

Original Research

UJI AKTIVITAS INHIBITOR ENZIM TIROSINASE EKSTRAK ETANOL DAUN BIDARA ARAB (*Ziziphus spina-christi* L.) SECARA *IN VITRO*

TEST OF TYROSINASE ENZYME INHIBITOR ACTIVITY OF BIDARA ARAB LEAVES ETHANOL EXTRACT (*ZIZIPHUS SPINA-CHRISTI* L.) BY *IN VITRO*

Dini Rizky Purnamasari¹, Zuraida Sagala^{2*}

^{1,2} Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Jakarta Utara, Indonesia, 14350.

*E-mail: zoerasagala@gmail.com

Diterima: 10/09/2019

Direvisi: 21/09/2019

Disetujui: 01/11/2019

Abstrak

Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) merupakan salah satu pohon tropis yang sangat bermanfaat dan sering disebut dengan tanaman serbaguna. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa tanaman ini digunakan sebagai antimikroba, antidiabetes, antipireutik, antikanker dan juga berpotensi sebagai inhibitor enzim tirosinase. Asam kojat adalah salah satu agen yang digunakan untuk menghambat enzim tirosinase sehingga mencegah terjadinya hiperpigmentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas inhibisi terhadap enzim tirosinase dari ekstrak etanol daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) secara *in vitro*. Metode yang digunakan dalam ekstraksi yaitu metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% hingga diperoleh ekstrak kental. Pengujian dilakukan dengan menggunakan 2 substrat yaitu L-Tyrosine dan L-DOPA, ekstrak etanol daun Bidara Arab dengan konsentrasi 10000, 8000, 4000, 2000 dan 1000 µg/mL serta asam kojat sebagai kontrol positif lalu diukur serapannya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 510 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun Bidara Arab memiliki aktivitas inhibitor tirosinase dengan nilai IC₅₀ sebesar 5364,186 pada L-Tyrosine dan 5568,362 pada L-DOPA.

Kata Kunci : Bidara Arab; Asam Kojat; Enzim Tirosinase; Hiperpigmentasi; Melanin

Abstrack

Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) is one of the tropical trees that is very useful and is often called a versatile plant. Several studies have proven that this plant is used as an antimicrobial, antidiabetic, antipireutic, anticancer and also has the potential to inhibit the enzyme tyrosinase. Kojic acid is one of the agents used to inhibit the tyrosinase enzyme so that it prevents hyperpigmentation. This study aims to determine the inhibitory activity of the tyrosinase enzyme from the ethanol extract of Bidara Arab leaves (*Ziziphus spina-christi* L.) *in vitro*. The method used in extraction is the maceration method using 70% ethanol until thick

extract is obtained. Tests were carried out using 2 substrate namely L-Tyrosine and L-DOPA, ethanol extract of Bidara Arab leaves with concentrations of 10000, 8000, 4000, 2000 and 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and kojat acid as positive controls and then measured absorption using microplate reader at wavelength 510 nm. The results showed that the Bidara Arab ethanol extract had tyrosinase inhibitor activity with IC_{50} values of 5364,186 in L-Tyrosine and 5568,362 in L-DOPA.

Keywords: Bidara Arab; Kojic Acid; Tyrosinase Enzyme; Hyperpigmentation; Melanin

PENDAHULUAN

Kulit yang cerah merupakan idaman semua orang terutama bagi kaum wanita yang tinggal di dataran tinggi. Oleh karena itu, banyak diantara mereka memakai produk-produk kecantikan yang mengandung bahan-bahan berbahaya, jika penggunaannya secara berlebihan dapat mengiritasi kulit. Kulit merupakan organ yang sangat penting karena dapat melindungi tubuh dari paparan sinar Ultra Violet (UV). Jika dalam jangka waktu yang lama, kulit yang sering terkena sinar UV maka akan mengakibatkan terjadinya hiperpigmentasi dengan cara meningkatnya sintesis melanin [1].

Melanin adalah zat yang sangat penting yang berfungsi untuk melindungi kulit tubuh dari radiasi sinar UV [2]. Jika jumlah melanin pada kulit berlebih maka kulit akan mengalami masalah seperti timbulnya bercak-bercak coklat terutama pada wajah bahkan terjadi hiperpigmentasi atau penggelapan warna kulit [3]. Penyebab terjadi hiperpigmentasi pada kulit salah satunya adalah paparan sinar UV. Sinar UV dapat memicu pembentukan melanin lebih cepat karena enzim tirosinase bekerja secara aktif. Untuk mencegah terjadinya hiperpigmentasi yaitu dengan cara menghambat pembentukan melanin seperti menurunkan sintesis tirosinase, menurunkan transfer tirosinase, dan menghambat aktivitas tirosinase [4]. Dalam menurunkan efek hiperpigmentasi diperlukan suatu zat yang dapat digunakan sebagai inhibitor tirosinase dalam produk kecantikan seperti hidroquinon, asam kojat, arbutin, dan aloesin [5].

