrinus, M. (2022). Pengaruh Perlakuan Awal Ampas Biji Jewawut (*Setaria Italica* L.) Dengan Microwave. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, *18*(2), 183–192. Https://Doi.Org/10.20961/Alchemy.18.2.59819.183-192

Setya, N., Rahmat, D., & Lilis, N. (2025). Penapisan Fitokima Dan Evaluasi Parameter Mutu Spesifik Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria Ternatea*). *Journal Syifa Sciences And Clinical Research (JSSCR)*, *7*, 42–49.

Setyani, I. K., Nanda, T., & Sulaiman, S. (2021). Standardisasi Simplisia Dan Ekstrak Buah Kemukus (*Piper Cubeba* L.) Sebagai Bahan Baku Sediaan Kapsul Jamu Sesak Nafas. *Journal Of Pharmaceutical Science And Clinical Research*, 238–253. Https://Doi.Org/10.20961/Jpscr.V6i3.50372

Sholikha, M., Wahyuningtyas, & Puspitasari, L. (2023). Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typhonium Flagelliforme* (Lodd.) *Blume*) Secara In Vitro. *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, *16*(1), 1–6.

Simamora, Y., Fachrial, E., & Syahputra, H. D. (2026). Aktivitas Antioksidan Dan Inhibitor Enzim Tirosinase Ekstrak Daun Pepaya (*Carica Papaya* L.). *Herbal Medicine*, *9*, 58–66.

Sunani, S., & Hendriani, R. (2023). Klasifikasi Dan Aktivitas Farmakologi Dari Senyawa Aktif Tanin. *Indonesian Journal Of Biological Pharmacy*, *3*(2), 130–136. Https://Jurnal.Unpad.Ac.Id/Ijbp

Supriningrum, R., & Warnida, H,. (2024). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Labu Kuning (*Cucurbita Moschata*) Berdasarkan Perbedaan Konsentrasi Pelarut Secara Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal*

Chemica, 110–118.

Surya, R. P. A., & Luhurningtyas, F. P. (2021). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70% Dan 96% Buah Parijoto Asal Bandungan Dan Profil Kromatografinya. *Pharmaceutical And Biomedical Sciences Journal*, *3*(1), 39–44. Https://Garuda.Kemdikbud.Go.Id/Documents/Detail/2446133

Sutanto, N. R., Yusharyahya, S. N., Nilasari, H., Legiawati, L., Astriningrum, R., & Fitri, E. M. (2023). Recent Developments In The Skin Aging Process. *Meditek Medical Journal*, *29*(1), 98–108.

Syakri, S., Khaerani, & Hasrawati. (2020). Pengujian Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase Ekstrak N-Heksan Dari Umbi Wortel (*Daucus Carrota* L.). *Jurnal Farmasi Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan UIN Alaudin Makassar*, *8*(2), 1–8.

Wahidah, S. W., Fadhilah, K. N., Nahhar, H., Afifah, S. N., Sri, N. & Buana, U. (2017). Uji Skrining Fitokimia Dari Amilum Familia. *Jurnal Buana Farma*, *1996*, 1–4.

Wahyuningsih, S., Yunita, I., Sundari, U. Y., Nurmalasari, E., Suryandani, H., Pagalla, D. B., Kalalinggi, S. Y., Alpian, Ramlah, & Nasrullah, M. (2024). Buku Ekstraksi Bahan Alam Edisi 2024. In *Researchgate* (Issue March).

Wijaya, A., & Noviana. (2022). Penetapan Kadar Air Simplisia Daun Kemangi (*Ocimum Basilicum* L .) Berdasarkan Perbedaan Metode pengeringan. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, *4*(2), 185–199.

Yasser, M., Nurdin, M. I., Bangngalino, H., Angraini, N., Said, R. U., Kimia, J. T., Negeri, P., & Pandang, U. (2022). Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid, Alkaloid, Saponin, Steroid Dan Terpenoid Dari Daun Kopasanda (*Chromoloena Odorata* L.). *Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat*, 90–94.

Yousef, H., & Sharma, S. (2017). Anatomy , Skin (Integument), Epidermis. *National Institutes Of Health.*

Yunita, E., & Khodijah, Z. (2020). Pengaruh Konsentrasi Pelarut Etanol Saat Maserasi Terhadap Kadar Kuersetin Ekstrak Daun Asam Jawa (*Tamarindus Indica* L .) Secara Spektrofotometri UV-Vis. Pharmacy: Jurnal Farmasi Indonesia*. 17*(02), 273–280.

