

Penentuan Aktivitas Gabungan Ekstrak Etanol Pulosari (*Alyxia reinwardtii*) dan Secang (*Sappan Lignum*) Sebagai Inhibitor Tirosinase Yang Potensial Untuk Bahan Kosmetik Melalui Pendekatan *In Silico* dan *In Vitro*

Penulis

Fadilah^{1*}, Aryo Tedjo¹, Rudi Heryanto²

Afiliasi

¹ Departemen Kimia Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Indonesia

² Pusat Studi Biofarmaka, LPPM, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

Kata Kunci

- Tirosinase
- Pulosari (*Alyxia reinwardtii*)
- Secang (*Sappan lignum*)
- Polifenol
- Simulasi *docking*
- uji *in vitro*

Diterima 20 Agustus 2015
Direvisi 8 Desember 2015
Disetujui 9 Februari 2016

*Penulis korespondensi

Fadillah
Departemen Kimia
Fakultas Kedokteran
Universitas Indonesia
Jl. Salemba Raya No.06
Jakarta Pusat, Indonesia
fadilah81@gmail.com

Abstrak

Tirosinase atau fenol oksidase adalah enzim utama yang terlibat dalam biosintesis melanin. Untuk menghindari produksi melanin secara berlebihan pada lapisan epidermal, maka dicari senyawa yang mampu menghambat tirosinase sehingga dapat digunakan sebagai bahan pemutih kulit. Inhibitor enzim tirosinase dapat diperoleh dari senyawa bahan alam diantaranya, polifenol, kumarin, stilben sebagai pengganti senyawa sintetik. Tirosinase telah diketahui struktur molekular sehingga dapat diketahui mekanisme kerjanya melalui uji *in-silico* dan pembuktian secara *in-vitro*. Penelitian ini digunakan untuk mendeteksi keefektifan gabungan dari ekstrak etanol pulosari (*Alyxia reinwardtii*) dan secang (*Sappan lignum*) sebagai inhibitor tirosinase. Dari hasil *in-silico* pengujian aktivitas inhibisi tirosinase menggunakan *software* MOE 2008 menunjukkan bahwa dalam ekstrak etanol dari secang yaitu senyawa brazilin dan rhamnitin berturut-turut memiliki nilai ΔG -15.6582 kkal/mol, -13.3378 kkal/mol dengan inhibisi 10.021 μM , 8.331 μM dan Hdon-acc 6, 8. Sedangkan dalam ekstrak etanol dari pulosari dengan senyawa scopoletin dan zhebeiresinol berturut-turut memiliki nilai ΔG -12.1661 kkal/mol; -13.8982 kkal/mol dengan inhibisi 7.279 μM ; 9.104 μM dan Hdon-acc 5 dan 6. Sedangkan senyawa parameter L-DOPA dan pembanding asam kojat berturut-turut memiliki nilai ΔG -9.8247 kkal/mol; -8.8047 kkal/mol dengan inhibisi 5.592 μM ; 4.976 μM dan Hdon-acc 3; 3. Dari pembuktian secara *in-vitro* menunjukkan bahwa uji aktivitas inhibisi tirosinase berturut-turut dari secang (Sl), pulosari (Ar), gabungan Sl dan Ar dengan pembanding asam kojat memiliki nilai IC_{50} berturut-turut 797.090 ppm, 1962.934 ppm, 571.352 ppm dan 93.557 ppm. Sehingga dari hasil *in-silico* dan *in-vitro* disimpulkan bahwa penggabungan antara pulosari dan secang memiliki tingkat IC_{50} lebih baik dibandingkan pemberian masing-masing ekstrak.



