

Pemanfaatan Ekstrak Khamir *Phaffia rhodozyma* Sebagai Sumber Karotenoid Pada Penghambatan Tirosinase

Muhammad Ryan Radix Rahardhian, Wulandari
STIFAR “YAYASAN PHARMASI” SEMARANG
r_radix@yahoo.com

Abstrak

Ekstrak khamir *Phaffia rhodozyma* mengandung senyawa karotenoid berupa *astaxhantin* yang memiliki aktivitas sebagai penghambat tirosinase. Senyawa ini dapat menghambat tirosinase dalam mekanisme pembentukan melanin. Ekstrak khamir *Phaffia rhodozyma* diperoleh dengan cara menyari khamir dengan pelarut aseton dan dikeringkan menggunakan gas N₂. Pengukuran aktivitas penghambatan tirosinase dilakukan dengan pengukuran dopakrom menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 480,5 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ hidrokuinon lebih besar dari sampel Ekstrak karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma*, yang mana masing-masing kontrol positif hidrokuinon memiliki nilai IC₅₀ sebesar 90,34 µg/ml dan IC₅₀ Ekstrak karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* sebesar 113,85 µg/ml.

PENDAHULUAN

Kulit putih dan cerah merupakan dambaan bagi sebagian besar kaum wanita bahkan juga kaum pria tentunya dalam menunjang penampilan mereka. Untuk menjadikan kulit putih dan cerah, banyak dari mereka yang menggunakan bahan pemutih seperti kosmetik ataupun bahan tradisional yang digunakan untuk memutihkan dan mencerahkan kulit.

Melanin merupakan pigmen utama pada warna kulit, rambut dan mata. Melanin dapat terbentuk secara berlebihan ketika terkena paparan matahari kronis, melasma atau penyakit hiperpigmentasi lainnya (Briganti *et al.* 2003). Inhibitor tirosinase penting dalam bidang kosmetik dan bidang pengobatan gangguan kulit yang terkait dengan hiperpigmentasi melanin (Parvez *et al.* 2007) dan untuk mencegah bintik-bintik karena sengatan matahari (Tanimoto *et al.* 2006).

Kosmetika pemutih memiliki beberapa mekanisme dalam memutihkan kulit salah satunya yaitu menghambat tirosinase. Tirosinase merupakan salah satu enzim yang berpengaruh dalam sintesis melanin. Kelebihan melanin dapat

ditekan dengan menghambat 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, (2005). Pada saat ini penelitian banyak berminat pada kandungan senyawa aktif biologis yang berasal dari sumber daya alam seperti senyawa karotenoid.

Karotenoid jenis Astaxhantin merupakan golongan karotenoid xantofil yang dapat ditemui dari berbagai mikroorganisme salah satunya Khamir *Phaffia rhodozyma* yang merupakan salah satu khamir penghasil karotenoid .

Penelitian ini bersifat eksperimental dan bertujuan untuk menguji dan mengetahui nilai IC₅₀ Ekstrak karotenoid dari Khamir *Phaffia rhodozyma*, dibandingkan dengan

hidrokuinon dalam menghambat tirosinase.

METODE PENELITIAN

Penumbuhan Khamir *Phaffia rhodozyma*

Sampel khamir *Phaffia Rhodozyma* diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Diponegoro Semarang. Sel khamir ditanam pada media *Potatoes Dextrose Agar* (PDA), diinkubasi selama 3 hari pada suhu kamar (25-30°C) dan terlindung dari cahaya.

Ekstraksi

Ekstraksi khamir *P. rodozyma* dilakukan di laboratorium Mikrobiologi STIFAR “Yayasan Paharmasi Semarang” dengan metode Maserasi menggunakan pelarut Aseton pada perbandingan (1:6). Ekstraksi diawali dengan menggerus khamir *P. rodozyma*, selanjutnya dilarutkan dalam aseton, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Filtrat yang diperoleh dikeringkan dengan menggunakan gas N₂. Selama proses ekstraksi harus terlindung dari cahaya.

