

Dua Belas Spesies Asteraceae sebagai Inhibitor Tirosinase: Seleksi dan Dugaan Senyawa Aktifnya

Twelve Asteraceae Species as Tyrosinase Inhibitors: Selection and Assumption of Active Compounds

Penulis Veby Tri Yani¹, Irma Herawati Suparto^{1,2}, Irmanida Batubara^{1,2*}

Afiliasi ¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University, kampus IPB Darmaga, Bogor.
²Pusat Studi Biofarmaka Tropika LPPM, IPB University, Kampus IPB Taman Kencana Bogor

Kata Kunci

- Asteraceae
- *Tithonia diversifolia*
- trigonellin
- tirosinase

Keywords

- Asteraceae
- *Tithonia diversifolia*,
- trigonelline
- tyrosinase

Diterima 9 Desember 2021

Disetujui 4 Januari 2022

*Penulis Koresponding

Irmanida Batubara

email: ime@apps.ipb.ac.id

ABSTRAK

Beberapa tanaman Asteraceae mengandung senyawa fitokimia yang biasa dimanfaatkan untuk mengatasi kesehatan. Namun, penelitian tentang penggunaan tanaman Asteraceae sebagai agen penghambat tirosinase masih jarang dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi ekstrak dan/atau fraksi teraktif dari spesies Asteraceae sebagai inhibitor tirosinase dan menduga senyawa aktif yang berperan di dalamnya. Sebanyak 12 spesies Asteraceae diekstraksi menggunakan pelarut air. Filtrat yang dihasilkan difraksinasi sebagian menggunakan kloroform untuk mendapatkan ekstrak air, fraksi air, dan fraksi kloroform. Setiap ekstrak dan fraksi masing-masing tanaman ditentukan aktivitas inhibitor tirosinase menggunakan microplate reader (ELISA) dengan substrat L-DOPA. Fraksi air tanaman *Tithonia diversifolia* memberikan aktivitas terbaik dari semua sampel yang diuji dengan IC_{50} terkecil. Senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman dengan aktivitas inhibitor tirosinase terbaik dianalisis menggunakan LC-MS/MS. Senyawa yang berperan sebagai inhibitor tirosinase adalah senyawa golongan alkaloid yang mendominasi tanaman yaitu trigonelin.

ABSTRACT

*Some Asteraceae plants have phytochemicals that are commonly used to treat some illness. However, research on the use of Asteraceae plants as tyrosinase inhibitor agents is still rare. Therefore, this study aims to select the most active fraction of Asteraceae species as tyrosinase inhibitors and suspect active compounds that play a role in it. About 12 species from Asteraceae are extracted using water. The resulting filtrate is partially fractionated using chloroform to obtain water extracts, water fractions, and chloroform fractions. Each extract and fraction of each plant determined the activity of its tyrosinase inhibitor using a microplate reader (ELISA) with L-DOPA as the substrate. *Tithonia diversifolia* water fraction provided the best activity of all the samples tested with the smallest IC_{50} . The active compounds contained are analyzed using LC-MS / MS. Compounds that act as tyrosinase inhibitors are alkaloid group that dominate the plant, namely trigonelline.*



PENDAHULUAN

Famili Asteraceae merupakan kelompok tumbuhan herba yang seringkali dianggap sebagai gulma atau pengganggu. Famili ini mudah ditemukan di mana saja karena sifatnya yang mudah tumbuh dan memiliki kemampuan beradaptasi yang tinggi serta perlakuan silvicultur yang mudah. Asteraceae sendiri banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sekitar sebagai obat tradisional, baik dalam bentuk ekstrak, air rebusan, maupun digunakan secara langsung untuk mengobati luka, demam, sakit perut, diabetes, dan sebagainya (Wegiera *et al.* 2012). Hal ini didukung oleh hasil penelitian para ahli di mana famili Asteraceae telah terbukti memiliki aktivitas seperti, antioksidan, antibakteri, antimelanogenesis, antiglikasi, antikanker, dan aktivitas lainnya (Budiarti *et al.* 2019; Hamamoto *et al.* 2019). Namun, aktivitas Asteraceae sebagai inhibitor tirosinase masih belum banyak diteliti.

Aktivitas inhibitor tirosinase berkaitan erat dengan proses melanogenesis. Melanogenesis adalah proses fisiologis dalam memproduksi melanin, suatu pigmen penyerap cahaya yang bertanggung jawab untuk warna kulit dan rambut manusia, bersama dengan tiga biokroma lainnya (Haryanti *et al.* 2018). Pembentukan melanin ini dikatalisasi oleh tirosinase, yaitu oksidoreduktase yang mengandung tembaga yang merupakan enzim kunci dalam biosintesis melanin. Enzim ini mengkatalisasi langkah pertama dalam dua reaksi sintesis melanin, yaitu mengkatalisasi hidroksilasi L-tirosin menjadi 4,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) dan oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon yang akan mengalami polimerisasi secara spontan membentuk melanin (Rauf *et al.* 2019).

Proses pembentukan melanin dapat dihambat dengan cara menghambat interaksi antara enzim tirosinase dengan substrat L-DOPA, sehingga antitirosinase dapat digunakan untuk mencegah proses pencoklatan enzimatis atau hiperpigmentasi pada kulit (Juwita *et al.* 2013). Berbagai inhibitor tirosinase telah banyak ditemukan dalam bahan kosmetik sebagai pencegah hiperpigmentasi, diantaranya adalah asam askorbat, arbutin, asam kojat, merkuri, dan hidrokuinon. Dari beberapa senyawa tersebut, asam kojat memiliki efek inhibisi dan kestabilan paling besar dalam produk kosmetik, namun asam kojat bersifat karsinogenik (Miyazawa dan Tamura 2007), sehingga diperlukan suatu senyawa yang mampu menghambat aktivitas enzim tirosinase dan aman digunakan pada kulit.