Pendahuluan

Tirosinase (EC 1.14.18.1) adalah enzim multifungsi yang mengandung Cu yang secara luas terdistribusi di alam. Enzim ini terutama terlibat dalam dua langkah pertama dari biosintesis melanin, yang terdiri dari hidroksilasi L-tirosin (aktivitas monofenolase) dan oksidasi dari produk ini reaksi, L-dopa (aktivitas difenolase) (Kim *et al.* 2005). Enzim ini juga bertanggung jawab untuk pigmentasi kulit kelainan seperti bintik-bintik dan cacat (Seo *et al.* 2003). Tirosinase juga terkait dengan Parkinson dan lainnya penyakit neurodegenerative (Asanuma *et al.* 2003; Xu *et al.* 1998). Enzim tirosinase berperan dalam biosintesis melanin di dalam tubuh makhluk hidup. Melanin memiliki fungsi yang sangat penting yaitu untuk melindungi tubuh dari radiasi sinar ultraviolet dari matahari (Artes *et al.* 1998).

Di negara yang beriklim tropis, seperti Indonesia tentunya paparan sinar matahari tidak dapat dihindari, terlebih apabila seseorang diharuskan beraktivitas di luar ruangan dan kulitnya mengalami kontak langsung dengan sinar matahari. Namun, apabila pigmen melanin, diproduksi secara berlebih akan terjadi penumpukan melanin pada permukaan kulit (hiperpigmentasi). Untuk menghindari produksi melanin berlebih maka mekanisme tirosinase perlu dihambat, adanya inhibitor tirosinase ini, akan menghambat reaksi enzimatik dari tirosinase. Beberapa inhibitor tirosinase diantaranya arbutin, asam askorbat, asam kojat, merkuri dan hidrokuinon (Kim *et al.* 2005).

Beberapa Inhibitor tersebut diperoleh secara sintesis dan dari bahan alam. Senyawa alam diantaranya turunan polifenol yang berasal dari tumbuh-tumbuhan telah diselidiki sebagai inhibitor tirosinase untuk menghindari produksi melanin secara berlebihan pada lapisan epidermal, sehingga dapat digunakan sebagai bahan kosmetik (Zheng *et al.* 2008). Senyawa alam diantaranya dalam tanaman Secang (*Sappan lignum*) dan Pulosari (*Alyxia reinwardtii*) memiliki kandungan kumarin, flavonoid, kalkon dan iridoit yang diprediksikan bisa menghambat aktivitas tirosinase (Kittagawa *et al.* 1988; Topcu *et al.* 1990; Lin *et al.* 1993; Steffan *et al.* 2005; Chen *et al.* 2008; Rattanappani *et al.* 2012).

Penggunaan senyawa alam terbukti lebih baik dan aman dibandingkan senyawa sintesis dalam

menghambat metabolisme pigmentasi. Beberapa analog kumarin, esculetin, diisolasi dari biji *Euphorbia lathyris* dan menunjukkan seperempat dari aktivitas antitirosinase asam kojat (Masamoto *et al.* 2003). Senyawa analog kumarin baru-baru ini terbukti merupakan substrat tirosinase dari jamur (Sollai *et al.* 2008). Analog kumarin yang lain yaitu 9-hidroksi-4-metoksipsoralen yang diisolasi dari *Angelica dahurica* terbukti enam kali memiliki aktivitas inhibisi tirosinase dari pada asam kojat (Piao *et al.* 2004).

Baru-baru ini teknologi bioinformatik menemukan struktur tiga dimensi tirosinase, maka pembentukan kompleks protein-ligan sebagai inhibitor dapat diprediksi dengan simulasi komputasi, dimana prediksi ikatan dan perubahan konformasi kompleks dapat diketahui. Salah satu cara untuk mengetahui apakah terjadi interaksi ligan dengan protein adalah dengan simulasi *docking*. Simulasi *docking* adalah suatu simulasi perhitungan mekanika kuantum dan penghitungan energi bebas ikatan suatu senyawa (ligan) terhadap reseptor (dalam hal ini protein) untuk mengetahui apakah senyawa tersebut mampu berinteraksi dengan reseptor (Leach 2001; Luchintes 2004; Funkhouser 2007). Pertimbangan untuk melakukan penelitian ini melalui pendekatan *molecular docking* adalah cara ini akan membantu menseleksi komponen senyawa yang akan diuji secara *in vitro* sehingga membuat pekerjaan ekstraksi, isolasi, dan elusidasi senyawa aktif menjadi lebih efisien.