Identifikasi Kandungan senyawa karotenoid

Identifikasi kandungan senyawa karotenoid pada ekstrak *P. rhodozyma* dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan fase diam Silica Gel 254F dan fase gerak (eluen) aseton : *n*-heksan (1:3).

Pembuatan Larutan Pereaksi

1. Larutan HCl 2 N

HCl 2 N dibuat dengan mengambil sejumlah 98,6 mL HCl 37% dan memasukkannya ke dalam labu takar 500 mL. Selanjutnya ditambah aquadest ad 500,0 mL.

2. Pembuatan air bebas CO₂

Air bebas CO₂ dibuat dengan cara mendidihkan air di dalam labu, setelah mendidih labu ditutup dengan tutup yang berisi (CaO) dan dibiarkan selama 10 menit kemudian diangkat dari atas kompor dan didinginkan.

3. Larutan Kalium fosfat monobase 0,1 M

Sebanyak 3,4 gram KH₂PO₄ dilarutkan dalam air bebas CO₂ hingga 250,0 mL.

4. Larutan KOH 0,1 N

Sebanyak 1,4 gram KOH dilarutkan dalam air bebas CO₂ hingga 250,0 mL.

5. Larutan dapar fosfat 0,1 M (pH 6,5)

Larutan Kalium fosfat monobase 0,1 M kemudian ditambahkan KOH 0,1 N sampai pH 6,5. Kemudian ditambahkan air bebas CO₂ sampai 250,0 mL.

6. Larutan L-tirosin 0,03%

Larutan L- tirosin yang digunakan sebagai substrat dibuat dengan cara 30 mg L-tirosin dilarutkan dengan air bebas CO₂ hingga larut dengan bantuan proses sonifikasi kemudian ditambahkan dapar fosfat pH 6,5 hingga 100,0 mL.

7. Larutan Tirosinase

Tirosinase 25 KU diencerkan dengan dapar fosfat pH 6,5 hingga 25,0 mL sehingga konsentrasi enzim menjadi 1000 unit/ mL digunakan sebagai stok. Dari larutan stok dibuat tirosinase dengan konsentrasi 300 unit/mL dengan cara diambil 3,0 mL ad 10,0 mL dengan menggunakan dapar fosfat pH 6,5.

8. Larutan Ekstrak Aseton *Phaffia Rhodozyma*

Ekstrak Aseton *P. rodozyma* yang akan diuji penghambatannya ditimbang kemudian dilarutkan dengan beberapa tetes DMSO dan ditambahkan dapar fosfat pH 6,5. Dibuat konsentrasi 100 µg/mL; 200 µg/mL; 300 µg/mL; 400 µg/mL, dan 500 µg/mL.

9. Larutan Pembanding Hidrokuinon

Larutan pembanding dibuat dengan melarutkan 100 mg dalam air bebas CO₂ sebanyak 100,0 mL sehingga konsentrasinya 1 mg/mL. Kemudian dari larutan stok tersebut dibuat konsentrasi 80 µg/mL; 90 µg/mL; 100 µg/mL; 110 µg/mL dan 120 µg/mL.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimal dopakrom menggunakan larutan kontrol negatif yang terdiri atas campuran 100µl tirosinase 300 U/ml, 300 µl L-tirosin 0,03%, dan 600 µl buffer fosfat 0,1M (pH 6,5). Larutan kontrol negatif kemudian dibaca serapannya menggunakan spektrofotometr UV-Vis panjang gelombangnya dari 400-800 nm.