Menurut Wegiera *et al.* (2012), famili Asteraceae memiliki komponen senyawa bioaktif dari golongan polifenol, seperti flavonoid dan tanin, serta golongan terpena, seperti seskuioterpena, lakton, triterpena pentasiklik, alkaloid, saponin, dan sterol. Senyawa bioaktif yang didapat dari ekstrak famili Asteraceae berupa senyawa polifenol, terpenoid, dan alkaloid yang berperan sebagai agen depigmentasi (Juwita *et al.* 2011). Oleh sebab itu penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi fraksi teraktif spesies Asteraceae sebagai inhibitor tirosinase dan menduga senyawa aktif yang berperan di dalamnya.

METODE

Penelitian dimulai dengan preparasi 12 spesies famili Asteraceae (**Tabel 1**). Bagian tumbuhan yang digunakan adalah herba atau bagian atas tanah. Sampel kemudian diekstraksi menggunakan air, lalu ekstrak air difraksinasi menggunakan kloroform hingga didapat fraksi air dan fraksi kloroform. Ekstrak air, fraksi air, dan fraksi kloroform ke-12 spesies ditentukan aktivitas penghambatan enzim tirosinase. Ekstrak/fraksi yang paling aktif kemudian ditentukan kandungan metabolit sekundernya secara kualitatif dan semikuantitatif. Selanjutnya dugaan senyawa aktif ditentukan menggunakan kromatografi-cair-spektrometri massa (LC-MS/MS).

Preparasi Sampel

Sebanyak 12 spesies famili Asteraceae dibersihkan dan dikeringkan. Setelah kering, sampel digiling hingga menjadi serbuk dengan ukuran 40 mesh. Setelah itu sampel siap digunakan untuk prosedur selanjutnya.

Ekstraksi dan Fraksinasi Sampel

Ekstraksi dilakukan dengan secara maserasi menggunakan pelarut air pada suhu 50 °C. Simplisia ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan pelarut dengan nisbah 1:10 selama 24 jam. Ekstraksi dilakukan secara triplo. Ekstrak disaring menggunakan kertas saring Whatmann, lalu sebagian filtrat yang diperoleh difraksinasi menggunakan corong pisah dengan menggunakan pelarut kloroform. Setelah diperoleh fraksi air dan fraksi kloroform, kemudian dilakukan penguapan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak air, fraksi air dan fraksi kloroform.



Tabel 1. Daftar nama 12 spesies Asteraceae yang digunakan pada penelitian ini

| No | Nama Latin | Nama Lokal Indonesia | Gambar Tumbuhan |
|----|--|----------------------|---|
| 1 | <i>Mikania micrantha</i> Kunth | Sembung rambat |  |
| 2 | <i>Widelia trilobata</i> L. Pruski | Widelia |  |
| 3 | <i>Chromolaena. Orodata</i> | Kirinyuh |  |
| 4 | <i>Tithonia diversifolia</i> Hemsl.) A. Gray | Kipahit |  |
| 5 | <i>Vernonia cinerea</i> (L.) Less. | Sawi langit |  |
| 6 | <i>Synedrella nodiflora</i> L. | Jotang kuda |  |



| No | Nama Latin | Nama Lokal Indonesia | Gambar Tumbuhan |
|----|--|----------------------|---|
| 7 | <i>Adenostema Lavenia</i> (L.) kunth | Legetan warak |  |
| 8 | <i>Acmella paniculata</i> (Wall.ex DC.) R.K. | Jotang |  |
| 9 | <i>Ageratum conyzoides</i> (L.) L | Bandotan |  |
| 10 | <i>Crassocephalum crepidioides</i> (Benth.) S. Moore | Sintrong |  |
| 11 | <i>Galinsoga parviflora</i> (Cav.) | Loseh |  |
| 12 | <i>Eclipta alba</i> | Urang aring |  |



Penentuan Aktivitas Penghambatan Tirosinase (Batubara dan Adfa 2013)

Penentuan aktivitas inhibisi tirosinase terhadap ekstrak dan, fraksi, dan minyak atsiri sampel dilakukan ditentukan dengan menggunakan L-DOPA sebagai substrat dan asam kojat sebagai kontrol positif. Nilai IC_{50} yaitu konsentrasi ekstrak (mg/mL) yang mampu menghambat aktivitas enzim tirosinase sebesar 50% kemudian ditentukan.

Uji fitokimia kualitatif (Harbone 1987)

Uji alkaloid. Sebanyak 0,05 g ekstrak/fraksi sampel terpilih dilarutkan dengan beberapa tetes NH_3 dan 5 mL $CHCl_3$ kemudian disaring. Filtratnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL H_2SO_4 2 M dan dikocok hingga terbentuk dua lapisan terpisah. Lapisan atas atau lapisan asamnya dipisahkan ke dalam pelat tetes. Lapisan tersebut kemudian diteteskan pereaksi Meyer, Wagner, dan Dragendoroff yang akan menimbulkan endapan berwarna berturut-turut putih, coklat, dan merah jingga jika di dalam sampel terdapat alkaloid.