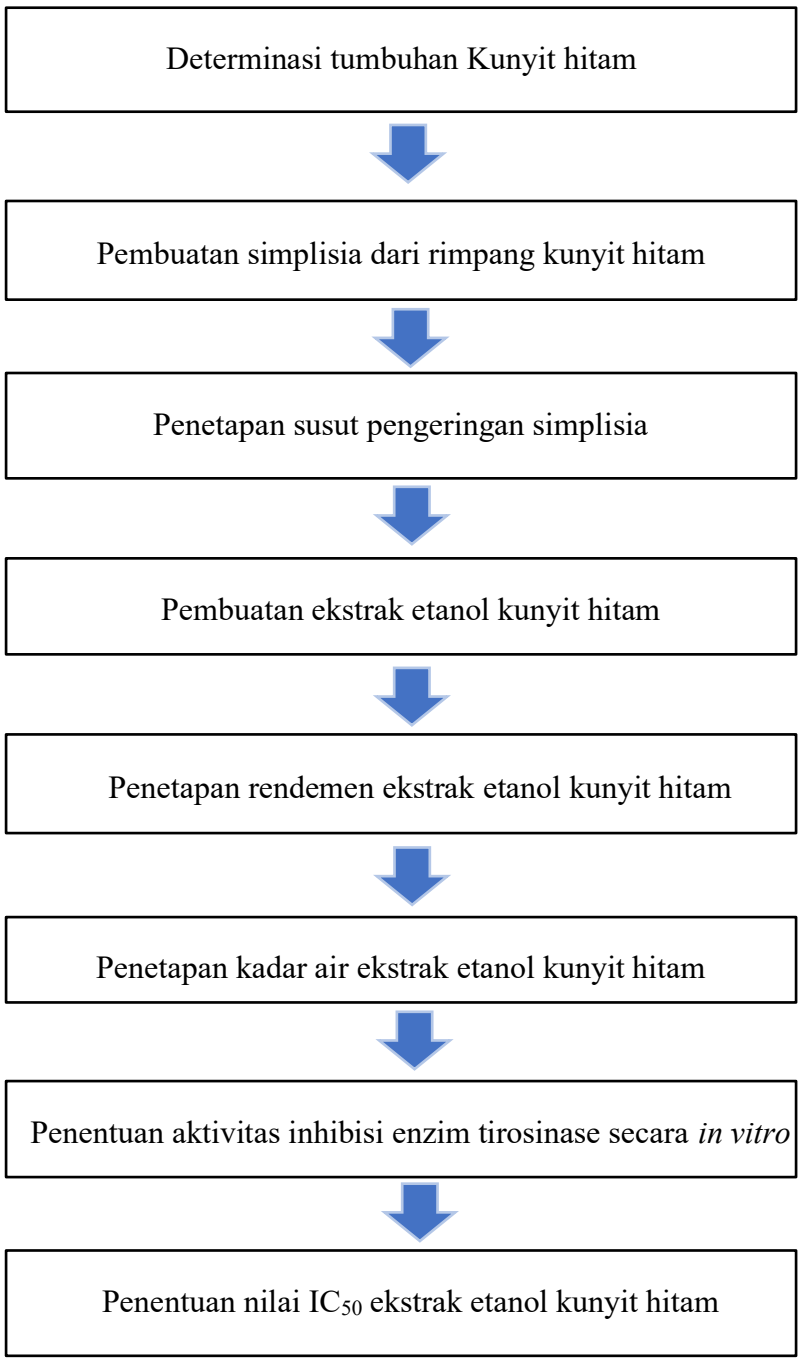
Yusniawati, W., & Hasan, T. (2024). Uji Kadar Fenolik Total Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kunyit Hitam (*Curcuma Caesia* Roxb.) Asal Kabupaten Bone Dengan Metode DPPH. *Jurnal Novem Medika Farmasi*, *3*(1), 38–45. Https://Doi.Org/10.59638/Junomefar.V3i1.824

Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A Comprehensive Review On Tyrosinase Inhibitors. *Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*, *34*(1), 279– 309. Https://Doi.Org/10.1080/14756366.2018.154

5767

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Penelitian



Lampiran 2. Surat determinasi kunyit hitam

KEMENTERIAN PENDIDIKAN TINGGI, SAINS, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS MULAWARMAN
FAKULTAS KEHUTANAN DAN LINGKUNGAN TROPIS
LABORATORIUM EKOLOGI DAN KONSERVASI BIODIVERSITAS HUTAN TROPIS
HERBARIUM MULAWARMAN (SHMU)
Alamat: Kampus Unmul Gunung Kelua, Jl. Panajam Gd. B11 Lt.1 Samarinda 75123
Email: lab.ekobio@fahutan.unmul.ac.id

Samarinda, 21 Oktober 2025

Nomor : 315/UN17.4.08/LL/2025
Lampiran : -
Perihal : *Hasil Identifikasi/Determinasi Tumbuhan*

Kepada Yth.
Bpk/Ibu/Sdr(i). Henny Nurhasnawati, S.Si., M.Si. (1103067801)
Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Samarinda
di-
Tempat

Dengan Hormat,
Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang saudara kirimkan ke "Herbarium Mulawarman", Laboratorium Ekologi dan Konservasi Biodiversitas Hutan Tropis Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman Samarinda, adalah sebagai berikut:

Kingdom	:	Plantae
Phyllum	:	Streptophyta
Class	:	Equisetopsida
Order	:	Zingiberales
Family	:	Zingiberaceae
Species	:	*Curcuma caesia* Roxb.
Synonyms	:	*Curcuma kuchoor* Royle
Common name	:	Kunyit Hitam

Demikian surat hasil identifikasi/determinasi tumbuhan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya, semoga bermanfaat bagi saudara. Atas perhatiannya, kami ucapkan terima kasih.