Uji Penghambatan Tirosinase

Uji penghambatan tirosinase dilakukan berdasarkan metode Chang dkk. (2005) dengan modifikasi tertentu. Sebanyak 560 µL buffer fosfat 0,1 M (pH 6,5), 300 µL larutan L-tirosin 0,03 %, 40 µL larutan hidrokuinon (konsentrasi 80 µg/mL; 90 µg/mL; 100 µg/mL; 110 µg/mL dan 120 µg/mL), serta 100 µL larutan tirosinase (300U/mL) sebagai kelompok kontrol, dimasukkan dalam tabung tes (*eppendorf microcentrifuge tube*), kemudian diinkubasi pada 37°C selama 30 menit dan dibaca serapannya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Sedangkan untuk kelompok perlakuan, sebanyak 560 µL buffer fosfat 0,1 M (pH 6,5), 300 µL larutan L-tirosin 0,03 %, 40 µL larutan sampel ekstrak karotenoid dari khamir *P. rhodozyma* (konsentrasi 100 µg/mL; 200 µg/mL; 300 µg/mL; 400 µg/mL dan 1000 µg/mL) dan 500 µL larutan tirosinase (300U/mL) dimasukkan dalam tabung tes (*eppendorf microcentrifuge tube*), kemudian diinkubasi pada 37°C selama 30 menit dan dibaca serapannya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Pengukuran absorbansi larutan uji dengan menggunakan Spektrofotometer visible (492 nm). Absorbansi yang terukur merupakan absorbansi pembentukan produk (dopakrom). Dari pengukuran absorbansi ini dapat dihitung persentase aktivitas penghambatan tirosinase dengan nilai mutlak, berdasarkan Tan dkk. (2002) dengan rumus sebagai berikut:

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

A = nilai serapan dengan *inhibitor*;

B = nilai serapan tanpa *inhibitor*.

Setelah diperoleh % inhibisi, kemudian dicari persamaan regresi linier antara konsentrasi inhibitor (x) dengan persen inhibisi (y) dari masing-masing perlakuan. Dari persamaan $y = bx + a$ kemudian dilakukan perhitungan IC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penumbuhan Khamir *Phaffia rhodozyma*

P. rhodozyma memproduksi Pigmen karotenoid pada fase stasioner yaitu fase mulai dibentuknya metabolit sekunder. Terbentuknya metabolit sekunder karena kondisi nutrisi sudah mulai berkurang yang menyebabkan terjadinya akumulasi hasil ekskresi sel, sehingga radikal bebas yang mulai masuk kedalam sel semakin banyak dan sel mulai membentuk karotenoid untuk menangkap radikal bebas hasil metabolisme sel (Verdoes, 1997). Pengamatan Visual koloni *P. rhodozyma* tampak berbentuk seperti lendir, mengkilap, dan berwarna orange karena *P. rhodozyma* mengandung pigmen karotenoid terutama astaksantin dan β karoten. Berikut ini adalah koloni khamir *P. rhodozyma* setelah peremajaan disajikan pada Gambar 1



Gambar 1. Koloni khamir *P. rhodozyma* Ekstraksi

Tujuan Ekstraksi adalah untuk menyari senyawa aktif metabolit sekunder yang terkandung pada khamir yaitu karotenoid. Ekstraksi senyawa karotenoid yang terkandung dalam Khamir *P. rhodozyma* menggunakan pelarut aseton. Diawali dengan penggerusan *P. rhodozyma* untuk merusak dinding sel

khamir sehingga pigmen dapat keluar dari sel dan dapat terlarut oleh pelarut aseton. Pelarut aseton yang digunakan untuk ekstraksi harus selalu baru hingga pigmen karotenoid dalam khamir *P. rhodozyma* tertarik sempurna yang ditandai dengan pelarut menjadi bewarna orange menjadi jernih.

Ekstrak karotenoid dikeringkan dengan mengaliri gas N₂ hingga kering dan untuk menghilangkan oksigen sehingga pigmen karotenoid dalam ekstrak lebih stabil. Selama ekstraksi berlangsung, pengerjaan dilakukan dalam kondisi terlindung dari cahaya dan harus disimpan dalam almari pendingin untuk menjaga kestabilan dari pigmen.