Uji triterpenoid/steroid. Sebanyak 0,05 g ekstrak/fraksi sampel terpilih dilarutkan dengan 5 mL etanol panas kemudian disaring ke dalam tabung reaksi. Filtratnya diuapkan hingga kering dan ditambahkan 1 mL dietil eter kemudian dipindahkan ke dalam pinggan porselin. Larutan ditambahkan 1 tetes H_2SO_4 pekat dan 1 tetes CH_3COOH anhidrat. Warna merah atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid dalam sampel.

Uji flavonoid. Sebanyak 0,05 g ekstrak/fraksi sampel terpilih dilarutkan dengan 5 mL akuades kemudian dididihkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan serbuk Mg, 1 mL HCl, 1 mL etanol, dan 1 mL amil alkohol. Campuran kemudian dikocok kuat selama beberapa menit. Hasil positif ditandai dengan munculnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol.

Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak/Fraksi Teraktif

Penentuan kadar flavonoid total dilakukan sesuai dengan metode yang disampaikan dalam Budiarti et al (2019). Total flavonoid dilaporkan sebagai gram kuersetin ekuivalen /g sampel.

Penentuan senyawa aktif tumbuhan terbaik menggunakan LC-MS/MS

Ekstrak/fraksi terpilih dilarutkan dengan asetonitril, kemudian disaring menggunakan milipore filter unit dengan ukuran 0,54 μm . Sebanyak 1 μL filtrat sampel diinjeksikan ke dalam sistem instrumen LC-ESI-QTOF. Analisis LC-MS/MS dilakukan dengan UPLC-MS yang dilengkapi dengan pompa biner. Kromatografi cair (LC) dihubungkan spektrometer massa Quadropole Time-of-Flight (QTOF) dilengkapi dengan sumber ionisasi Electrospray Ionization (ESI). Spektrometri Massa (MS) yang digunakan, yaitu sistem QTOF dengan mode ionisasi positif. Parameter ESI yang digunakan meliputi suhu kapiler 40°C dan gas pengabut 1000 L/jam, sumber tegangan 2 kV. Modus full scan dari m/z 50-1200. Kolom UPLC yang digunakan Acquity UPLC HSS C-18 1.8 μm (2,1×150 mm). Eluen yang digunakan adalah H_2O (A) dan asetonitril p.a (B). Eluen diatur pada laju aliran total 0.3 mL/menit. Sistem elusi dijalankan dengan gradien linier pelarut A dari 95% hingga 5% dari menit 0-2, menit ke 2-8 elusi gradien linier pelarut A dari 60% hingga 40%, menit ke 8-10 elusi isokratik perbandingan 60:40, menit ke 10-11 elusi isokratik perbandingan 0:100, menit ke 11-13 elusi gradient linier pelarut A dari 0% hingga 100%, menit ke-16 elusi isokratik perbandingan 95:5, menit ke-16 elusi gradient linier pelarut A dari 95% hingga 5%. Data kromatogram yang dihasilkan dikonversi menjadi format NetCDF untuk mempermudah dalam mengolah data dengan MZmine. Pemrosesan data MZmine terdiri atas beberapa tahap, yaitu membuat kromatogram sampel, mengurangi noise, identifikasi berdasarkan berat molekul, dan penyusunan data.

Analisis data

Analisis statistika diperlukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan dari hasil yang diperoleh pada 40 36 ekstrak/fraksi tumbuhan. Analisis statistika dilakukan menggunakan program SPSS 16.0 dengan analisis menggunakan One Way ANOVA dan dilanjutkan dengan analisis lanjutan berupa uji Duncan. Analisis ini membandingkan aktivitas setiap sampel berupa nilai IC_{50} dengan menggunakan selang kepercayaan 95%.



HASIL & PEMBAHASAN

Rendemen Ekstrak dan Fraksi

Ekstrak air kedua belas spesies *Asteraceae* memiliki bervariasi, yang paling besar pada ekstrak air bandotan (*A. conyzoides*). Setelah difraksinasi menggunakan kloroform sebagian senyawa semipolar akan terlarut pada fraksi kloroform dan sisanya masih berada pada fraksi air. Rendemen fraksi air tiap ekstrak ditemukan lebih besar dibandingkan rendemen fraksi kloroform. Hanya sekitar 10% dari ekstrak air yang dapat terlarut ke dalam kloroform, bahkan beberapa rendemennya tidak mencapai 1% (**Tabel 2**).

Aktivitas Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase

Pengujian penghambatan tirosinase dilakukan menggunakan spektrofotometri menggunakan enzim tirosinase yang diisolasi dari jamur dan L-DOPA sebagai substrat. Prinsip pengukuran yaitu enzim tirosinase akan mengatalisis pembentukan L-DOPA menjadi DOPAkuinon yang kemudian terbentuk dopakrom yang dapat terukur intensitasnya pada panjang gelombang 492 nm (Miyazawa et al. 2006). Dalam proses alamnya, dopakuinon melalui serangkaian reaksi akan membentuk melanin yang memicu terjadinya pencoklatan pada kulit (Likhitwitayawuid 2008). Hasil skrining aktivitas 12 spesies *Asteraceae* sebagai inhibitor tirosinase disajikan pada **Tabel 3**.