Mekanisme kerja enzim diduga akan menghasilkan senyawa yang lebih berdaya guna. Senyawa yang lebih menghambat kejadian dan proses yang spesifik dalam sistem pigmentasi. Diantara pilihan yang ada, penggunaan komponen bahan alam yang memiliki sifat memperbaiki dan kinerja lebih baik dari sintesis dapat dicoba pada enzim tirosinase. Oleh karena itu, Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan senyawa yang berasal dari tanaman asli Indonesia terpilih (pulosari dan secang) yang dapat berfungsi sebagai inhibitor tirosinase. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kandidat senyawa polifenol penghambat tirosinase dari pulosari dan secang yang berasal dari ekstrak etanolnya. Selain itu didapatkan pula bukti ilmiah penggunaan bahan alam gabungan



dalam bentuk ekstrak kasar terkait keberadaan senyawa kandidat yang dapat menghambat. Hasil lain yang diharapkan dalam penelitian ini adalah didapatkan alur/model bagi penelitian bahan alam berdasarkan database yang ada sehingga dapat dihindari pengulangan penelitian yang telah dilakukan, sehingga akan mempercepat aplikasi penerapan bahan-bahan alam. Manfaat penelitian ini diharapkan dapat mendukung pengembangan produk pemutih kulit yang akan membantu masyarakat dunia untuk memperoleh senyawa-senyawa dalam ekstrak yang ampuh dan meningkatkan penggunaan bahan-bahan alam Indonesia serta mampu mengeksplorasi sumber alam kekayaan Indonesia ke kancah dunia. Riset ini juga diperlukan untuk mengembangkan produk-produk lebih jauh lagi sebagai bahan-bahan fitofarmaka modern yang nantinya dapat diakui di pasar dan diekspor ke negara lain.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka LPPM Institut Pertanian Bogor dan Laboratorium Kimia Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang tanaman pulosari dan secang dari daerah Bogor, etanol, bufer fosfat pH 6.5, NH_4OH , alkohol, HCl 37%, etanol 95%, DMSO, L-DOPA, L-tirosin, asam kojat, dan enzim tirosinase dari jamur (Sigma, 333 unit/mL dalam bufer fosfat). Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-UV 1700), *multi-plate reader*, *multi-well plate*, penguap putar, dan alat-alat gelas.

Uji *in-vitro* aktivitas inhibitor tirosinase

Preparasi awal sampel dilakukan dengan mengambil sampel kulit batang dari secang dan pulosari. Sampel dikeringkan dan diserbukkan. Serbuk yang dihasilkan dimaserasi menggunakan etanol sebanyak 3 kali ulangan. Ekstrak yang diperoleh kemudian disaring dan filtratnya dipekatkan dengan menggunakan penguap putar pada suhu 30 °C.

Uji aktivitas inhibitor tirosinase (Batubara *et al.* 2010), ekstrak tanaman pulosari dilarutkan di dalam DMSO hingga konsentrasi 20 mg/mL. Larutan stok disiapkan dengan cara melarutkan ekstrak pekat ke