Salah satu agen yang digunakan untuk pemutih kulit yaitu asam kojat dengan konsentrasi 1%. Jika penggunaan asam kojat dalam kosmetik melebihi konsentrasi 2% maka akan bersifat karsinogenik [6]. Selain beberapa agen diatas, dalam tumbuhan terdapat senyawa yang mampu menghambat enzim tirosinase yaitu senyawa flavonoid. Indonesia telah banyak yang melakukan penelitian tentang pengujian aktivitas enzim tirosinase. Salah satu bahan alam yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku alternatif dalam penelitian yaitu daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.). Ekstrak daun Bidara Arab memiliki kadar total flavonoid sebesar 1,5312% dan memiliki aktivitas antioksidan (IC_{50}) yang kuat sebesar 90,9584 ppm [7].

Ekstrak etanol daun Bidara Arab memiliki nilai IC_{50} yaitu 0,02 mg/ml yang berkhasiat sebagai efek sitotoksik pada sel MCF-7 [8]. Selain itu telah dilakukan penelitian dari ekstrak etanol 70% daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.), pada mencit yang dapat digunakan sebagai antipireutik [9]. Penelitian yang telah dilakukan oleh [8], ekstrak etanol daun Bidara Arab memiliki aktivitas sebagai antikanker sel WiDr dengan nilai IC_{50} sebesar 83,459 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Selain itu telah ditunjukkan bahwa ekstrak daun Bidara Arab memiliki antimikroba, sifat antinociceptive dan antidiabetes. Efek antidiabetes dari ekstrak daun adalah karena adanya saponin dan polifenol [10]. Telah diketahui bahwa daun Bidara Arab mengandung alkaloid (seperti amphibine B), berbagai senyawa flavonoid (seperti rutin,

kuersetin dan myricerin dan kaempferol), dan triterpen pentasiklik (asam betulitik) [11]. Dalam hal pengujian aktivitas inhibitor enzim tirosinase, senyawa flavonoid golongan flavonol yang ditemukan meliputi quercetin, myricetin, morin, buddlenoid A, buddlenoid B telah diidentifikasi sebagai inhibitor enzim tirosinase [5].

Berdasarkan uraian sebelumnya, maka akan dilakukan penelitian tentang “Uji Aktivitas Inhibitor Tirosinase Ekstrak Etanol Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) secara *In Vitro*”. Metode ekstraksi yang digunakan adalah dengan cara maserasi simplisia daun Bidara Arab menggunakan etanol 70%. Pengujian aktivitas inhibitor tirosinase dari ekstrak etanol daun Bidara Arab menggunakan 2 substrat yaitu L-DOPA dan L-Tyrosine serta kontrol positif asam kojat, lalu diukur serapannya dengan menggunakan *microplate reader*. Hasil yang akan diperoleh berupa persentase hambatan dan nilai konsentrasi hambatan 50% (IC₅₀).

METODE

Bahan Penelitian

Bahan Uji yang digunakan yaitu simplisia daun Bidara. Bahan Perbandingan yang digunakan yaitu Asam Kojat (SIGMA-ALDRICH; 98,5%), Etanol 70%, Akuades, HCl 2N, NaOH (Merck, Jerman), KH₂PO₄ (Merck, Jerman), DMSO (EMSURE; 99,9%), Enzim Tirosinase (SIGMA-ALDRICH; 5771 unit/ml), Substrat L-DOPA dan L-Tyrosine (SIGMA-ALDRICH; 95%).

Prosedur Kerja

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Bidara Arab

Simplisia daun bidara arab yang telah diserbukkan ditimbang sebanyak 500 g lalu dimasukkan ke dalam bejana maserasi, ditambahkan 3000 mL etanol 70% hingga simplisia terendam sempurna selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Maserasi ini dilakukan beberapa kali pengulangan. Ampas dan filtrat sampel dipisahkan dengan cara disaring, filtrat yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan ditempatkan dalam botol coklat untuk dipekatkan dalam *vacuum rotary evaporator* dalam temperatur 50°C dan tekanan 40 rpm sampai volume filtrat berkurang dan cairan penyaringnya diuapkan hingga diperoleh ekstrak etanol yang kental. Selanjutnya ekstrak kental yang diperoleh tersebut dihitung dan dicatat rendemennya menggunakan rumus :

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak yang Diperoleh}}{\text{Bobot Simplisia yang Digunakan}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

Pengujian Parameter Ekstrak

Terdapat 2 parameter dalam pengujian ekstrak dan simplisia yaitu parameter spesifik berupa uji identitas dan uji organoleptis, dan parameter non spesifik berupa penetapan kadar abu total, penetapan kadar air.

