

## Uji Aktivitas Inhibisi Terhadap Enzim Tirosinase dari Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum americanum* L.) Secara In Vitro

Zuraida Sagala<sup>1\*</sup>, Tri Mulyaningsih<sup>2</sup>, Yunita<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup>Fakultas Farmasi Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta

\*Email : [zoerasagala@gmail.com](mailto:zoerasagala@gmail.com)

### ABSTRAK

Kulit merupakan bagian tubuh terluar dari manusia yang memiliki berbagai macam fungsi, salah satunya adalah melindungi tubuh dari paparan sinar ultra violet. Kulit yang terkena paparan sinar matahari dalam jangka waktu yang lama dapat menimbulkan pengaruh buruk terhadap kulit tubuh terutama pada kulit wajah. Sinar ultra violet (UV) ini akan merangsang enzim untuk bekerja sehingga melanosit meningkatkan jumlah melanin yang dapat menyebabkan terjadinya hiperpigmentasi. Proses pembentukan melanin terjadi dengan bantuan biokatalis yang berperan dalam reaksi pencokelatan adalah tirosinase. Inhibitor tirosinase digunakan dalam kosmetik sebagai pencegah hiperpigmentasi. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas inhibitor tirosinase ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) secara *in vitro*. Ekstrak etanol daun kemangi diperkirakan memiliki aktivitas inhibitor tirosinase karena mengandung senyawa flavonoid. daun kemangi diekstraksi secara maserasi dengan etanol 70%, hingga diperoleh ekstrak kental. Pengujian dilakukan dengan L-DOPA sebagai substrat, ekstrak etanol daun kemangi konsentrasi 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625 dan 312,5 µg/ml serta kontrol positif asam kojat lalu diukur serapannya dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 490 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kemangi mengandung flavonoid sebesar 18,44 mg QE/gram ekstrak. Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) memiliki aktivitas inhibitor tirosinase dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 2330,44 µg/ml dan potensi relatif 35,9 x 10<sup>-3</sup> kali asam kojat.

**Kata Kunci:** inhibitor tirosinase, daun kemangi, flavonoid, ekstrak, melanin

---

### ABSTRACT

The skin is the outer part of the human body which has a variety of functions, one of which is to protect the body from exposure ultra violet. The skin is exposed to sunlight exposure in the long term can cause a bad influence on the skin of the body, especially the skin face. Ultraviolet light (UV) will stimulate the enzymes to work so that the melanocytes increases the amount of melanin that can cause hyperpigmentation. The process of melanin formation occurs with the help of the biocatalyst that play a role in the

browning reaction is tyrosinase. Tyrosinase inhibitors used in cosmetics as a deterrent hyperpigmentation. This study aimed to test the activity of tyrosinase inhibitors ethanol extract of basil (*Ocimum americanum* L.) in vitro. The ethanol extract of basil leaves is estimated to have activity of tyrosinase inhibitor compounds that contain flavonoids. basil leaves extracted by maceration in 70% ethanol, to obtain a thick extract. Testing is done with L-DOPA as a substrate, the concentration of ethanol extract of basil leaves 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625 and 312.5 µg/ml and a positive control kojic acid and absorbance was measured using a microplate reader at a wavelength of 490 nm. The results showed that ethanol extracts of basil leaves contain flavonoids of 18.44 mg QE / g extract. The ethanol extract of leaves of basil (*Ocimum americanum* L.) have activity of tyrosinase inhibitor with IC<sub>50</sub> value of 2330.44 µg/ml and the relative potency of 35.9 x 10<sup>-3</sup> times kojic acid.

Keywords: tyrosinase inhibitors, basil leaves, flavonoids, extracts, melanin

## PENDAHULUAN

Hiperpigmentasi merupakan gangguan pada pigmen kulit yang disebabkan oleh peningkatan melanogenesis, sehingga menyebabkan penggelapan warna kulit (Cayce *et al.* 2004).

Pada kulit terdapat enzim yang berperan dalam pembentukan melanin, yaitu tirosinase. Enzim ini mengkatalisis dua reaksi utama dalam biosintesis melanin, yaitu hidroksilasi L-tirosin menjadi L-dopa dan oksidasi L-dopa menjadi dopakuinon. Senyawa dopakuinon mempunyai kereaktifan yang sangat tinggi sehingga dapat mengalami polimerisasi secara spontan membentuk dopakrom yang kemudian menjadi melanin. Salah satu cara menghambat pembentukan melanin adalah dengan menghambat aktivitas tirosinase (Chang, 2012).

