

Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% dan Etil Asetat Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg Sebagai Inhibitor Tirosinase.

Herson Cahaya Himawan¹, M.Si., Antonius Padua Ratu², M Far Apt., Maya Miani³

1. Program Studi Farmasi Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor
2. Program Studi Farmasi Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor
3. Mahasiswa Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor

Korespondensi: hersonindonesia2011@gmail.com

ABSTRAK

Melanin merupakan zat yang memberi warna coklat atau coklat kehitaman pada kulit. Tirosinase merupakan enzim utama dalam proses biosintesis melanin.. Pemanfaatan daun sukun berdasarkan senyawa kimia yang terkandung didalamnya seperti flavonoid dan tanin yang merupakan senyawa turunan fenol akan dilakukan Uji aktivitas inhibisi tirosinase. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui adanya daya inhibisi tirosinase pada ekstrak etanol 70% dan ekstrak etil asetat daun sukun. Perolehan ekstraksi dengan cara maserasi, selanjutnya diuapkan dengan alat pemisahan (*rotary vacuum evaporator*). Maserat yang diperoleh dibuat deret standar masing-masing larutan sampel dari konsentrasi 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 ppm dan asam kojat sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 ppm kemudian masing-masing sampel diuji aktivitas inhibisi tirosinase.

Berdasarkan hasil penelitian, aktivitas inhibisi tirosinase tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak etil asetat daun, karena memiliki nilai IC_{50} lebih kecil dibanding ekstrak etanol 70% daun sukun. Nilai IC_{50} pada ekstrak etil asetat adalah 245,43ppm, sedangkan nilai IC_{50} pada ekstrak etanol 70% adalah 3143,21 ppm. Namun aktivitas inhibisi tirosinase ekstrak etanol 70% dan etil asetat daun sukun tersebut lebih rendah dibandingkan dengan asam kojat sebagai kontrol positif yang mempunyai nilai IC_{50} 19,36 ppm, yang memiliki nilai IC_{50} jauh lebih kecil. Karena semakin kecil nilai IC_{50} semakin besar daya inhibisi tirosinase.

Kata kunci :*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg, Enzim tirosinase, Flavonoid, Inhibitor tirosinase, Melanin.

ABSTRACT

Melanin is a substance that gives brown or blackish brown on the skin. Tyrosinase is the main enzyme in biosynthesis of melanin. Utilization of breadfruit leaves based chemical compounds therein such as flavonoids and tannins which are derivatives of phenol. Then tested of tyrosinase inhibitory activity. The purpose of this study was to determine the power of inhibition of tyrosinase at ethanol extracts 70% and ethyl acetate extracts of leaves of breadfruit. Acquisition of extraction by maceration, subsequently evaporated by means of separation (*rotary vacuum evaporator*). Maserate were obtained for a each standard series of concentration 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 ppm and kojic acid as positive control with concentration 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 ppm, then each sample tested the inhibitory activity of tyrosinase. Based on the results of the study for the highest tyrosinase inhibitory activity shown by ethyl acetate extract of leaves of breadfruit, because it value smaller IC_{50} than ethanol extracts 70% of leaves of

breadfruit. The value IC_{50} the ethyl acetate extract was 245,43 ppm, while the value IC_{50} the is 3143,21 ppm. However the activity of tyrosinase inhibition of ethanol extracts 70% and ethyl acetate extract of leaves of breadfruit was lower than kojic acid as positive control that has a value IC_{50} is 19,36 ppm, because the smaller the value IC_{50} The greater power inhibition of tyrosinase.

Keywords : *Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg, Enzyme tyrosinase, Flavonoids, Inhibitor of tyrosinase, Melanin.