dalam bufer fosfat 50 mM (pH 6.5) hingga diperoleh konsentrasi 600 $\mu\text{g/mL}$. Setelah itu, ekstrak diuji dengan konsentrasi 31–2000 $\mu\text{g/mL}$. Asam kojat sebagai kontrol positif juga diuji pada variasi konsentrasi yang sama dalam pelat tetes 96 sumur. Ekstrak sampel masing-masing ditambahkan sebanyak 70 μL ke dalam pelat tetes 96 sumur. Kemudian ke dalam tiap sumur ditambahkan 30 μL enzim tirosinase (Sigma, 333 unit/mL dalam bufer fosfat) dan campuran diinkubasi selama 5 menit. Setelah itu, sebanyak 110 μL substrat (L-tirosin 2 mM atau L-DOPA 12 mM) ditambahkan dan campurannya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Larutan pada masing-masing sumur diukur absorbansnya dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 492 nm untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambat 50% (IC_{50}). Persen inhibisi dihitung dengan cara membandingkan absorbans sampel tanpa penambahan ekstrak (A) dan dengan penambahan ekstrak (B) pada panjang gelombang 492 nm.

Uji *in-silico*

Preparasi tirosinase, sekuen tirosinase dapat diunduh dari *database* NCBI yang ada di *National Center for Biotechnology Information* melalui alamat situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/flu/> dengan menggunakan perangkat komputer yang terhubung dengan *internet*. Sekuen dari hasil searching dialignment menggunakan program Clustal W2. Program Clustal W2 disediakan secara online dengan mengakses www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html. Hasil *alignment* diinterpretasikan dengan score yang paling tinggi. Proses *editing alignment* digunakan *software* Bioedit. Pencarian struktur tiga dimensi tapak sekuen dilakukan dengan menggunakan Swiss model yang dapat diakses melalui <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>. yang dilakukan dengan menggunakan bantuan perangkat komputer yang terhubung dengan *internet*. Sistem operasi yang digunakan adalah *Microsoft Windows XP* dengan *browser Mozilla Firefox 2.0*. selanjutnya hasil struktur tiga dimensi dioptimasi geometri dan minimisasi energi struktur tiga dimensi tirosinase dilakukan menggunakan *software* MOE yang telah diunduh dengan format pdb. Kemudian dilakukan penambahan atom



hidrogen dan dilakukan protonasi dengan program protonate 3D. Selanjutnya dilakukan pengaturan muatan partial dengan menggunakan partial charge dan optimasi dengan force field MMFF94x. Saat optimasi, solvasi enzim dalam bentuk gas phase dan dilakukan fix charge dengan RMS gradient 0.05 kcal/Amol, dan parameter yang lain menggunakan standar yang telah ada di software MOE.

Perancangan senyawa bioaktif, senyawa bioaktif dari pulosari dan secang dari studi jurnal dimodelkan ke dalam struktur tiga dimensi. Pemodelan ini dilakukan dengan menggunakan *software ACD Labs*. Bentuk tiga dimensi didapatkan dengan menyimpan dalam 3D viewer pada ACDLabs, dan struktur tiga dimensi disimpan dalam format MDL molfile. Selanjutnya format MDL Molfile diubah kedalam format MDL Mol menggunakan *software* Vegazz agar sesuai untuk proses *docking*. Selanjutnya kandidat ligan yang dirancang disimpan dalam format Mol dibuka dengan *software* MOE dalam bentuk *database viewer*. Selanjutnya ligan di *wash* dengan program *compute*, dilakukan penyesuaian muatan *partial* ligan dengan *partial charge* dan optimasi menggunakan *forcefield* MMFF94. Selanjutnya ligan diminimasi menggunakan *energy minimize* dengan RMS gradient 0.001 Kcal/Amol. Parameter lainnya sesuai dengan *default* yang ada dalam *software docking tirosinase* terhadap ligan. Proses *docking* diawali dengan preparasi *file docking* yang dilakukan dengan menggunakan program *docking* yang terdapat dalam *software MOE*.

Simulasi *docking* dilakukan dengan program *Compute-Simulation dock* dengan *operating system* Microsoft Windows XP Professional. Metode penempatan menggunakan *triangle matcher* dengan pengulangan pembacaan energi tiap posisi 2.000.000 dan parameter yang lain sesuai yang ada dalam MOE. Selanjutnya *scoring function* menggunakan longdon dG, *refinement forcefield* dengan konfigurasi pengulangan populasi 1000. Pengulangan yang pertama sebanyak seratus (100) kali dan pengaturan kedua hanya ditampilkan satu dari hasil yang terbaik dari 100 pengulangan.