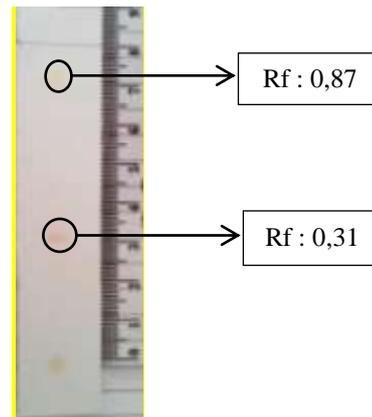
Ekstrak karotenoid yang diperoleh sebanyak 33,8840 gram dengan penimbangan awal sel *phaffia* sebesar 33,8840 gram dengan randemen sebesar 2,29%. Hasil ekstraksi senyawa karotenoid dari khamir *P. rhodozyma* setelah dilakukan preparasi dan dikering dengan gas N₂ disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Ekstrak kering karotenoid dari khamir *P. rhodozyma*

Identifikasi senyawa karotenoid

Identifikasi senyawa karotenoid dengan metode KLT dengan fase diam Silika Gel 256F dan fase gerak aseton:heksana (1:3) diperoleh 2 spot senyawa. Hasil KLT senyawa ekstrak karotenoid dari khamir *P. rhodozyma* disajikan pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil KLT Ekstrak karotenoid dari khamir *phaffia rhodozyma* dengan pelarut aseton : heksana (1:3)

Identifikasi Senyawa karotenoid berdasarkan nilai Rf disajikan pada tabel I. **Tabel I. Harga Rf yang digunakan sebagai standard untuk karotenoid dengan eluen aseton : heksana (1:3) (Lorenz, 1998)**

Karotenoid	Rf
Betakaroten	0,99
Ekinenon	0,87
Astaksantin Di-esters	0,75
Astaksantinmonoesters	0,50
Kantasantin	0,40
Astaksantin bebas	0,33

Berdasarkan tabel I nilai Rf diatas Ekstrak karotenoid dari khamir *phaffia rhodozyma* memiliki nilai Rf 0,31 yang mendekati senyawa astaksantin bebas dan Rf 0,87 yaitu senyawa karotenoid Ekinenon

Uji Penghambatan Tirosinase

Penetapan inhibisi aktivitas tirosinase dilakukan dengan metode spektrofotometri visibel untuk mengukur absorbansi dopakrom. Menurut Chang (2006), pengukuran absorbansi dopakrom dilakukan pada lamda 492 nm. Pada penelitian ternyata lamda yang diperoleh 480,5 nm. Pengukuran panjang gelombang dilakukan dengan menggunakan kontrol negatif (tanpa pemberian inhibitor). Menurut Farmakope Indonesia edisi III (1979), panjang gelombang yang didapat masih ditoleransi asalkan memenuhi persyaratan tidak berbeda lebih dari ± 0,5 nm pada daerah 240 – 280 nm, tidak lebih dari ± 1 nm pada daerah 280 – 320 nm dan

tidak lebih dari ± 2 nm diatas 320 nm dari panjang gelombang yang ditentukan.

Uji aktivitas tirosinase tanpa menggunakan inhibitor (kontrol negatif) bertujuan untuk mengetahui seberapa besar aktivitas tirosinase dalam mengkatalisis tirosin tanpa adanya pengaruh dari inhibitor. Serapan absorbansi kontrol negatif yang diperoleh adalah 0,32 nm.

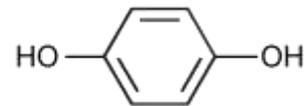
Aktivitas inhibisi tirosinase ditentukan dengan cara mereaksikan enzim (tirosinase) dan substrat (L-tirosin) beserta inhibitor hidrokuinon (kontrol positif) dan ekstrak karotenoid dari khamir *P. rhodozyma* dalam larutan yang diinkubasi selama 30 menit. Reaksi yang terjadi merupakan reaksi enzimatis antara substrat dengan tirosinase membentuk dopakrom. Penggunaan hidrokuinon sebagai kontrol positif dikarenakan hidrokuinon sudah terbukti mampu menghambat aktivitas tirosinase dan banyak digunakan dalam sediaan kosmetika pemutih kulit.