PENDAHULUAN

Kekayaan alam di Indonesia sangat melimpah baik itu hayati maupun non hayati. Pada kulit manusia sering timbul bercak berwarna coklat, terutama ditemukan pada orang yang kulitnya sering terbakar oleh sinar matahari, kondisi tersebut dikenal sebagai hiperpigmentasi. Hiperpigmentasi dapat terjadi akibat produksi melanin yang berlebih.. Pembentukan melanin dapat dihambat dengan berbagai cara diantaranya menurunkan sintesis tirosinase, menurunkan transfer tirosinase dan menghambat aktivitas enzim tirosinase. Kerja enzim tirosinase ini dapat dihambat dengan senyawa inhibitor tirosinase dimana pada penelitian yang dilakukan oleh [1] Supriyanti (2009) menyebutkan bahwa senyawa flavonoid diduga memiliki efek depigmentasi. Mekanisme antioksidan dan inhibitor tirosinase erat kaitannya dengan enzim tirosinase dimana keduanya melakukan aktivitas pencegahan agar enzim tirosinase tidak dapat mengoksidasi L-dopa menjadi dopakuinon karena jumlah produk dopakuinon sebanding dengan jumlah produk melanin (Shosuke, 2003). Inhibitor tirosinase telah banyak ditemukan dalam bahan kosmetik sebagai pencegah hiperpigmentasi. Salah satu yang digunakan adalah asam kojat. Namun menurut [2] asam kojat bersifat karsinogenik. Berdasarkan hal itu perlu dihasilkan bahan pemutih kulit lain yang bersifat alami. Bahan tersebut diduga terdapat pada daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg) karena kandungan flavonoid dan tanin yang dimilikinya. Senyawa tersebut merupakan turunan fenol yang berkaitan dengan mekanisme antioksidan agar kerja enzim tirosinase dapat dihambat.

Flavonoid pada daun sukun memiliki aktivitas langsung terhadap inhibisi enzim tirosinase.

METODE PENELITIAN

Bahan Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun sukun (*Artocarpus altilis*), Aqua destilata, Etil asetat teknis, etanol 70%, DMSO (Dimetil sulfoksida), larutan buffer fosfat 0.1 M (pH 6,5), larutan L-tirosin 2 mM, Enzim tirosinase ($\Sigma = 333$ u/ml), Asam kojat, amil alkohol, HCl, etanol 95%, serbuk Mg, larutan $FeCl_3$, dietil eter, larutan H_2SO_4 pekat, CH_3COOH anhidrat, larutan asam sulfat 2 M, pereaksi dragendorf, pereaksi mayer, pereaksi wagner, larutan NaOH 10%.

Alat Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah microplate, gelas ukur, sudip, erlenmeyer, tabung reaksi, pipet tetes, mikropipet, kertas saring Whatman No.1, corong, timbangan analitik, kaca arloji, sonikator, alat pemisahan (*rotary vacuum evaporator*), gelas piala, grinder, oven, desikator, alluminium foil, botol semprot, dan untuk keperluan analisis digunakan *Elisa Reader EPOCH*.

Metode

Pengambilan Sampel

Sampel daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg) diambil di Kebun Percobaan Unit Konservasi Budidaya Biofarmaka (UKBB) Pusat Studi Biofarmaka IPB di Cikabayan, Dramaga, Bogor dan ekstraknya dibuat di Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka IPB.

Persiapan Sampel

Persiapan sampel daun sukun yang berwarna hijau tua, dibersihkan (sortasi), kemudian dicuci yang bersih dengan air yang mengalir, tiriskan, lalu dirajang, dikeringkan di oven pada suhu 40-50 °C selama ±5 hari, setelah itu dihaluskan sehingga terbentuk ukuran sebesar mesh 80.

Uji Kadar Air Dalam Bentuk Serbuk

Cawan porselin dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 30 menit,

Kadar air menggunakan rumus sebagai berikut:

Kadar Air = $\frac{\text{bobot sampel basah} - \text{bobot sampel kering}}{\text{bobot sampel basah}} \times 100 \%$

Ekstraksi

Cara ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Sampel daun sukun dalam bentuk serbuk ditimbang dua kali sebanyak 25 gram, pelarut masing-masing yang digunakan adalah etanol 70% dan etil asetat sebanyak 250 ml, dengan merendam serbuk kering daun sukun selama 2x24 jam dengan mengganti pelarut setiap 24 jam dan dilakukan 2 kali ulangan. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya dipekatkan untuk mengetahui persentase rendemen. Pemekatan dilakukan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50-55 °C untuk mencegah kemungkinan terjadinya kerusakan komponen yang terkandung dalam ekstrak.

Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase

Potensi inhibisi dari masing-masing kombinasi diuji terhadap reaksi enzimatis -tirosinase. Sampel dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (konsentrasi 10000 ppm) kemudian dibuat deret standar dengan melarutkan larutan sampel dalam larutan buffer fosfat 0,1 M (pH 6.5) dimulai dari konsentrasi paling besar 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 ppm pada *microtiter*. Sebagai kontrol positif, sampel menggunakan asam kojat dan dibuat larutan induk (konsentrasi 500 ppm) dengan cara melarutkan asam kojat sebanyak 5 gram dalam pelarut buffer fosfat 0,1 M (pH 6.5) 10 ml, Setelah itu dibuat deret standar

lalu cawan didinginkan didalam eksikator selama 30 menit dan ditimbang bobot kosongnya. Sampel serbuk daun sukun ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian dimasukan kedalam cawan porselin. Sampel beserta cawan dipanaskan pada suhu 105°C selama 3 jam didalam oven kemudian didinginkan dalam eksikator selama 30 menit, cawan beserta isinya ditimbang. Penentuan kadar air dilakukan sebanyak 2 kali ulangan (duplo).

dengan mengencerkan larutan induk dalam pelarut buffer fosfat 0,1 M (pH 6.5) dimulai dari konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 ppm pada *microtiter*. Masing-masing sampel sebanyak 70 µl Selanjutnya ditambah larutan L-tirosin 2 mM 110 µl dan larutan tirosinase ($\Sigma = 333$ u/ml) 30 µl Pada setiap lubang *microtiter*. Setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 492 nm dengan menggunakan *ELISA Reader EPOCH*. [3].

Aktivitas inhibisi diukur dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi tirosinase} = \frac{A - B}{A} \times 100 \%$$

A = Absorbansi larutan tanpa sampel atau kontrol positif.

B = Absorbansi dengan penambahan sampel.

Analisa data

1. Kurva kalibrasi dan penentuan nilai IC_{50} sampel diolah dengan statistik korelasi regresi : $Y = A \ln(X) + B$
2. Aktivitas inhibisi tirosinase ditentukan oleh besarnya hambatan serapan antara absorbansi reaksi positif tirosin-tirosinase dengan absorbansi sampel yang diukur dengan *ELISA Reader EPOCH*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengujian Kadar Air

Kadar air merupakan banyaknya air yang terkandung dalam bahan yang dinyatakan dalam persen. Kadar air dalam suatu sampel ikut menentukan kesegaran dan daya awet sampel tersebut, kadar air yang tinggi mengakibatkan mudahnya bakteri, kapang, dan khamir untuk berkembang biak, sehingga akan terjadi perubahan pada sampel atau bahan uji). Penetapan kadar air yaitu tidak lebih dari 10% [4]

Berdasarkan pada hasil penelitian penentuan kadar air, maka diperoleh hasil rata-rata kadar air pada simplisia daun sukun yaitu 8,49%. Sehingga memenuhi persyaratan yang ditetapkan dalam MMI.

Hasil Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel menghasilkan nilai rata-rata rendemen ekstrak etanol 70% sebesar 8,76% lebih tinggi dari pada

ekstrak etil asetat daun sukun yang sebesar 5,31%, hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang terekstrak pada pelarut ekstrak etanol 70% lebih banyak dibandingkan dengan pelarut etil asetat.