Penggunaan bahan-bahan yang bersifat sintetis pada produk kosmetika dinilai kurang aman karena dapat menimbulkan efek samping pada penggunaan jangka panjang. Agen depigmentasi seperti hidrokuinon dan kortikosteroid walaupun sampai saat ini efektivitasnya masih tinggi namun dalam pemakaian jangka panjang menimbulkan beberapa efek samping seperti okronosis, atrofi, karsinogenesis dan efek samping sistemik lainnya (Parvez S *et al.*,2006)

Menurut Djajadisastra (2003), saat ini telah dikembangkan senyawa aktif dalam tanaman yang dapat menghambat aktivitas tirosinase yang digunakan dalam sediaan *skin whitening*, seperti ekstrak licorice, mulberi, teh hijau, dan lain-lain. Ada lima kelas utama untuk senyawa fitokimia yang berkhasiat sebagai inhibitor tirosinase, diantaranya polifenol, derivat benzaldehid dan benzoat, steroid dan lipid. Flavonoid, kuersetin, dan *p-Coumaric acid* juga merupakan senyawa fitokimia yang berperan sebagai inhibitor tirosinase (Chang 2012). Inhibitor tirosinase yang banyak ditemukan dalam bahan

kosmetik sebagai pencegah hiperpigmentasi, diantaranya adalah asam askorbat, arbutin, *cojic acid*, merkuri dan hidrokinon (Supriyanti, 2009)

Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai antioksidan adalah *Ocimum americanum* L. yang memiliki kandungan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, triterpenoid, asam ursolat, vitamin C dan polisakarida. Senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan adalah flavonoid (Dhale, Birari, & Dhulgande, 2010). Senyawa bioaktif yang didapat dari ekstrak daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) berupa senyawa flavonoid yang berperan sebagai agen depigmentasi (Chang, 2009).

## **METODE PENELITIAN**

### **Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Adam), alat refluks (Electrothermal), *vacuum rotary evaporator* (Eyela), *pen type* pH meter, pipet volume, mikropipet 100-1000 µl, mikropipet 10-100 µl, *microplate reader* (Bio-Rad), 96 *well microplate*, *ultrasonic*, spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu), *waterbath*, desikator, oven (Memmert) dan alat gelas lainnya. Daun Kemangi, Asam Kojat, enzim *Mushroom tyrosinase* (Sigma), L-DOPA (Sigma), Aquades, Aquades bebas CO<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), NaOH (Merck), Etanol 96% (Brataco), DMSO, HCl P, Kuersetin (Sigma), AlCl<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COONa, Pereaksi Mayer, Pereaksi Dragendorff, Pereaksi Bouchardat, HCl 2 N, serbuk Mg dan pereaksi FeCl<sub>3</sub>.

### **Cara Kerja**

Daun kemangi dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka. Setelah kering diserbukan dengan cara di blender sampai halus dan disaring sehingga diperoleh serbuk yang homogen. Serbuk daun kemangi diekstrak dengan etanol 70%. Filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator*, kemudian diidentifikasi komponen fitokimianya.

### **Analisis Skrining Fitokimia**

**Identifikasi Alkaloid.** Identifikasi Alkaloid dilakukan dengan metode Mayer, Bouchardat, dan Dragendorff. Sejumlah ekstrak etanol daun kemangi dilarutkan dalam 1 ml HCl 2 N dan 9 ml akuades, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian, masing-masing ditambah dengan pereaksi Mayer, Bouchardat, dan Dragendorff.

**Identifikasi flavonoid.** Sejumlah ekstrak etanol daun kemangi dilarutkan dalam 1 ml etanol (96%), tambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 10 ml HCl P jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid. Jika terjadi warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron.

**Identifikasi saponin.** Sejumlah ekstrak etanol daun kemangi dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang mantap setinggi 1 sampai 10 cm, tidak kurang dari 10 menit, dan tidak hilang dengan penambahan 1 ml HCl 2 N menunjukkan adanya saponin.

**Identifikasi tanin.** Sejumlah ekstrak dilarutkan dengan akuades secukupnya, kemudian pada larutan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Jika terjadi warna biru atau hijau kehitaman, menunjukkan adanya tanin.