Penanggung Jawab,

Tembusan:
Arsip

Dr. Ir. Rita Diana, M.A.
NIP 196403031989032002

Lampiran 3. Tahapan Pembuatan Simplisia

	
Pengumpulan rimpang Kunyit hitam sebanyak 2 kg	Sortasi basah dan pencucian rimpang kunyit hitam dengan air mengalir
	
Perajangan rimpang kunyit hitam dengan ketebalan 3-5 mm	Pengeringan simplisia dengan metode oven suhu 50^{o}C
	
Diperoleh hasil simplisia kering	Penghalusan dan pengayakan simplisia

Lampiran 4. Perhitungan Susut Pengeringan dengan Metode Gravimetri

Rumus perhitungan susut pengeringan:

$$\text{Susut pengeringan simplisia (\%)} = \frac{b - (c - a)}{b} \text{x } 100\%$$

Keterangan:
a = Bobot cawan kosong (g)
b = Bobot simplisia rimpang kunyit hitam sebelum pemanasan (g)
c = Bobot cawan + simplisia rimpang kunyit hitam setelah pemanasan (g)

Berat krus kosong (g)	
Krus 1	37,2126
Krus 2	37,5008
Krus 3	37,5008

Oven	Berat krus dan sampel		
	Krus 1	Krus 2	Krus 3
Oven II	38,1308	38,4119	38,4134
Oven III	38,1304	38,4116	38,4131

Perhitungan susut Pengeringan

1. Krus 1

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{1 - (38{,}1304 - 37{,}2126)}{1} \text{x } 100\%$$
$$= \frac{1 - 0{,}9178}{1} \text{x } 100\%$$
$$= 8{,}22\%$$

2. Krus 2

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{1 - (38{,}4116 - 37{,}5008)}{1} \text{x } 100\%$$
$$= \frac{1 - 0{,}9108}{1} \text{x } 100\%$$
$$= 8{,}92\%$$

3. Krus 3

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{1 - (38{,}4131 - 37{,}5008)}{1} \text{x } 100\%$$
$$= \frac{1 - 0{,}9123}{1} \text{x } 100\%$$
$$= 8{,}77\%$$

$$\text{Rata} - \text{rata} = \frac{8{,}22\% + 8{,}92\% + 8{,}77\%}{3}$$

$$= 8{,}72\%$$

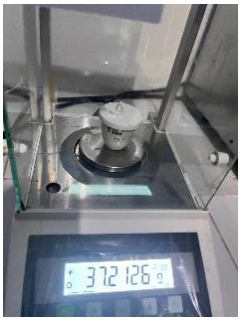
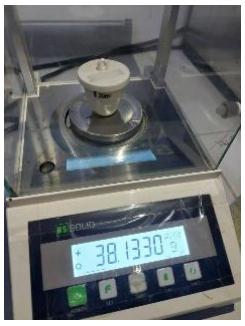
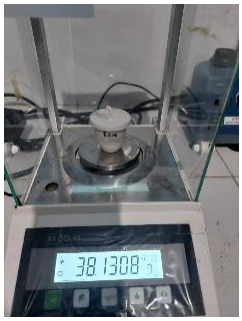
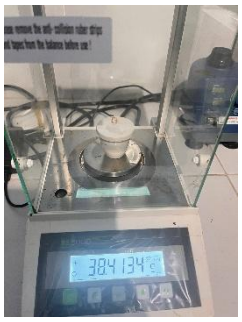
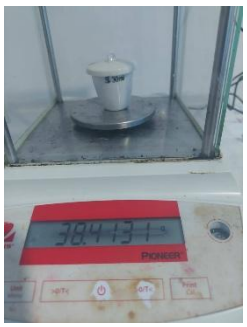
Standar Deviasi

No	x	$(x-\bar{x})$	$(x-\bar{x})^2$
1	8,22	-0,37333	0,139378
2	8,92	0,316667	0,100278
3	8,77	0,056667	0,003211
$\bar{x}$ rata-rata	8,713333	1E-09	0,242867

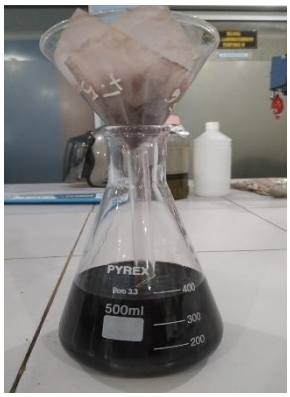
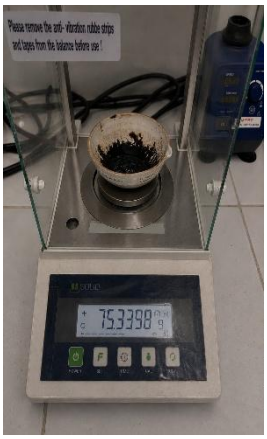
SD = 0,3484