Konsentrasi hidrokuinon yang digunakan adalah 80, 90, 100, 110, 120 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan konsentrasi ekstrak karotenoid dari khamir *P. rhodozyma* yang digunakan adalah 100, 200, 300, 400 dan 500 $\mu\text{g/ml}$. Dari 3 kali replikasi diperoleh nilai rata-rata IC_{50} hidrokuinon sebesar 90,3399 $\mu\text{g/ml}$ dan IC_{50} ekstrak karotenoid dari khamir *P. rhodozyma* sebesar 113,854 $\mu\text{g/ml}$.

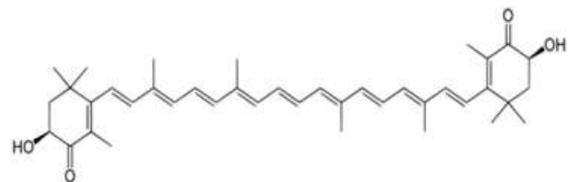
Perbedaan aktivitas inhibisi tirosinase dari senyawa hidrokuinon dan senyawa karotenoid dimungkinkan karena hidrokuinon memiliki struktur menyerupai substrat alami dari tirosinase, sehingga terjadi kompetisi antara hidrokuinon dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif tirosinase. Selain itu hidrokuinon juga memiliki gugus hidroksil dan merupakan senyawa tunggal, tidak ada campuran dari senyawa lain sehingga konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat aktivitas tirosinase lebih kecil dibandingkan ekstrak karotenoid dari khamir *phaffia rhodozyma*.

Hidrokuinon merupakan diphenol yang dapat dikatalisis oleh tirosinase

sehingga pembentukan dopakrom dapat dihambat karena tirosinase mengkatalisi hidrokuinon bukan substratnya. Senyawa karotenoid terutama astaxhantin yang terkandung didalam khamir *phaffia rhodozyma*. Rumus struktur Hidrokuinon dan Astaxhantin disajikan pada Gambar 3 dan 4



Gambar 3. Rumus struktur Kimia Hidrokuinon



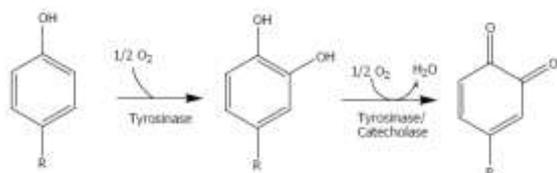
Gambar 4. Rumus struktur Kimia Astaxhantin (Urich, 1994)

Astaxhantin memiliki hidraksi alkohol yang dapat membentuk khelat dengan tirosinase berasal dari adanya gugus hidroksil. Sisi aktif dari enzim yaitu bagian tembaga akan berikatan membentuk kompleks dengan gugus fenol yang terdapat pada astaxhantin (Chang, 2009). Sisi aktif enzim yang seharusnya digunakan untuk mengoksidasi L-DOPA menjadi dopaquinon yang selanjutnya akan diubah menjadi dopakrom dan senyawa melanin digunakan untuk berikatan dengan gugus fenol membentuk kompleks. Sehingga kemampuan pengoksidasinya berkurang, produk dopakrom juga berkurang dan pembentukan senyawa melanin terhambat.

Tirosinase merupakan salah satu enzim yang berpengaruh dalam sintesis melanin. Kelebihan melanin dapat ditekan dengan menghambat 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, 2005)

Tirosinase terdapat pada mikroorganisme, tumbuhan dan hewan (Matsuura *et al.* 2006) dan terlibat dalam biosintesis melanin (Lerch 1983). Tirosinase dapat mengkatalisis hidrosilasi monophenols dari tirosin menjadi o-diphenols oleh monoooksigenase, dan oksidasi o-diphenols menjadi o-kuinon (katekol oksidase) (Salzbrunn 2007). O-kuinon selanjutnya mengalami polimerisasi dengan rangkaian reaksi enzimatik dan nonenzimatik berikutnya (Matsuura *et al.* 2006) untuk menghasilkan pigmen cokelat dan merah (Friedman 1996) dan melanin hitam (Sasaki *et al.* 2002). Reaksi tirosinase disajikan pada gambar 5.