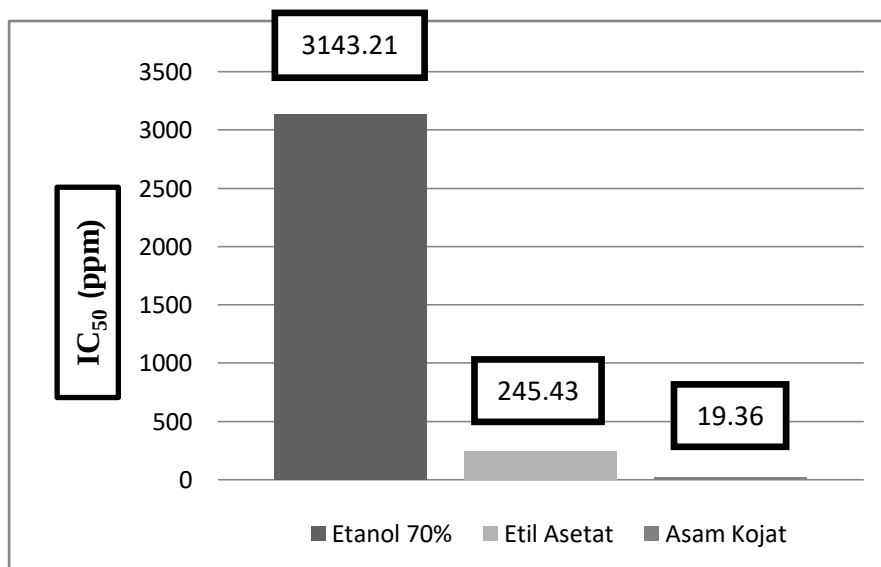
Pengujian Aktivitas Inhibisi Tirosinase

Enzim ini bereaksi dengan substrat menghasilkan warna, warna yang timbul dapat ditentukan secara kualitatif dengan pandangan mata atau kuantitatif dengan pembacaan nilai absorbansi optical density (OD) pada *ELISA plate Reader* [5]

Pada hasil pengamatan ini warna enzim setelah ditambah dengan substrat menghasilkan produk dengan warna cokelat. Menandakan adanya reaksi enzimatis atau menunjukkan adanya daya inhibisi secara visual intensitas warna coklat akan berkurang.

Tabel 1. Rata-rata Persen Inhibisi Tirosinase Ekstrak Etanol 70% Daun Sukun, Ekstrak Etil Asetat Daun Sukun, dan Asam Kojat.

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata % inhibisi tirosinase Ekstrak etanol 70% daun sukun	Rata-rata % inhibisi tirosinase Ekstrak etil asetat daun sukun	Rata-rata % inhibisi tirosinase asam kojat
2000	40,37	80,27	-
1000	38,23	79,36	-
500	39,30	61,47	100,23
250	38,00	39,98	99,31
125	39,30	34,40	97,78
62,5	32,95	36,09	87,84
31,25	18,42	20,41	54,74
15,63	2,52	12,00	35,55