Kadar Susut pengeringan = 8,71 ± 0,35

Lampiran 5. Penetapan Susut Pengeringan

	Krus 1	Krus 2	Krus 3
Krus Kosong			
Oven I			
Oven II			
Oven III			

Lampiran 6. Tahapan Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam

	 
Ditimbang serbuk simplisia sebanyak 100 gram	Dimaserasi dengan etanol 70% dan etanol 95% selama 6 jam, lalu direndam 18 jam
	
Penyaringan ekstrak	Ekstrak dikentalkan dengan rotary evaporator
	 
Diuapkan menggunakan waterbath pada suhu 60^{o}C	Diperoleh ekstrak kental rimpang kunyit hitam

Lampiran 7. Perhitungan Rendemen Ekstrak

A. Rendemen Ekstrak Etanol 70% Kunyit Hitam

Bobot Cawan kosong = 87,18 gram

Bobot cawan + ekstrak = 103,78 gram

Bobot ektrak = 103,78 gram – 87,18 gram

= 16,6 gram

Bobot simplisia = 100 gram

Rendemen Ekstrak $= \frac{16{,}6\ gram}{100\ gram}\ x\ 100\%$

= 16,6 %

B. Rendemen Ekstrak Etanol 95% Kunyit Hitam

Bobot Cawan kosong = 66,90 gram

Bobot cawan + ekstrak = 75,3398 gram

Bobot ektrak = 75,3398 gram – 66,90 gram

= 8,4398 gram

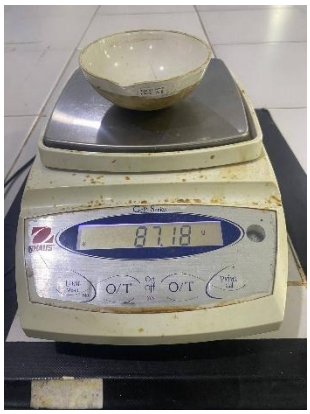
Bobot simplisia = 100 gram

Rendemen Ekstrak $= \frac{8{,}4398\ gram}{100\ gram}\ x\ 100\%$

= 8,44 %

Lampiran 8. Penetapan Rendemen Ekstrak Kunyit Hitam

A. Rendemen Ekstrak Etanol 70% Kunyit Hitam

<table>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Berat cawan kosong</td><td>Berat simplisia yang digunakan</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="2">Berat cawan dan ekstrak yang diperoleh</td></tr>
</table>

B. Rendemen Ekstrak Etanol 95% Kunyit Hitam

<table>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Berat cawan kosong</td><td>Berat simplisia yang digunakan</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="2">Berat cawan dan ekstrak yang diperoleh</td></tr>
</table>

Lampiran 9. Perhitungan Kadar Air Ekstrak

Rumus perhitungan kadar air ekstrak :

$$\text{kadar air } (\%) = \frac{b - (c - a)}{b} \text{ x } 100\%$$

Keterangan:
a = Bobot cawan kosong (g)
b = Bobot ekstrak rimpang kunyit hitam sebelum pemanasan (g)
c = Bobot cawan + ekstrak rimpang kunyit hitam setelah pemanasan (g)

A. Kadar Air Ekstrak Etanol 70% Kunyit Hitam

Berat Cawan kosong (g)	
Cawan I	28,1848
Cawan II	25,2003

Oven	Berat Cawan dan sampel	
	Cawan I	Cawan II
Oven II	29,0750	26,0938
Oven III	29,0746	26,0935

Perhitungan Kadar Air Ekstrak Etanol 70% Kunyit Hitam

1. Cawan 1

$$\text{Kadar Air Ekstrak } = \frac{1 - (29{,}0746 - 28{,}1848)}{1} \text{ x } 100\%$$
$$= \frac{1 - 0{,}8898}{1} \text{ x } 100\%$$
$$= 11{,}02\%$$

2. Cawan 2

$$\text{Kadar Air Ekstrak } = \frac{1 - (26{,}0935 - 25{,}2003)}{1} \text{ x } 100\%$$
$$= \frac{1 - 0{,}8932}{1} \text{ x } 100\%$$
$$= 10{,}68\%$$

$$\text{Rata} - \text{rata } = \frac{11{,}02 + 10{,}68}{2}$$
$$= 10{,}85\%$$

Standar Deviasi

No	x	(x-$\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$)^2
1	10,68	-0,17	0,0289
2	11,02	0,17	0,0289
$\bar{x}$ rata-rata	10,85	0	0,0578