## **Hasil dan Pembahasan**

### **Persiapan dan Ekstraksi Daun Kemangi**

Sebanyak 1 kg simplisia daun Kemangi (*Ocimum americanum* L.) dihasilkan dari proses pemisahan 10 kg daun kemangi segar. Proses pengeringan daun kemangi dilakukan dengan cara di angin-anginkan karena cocok digunakan untuk bagian tanaman yang mengandung flavonoid. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik, sehingga simplisia tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Penyerbukan simplisia daun kemangi dilakukan untuk memudahkan proses ekstraksi. Pengayakan dengan pengayak mesh 40 bertujuan untuk menyeragamkan ukuran serbuk simplisia.

Daun Kemangi (*Ocimum americanum* L.) diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Metode maserasi dipilih karena daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) memiliki kandungan flavonoid yang tidak tahan pemanasan. Sistem pelarut dalam ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Gamse, 2002). Larutan penyari yang baik harus memenuhi kriteria : murah, mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki dan tidak mempengaruhi zat aktif (Lucas *et al*, 1949). Pelarut etanol dipilih karena pelarut organik selain etanol memiliki potensi toksisitas yang lebih tinggi (Saifudin *et.al.*, 2011). Selain itu, etanol digunakan sebagai penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 70%, tidak beracun, netral, absorpsinya baik dan mudah bercampur dengan air (Eka dan Aprival, 2010). Etanol 70% memiliki kemampuan menyari dengan polaritas yang lebar sehingga sangat sesuai untuk menyari senyawa flavonoid (polar dan non polar) yang diduga berpotensi sebagai inhibitor tirosinase. Senyawa fenol terbanyak yang ditemukan di alam adalah flavonoid (Harborne 1987).

Dari proses maserasi dihasilkan ekstrak etanol 70% daun kemangi yang berwarna kecoklatan, berbau khas, rasa agak pahit sebanyak 103,7 g dengan rendemen ekstrak yaitu 10,37%. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia

awal (Dirjen POM 2000). Hasil rendemen yang cukup tinggi menandakan bahwa etanol 70% cukup baik menyari senyawa aktif dalam simplisia daun kemangi. Berat total ekstrak yang didapat dari proses ekstraksi maserasi 1000 g serbuk simplisia daun Kemangi adalah 103,7 g.

### Analisis Skrining Fitokimia

Uji fitokimia merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui kandungan senyawa spesifik seperti alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin. Hasil identifikasi fitokimia ekstrak tertera pada Tabel 1.

**Tabel 1. Hasil Identifikasi Fitokimia pada Ekstrak Etanol 70% Daun Kemangi**

Senyawa kimia	Pereaksi	Hasil Pengamatan	Hasil Identifikasi
Alkaloid	Mayer	Endapan Putih	+
	Bouchardad	Endapan Coklat	+
	Dragendorff	Endapan Merah Bata	+
Flavonoid	Logam Mg, HCl	Larutan merah jingga	+
Tanin	Akuades, FeCl <sub>3</sub>	Larutan Hijau Kehitaman	+
Saponin	Air Panas, HCl 2N	Buih setinggi ± 2 cm	+

Ket: (+)=Positif mengandung senyawa, (-)=Negatif mengandung senyawa

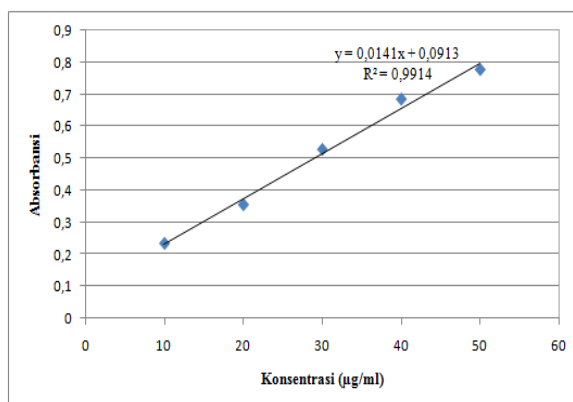
Identifikasi alkaloid menggunakan 3 pereaksi yakni Mayer, Bouchardad, dan Dragendorff menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya endapan putih, endapan coklat, dan endapan merah bata. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K<sup>+</sup> dari kalium tetraiodomercurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marliana *et al.*, 2005). Uji alkaloid dengan pereaksi Bouchardad, iodine bereaksi dengan ion I<sup>-</sup> dari kalium iodida menghasilkan ion I<sup>3-</sup> yang berwarna coklat. Dan uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K<sup>+</sup> yang merupakan ion logam membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Sehingga terbentuk endapan merah/jingga.