Analisis *docking*, Hasil pembentukan kompleks docking enzim ligan ditampilkan dalam *database viewer output* pada halaman MOE. Parameter yang ditampilkan dan digunakan untuk analisis adalah energi bebas ikatan (Gbinding), Log P, bobot molekul,

konstanta inhibisi, ikatan hidrogen, konformasi inhibitor terhadap *binding site* enzim. Analisis dilakukan terhadap ligan kandidat dan sebagai parameter dilakukan analisis terhadap pembandingan asam kojat dan L-dopa.

Hasil dan Pembahasan

Penapisan aktivitas ekstrak kasar etanol sampel pulosari dilakukan untuk mengetahui ekstrak yang berfungsi sebagai inhibitor enzim tirosinase. Aktivitas inhibitor enzim tirosinase ditunjukkan dari daya inhibisi yang tertera pada Tabel 1. Ekstrak etanol yang digunakan adalah kulit batang pulosari dan secang, dengan pembandingan asam kojat dan parameter L-DOPA. Tabel 1 menunjukkan bahwa sampel yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim tirosinase yang baik adalah campuran antara pulosari dan secang dengan komposisi 1:1. Beberapa senyawa flavonoid yang diketahui memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim tirosinase diantaranya golongan senyawa flavonol (kuersetin), flavon (noratokarpetin), flavanon (stepogenin), flavanol (dihidromorin dan taksifolin), isoflavan (gliasperin C, glabridin), kalkon, dan isoflavon (Kalikosin) (Chang *et al.* 2009).

Hasil yang diperoleh mendukung pendugaan senyawa aktif gabungan dari keduanya banyak mengandung senyawa flavonoid dan kumarin. Dimana senyawa golongan flavonol telah diketahui mempunyai potensi sebagai inhibitor tirosinase. Senyawa flavonol yang aktif sebagai inhibitor tirosinase diantaranya adalah kaempferol, misertin, dan kuersetin (Chang *et al.* 2009). Perbedaan senyawa flavonol dengan senyawa flavonoid lainnya dapat dilihat dari strukturnya. Senyawa flavonol memiliki gugus 3-hidroksi. Hal ini juga yang dapat menyebabkan flavonol lebih aktif sebagai inhibitor tirosinase. Sisi tempat gugus hidroksi menempel pada struktur benzena dan juga jumlah gugus hidroksil pada suatu flavonoid berperan penting dalam proses penghambatan aktivitas enzim tirosinase (Donghyun *et al.* 2006). Hal ini ditunjang oleh data dari hasil uji in-silico pada Tabel 2. Dari hasil uji in-silico pendekatan docking interaksi antara enzim tirosinase dengan ligan dari senyawa bioaktif pulosari dan secang SI sebagaimana Tabel 2. Hasil docking menunjukkan bahwa dari 8 senyawa bioaktif dari pulosari (Rattanappani *et al.* 2012) dan 13 senyawa



bioaktif dari secang (Chen *et al.* 2008) dengan enzim tirosinase, ada 4 senyawa aktif yang mampu menghambat tirosinase lebih baik dan memiliki energi Gibbs rendah dibandingkan dengan senyawa pembanding asam kojat. Energi Gibbs ikatan merupakan energi ikatan antara enzim dengan inhibitor pada kondisi kesetimbangan, maka dengan terhitungnya energi gibbs kekuatan dan kestabilan interaksi antara kompleks enzim dan ligan dapat diketahui. Dalam *software* MOE energi Gibbs dilambangkan dengan S yang menunjukkan jumlah total dari tahapan akhir docking. Nilai S memiliki *score* yang sama dengan E_{refine} , dimana E_{refine} merupakan energi total dari ikatan kompleks *docking*. Dari tabel 2 menunjukkan bahwa tingkat nilai S yang paling rendah adalah senyawa SI1 dari secang dan Ar5 dari pulosari berturut-turut dengan nilai S -