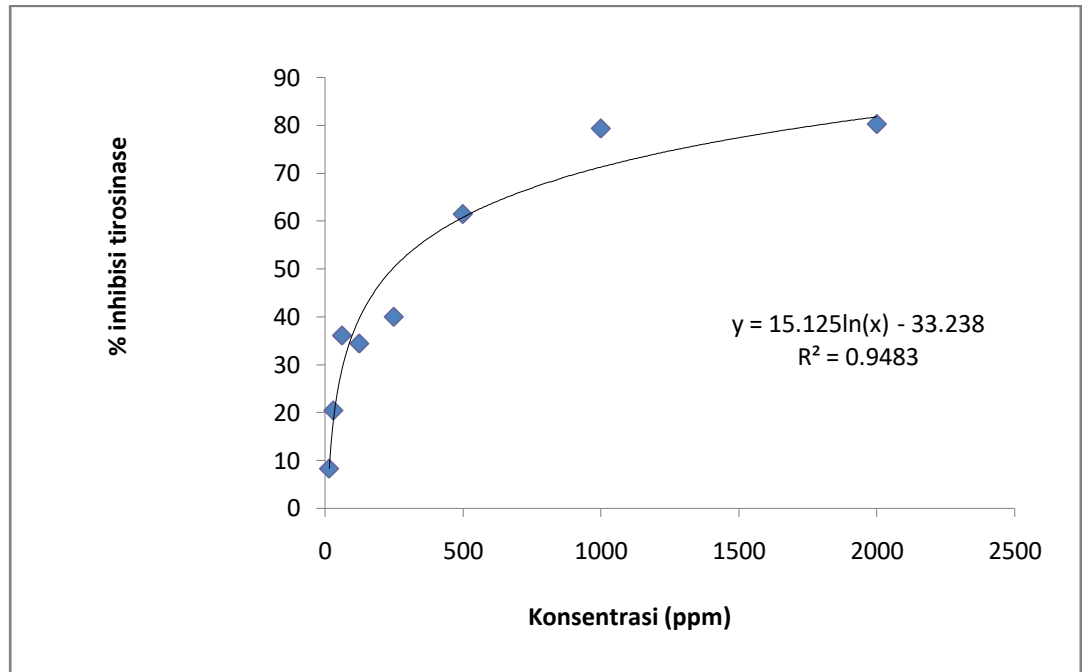


Gambar 1. Grafik IC₅₀ Ekstrak Etanol 70% dan Etil Asetat Daun Sukun Terhadap Enzim Tirosinase

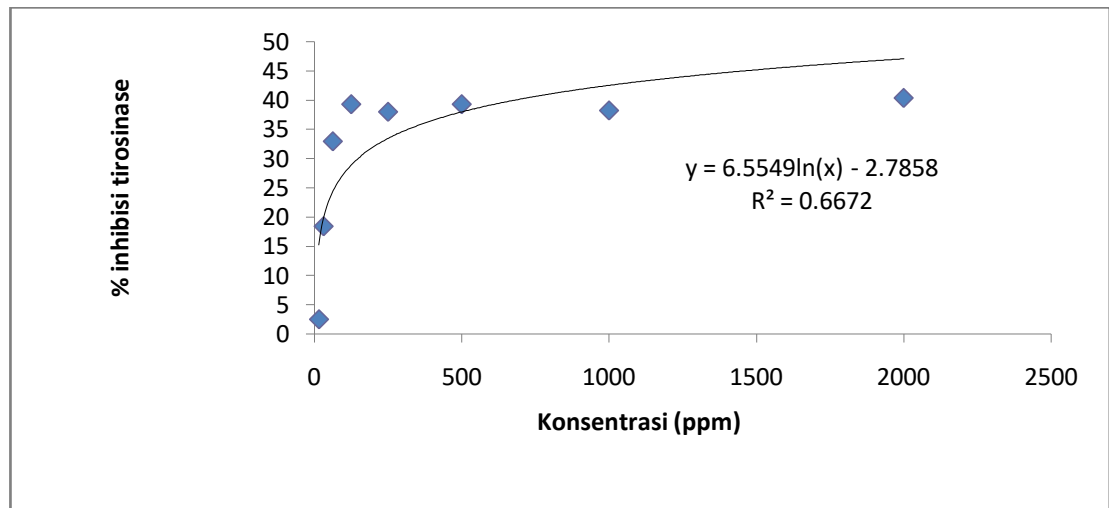
Persentase inhibisi ini didapatkan dari perbedaan serapan antara absorbansi sampel dengan absorbansi tirosin-tirosinase yang diukur dengan spektrofotometer *ELISA Reader EPOCH*. Aktivitas inhibisi tirosinase dinyatakan dengan nilai IC₅₀. Nilai ini adalah konsentrasi larutan sampel yang mampu menghambat 50% enzim tirosinase. Semakin rendah nilai IC₅₀ dari suatu inhibitor tirosinase maka semakin kuat daya inhibitor tersebut.