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia ekstrak etanol daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) yang dilakukan meliputi flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid, steroid, tanin, dan kuinon.

Pengujian Asam Kojat sebagai Kontrol Positif

Larutan asam kojat sebanyak 70 µL dengan beberapa konsentrasi, yaitu 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 µg/mL dimasukkan dalam 96 well-microtiter plate. Kemudian tambahkan larutan enzim tirosinase 333 Unit/mL sebanyak 30 µL dan larutan substrat (L-DOPA 2 mM atau L-Tyrosine 2 mM) sebanyak 110 µL. larutan campuran tersebut diinkubasi pada suhu ruangan (25-30^o C) selama 30 menit, lalu ukur serapan pada panjang gelombang 510 nm dengan menggunakan *microplate reader*. Larutan yang digunakan sebagai kontrol yaitu kontrol asam kojat, kontrol blangko, dan blangko [13].

Pengujian Larutan Ekstrak Etanol 70% Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.)

Larutan sampel sebanyak 70 µL dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu 10.000; 8.000; 4.000; 2.000; dan 1.000 µg/mL dimasukkan ke dalam 96 well-microtiter plate, tambahkan larutan tirosinase 333 Unit/mL sebanyak 70 µL kemudian dilakukan pengocokan secara perlahan. Lalu tambahkan larutan substrat (L-DOPA 2 mM atau L-Tyrosine 2 mM) sebanyak 110 µL 2 mM. Larutan campuran diinkubasi pada suhu ruangan (25-30^oC) selama 30 menit kemudian ukur serapan pada panjang gelombang 510 nm dengan menggunakan *microplate reader*.

Tabel 1. Prosedur Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Daun Bidara Arab dan Asam Kojat

Bahan	Volume Plate (µL)				
	B	KB	S	KS	KS + E
Larutan Asam Kojat/Ekstrak	-	-	70	70	70
Larutan Enzim Tirosinase	30	-	30	-	30
Larutan Substrat (L-DOPA atau L-Tyrosine)	110	-	110	-	-
Larutan Dapar Fosfat	70	210	-	140	110
Inkubasi pada suhu ruangan (25-30 ^o C) selama 30 menit Ukur absorbansi pada λ = 510 nm dengan <i>microplate reader</i>					
B=Blanko, KB=Kontrol Blanko, S=Sampel, KS=Kontrol Sampel, KS+E=Kontrol Sampel + Enzim					

Teknik Analisis Data

Menurut metode [5], persentase inhibisi dihitung dengan cara membandingkan absorbansi larutan blangko yang telah dikurangi absorbansi sampel terhadap absorbansi blangko.

$$\text{Persentase inhibisi} = \frac{(A-B)}{A} \times 100\% \quad (4)$$

Keterangan :

A = Absorbansi blangko dikurangi absorbansi kontrol blangko

B = Absorbansi sampel (asam kojat/ekstrak etanol daun Bidara Arab) dikurangi absorbansi kontrol sampel.

Setelah diperoleh persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, lalu dihitung konsentrasi sampel (µg/mL) dalam ln sebagai sumbu x terhadap persentase (%) inhibisi sebagai sumbu y,

sehingga diperoleh nilai a, b, dan R². Nilai a dan b dimasukkan ke dalam persamaan matematika $y = a + b \ln(x)$, kemudian nilai IC₅₀ diperoleh dari x setelah mengganti y dengan angka 50. Aktivitas potensi relatif ekstrak dihitung dengan membagi nilai IC₅₀ asam kojat dengan nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun Bidara Arab yang diuji pada waktu yang sama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi tanaman

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) yang berasal dari suku Rhamnaceae sesuai dengan hasil determinasi yang dilakukan di Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya LIPI-Bogor.