Tabel 2. Rendemen ekstrak air, fraksi air, dan fraksi kloroform dua belas spesies *Asteraceae*

| No | Nama Latin | Rendemen (%) | | |
|----|--|--------------|-------------|------------------|
| | | Ekstrak Air | Fraksi Air | Fraksi Kloroform |
| 1 | <i>M. micrantha</i> Kunth | 14.91±1.55 | 11.04±1.50 | 1.64 ±0.24 |
| 2 | <i>W. trilobata</i> L. Pruski | 19.77±2.51 | 15.16 ±1.37 | 2.05 ±0.76 |
| 3 | <i>C. orodata</i> | 12.03±2.67 | 11.37±2.01 | 0.91±0.13 |
| 4 | <i>T. diversifolia</i> Hemsl.) A. Gray | 21.43±2.81 | 15.71±1.49 | 6,87 ± 6,61 |
| 5 | <i>V. cinerea</i> (L.) Less. | 18.41±1.66 | 15.22±1.58 | 2,69 ± 1,58 |
| 6 | <i>S. nodiflora</i> L. | 12.16±2.36 | 11.05 ±1.10 | 0.75 ±0.16 |
| 7 | <i>A. lavenia</i> (L.) kunth | 15.71±1.49 | 13.61±2.67 | 3.06 ±0.82 |
| 8 | <i>A. paniculata</i> (Wall.ex DC.) R.K. | 15.87±2.91 | 12.31±2.11 | 2.96±0.73 |
| 9 | <i>A. conyzoides</i> (L.) L | 34.18±4.75 | 27.93±1.26 | 0.89 ±0.04 |
| 10 | <i>C. crepidioides</i> (Benth.) S. Moore | 9.07±1.44 | 5.26±1.13 | 3.47±1.56 |
| 11 | <i>G. parviflora</i> (Cav.) | 14.06±2.73 | 13.30±2.50 | 2.11 ±0.65 |
| 12 | <i>E. alba</i> | 10.06±1.77 | 8.71±1.66 | 1.09±0.53 |

Tabel 3. Aktivitas inhibitor tirosinase (IC₅₀) ekstrak air, fraksi air, dan fraksi kloroform beberapa spesies *Asteraceae*

| No | Sampel | IC ₅₀ (µg ekstrak kering/mL larutan) | | |
|------------------------|------------------------|---|------------------------------|------------------------------|
| | | Ekstrak Air | Fraksi Air | Fraksi Kloroform |
| 1 | <i>M. micrantha</i> | 589.65 ± 28.07 ^l | 311.98 ± 5.34 ^b | 372 ± 16.92 ^{cd} |
| 2 | <i>W. trilobata</i> | 348.51 ± 9.97 ^{bc} | 411.25 ± 9.06 ^{def} | 319.24 ± 3.03 ^b |
| 3 | <i>C. orodata</i> | 619.17 ± 24.35 ^{ij} | 301.34 ± 7.89 ^b | 308.70 ± 2.99 ^b |
| 4 | <i>T. diversifolia</i> | 639.83 ± 26.08 ⁱ | 143.03 ± 0.77 ^a | 449.03 ± 12.46 ^{fg} |
| 5 | <i>V. cinerea</i> | 761.33 ± 13.90 ^k | 328.75 ± 4.31 ^b | 380.35 ± 2.18 ^{cd} |
| 6 | <i>S. nodiflora</i> | 735.52 ± 53.59 ^k | 328.34 ± 22.61 ^b | 314.48 ± 13.50 ^b |
| 7 | <i>A. lavenia</i> | 869.19 ± 64.60 ^l | 950.96 ± 65.28 ^m | 430.23 ± 1.12 ^{efg} |
| 8 | <i>A. paniculata</i> | 521.32 ± 14.95 ^h | 514.23 ± 6.44 ^h | 426.65 ± 6.97 ^{efg} |
| 9 | <i>A. conyzoides</i> | 467.14 ± 11.63 ^g | 623.47 ± 11.49 ^{ij} | 327.32 ± 5.50 ^b |
| 10 | <i>C. crepidioides</i> | 612.47 ± 12.65 ^{ij} | 582.30 ± 9.80 ⁱ | 395.52 ± 5.24 ^{de} |
| 11 | <i>G. parviflora</i> | 764.93 ± 40.30 ^k | 1139.45 ± 64.75 ⁿ | 318.80 ± 4.32 ^b |
| 12 | <i>E. alba</i> | 862.52 ± 40.90 ^l | 604.46 ± 12.77 ^{ij} | 320.18 ± 7.37 ^b |
| Asam kojat (kontrol +) | | 66.79 ± 0.99 | | |

Keterangan: Huruf yang berbeda di belakang angka pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan pada $\alpha=0.05$.



Penghambatan aktivitas enzim tirosinase ditunjukkan dengan nilai IC_{50} . IC_{50} merupakan nilai konsentrasi penghambatan tirosinase yang dapat menghambat 50% aktivitas tirosinase (Rauf et al. 2019). Menurut Miyazawa dan Tamura (2007), sampel tergolong aktif sebagai inhibitor tirosinase jika memiliki nilai $IC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$. Nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ menunjukkan potensi penghambatan aktivitas tirosinase yang paling kuat, nilai $IC_{50} 100\text{-}450 \mu\text{g/ml}$ menunjukkan potensi penghambatan sedang, dan $450\text{-}700 \mu\text{g/ml}$ menunjukkan potensi penghambatan aktivitas tirosinase sangat lemah. Asam kojat digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini. Asam kojat memiliki efek inhibisi terhadap enzim tirosinase paling besar ($66,79 \mu\text{g/ml}$) diantara seluruh sampel. Hasil ini juga didukung oleh penelitian yang dilakukan Purnamasari dan Sagala (2020), dengan nilai IC_{50} asam kojat sebesar $67,2 \mu\text{g/ml}$.