SD = 0,24

Kadar Susut pengeringan = 10,85 ± 0,24

B. Kadar Air Ekstrak etanol 95% Kunyit Hitam

Berat cawan kosong (g)	
Cawan I	41,7754
Cawan II	38,0020

Oven	Berat cawan dan sampel	
	Cawan I	Cawan II
Oven II	42,6829	38,9050
Oven III	42,6827	38,9048

Perhitungan Kadar Air Ekstrak Etanol 95% Kunyit Hitam

1. Cawan 1

$$\text{Kadar Air Ekstrak} = \frac{1-(42{,}6827-41{,}7754)}{1} \text{x } 100\%$$
$$= \frac{1-0{,}9049}{1} \text{x } 100\%$$
$$= 9{,}27\%$$

2. Cawan 2

$$\text{Kadar Air Ekstrak} = \frac{1-(38{,}9048-38{,}0020)}{1} \text{x } 100\%$$
$$= \frac{1-0{,}9017}{1} \text{x } 100\%$$
$$= 9{,}72\%$$

$$\text{Rata} - \text{rata} = \frac{9{,}27+9{,}72}{2}$$
$$= 9{,}5\%$$

Standar Deviasi

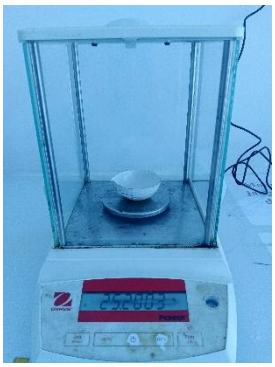
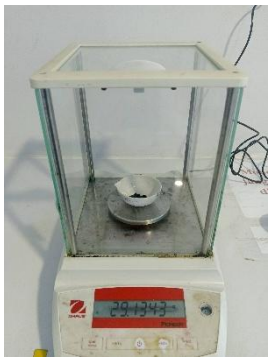
No	x	$(x-\bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$
1	9,27	-0,225	0,050625
2	9,72	0,225	0,050625
$\bar{x}$ rata-rata	9,495	-1,8E-15	0,10125

SD = 0,3181

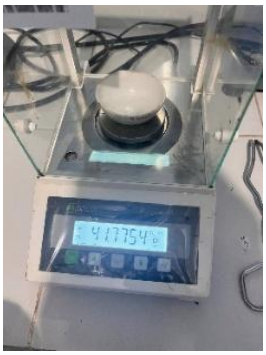
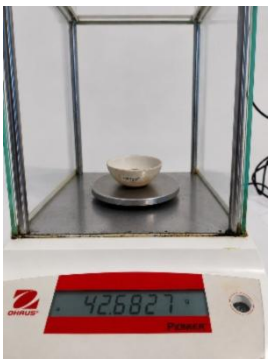
Kadar Susut pengeringan = 9,5 ± 0,32

Lampiran 10. Penetapan Kadar Air Ekstrak

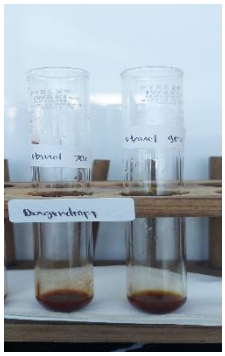
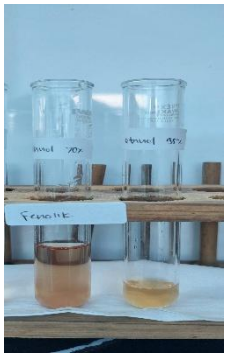
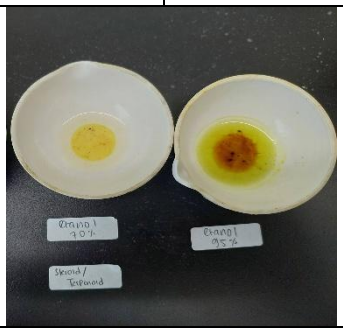
Ekstrak Etanol 70% Kunyit Hitam

	Cawan 1	Cawan 2
Cawan Kosong		
Oven I		
Oven II		
Oven III		

Ekstrak Etanol 95% Kunyit Hitam

	Cawan 1	Cawan 2
Cawan Kosong		
Oven I		
Oven II		
Oven III		

Lampiran 11. Skrining Fitokimia

	
Senyawa Alkaloid (Pereaksi Mayer)	Senyawa Alkaloid (Pereaksi Bouchardat)
	
Senyawa Alkaloid (Pereaksi Dragendorff)	Senyawa Flavonoid
	
Senyawa Tanin	Senyawa Saponin
	
Senyawa Triterpenoid	

Lampiran 12. Perhitungan Larutan Enzim dan Kontrol Positif

A. Perhitungan Larutan Enzim Tirosinase 250 unit/mL

Larutan Enzim Tirosinase 250 unit/ml	$\frac{25.000\ unit}{100\ ml} = 250\ unit/ml$