Gambar 5. Reaksi tirosinase dan catecholase. Tirosinase mengkatalisis hidrosilasi dari monophenol untuk membentuk o-diphenol dan oksidasi dari o-diphenol untuk membentuk o-kuinon. Reaksi hidrosilasi dan oksidasi, perlu kehadiran oksigen (Salzbrunn 2007)

KESIMPULAN

Ekstrak khamir *Phaffia rhodozyma* dapat menghambat reaksi oksidasi *l*-tirosin dalam mekanisme pembentukan melanin dengan nilai IC_{50} 90,3399 $\mu\text{g/ml}$ dan IC_{50} Ekstrak khamir *Phaffia rhodozyma* sebesar 113,8543 $\mu\text{g/ml}$. Senyawa karotenoid dari khamir *phaffia rhodozyma* yang berpotensi memiliki aktivitas inhibisi tirosinase adalah Astakshantin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pemerintah Republik Indonesia

c.q. Kemenristek DIKTI, yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah Penelitian Dosen Muda 2016. Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada para mahasiswa Prodi S1 Farmasi STIFAR “Yayasan Pharmasi” Semarang, yaitu Cahya Rahma Utami, Dea Fitria Mitha Pangestika dan Chintiana Nindya Putri. yang berperan sebagai eksekutor percobaan-percobaan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1979, *Farmakope Indonesia*, Edisi III, Departemen Kesehatan RepublikIndonesia, Jakarta.
- Briganti, S., Camera, E., Picardo, M., Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment Cell Res.*, 16, **2003**, 101-110
- Chang, T. S., 2009, An Updated Review of Tirosinase Inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.*, 10(6) : 2440-2475.
- Chang, T. S., Ding H.Y. , Lin H.C., 2005, “Identifying 6,7,4’ Trihydroxyisoflavone as a potent Tirosinase Inhibitor”, *Biosci. Biotechnol.Biochem.*, 69 (10), 1999-2001.
- essential oils, *J. Agric. Food Chem.*, 54, **2006**, 2309-2313
- Friedman, M., Food browning and its prevention : An overview, *J. Agric. Food Chem.*, 44, **1996**, 631-653
- Lerch, K., Neurospora tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties, *Mol. Cell. Biochem.*, 52, **1983**, 125-138
- Matsuura, R., Ukeda, H., Sawamura, M., Tyrosinase inhibitory activity of Citrus
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S., Bae, H., Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industrie, *Phytother. Res.*, 21, **2007**, 805-816
- Salzbrunn, K. U., Über die Funktion und Struktur Tyrosinase aus Streptomycesantibioticus,

- Dissertation, The Johannes
Gutenberg-Mainz University,
Germany, **2007**, 1-18
- Sasaki, K. and Yoshizuki, F., Nobiletin as
a tyrosinase inhibitor from the peel
of Citrus fruit, *Biol. Pharm. Bull.*,
25, **2002**, 806-808
- Tan, C., Zhu, W., and Lu, Y., 2002, *Chin.
Med. J.*, **115**, 1859-1862.
- Tanimoto, S., Tominaga, H., Okada, Y.,
Nomura, M., Synthesis and cosmetic
whitening effect of glycosides
derived from several
phenylpropanoids, *Pharm. Soc.*, 126,
2006, 173-177
- Urich, K. 1994. *Comparative Animal
Biochemistry*. Springer Verlag.
Germany
- Verdoes, J. 1997. Molecular genetics of
carotenoid biosynthesis in yeast :
improved production of natural
pigments. *Gene*. 184 : 89-97.