15.1582 kkal/mol; 13.8982 kkal/mol dan pK_i 10.021 μ M,; 9.104 μ M dan lebih rendah dibandingkan dengan senyawa pembanding asam kojat dengan S - 8.8047 kkal/mol. Dimana ΔG adalah energi bebas gibbs, R adalah tetapan gas konstan (J/mol K), T adalah temperatur absolut (K) dan KA adalah konstanta aktifitas enzim, K_i adalah konstanta inhibitor (Kitchen *et al.* 2004) Dari persamaan diatas, maka semakin kecil nilai K_i kesetimbangan reaksi dan afinitas ikatan cenderung stabil dalam pembentukan kompleks. Data *docking* dari *software* MOE menunjukkan nilai konstanta inhibisi dalam pK_i . Artinya semakin besar nilai pK_i , maka ligan memiliki K_i yang kecil. Maka nilai pK_i ini dapat digunakan untuk mengetahui tingkat keefektifan dalam pembentukan kompleks enzim dengan ligan.

Tabel 1. Hasil uji penghambatan ekstrak etanol terhadap tirosinase

Nama sampel	Identitas sampel	Parameter		Hasil (ppm)
Secang	Ekstrak etanol 90%	IC ₅₀ -enzim tirosinase	L-DOPA	797.090
Pulosari	Ekstrak etanol 90%			1962.934
campuran	(SI:Ar) = (1:1)			415.897
Asam Kojat				93.557

Tabel 2. Hasil *docking* dan minimasi energi antara ligan dengan tirosinase

Ligan	Ar1	Ar5	SI1	SI8	L-dopa	AK
Energi	-12.1661	-14.8982	-15.1582	-13.3378	-9.8247	-8.9047
pK_i	7.979	9.104	10.021	8.331	5.592	4.976
H Don						
Hacc	5	6	6	8	3	5

Ket : Ar1: Scopoletin, Ar5: Zheberesinol, SI1: Brazilin, SI8: Rhamnitin, AK: Asam kojat

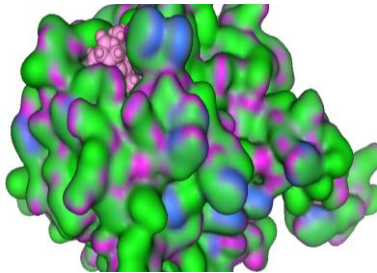


Dari hasil *docking* nilai pKi dari ligan SI1 dan Ar5 yaitu 10.021 μ M; 10.021 μ M, nilai ini menunjukkan bahwa ligan SI1 dan Ar8 memiliki afinitas dan berinteraksi lebih kuat dalam membentuk kompleks dengan tirosinase dibandingkan dengan senyawa pembanding dengan pKi 4.976 μ M. Analisis ikatan hidrogen dan interaksi merupakan gaya antramolekul yang terjadi pada atom yang memiliki keelektronegatifan tinggi dengan hidrogen yang terikat secara kovalen pada atom elektronegatif. Ikatan hidrogen dari kompleks tirosinase dengan ligan hasil *docking* diidentifikasi dengan *software* MOE program LigX *interactions*. Hasil identifikasi ikatan hidrogen antara residu asam amino tirosinase dengan ligan SI1 dan Ar8 dan ligan pembanding seperti dalam Tabel 2.