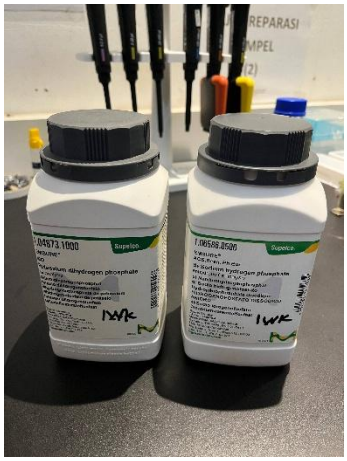
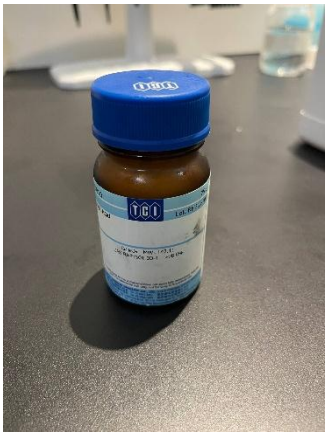
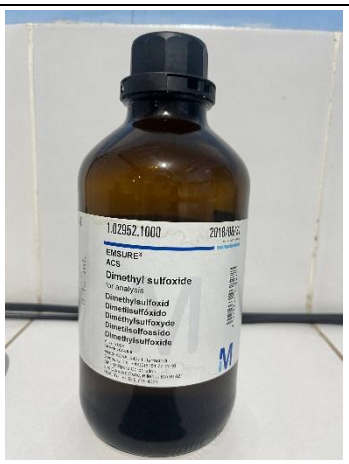
B. Perhitungan Larutan Kontrol Positif Asam Kojat

Larutan Induk Asam kojat 1000 ppm	$\frac{10\ mg}{0{,}01\ L} = 1000\ ppm$
Larutan Seri 500 ppm	$V_1C_1 = V_2C_2$ V_1 x 1000 ppm = 1 ml x 500 ppm $V_1 = \frac{1\ ml\ x\ 500\ ppm}{1000\ ppm}$ V_1 = 0,5 mL = 500 µL

Lampiran 13. Perhitungan Larutan Uji Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam

Larutan Induk 1000 ppm	$\frac{10\ mg}{0{,}01\ L} = 1000\ ppm$
Larutan Seri 500 ppm	$V_1C_1 = V_2C_2$ V_1 x 1000 ppm = 1 mL x 500 ppm $V_1 = \frac{1\ ml\ x\ 500\ ppm}{1000\ ppm}$ V_1 = 0,5 ml = 500 µL

Lampiran 14. Uji Aktivitas Anti tirosinase Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam

	
Larutan dapar fospat pH 6,8	Potassium dihydrogen phosphate dan di-Sodium hydrogen phosphate
	
Enzim tyrosine 25.000 unit	Asam kojat
	
Larutan L-DOPA 2,5 mM	DMSO



Pengujian antitirosine ekstrak etanol 70% dan 95% kunyit hitam

Lampiran 15. Perhitungan Persen Inhibisi Asam Kojat

Asam Kojat Konsentrasi 500 ppm

Asam Kojat				
No.	**Konsentrasi 500 ppm**	**Absorbansi**		**Persen Ihibisi (%)**
		Blanko	**Sampel**	
1	Replikasi 1	0,5117	0,1549	69,72835646
2	Replikasi 2		0,1531	70,08012507
3	Replikasi 3		0,153	70,09966777

Perhitungan Persen Inhibisi Asam Kojat 500 ppm

1. Replikasi 1 $= \frac{0,5117-0,1549}{0,5117}\ x\ 100\% = 69,7283\%$
2. Replikasi 2 $= \frac{0,5117-0,1531}{0,5117}\ x\ 100\% = 70,0801\%$
3. Replikasi 3 $= \frac{0,5117-0,1531}{0,5117}\ x\ 100\% = 70,0996\%$

Rata-rata $= \frac{69,7283+70,0801+70,0996}{3} = 69,9693\%$

Standar Deviasi

No	x	$(x-\bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$
1	69,72835646	-0,24102664	0,058094
2	70,08012507	0,11074197	0,012264
3	70,09966777	0,13028467	0,016974
X rata-rata	69,9693831	-1,42109E-14	0,087332

SD = 0,208963777

Kadar Persen Ihibisi = 69,97 ± 0,21

Asam Kojat Konsentrasi 1000 ppm

Asam Kojat				
No.	**Konsentrasi 1000 ppm**	**Absorbansi**		**Persen Ihibisi (%)**
		Blanko	**Sampel**	
1	Replikasi 1	0,5117	0,1222	76,11881962
2	Replikasi 2		0,1245	75,6693375
3	Replikasi 3		0,1235	75,86476451

Perhitungan Persen Inhibisi

1. Replikasi 1 $= \frac{0,5117-0,1222}{0,5117}\ x\ 100\% = 76,1188\%$
2. Replikasi 2 $= \frac{0,5117-0,1245}{0,5117}\ x\ 100\% = 75,6693\%$
3. Replikasi 3 $= \frac{0,5117-0,1235}{0,5117}\ x\ 100\% = 75,8647\%$