Aktivitas penghambatan enzim tirosinase pada Tabel 3 menunjukkan, bahwa ekstrak air 12 spesies Asteraceae tergolong lemah, Hanya ekstrak air *W. trilobata* yang tergolong sedang. Setelah ekstrak air dibagi menjadi fraksi air dan fraksi kloroform hasil yang berbeda ditemukan. Fraksi air yang sudah kehilangan sekelompok senyawa golongan semipolarnya sebagian besar menjadi lebih aktif dibandingkan ekstrak airnya. Sekitar 50% fraksi air memiliki aktivitas yang tergolong sedang dengan aktivitas tertinggi ditemukan pada fraksi air *T. diversifolia* ($IC_{50} 143 \mu\text{g/ml}$). Berbeda dengan sebagian besar fraksi air, fraksi air *A. lavenia* dan *G. parviflora* lebih kecil dibandingkan ekstrak airnya, bahkan fraksi air *G. parviflora* tidak mampu menghambat 50% hingga konsentrasi $1000 \mu\text{g/ml}$. Fraksi kloroform yang mengandung senyawa semipolar memiliki aktivitas tergolong sedang seluruhnya ($IC_{50} 308,7 \mu\text{g/ml} - 449 \mu\text{g/ml}$). Hasil uji statistika menunjukkan bahwa dari keseluruhan sampel, fraksi air *T. diversifolia* merupakan sampel paling aktif ($\alpha=0,05$). Untuk itu, selanjutnya fraksi air *T. diversifolia* ditentukan dugaan senyawa aktifnya.

Tithonia diversifolia di Indonesia dikenal dengan nama kipahit. Secara tradisional tumbuhan ini telah banyak dimanfaatkan sebagai pakan ternak (Susanti & marhaenyanto 2016). Sementara daunnya banyak dimanfaatkan untuk mengatasi diabetes terutama dilaporkan dimanfaatkan di Yogyakarta, Kalimantan Selatan, ataupun Kalimantan Barat (Amanatie & Sulistypwati 2015; Anwar et al 2016, Meisia et al 2020).

Kandungan senyawa metabolit sekunder fraksi air *T. diversifolia* secara kualitatif

Dugaan senyawa aktif pada tumbuhan *T. diversifolia* dimulai dengan uji fitokimia kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekundernya. Golongan metabolit sekunder yang dipilih adalah alkaloid, flavonoid, dan terpenoid/steroid yang banyak dilaporkan sebagai penghambat aktivitas enzim tirosinase. Hasil uji menunjukkan bahwa fraksi air *T. diversifolia* mengandung flavonoid dan tidak mengandung alkaloid, terpenoid, maupun steroid. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Ahmed dan Samson (2020). Namun berbeda dengan yang telah dilaporkan oleh Yazid et al. (2021) yang menyatakan bahwa *T. diversifolia* juga mengandung alkaloid yaitu trigonellin. Selain itu, Fauzi'ah dan Hajati (2020) menyatakan bahwa tumbuhan ini banyak mengandung senyawa golongan terpenoid seperti, limonena, β pinena, α pinena, trans kariofilena, bisiklogermakrena, β felandrena, dan lainnya. Perbedaan hasil yang diperoleh pada penelitian ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti, teknik ekstraksi dan pelarut yang digunakan, bagian tumbuhan yang digunakan dalam ekstraksi, usia tumbuhan yang digunakan, dan masih banyak faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian yang dilakukan.

Kandungan senyawa metabolit sekunder fraksi air *T. diversifolia* secara semikuantitatif

Berdasarkan kandungan flavonoid, ditentukan kadar total flavonoidnya. Hasilnya menunjukkan bahwa kadar total flavonoid pada ekstrak air sebesar $5,27 \text{ mg kuersetin ekuivalen/g}$ ekstrak kering dan pada fraksi air lebih kecil yaitu $3,57 \text{ mg kuersetin ekuivalen/g}$ ekstrak kering. Fenolik maupun flavonoid memiliki cincin fenol dengan adanya substituen hidroksil yang mampu menghambat ROS, mereduksi ion logam, memodulasi fosforilasi protein yang berhubungan dengan penghambatan aktivitas enzim dan penghambatan perosisasi lipid (Karim et al. 2014; Hamamoto et al. 2019). Golongan flavonoid yang diduga berperan dalam aktivitas tersebut adalah flavonol dan turunannya (Chang 2009; Karim et al. 2014). Hasil penelitian Yazid et al. (2021), menyatakan bahwa senyawa golongan flavonol yang terdapat pada *T. diversifolia* adalah kaempferol. Senyawa flavonoid lainnya yaitu, 5-hidroksi-6,4'-dimetoksiflavon-7-O- β -D-glukopiranosida dan 5-O-metilvisamminol. 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. 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 (Chang 2009).