Identifikasi flavonoid dengan logam Mg dan HCl pekat menunjukkan hasil positif yaitu terbentuknya warna merah jingga. Logam Mg dan HCl pekat pada uji ini berfungsi untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terbentuk perubahan warna menjadi merah atau jingga. (Phrashant, *et al.*, 2011). Jika dalam suatu ekstrak tumbuhan terdapat senyawa flavonoid akan terbentuk garam flavilium saat penambahan Mg dan HCl yang berwarna merah atau jingga.

Identifikasi tanin menunjukkan hasil positif yaitu terbentuknya warna hijau kehitaman sesuai dengan literatur yang menyatakan larutan berwarna biru atau hijau kehitaman jika menunjukkan adanya tanin. Terbentuknya warna hijau kehitaman pada ekstrak setelah ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1% karena tanin akan bereaksi dengan ion  $\text{Fe}^{3+}$  membentuk senyawa kompleks (Harborne, J.B, 1987) .

Identifikasi saponin menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya buih yang tidak hilang dengan penambahan HCl 2 N. Timbulnya busa pada uji ini menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Marliana *et al.*, 2005).

### Analisis Kandungan Total Flavonoid



**Gambar 1. Kurva Kalibrasi Kuersetin**

**Tabel 2. Hasil Analisa Kandungan Total Flavonoid Ekstrak Etanol 70% Daun Kemangi**

Berat Ekstrak (g)	Absorbansi	Kandungan Kuersetin (mg)	Rata-rata Kandungan Kuersetin (mg)
1,00	0,741	18,43	
1,00	0,742	18,46	18,44
1,00	0,741	18,43	

Kandungan total flavonoid dalam ekstrak dinyatakan sebagai *Quercetin Equivalent* yaitu mg ekuivalen kuersetin tiap gram ekstrak yang didapat dari persamaan kurva baku kuersetin.

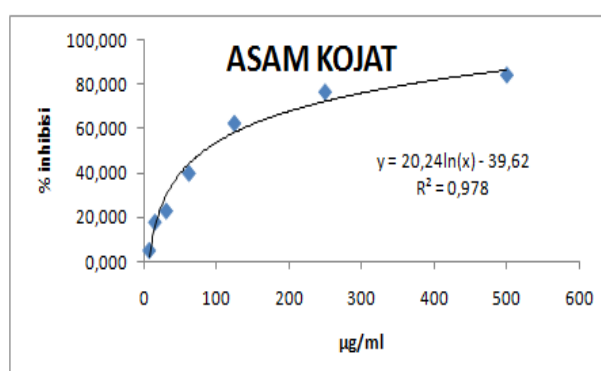
Persamaan kurva baku diperoleh dari regresi linier antara kadar kuersetin (x) dengan absorbansi (y). Nilai  $R^2$  yang didapat sebesar 0,9914 menandakan bahwa seri

konsentrasi cukup linier (Gambar 1). Perlakuan sampel dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*) dengan hasil absorbansi 0,741; 0,742; dan 0,741. Setelah dilakukan perhitungan dengan mengalikan faktor pengeceran, didapat kandungan total flavonoid ekstrak etanol 70% daun kemangi sebesar 18,44 mg QE dalam 1 gram ekstrak (Tabel 2).

### Uji Penghambatan Aktivitas Tirosinase

**Tabel 3. Persentase Penghambatan Aktivitas Tirosinase oleh Asam Kojat**

Konsentrasi sampel ( $\mu\text{g/ml}$ )	Persen Inhibisi (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
500	84,074	
250	76,420	
125	62,346	
62,5	39,877	83,75
31,25	22,963	
15,63	17,901	
7,8	5,185	



**Gambar 2. Kurva Penghambatan Aktivitas Tirosinase oleh Asam Kojat**

Uji penghambatan aktivitas tirosinase dengan asam kojat sebagai kontrol positif dilakukan untuk memastikan bahwa metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar serta dapat diterapkan. Pada uji aktivitas dibuat 4 jenis larutan yaitu larutan asam kojat/ekstrak, larutan kontrol asam kojat/ekstrak, larutan blangko, dan larutan kontrol blangko. Larutan blangko merupakan larutan tanpa adanya penghambatan baik dari asam kojat maupun ekstrak. Larutan kontrol dibuat sebagai faktor koreksi yaitu tanpa adanya penambahan enzim dan substrat. Metode uji penghambatan tirosinase mengacu pada penelitian Batubara dkk. (2010).