Ekstraksi Daun Bidara Arab

Daun Bidara Arab diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut Etanol 70%. Dalam simplisia yang direndam akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara diluar dan didalam sel sehingga metabolit sekunder yang ada didalam sitoplasma akan terlarut oleh pelarut sesuai dengan kelarutannya. Jangka waktu dalam perendaman simplisia menentukan titik jenuh dari larutan tersebut, semakin lama waktu ekstraksi yang terjadi antara simplisia dengan pelarut maka hasil yang didapatkan akan bertambah. Proses pengadukan dalam maserasi juga cukup berperan penting karena semakin sering dilakukan pengadukan maka kontak antara simplisia dengan pelarut dalam maserasi lebih sempurna [14]. Pemilihan pelarut Etanol 70% dalam ekstraksi karena pelarut ini bersifat netral, tidak beracun, mudah bercampur dengan air, dan absorpsinya baik [15]. Rendemen adalah hasil perbandingan antara bobot ekstrak yang sudah didapatkan dengan bobot simplisia awal [16]. Hasil rendemen yang didapatkan dari ekstrak daun Bidara Arab yaitu sebesar 10,32%.

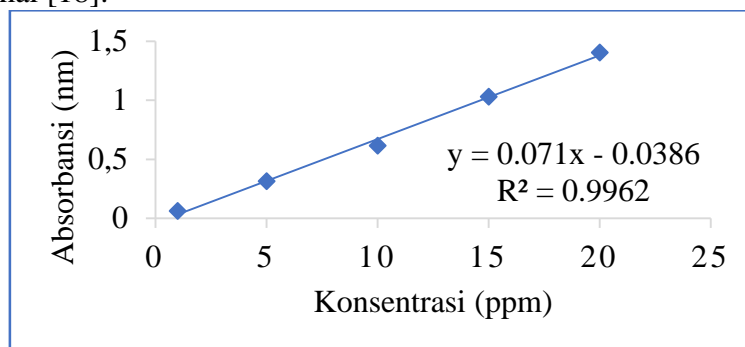
Pengujian Parameter Ekstrak

Hasil uji identitas dari simplisia Bidara Arab meliputi nama ekstrak yaitu *Ziziphus spina-christi extractum*, nama latin yaitu *Ziziphus spina-christi* L., bagian tumbuhan yang digunakan yaitu daun. Hasil uji organoleptik dari ekstrak tersebut meliputi bentuk yaitu padat/ekstrak kental, berbau khas dari tanaman, warnanya coklat, rasanya pahit. Hasil dari pengujian parameter non spesifik berupa susut pengeringan yang telah didapat sebesar 1%, kadar air yang telah didapat sebesar 6,97% (serbuk) dan 7,94% (ekstrak), serta kadar abu dari ekstrak yang telah didapat sebesar 1,40%.

Penapisan Fitokimia

Penelitian ini menggunakan kuersetin sebagai larutan standar dalam penentuan kadar senyawa flavonoid total dan kandungan flavonoid total dalam ekstrak dinyatakan sebagai Quersetin Equivalent (QE) yang artinya mg ekivalen kuersetin tiap gram ekstrak yang didapat dari persamaan kurva baku kuersetin [17]. Prinsip dari penetapan kadar flavonoid total dengan menggunakan metode aluminium klorida yaitu terjadinya pembentukan senyawa kompleks antara aluminium klorida dengan gugus keto pada atom C4 dan gugus hidroksil pada atom C3 atau atom C5 yang berdekatan dari golongan flavon dan flavonol [5]. Alasan menggunakan kuersetin dalam analisis kandungan flavonoid karena kuersetin merupakan senyawa flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C4 dan juga gugus hidroksil pada atom

C3 dan C5 yang bertetangga. Alasan menambahkan kalium asetat yaitu untuk mendeteksi adanya gugus 7-hidroksil kemudian diinkubasi selama 30 menit yang dilakukan sebelum pengukuran dimaksudkan agar reaksi berjalan sempurna, sehingga memberikan intensitas warna yang maksimal [18].



Gambar 1. Kurva Kalibrasi Kuersetin

Berdasarkan gambar 1, dapat dilihat bahwa kurva kalibrasi dengan persamaan regresi untuk serapan kuersetin pada konsentrasi 1, 5, 10, 15, dan 20 ppm sebesar $0,071x - 0,0386$. Pada pengukuran serapan kuersetin yang ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9962. Pengujian kadar flavonoid dilakukan sebanyak dua kali (duplo) dengan hasil absorbansi 0,304 nm dan 0,303 nm. Berdasarkan tabel 2 menyatakan bahwa kandungan total flavonoid ekstrak etanol daun Bidara Arab sebesar 9,461 mgQE dalam 1 gram ekstrak.