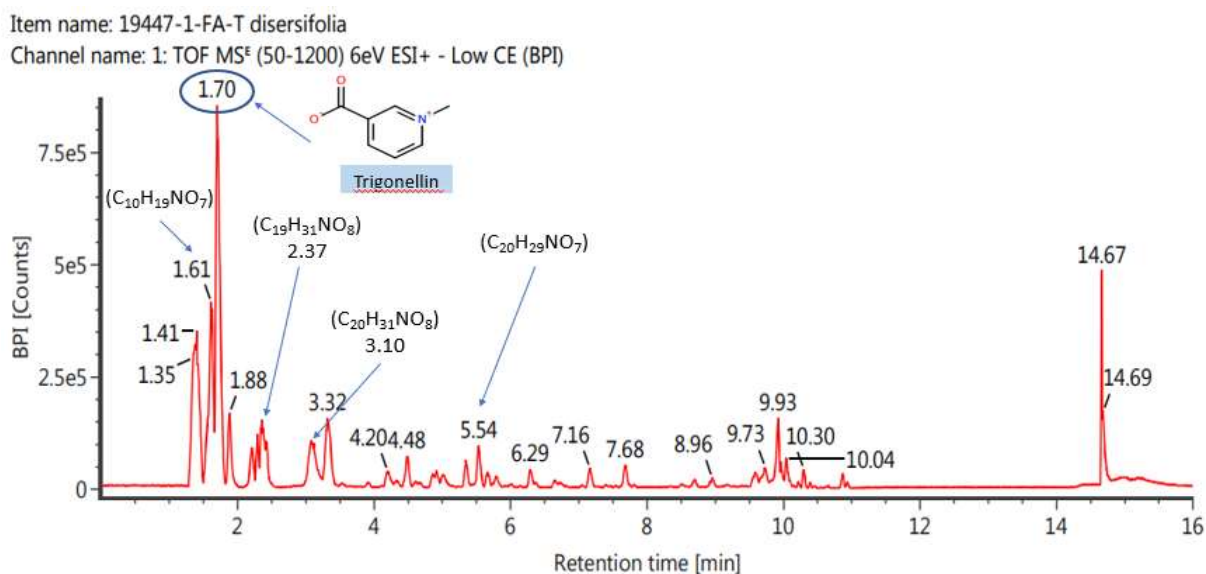
Dugaan senyawa aktif

Kromatogram fraksi air *T. diversifolia* dapat dilihat pada **Gambar 1**. Terdapat 5 senyawa yang diduga dapat menjadi kandidat senyawa bioaktif dalam aktivitas inhibitor tirosinase. Di antara kelima senyawa tersebut, trigonelline dari golongan senyawa alkaloid (waktu retensi 1.70 menit) memiliki intensitas paling tinggi. Oleh sebab itu, senyawa ini dipercaya menjadi komponen aktif utama yang berperan dalam aktivitas penghambatan tirosinase. Terdapat empat puncak senyawa lainnya yang perlu diidentifikasi yaitu pada waktu retensi 1.61, 2.37, 3.10, dan 5.54 menit.

Mode ionisasi yang digunakan dalam analisis tersebut adalah mode positif (ESI+), yaitu ionisasi dengan penambahan H⁺ (prinsip protonisasi) sehingga ion yang teramati berbentuk [M-H⁺]. Berdasarkan spektrum massa puncak dengan waktu retensi 1.70 menit diketahui, senyawa pada puncak ini memiliki bobot molekul sebesar 137,04 m/z. Pola fragmentasi menunjukkan senyawa pada waktu retensi ini merupakan trigonelline. Empat puncak lainnya

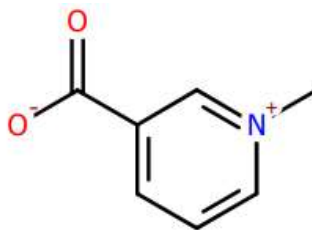
berdasarkan pola fragmentasi massanya diketahui memiliki struktur yang mengandung N karena bobot molekulnya yang bernilai negative. Dugaan rumus molekulnya adalah C₁₀H₁₉NO₇, C₁₉H₃₁NO₈, C₂₀H₃₁NO₈, dan C₂₀H₂₉NO₇ berturut-turut untuk waktu retensi 1.61, 2.37, 3.10, dan 5.54 menit. Walaupun dugaan rumus molekulnya telah diketahui namun, struktur senyawanya belum dapat ditentukan dan perlu dianalisis lebih lanjut. Di dalam analisis kualitatif tidak terdeteksi adanya alkaloid pada fraksi air, namun pada hasil analisis LC-MS/MS ditemukan alkaloid dan turunannya. Hal ini dapat terjadi dimungkinkan karena perbedaan limit deteksi pada uji kualitatif dan analisis menggunakan LC-MS/MS. Selain senyawa yang mengandung unsur N, beberapa puncak lainnya belum dapat ditentukan rumus strukturnya sehingga perlu dianalisis lebih lanjut. Diduga golongan senyawa lainnya dapat berupa golongan flavonoid yang terdeteksi positif pada uji kualitatif.

Trigonellin (**Gambar 2**) sebagai senyawa dominan pada penelitian ini belum pernah dilaporkan sebagai inhibitor tirosinase. Namun hasil penelitian yang dilakukan oleh Nazir *et al.* (2018), menyatakan bahwa trigonellin merupakan golongan alkaloid alami dalam melindungi fibroblas kulit manusia dari irradiasi UV-B melalui pelemahan sel oksidatif, pemulihan homeostasis kalsium seluler dan pencegahan stres retikulum endoplasma (ER). Pada penelitian tersebut juga disebutkan bahwa trigonellin berpotensi sebagai agen terapeutik / kosmetik dalam mencegah kerusakan foto kulit yang ditandai dengan mengembalikan



Gambar 1. Kromatogram LC-MS/MS fraksi air *T. diversifolia*





Gambar 2. Struktur kimia senyawa trigonellin

pembentukan kerutan, warna kulit, kekeringan dan peningkatan UPR yang dimediasi oleh ER-stres di Balb/C tikus yang terpapar UV-B.