Rata-rata $= \frac{76,1188+75,66931+75,8647}{3} = 75,8843\%$

Standar Deviasi

No	x	(x-x̄)	(x - x̄)^2
1	76,1188196	0,23451241	0,054996
2	75,6693375	-0,21496971	0,046212
3	75,8647645	-0,0195427	0,000382
X rata-rata	75,88430721	2,84217E-14	0,10159

SD =0,225377

Kadar Persen Ihibisi = 75,88 ± 0,23

Lampiran 16. Perhitungan Persen Inhibisi Ekstrak Etanol Kunyit Hitam

Perhitungan Persen Inhibisi Ekstrak Etanol 70% konsentrasi 500 ppm

Esktrak Etanol 70% Kunyit Hitam				
No.	**Konsentrasi 500 ppm**	**Absorbansi**		**Persen Ihibisi (%)**
		Blanko	**Sampel**	
1	Replikasi 1	0,5117	0,4747	7,230799296
2	Replikasi 2		0,4758	7,015829588
3	Replikasi 3		0,4764	6,898573383

Perhitungan Persen Inhibisi

1. Replikasi 1 $= \frac{0,5117-0,4774}{0,5117}\ x\ 100\% = 7,2307\%$
2. Replikasi 2 $= \frac{0,5117-0,4758}{0,5117}\ x\ 100\% = 7,0158\%$
3. Replikasi 3 $= \frac{0,5117-0,4764}{0,5117}\ x\ 100\% = 6,8985\%$

Rata-rata $= \frac{7,2307+7,0158+6,8985}{3} = 7,0484\%$

Standar Deviasi

No	x	$(x-\bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$
1	7,2308	0,182398	0,033269
2	7,01583	-0,03257	0,001061
3	6,89857	-0,14983	0,022448
X rata-rata	7,048401	0	0,056778

SD = 0,17

Kadar Persen Ihibisi = 7,04 ± 0,17

Perhitungan persen inhibisi Ekstrak Etanol 70% konsentrasi 1000 ppm

Esktrak Etanol 70% Kunyit Hitam				
No.	**Konsentrasi 1000 ppm**	**Absorbansi**		**Persen Ihibisi (%)**
		Blanko	**Sampel**	
1	Replikasi 1	0,5117	0,4412	13,77760406
2	Replikasi 2		0,4421	13,60171976
3	Replikasi 3		0,4414	13,73851866

Perhitungan Persen Inhibisi

1. Replikasi 1 $= \frac{0,5117-0,4412}{0,5117}\ x\ 100\% = 13,7776\%$
2. Replikasi 2 $= \frac{0,5117-0,4421}{0,5117}\ x\ 100\% = 13,6017\%$
3. Replikasi 3 $= \frac{0,5117-0,4414}{0,5117}\ x\ 100\% = 13,7385\%$

Rata-rata $= \frac{13,7776+13,6017+13,7385}{3} = 13,7059\ \%$

Standar Deviasi

No	x	$(x-\bar{x})$	$(x-\bar{x})^2$
1	13,7776	0,071653	0,005134
2	13,6017	-0,10423	0,010863
3	13,7385	0,032573	0,001061
X rata-rata	13,70595	-3,6E-15	0,017058

SD = 0,09

Kadar Persen Ihibisi = 13,70 ± 0,09

Persen Inhibisi Ekstrak Etanol 95% konsentrasi 500 ppm

Esktrak Etanol 95% Kunyit Hitam				
No.	**Konsentrasi 500 ppm**	**Absorbansi**		**Persen Ihibisi (%)**
		Blanko	**Sampel**	
1	Replikasi 1	0,5117	0,4591	10,27946062
2	Replikasi 2		0,458	10,49443033
3	Replikasi 3		0,4601	10,08403361

Perhitungan Persen Inhibisi

1. Replikasi 1 $= \frac{0,5117-0,4591}{0,5117}\ x\ 100\% = 10,2794\%$
2. Replikasi 2 $= \frac{0,5117-0,458}{0,5117}\ x\ 100\% = 10,4944\%$
3. Replikasi 3 $= \frac{0,5117-0,4601}{0,5117}\ x\ 100\% = 10,0840\%$

Rata-rata $= \frac{10,2794+10,4944+10,0840}{3} = 10,28597\%$

Standar Deviasi

No	x	$(x-\bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$
1	10,2795	-0,00651	4,24E-05
2	10,4944	0,208457	0,043454
3	10,084	-0,20194	0,040781
X rata-rata	10,28597	1,78E-15	0,084278

SD = 0,21

Kadar Persen Ihibisi = 10,2859 ± 0,21

Perhitungan Persen Inhibis Ekstrak Etanol 95% konsentrasi 1000 ppm

Esktrak Etanol 95% Kunyit Hitam				
No.	**Konsentrasi 1000 ppm**	**Absorbansi**		**Persen Ihibisi (%)**
		Blanko	**Sampel**	
1	Replikasi 1	0,5117	0,4357	14,85245261
2	Replikasi 2		0,4359	14,81336721
3	Replikasi 3		0,4323	15,51690444