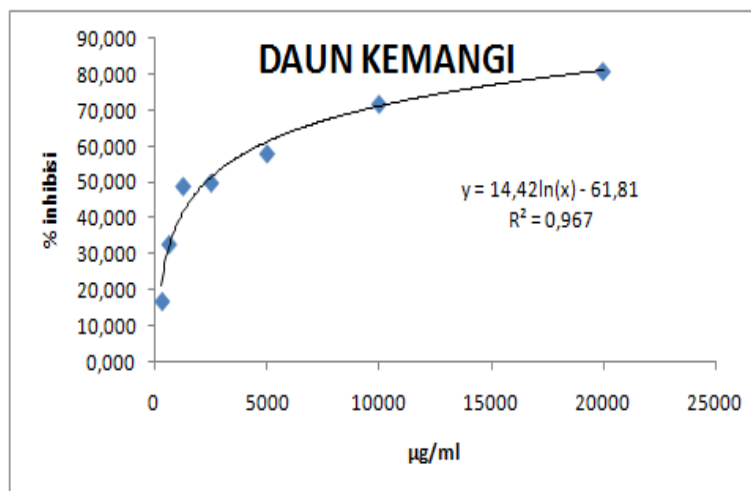
Prinsip pengujian aktivitas inhibitor tirosinase adalah terhambatnya pembentukan produk dopakrom hasil reaksi substrat L-DOPA dan enzim tirosinase. Hambatan pembentukan dopakrom ditandai dengan menurunnya intensitas warna yang diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang maksimum, yaitu 490 nm. *Microplate reader* merupakan teknik pengukuran spektrofotometer yang melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu melalui sumuran berisi sampel lalu diukur intensitas cahaya yang ditransmisikan, sehingga diperoleh absorbansi. Absorbansi tersebut digunakan untuk menghitung besarnya penghambatan reaksi L-DOPA dan tirosinase.

Dalam beberapa penelitian yang dilakukan untuk menemukan senyawa baru inhibitor tirosinase, asam kojat sering digunakan sebagai kontrol positif pada waktu yang sama untuk dibandingkan kekuatan inhibisinya (Chang 2012). Berdasarkan hasil pengujian didapat  $IC_{50}$  asam kojat sebesar 83,75  $\mu\text{g/ml}$  (Tabel 6 dan Gambar 6). Asam kojat menunjukkan penghambatan secara kompetitif dengan kemampuannya membentuk kelat logam tembaga pada situs aktif enzim tirosinase (Chang 2009). Semakin tinggi konsentrasi asam kojat yang digunakan, maka semakin tinggi kemampuan inhibisinya. Kemampuan inhibisi yang tinggi ditandai dengan penurunan pembentukan dopakrom dan penurunan intensitas warna yang terbentuk.

**Tabel 4. Persentase Penghambatan Aktivitas Tirosinase Ekstrak Etanol 70% Daun Kemangi**

Konsentrasi sampel ( $\mu\text{g/ml}$ )	Persen Inhibisi (%)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
20.000	80,741	
10.000	71,605	
5.000	57,778	
2.500	49,630	
1.250	48,642	2330,44
625	32,469	
312,5	16,543	





**Gambar 3. Kurva Penghambatan Aktivitas Tirosinase Ekstrak Etanol 70% Daun Kemangi**

Daun Kemangi dapat berperan sebagai inhibitor tirosinase karena adanya kandungan senyawa flavonoid. Mekanisme penghambatan yang terjadi adalah penghambatan kompetitif untuk oksidasi L-DOPA oleh enzim tirosinase dan bagian 3-hidroksi-4-keto dari struktur flavonoid yang berperan sebagai pengelat logam tembaga (Cu) dari struktur enzim tirosinase. Pada umumnya satu molekul enzim tirosinase mengandung dua atom Cu yaitu CuA dan CuB yang terikat dengan tiga asam amino histidin (Chang 2009). Logam Cu berperan sebagai kofaktor pada aktivitas enzim tirosinase. Kemampuan katalitik enzim tirosinase menjadi berkurang dengan hilangnya Cu dari situs aktif enzim, sehingga dopakrom tidak terbentuk.

Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol 70% daun kemangi sebesar 2330,44  $\mu\text{g/ml}$  menandakan bahwa ekstrak daun kemangi berpotensi lemah sebagai inhibitor tirosinase dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  asam kojat dengan potensi relatif sebesar  $35,9 \times 10^{-3}$  kali. Hal ini sebanding dengan hasil pengujian kandungan total flavonoid ekstrak etanol 70% daun kemangi yaitu hanya 18,44 mg QE dalam 1 g ekstrak. Keamanan adalah pertimbangan utama dalam pemilihan senyawa sebagai inhibitor tirosinase. Penggunaan asam kojat mulai dibatasi karena menyebabkan iritasi kulit dan kemampuannya masuk ke aliran darah sistemik, sehingga dapat menimbulkan gangguan pada kelenjar tiroid. Oleh karena itu, daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) dengan kandungan senyawa alami yaitu flavonoid masih memiliki peluang untuk dikembangkan sebagai inhibitor tirosinase.

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) mempunyai aktivitas inhibitor tirosinase dengan nilai potensi relatif  $35,9 \times 10^{-3}$  kali asam kojat.
2. Nilai IC<sub>50</sub> daun kemangi sebesar 2.330,44 µg/ml

Berdasarkan data tersebut, daun kemangi (*Ocimum americanum* L.) berpotensi lemah sebagai inhibitor tirosinase.

## DAFTAR PUSTAKA

- Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T, Rahminiwati M, Djauhari E. 2010. Potency of Indonesian Medicinal Plants as Tyrosinase Inhibitor and Antioxidant Agent. *Journal of Biological Sciences*. 10(2): 138-144.
- Batubara I, Zamani NP, Gazali M. 2014. *Potensi Limbah Kulit Buah Nyirih Xylocarpus Granatum sebagai Inhibitor Tirosinase*. Depik, 3(3): 187-194
- Cayce KA, McMichael AJ, Feldman SR. 2004. *Hyperpigmentation: an overview of the common afflictions*. Dermatology Nursing/Dermatology Nurse's Association. New Jersey. Hlm. 401-416.
- Chang TM. 2012. Tyrosinase and Tyrosinase Inhibitors. *Journal Biocatalysis and Biotransformation* 1(2): 1-2.
- Chang TS. 2012. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. *Materials* 5(9): 1661-1685.
- Dhale, D.A., Birari, A. R., & Dhulgande, G. S. (2010). Preliminary screening of antibacterial and phytochemical studies of *Ocimum americanum* Linn. *Journal of Ecobiotechnology*. ISSN :2077-0464. 2(8): 11-13. (Online). (2 April 2017, 20.30)
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. Hlm. 11.
- Djajadisastra, J. 2003. *Pemutih yang Tepat dan Aman bagi Wanita Indonesia*. Disampaikan pada Pharmacy Beauty & Health. 12 September 2003.

- Eka A dan Aprival H. 2010. Pengaruh konsentrasi etanol, suhu dan jumlah stage pada ekstraksi oleoresin jahe (*Zingiber officinale Rosc.*) secara batch. Dalam skripsi untuk memperoleh gelar sarjana teknik. Fakultas Teknik Kimia Universitas Diponegoro.
- Gamse, T. 2002. *Liquid-Liquid Extraction and Solid-Liquid Extraction*. Graz University of Technology.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (Terjemahan: Padmawinata K, Soediro I.). Penerbit ITB. Bandung. Hlm. 47-238.
- Lucas, Howard J., David Pressman. 1949. *Principles and Practice In Organic Chemistry*. New York : John Wiley and Sons, Inc.
- Marliana et.al. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium Edule Jacq. Swartz.*) dalam Ekstrak Ethanol. *Biofarmasi* 3(1): 26-31
- Parvez, et.al. 2006. Survey and Mechanism of Skin Depigmenting and Lightening Agent. *Phytother. Res*, 20 : 921 – 934
- Phrasant, et.al. 2011. Phytochemical Screening and Extraction. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1(1) : 1-9
- Saifudin A, Rahayu V, Teruna HY. 2011. *Standardisasi Bahan Obat Alam Edisi Pertama*. Penerbit Graha Ilmu. Yogyakarta. Hlm. 1-75.
- Supriyanti, FMT. 2009. Pemanfaatan Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Kulit Batang *Artocarpus* sp sebagai Inhibitor Tirosinase pada Pigmentasi Kulit. *Jurnal Pengajaran MIPA*. 13(1):105-115