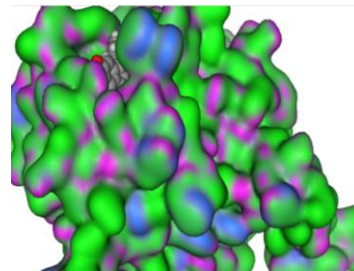
Dari Tabel 2 menunjukkan bahwa ligan SI1 dan Ar5 dan ligan standar asam kojat membentuk ikatan hidrogen secara berturut-turut 6, 6 dan 3 ikatan. Ikatan hidrogen berperan terhadap afinitas ligan dalam membentuk kompleks dengan enzim tirosinase hal ini disebabkan adanya interaksi elektrostatik antara atom oksigen atau hidrogen ligan dengan atom hidrogen asam amino ataupun sebaliknya. Kontak residu merupakan interaksi residu enzim tirosinase dengan ligan (inhibitor). Interaksi yang terjadi antar kompleks enzim ligan adalah interaksi

hidrogen, selain itu juga terjadi interaksi non kovalen yang sangat mempengaruhi stabilitas enzim. Interaksi hidrofob yang menyebabkan protein dapat mempertahankan integrasinya karena *folding*, serta interaksi aromatik yang mempengaruhi stabilitas struktur tersier. Kontak residu antara ligan dengan enzim tirosinase hasil *docking* dapat diketahui dengan *software* MOE program LigX *interaction*. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kontak residu antara semua ligan dengan tirosinase menunjukkan mekanisme penghambatan kompetitif dengan substrat yaitu L-DOPA memiliki konformasi penempatan penghambatan sama dengan ligan-ligan lainnya.

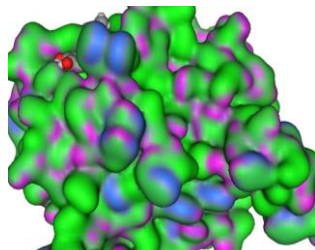
Gambar 1-6 menunjukkan bahwa interaksi ligan dengan sisi katalitik tirosinase terlihat bahwa senyawa SI1 dan Ar5 memiliki interaksi lebih baik dibandingkan dengan senyawa asam kojat. Menurut hasil ini melalui pendekatan *docking* bahwa senyawa diatas dapat digunakan sebagai senyawa inhibitor tirosinase. Pemberian ekstrak yang bersamaan dalam in-vitro membuktikan bahwa kedua tanaman ini mengandung senyawa golongan flavonoid dan kumarin yang telah diketahui mempunyai potensi sebagai inhibitor tirosinase. Senyawa flavonol yang aktif sebagai inhibitor tirosinase diantaranya adalah kaempferol, misertin, dan kuersetin (Chang 2009).



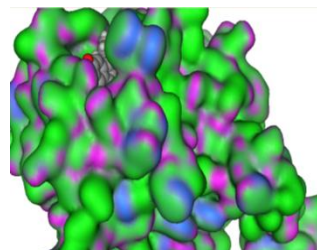
Gambar 1. Kompleks Ar1-tirosinase



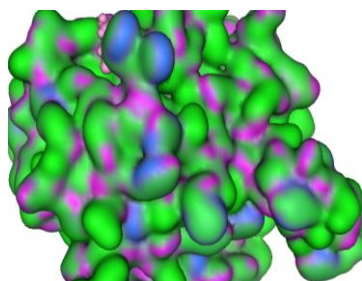
Gambar 2. Kompleks Ar5-tirosinase



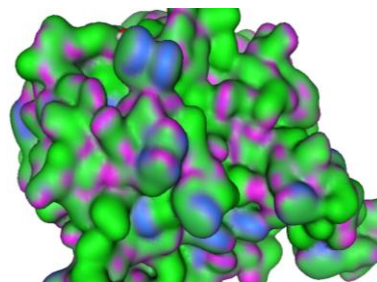
Gambar 3. Kompleks SI1-tirosinase



Gambar 4. Kompleks SI8-tirosinase



Gambar 5. Komplek asam kojat-tirosinase



Gambar 6. Komplek L-DOPA-tirosinase

Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gabungan ekstrak etanol kulit batang pulosari dan secang dapat digunakan sebagai inhibitor tirosinase, melalui pendekatan *in silico* senyawa dalam Ar dan SI memiliki nilai inhibisi yang lebih baik dibandingkan senyawa pembanding asam kojat dan sebagai ligan kompetitif yang mengisi katalitik site sesuai dengan konformasi L-DOPA. Pembuktian secara *in vitro* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak yang bersamaan memiliki nilai inhibisi yang lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian masing-masing ekstrak.