Senyawa alkaloid lainnya juga telah dilaporkan berperan dalam proses penghambatan tirosinase. Senyawa alkaloid sebagai inhibitor tirosinase yang dilaporkan umumnya merupakan senyawa gabungan dari terpenoid dan alkaloid. Di antara senyawa gabungan tersebut, yaitu alkaloid oxindole yang merupakan senyawa monoterpena alkaloid (Ahmad *et al.* 2010), alkaloid norditerpenoid tipe likoktonin seperti, lappakonitin dan puberanin (Shaheen *et al.* 2005). Selain itu, dalam beberapa tahun terakhir beberapa alkaloid aporfin seperti magnoflorin (Li dan Wang 2014) dan N-formilanonain telah diusulkan untuk digunakan sebagai agen anti-pigmentasi karena sitotoksitasnya yang rendah (Wang *et al.* 2010). Lebih khusus lagi, boldin adalah inhibitor tirosinase tipe campuran dengan nilai IC_{50} sekitar 6,52 mM, mengikat enzim bebas dan kompleksnya dengan L-DOPA (Si *et al.* 2013). Senyawa yang terkait secara struktural adalah diasetilboldin, salah satu bahan yang dipatenkan dari Revitol *Skin Brightener*, sebuah krim pemutih kulit komersial yang dilaporkan menghambat tirosinase pada tingkat ekspresi tanpa efek samping (Fuller *et al.* 2000).

SIMPULAN

Dari 12 spesies Asteraceae yang memiliki aktivitas inhibitor tyrosinase, fraksi air *Tithonia diversifolia* merupakan fraksi teraktif. Dugaan senyawa aktif pada fraksi air *T. diversifolia* adalah trigonellin, beserta turunan alkaloid dan flavonoid lainnya. Perlu dilakukan identifikasi terhadap 4 senyawa yang telah diketahui rumus molekulnya dan puncak lainnya yang belum diketahui. Terhadap senyawa/isolat tersebut pun perlu dilakukan pengujian aktivitas inhibitor tirosinasenya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti menyampaikan terima kasih kepada Taofik Ridwan, SP, MSI yang telah membantu menyediakan foto tumbuhan pada penelitian ini. Sebagian penelitian ini didanai oleh the bilateral exchange program Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi RI /Japan society for the promotion of science joint research project 2021 No 103/E4.4/KU/2021.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad I, Ijaz F, Fatima I, Ahmad N, Chen S, Afza N, Malik A. 2010. Xanthine oxidase/tyrosinase inhibiting, antioxidant, and antifungal oxindole alkaloids from *Isatis costata*. *Pharmaceutical Biology*. 48(6): 716–721. Doi: <https://doi.org/10.3109/13880200903271298>.
- Ahmed SO, Samson B. 2020. Preliminary phytochemical screening of bioactive chemicals in sunflower (*Tithonia diversifolia*) roots. *International Journal on Human Computing Studies*. 2(6): 12-18. ISSN: 2615-8159.
- Amanatie, Sulistyowati, E. 2015. Structure of the leaf of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. *Journal of Science and Mathematics*, 23(4), 101-106. Issn. 0854-0675
- Anwar, K., Ngindra, A. P. L., Hariadi, R. E. P., Kamalia, N., Santoso, H. B. 2016. Comparison of the effects of ethanol extract, n-butanol fraction, and petroleum fraction of the moonflowerleaf ether (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray) against decreased blood glucose levels of aloksan-induced males. *Journal of Pharmascience*, 3(2), 80-88. <http://dx.doi.org/10.20527/jps.v3i2.5742>.
- Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T, Rahminiwati M, Djauhari E. 2010. Potency of medicinal plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. *Biological Science Journal*. 10(2): 138-144. Doi: <http://dx.doi.org/10.3923/jbs.2010.138.144>.