Pada konsentrasi sampel yang sama kedua ekstrak memperlihatkan daya inhibisi yang berbeda-beda. Perbedaan daya inhibisi ini diduga karena adanya perbedaan jenis senyawa bioaktif yang terkandung atau jumlah senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai inhibitor tirosinase

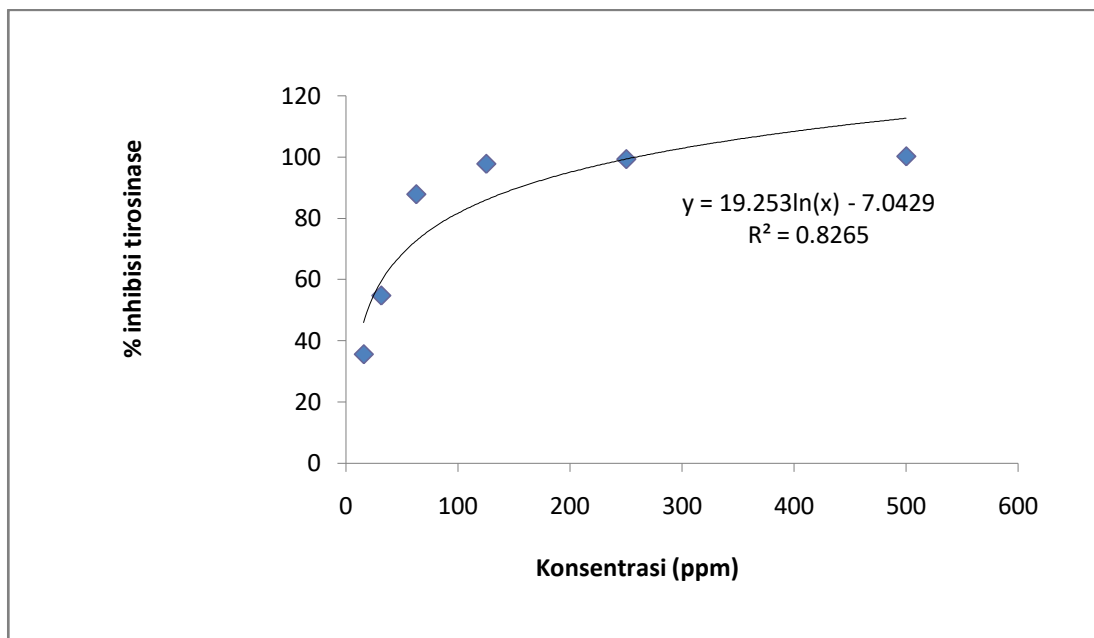
yang dapat terekstrak oleh etil asetat dan etanol 70%. Dilihat dari kandungan senyawa daun sukun yang terekstrak oleh pelarut etil asetat yaitu flavonoid, saponin, tanin dan steroid, sedangkan senyawa yang terekstrak oleh pelarut etanol 70% yaitu flavonoid, saponin dan hidrokuinon. Senyawa yang diharapkan yaitu flavonoid dan tanin merupakan senyawa turunan fenol yang memiliki banyak gugus OH. Dimana kandungan flavonoid dan tanin pada daun sukun terdapat pada ekstrak etil asetat, sedangkan pada ekstrak etanol 70% hanya memiliki flavonoid saja, sehingga IC₅₀ yang dihasilkan oleh ekstrak etil asetat memiliki daya inhibisi lebih baik dibanding ekstrak etanol 70%.