Perhitungan Persen Inhibisi

1. Replikasi 1 $= \frac{0,5117-0,4357}{0,5117}\ x\ 100\% = 14,8524\%$
2. Replikasi 2 $= \frac{0,5117-0,4359}{0,5117}\ x\ 100\% = 14,8133$
3. Replikasi 3 $= \frac{0,5117-0,4323}{0,5117}\ x\ 100\% = 15,5169\%$

Rata-rata $= \frac{14,8524+14,8133+15,5169}{3} = 15,0609\%$

Standar Deviasi

No	x	(x-x̄)	(x - x̄)^2
1	14,8525	-0,20846	0,043454
2	14,8134	-0,24754	0,061274
3	15,5169	0,455993	0,20793
X rata-rata	15,06091	-3,6E-15	0,312659

SD = 0,40

Kadar Persen Ihibisi = 15,06 ± 0,40

Lampiran 17. Hasil Uji Statistika % Inhibisi Tirosinase

A. Data % Inhibisi

No	Sampel	Konsentrasi (ppm)	Replikasi 1 (%)	Replikasi 2 (%)	Replikasi 3 (%)	Rata-rata(%)
1	Ekstrak etanol 70% kunyit hitam	500	7,230	7,015	6,898	7,048
2	Ekstrak etanol 70% kunyit hitam	1000	13,777	13,601	13,738	13,705
3	Ekstrak etanol 95% kunyit hitam	500	10,279	10,494	10,084	10,286
4	Ekstrak etanol 95% kunyit hitam	1000	14,852	14,813	15,516	15,060
5	Asam kojat	500	69,728	70,080	70,099	69,969
6	Asam kojat	1000	76,118	75,669	75,864	75,884

B. Uji Normalitas

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
VAR00003	Etanol 70% 500 ppm	,243	3	.	,972	3	,679
	Etanol 70 % 1000 ppm	,304	3	.	,907	3	,407
	Etanol 95% 500 ppm	,179	3	.	,999	3	,948
	Etanol 95% 1000 ppm	,368	3	.	,792	3	,094
	Asam kojat 500 ppm	,369	3	.	,789	3	,089
	Asam kojat 1000 ppm	,201	3	.	,994	3	,856

a. Lilliefors Significance Correction

Data dinyatakan berdistribusi normal berdasarkan uji normalitas Shapiro-Wilk (sig. > 0,05)

C. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances[a,b]

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
VAR00003	Based on Mean	1,933	5	12	,162
	Based on Median	,265	5	12	,924
	Based on Median and with adjusted df	,265	5	4,766	,914
	Based on trimmed mean	1,714	5	12	,206

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Dependent variable: VAR00003

b. Design: Intercept + VAR00001 + VAR00002 + VAR00001 * VAR00002

Uji homogenitas Levene's Test menunjukkan nilai F = 1,933 dengan signifikansi 0,162 > 0,05, sehingga varian antar kelompok dinyatakan homogen dan analisis dilanjutkan menggunakan uji Two-Way ANOVA

D. Uji Two-Way ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: VAR00003

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15249,578[a]	5	3049,916	55478,375	,000
Intercept	18423,346	1	18423,346	335123,153	,000
VAR00001	15096,414	2	7548,207	137302,903	,000
VAR00002	150,466	1	150,466	2737,001	,000
VAR00001 * VAR00002	2,698	2	1,349	24,535	,000
Error	,660	12	,055		
Total	33673,583	18			
Corrected Total	15250,237	17			

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = 1,000)

Hasil uji Two-Way ANOVA menunjukkan bahwa jenis sampel, konsentrasi, dan interaksi keduanya berpengaruh signifikan terhadap % inhibisi tirosinase (p = 0,000 < 0,05).

E. Uji Post Hoc Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00003

Tukey HSD

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Etanol 70%	Etanol 95%	-2,30*	,135	,000	-2,66	-1,94
	Asam kojat	-62,55*	,135	,000	-62,91	-62,19
Etanol 95%	Etanol 70%	2,30*	,135	,000	1,94	2,66
	Asam kojat	-60,25*	,135	,000	-60,61	-59,89
Asam kojat	Etanol 70%	62,55*	,135	,000	62,19	62,91
	Etanol 95%	60,25*	,135	,000	59,89	60,61

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = ,055.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

VAR00003

Tukey HSD[a,b]

VAR00001	N	Subset 1	2	3
Etanol 70%	6	10,38		
Etanol 95%	6		12,67	
Asam kojat	6			72,93
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = ,055.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

b. Alpha = ,05.

Uji Post Hoc Tukey HSD menunjukkan ketiga kelompok berbeda signifikan ($p = 0,000 < 0,05$), dengan rata-rata % inhibisi tertinggi pada Asam Kojat (72,93%), diikuti Etanol 95% (12,67%) dan Etanol 70% (10,38%).