Daftar Pustaka

- Artés F, Castañer M, Gil MI. 1998. Review: enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 4:377-389.
- Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. 2003. Dopamine- or L-DOPA induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*. 5:165-176.
- Steffan B, Wätjen W, Michels G, Niering P, Wray V, Ebel R, Edrada R, Kahl R, Proksch P. 2005. Polyphenols from plants used in traditional Indonesian medicine (Jamu): uptake and antioxidative effects in rat H4IIE hepatoma cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 57:233-240.
- Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T, Rahminiwati M, Djauhari E. 2010. Potency of Indonesia medicinal plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. *Journal of Biological Sciences*. 10:138-144.
- Chang TS. 2009. An update review of tyrosinase inhibitors. *J Mol Sci* 10:2440-2473.
- Donghyun K, Jiyeoun P, Jinhee K, Cheolkyu H, Jeonghyeok Y, Namdoo K, Jinho S, Choonghwan L. 2006. Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: a fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:935-941.
- Funkhouser, Thomas. 2007. *Lecture : Protein-Ligand Docking Methods*. Princeton University.
- Topcu G, Che CT, Cordell GA, Ruangrunsi N. 1990. Iridolactones from *Alyxia reinwardti*. *Phytochemistry*. 29(10), 3197-3199.
- Kitagawa I, Shibuya H, Baek NI, Yokokawa Y, Nitta A, Wiriadinata H, Yoshikawa M. 1988. Pulosarioside, a new bitter trimeric-iridoiddiglucoside from an Indonesian Jamu, the bark of *Alyxia reinwardtii* BL. (Apocynaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 36:4232-4235
- Lin LJ, Lin LZ, Ruangrunsi N, Cordell GA. 1993. 3-Hydroxycoumarin glycosides from *Alyxia reinwardtii* var. *Lucida*. *Phytochemistry*. 34:825-830.
- Leach RA. 2001. *Molecular Modelling Principle and Application*. Ed ke-2. Chichester (UK) : Pearson Education Limited.
- Lucientes, Gil MT. 2004. *Protein Docking and Interactions Modeling*
- Masamoto Y, Ando H, Murata Y, Shimoishi Y, Tada M, Takahata K. 2003. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculentin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67:631-634.
- Piao XL, Baek SH, Park MK, Park JH. 2004. Tyrosinase-inhibitory furanocoumarin from *Angelica*



- dahurica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27:1144-1146.
- Rattanapani J, Sichaem J, Tip-pyang S. 2012. Chemical Constituents and Antioxidant Activity from the Stems of *Alyxia reinwardtii*. *Records of Natural Products*. 6:3. 288-291
- Seo SY, Sharma VK, Sharma N. 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:2837-2853.
- Sollai F, Zucca P, Sanjust E, Steri D, Resciqno A. 2008. Umbelliferone and esculetin: inhibitors or substrates for polyphenol oxidases. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 31:2187-2193.
- Xu Y, Stokes AH, Roskoski RJr. Vrana KE. 1998. Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *Journal of Neuroscience Research*. 54:691-697.
- Chen YP, Liu L, Zhou YH, Wen J, Jiang Y, Tu PF. 2008. Chemical constituents from *Sappan lignum*. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*. 17:82-86.
- Zheng ZP, Cheng KW, Chao J, Wu J, Wang M. 2007. Tyrosinase inhibitors from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). *Journal Food Chemistry*. 106:529-535.