Gambar 2. Kurva Persamaan Garis Antara Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat (ppm) dan % Inhibisi Tirosinase



Gambar 3. Kurva Persamaan Garis Antara Konsentrasi Ekstrak Etanol 70% (ppm) dan % Inhibisi Tirosinase



Gambar 4. Kurva Persamaan Garis Antara Konsentrasi Asam Kojat (ppm) dan % Inhibisi Tirosinase

Kurva kejenuhan suatu reaksi enzim yang menunjukkan relasi antara konsentrasi substrat dengan kelajuan. Hal ini ditunjukkan pada gambar kurva di atas. Nilai IC_{50} diperoleh dari perpotongan garis antara 50% daya hambat dengan sumbu konsentrasi dalam persamaan $Y = A \ln X + B$ dengan $Y = 50$ dan X menunjukkan IC_{50} . Berdasarkan persamaan regresi untuk ekstrak etil asetat daun sukun yaitu $Y = 15,125 \ln X - 33,238$, $R^2 = 0,9483$, maka hasil perhitungan aktivitas inhibisi tirosinase (nilai X) dengan nilai IC_{50} terhadap ekstrak etil asetat 245,43 ppm. Berdasarkan persamaan regresi untuk ekstrak etanol 70% daun sukun yaitu $Y = 6,5549 \ln X - 2,7858$, $R^2 = 0,6672$, maka hasil perhitungan aktivitas inhibisi tirosinase (nilai X) dengan nilai IC_{50} terhadap ekstrak etanol 70% 3143,21 ppm. Berdasarkan persamaan regresi untuk kontrol positif yaitu asam kojat adalah $Y = 19,253 \ln X - 7,0429$, $R^2 = 0,8265$, maka hasil perhitungan aktivitas inhibisi tirosinase (nilai X) dengan nilai IC_{50} terhadap asam kojat adalah 19,36 ppm.

SIMPULAN

Berdasarkan pada hasil penelitian yang dilakukan terhadap ekstrak etanol 70% dan etil asetat daun sukun dapat disimpulkan bahwa :

1. Nilai IC_{50} yang terbaik adalah ekstrak etil asetat karena memiliki nilai IC_{50} yang lebih kecil dari ekstrak etanol 70%. Nilai IC_{50} pada hasil penelitian pada ekstrak etil asetat daun sukun adalah 245,43 ppm dan nilai IC_{50} pada ekstrak etanol 70% adalah 3143,21 ppm, sedangkan penelitian menggunakan asam kojat memiliki nilai IC_{50} jauh lebih kecil dari ekstrak etanol 70% dan etil asetat yaitu 19,36 ppm.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut seperti kromatografi lapis kolom agar senyawa terpisah spesifik sehingga didapat konsentrasi yang tepat untuk memberikan hasil aktivitas inhibisi tirosinase yang maksimal dan perlu ditentukan juga jenis inhibitor, apakah

termasuk dalam inhibitor kompetitif atau inhibitor non kompetitif.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Supriyanti, F. 2009. *Pemanfaatan Senyawa Bioaktif Dari Ekstrak Kulit Batang Artrocarpus sp. Sebagai Inhibitor Tirosinase Pada pigmentasi Kulit. Jurnal Pengajaran MIPA Vol 13 No.1 April 2009 ISSN-0917.mm*

- [2] Miyazawa, mitsuo dan Naotaka Tamura. 2006. “*Inhibitory Compound of Tyrosinase Activity from the Sprout of Polygonum hydropiper L. (Benitade)*”. *Biology Pharmaceutical Bulletin*. 30 (3) 595-597.

- [2] Miyazawa, mitsuo dan Naotaka Tamura. 2006. “*Inhibitory Compound of Tyrosinase Activity from the Sprout of Polygonum hydropiper L. (Benitade)*”. *Biology Pharmaceutical Bulletin*. 30 (3) 595-597.

- [3] Batubara, I., L.K Darusman, T.Mitsunaga, M. Rahminiwati, E. Djauhari. 2010. *Potency of Indonesia Medicinal Plants as Tyrosinase Inhibitors and Antioxidant Agent. Journal of Biological Sciences*, 10 (2): 138-144.

- [4] *Materia Medika Indonesia*. Jilid II. Jakarta: Departemen ... Jilid III A. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia. Hal. 147-157. Gunawan, D. ... Ketaren, S. (1985)

- [5] Maratua. 2008. Analisis Residu Tetrasiklin Pada Udang Windu Untuk Ekspor menggunakan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)