- Batubara I, Adfa M. 2013. Potensi daun kayu bawang (*Protium javanicum*) sebagai penghambat kerja enzim tirosinase. *Jurnal Sains dan Matematika*. 1(2): 52 – 56. ISSN: 2302-7290.
- Budiarti E, Batubara I, Ilmiawati A. 2019. Potensi beberapa ekstrak tumbuhan Asteraceae sebagai antioksidan dan antiglikasi. *Jurnal Jamu Indonesia*. 4(3): 103-111.
- Chang TS. 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal Molecule Science*. 10(6): 2440-2475. doi.org/10.3390/ijms10062440.
- Fauzi`ah L, Hajati SN. 2020. Komposisi kimia penyusun minyak atsiri daun insulin (*Tithonia diversifolia* (Hamsley) A. Gray) dari Kalimantan Selatan. *Jurnal Sains dan Edukasi Sains*. 3(2): 32-37. Doi: https://doi.org/10.24246/juses.v3i2p32-37.
- Fuller BB, Drake MA, Spaulding DT, Chaudhry F. 2000. Downregulation of tyrosinase activity in human melanocyte cell cultures by yohimbine. *Journal of Investigative Dermatology*. 114 (2): 268-276. Doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00860.x.
- Hamamoto A, Isogai R, Maeda M, Hayazaki M, Horiyama E, Takashima S, Koketsu M, Takemori H. 2019. The High Content of Ent-11-hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic Acid in *Adenostemma lavenia* (L.) O. Kuntze Leaf Extract: With Preliminary in Vivo Assays. *Food Journal*. 9(73): 1-12. Doi: 10.3390/foods9010073.
- Harbone JB. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* Edisi I. Bandung (ID): Institut Teknologi Badung.
- Haryanti R, Suwantika A, Abdassah M. 2018. Artikel ulasan: Tinjauan bahan berbahaya dalam krim pencerah kulit. *Jurnal Farmaka*. 16(2): 214-224. Doi: https://doi.org/10.24198/jf.v16i2.16932.g8801.
- Juwita NK, Djajadisastra J, Azizahwati. 2011. Uji penghambatan tirosinase dan stabilitas fisik sediaan krim pemutih yang mengandung ekstrak kulit batang nangka (*Artocarpus heterophyllus*). *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 8(2): 127-164. ISSN: 1693 9883. Doi: http://dx.doi.org/10.7454/psr.v8i2.3477.
- Juwita NK, Djajadisastra J, Azizahwati. 2013. Uji penghambatan tirosinase dan stabilitas fisik sediaan krim pemutih yang mengandung ekstrak kulit batang nangka (*Artocarpus heterophyllus*). *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 8(2): 57–124. ISSN: 1693 9883. Doi: http://dx.doi.org/10.7454/psr.v8i2.3477.
- Karim AA, Azlan A, Ismail A, Hashim P, Gani SSA, Zainudin BH, Abdullah NA. 2014. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14(381): 1-13. Doi: https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-381.
- Likhitwitayawuid K. 2008. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Current Science*. 94(1): 44–52. Doi: https://www.jstor.org/stable/24102028.
- Li C, Wang M-H. 2014. Potential biological activities of magnoflorine: A compound from *Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc. *Kor J Plant Resour*. 27(3): 223-228. ISSN: 2287-8203.
- Meisia, L., Rafdinal, Ifadatin, S. 2020. Utilization of medicinal plants by malay people in Sungai Daun Village, Selakau District, Sambas Regency. *Journal of Protobiont*, 9(1), 7-16.
- Miyazawa, Mitsuo, Tamura N. 2006. Inhibitory compound of tyrosinase activity from the sprout of *Polygonum hydropiper* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30(3): 595-597. Doi: https://doi.org/10.1248/bpb.30.595.
- Miyazawa, Tamura. 2007. Inhibitory compound of tyrosinase activity from the sprout of *polygonum hydropiper* L. (Benitade). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30(3): 595-597. Doi: https://doi.org/10.1248/bpb.30.595.
- Nazir LA, Tanveer MA, Shahid NH, Sharma RR, Tasduq S. 2018. Trigonelline, a naturally occurring alkaloidal agent protects ultraviolet-B (UV-B) -irradiation - induced apoptotic cell death in human skin fibroblasts via attenuation of oxidative stress, restoration of cellular calcium homeostasis and prevention of endoplasmic reticulum (ER) stress. *Journal of Photochemistry & Photobiology*. 1-29. Doi: https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111720.
- Purnamasari DR, Sagala Z. 2020. Uji aktivitas inhibitor enzim tirosinase ekstrak etanol daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) secara in vitro. *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal*. 5(1): 35-44.
- Rauf A, Ningsi S, Nurdin H. 2019. Potensi penghambatan tirosinase ekstrak etanol daun tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill, var. Pyriforme Alef). *Jurnal Farmasi*. 7(1): 1-7. Doi: https://doi.org/10.24252/jurfar.v7i1.10018.
- Shaheen F, Ahmad M, Khan MTH, Jalil S, Ejaz A, Sultankhodjaev MN, Arfan M, Choudhary MI, Rahman A. 2005. Alkaloids of *Aconitum laeve* and their anti-inflammatory, antioxidant, and tyrosinase inhibition activities. *Phytochemistry*. 66: 935–940. Doi: 10.1016/j.phytochem.2005.02.010.
- Si YX, Ji S, Wang W, Fang NY, Jin QX, Park YD, Qian GY, Lee J, Han HY, Yin SJ. 2013. Effects of boldine on



- tyrosinase: Inhibition kinetics and computational simulation. *Process Biochem.* 48(1): 152-161. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.11.001>.
- Susanti, S. Marhaeniyanto E. 2016. The proportion of the use of different types of plant leaves for goat animal feed at different locations and heights in Malang Raya area. *Journal of Animal Sciences*, 26(3), 42-52. <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jiip.2016.026.03.07>.
- Wang HM, Chen CY, Chen CY, Ho ML, Chou YT, Chang HC, Lee CH, Wang CZ, Chu IM. 2010. (-)-N-Formylanonaine from *Michelia alba* as a human tyrosinase inhibitor and antioxidant. *Bioorg Med Chem.* 18(14): 5241-5247. Doi: [10.1016/j.bmc.2010.05.045](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.05.045).
- Wegiera M, Smolarz HD, Jedruch M, Korczak M, Kopron K. 2012. Cytotoxic effect of some medicinal plants from Asteraceae family on J-45.01 leukemic cell line – pilot study. *Polish Pharmaceutical Society.* 69(2): 263 – 268. ISSN: 0001-6837.
- Yazid F, Salim SO, Rahmadika FD, Rosmalena R, Artanti N, Sundowo A, Prasasty VD. 2021. Antidiabetic effects of *Tithonia diversifolia* and *Malus domestica* leaf extracts in alloxan-induced sprague dawley rats. *Systematic Reviews in Pharmacy.* 12(1): 1630-1638.