Tabel 2. Hasil Analisa Kandungan Total Flavonoid Ekstrak Etanol 70% Daun Bidara Arab

Berat Sampel (g)	Absorbansi (nm)	Kadar Flavonoid (mgQE/1g ekstrak)
0,3183	0,304	9,475
0,3183	0,303	9,447
Rata-rata Kadar Flavonoid (mgQE/1g ekstrak)		9,461

Tirosinase atau sering disebut juga polifenol oksidase merupakan enzim yang mengandung atom Cu yang berperan sebagai katalisator pada dua reaksi yang berbeda dalam pembentukan melanin. Reaksi yang pertama yaitu hidroksilasi L-Tyrosine menjadi L-DOPA dalam aktivitas monofenolase sedangkan reaksi kedua yaitu oksidasi L-DOPA menjadi dopaquinon (senyawa kuinon) dalam aktivitas difenolase [19]. Pengujian aktivitas inhibitor enzim tirosinase ini menggunakan DMSO (Dimethylsulfoxide) sebagai pelarut dalam pembuatan larutan ekstrak etanol daun Bidara Arab dan asam kojat. Jika penggunaan DMSO melebihi 1% maka akan mengganggu reaksi pengujian aktivitas enzim tirosinase tersebut. Larutan dapar yang digunakan yaitu dapar fosfat dengan pH 6,5 karena pH optimum yang dalam reaksi katalisis enzim tirosinase. Dalam pengujian aktivitas inhibitor enzim tirosinase ini, larutan uji diinkubasi pada ruangan ($25-30^{\circ}\text{C}$) selama 30 menit. Suhu ruangan ($25-30^{\circ}\text{C}$) dipilih karena suhu tersebut merupakan suhu standar bagi enzim tirosinase untuk bekerja (tidak terlalu panas ataupun dingin). Sedangkan waktu inkubasi selama 30 menit sudah dianggap cukup untuk enzim dapat bekerja [20]. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *microplate reader* karena memiliki sensitifitas yang tinggi, pengoperasian alat yang halus, kecepatan deteksi yang tinggi, dan sangat akurat. Penghambat enzim tirosinase biasanya dinyatakan sebagai nilai IC_{50} , artinya konsentrasi inhibitor yang diperlukan untuk menghambat setengah aktivitas enzim dalam kondisi yang diuji [5].

Larutan-larutan yang digunakan dalam pengujian yaitu larutan kontrol positif (asam kojat), blanko, kontrol blanko, dan kontrol sampel. Asam kojat sebagai kontrol positif yang akan menunjukkan efek penghambatan yang kompetitif pada aktivitas monophenolase dan efek penghambatan campuran pada aktivitas difenolase jamur tirosinase. Asam kojat mempunyai kemampuan untuk mengkelat logam tembaga di situs aktif enzim tirosinase. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 510 nm [21]. Dalam penelitian ini menggunakan sampel ekstrak daun Bidara Arab pada konsentrasi 10000, 8000, 4000, 2000, dan 1000 ppm. Pengujian sampel dilakukan untuk melihat kemampuan ekstrak etanol 70% daun Bidara Arab dalam menghambat enzim tirosinase.

Tabel 3. Persentase (%) Inhibisi *Monophenolase* Ekstrak Etanol 70% Daun Bidara Arab

Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	Regresi Linier
Ekstrak Etanol 70% Daun Bidara Arab (<i>Monophenolase</i>)	10000	75,487	$y = 28,46\ln(x) - 194,45$ $R^2 = 0,923$
	8000	61,039	
	4000	31,899	
	2000	16,234	
	1000	9,984	

Hasil persentase inhibisi yang sudah didapatkan selanjutnya dihitung nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun Bidara Arab oleh substrat L-Tyrosine yang didapat yaitu sebesar 5364,186 ppm dengan persamaan regresi linier yaitu $y = 28,46\ln(x) - 194,45$ (Tabel 3).

Tabel 4. Persentase (%) Inhibisi *Diphenolase* Ekstrak Etanol 70% Daun Bidara Arab

Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	Regresi Linier
Ekstrak Etanol 70% Daun Bidara Arab (<i>Diphenolase</i>)	10000	59,375	$y = 17,150\ln(x) - 98,130$ $R^2 = 0,9611$
	8000	59,948	
	4000	39,792	
	2000	30,521	
	1000	22,865	

Nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun Bidara Arab oleh substrat L-DOPA yang didapat yaitu sebesar 5568,362 ppm. Kurva % inhibisi ekstrak etanol 70% daun Bidara Arab dengan L-DOPA (*diphenolase*) dapat dilihat pada gambar 3 dan persamaan regresi linier yaitu $y = 17,150\ln(x) - 98,130$ (Tabel 4). Hal ini dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol daun Bidara Arab memiliki aktivitas penghambatan melanin yang sangat rendah. Semakin besar nilai IC₅₀ maka aktivitas penghambatan terhadap melanin akan semakin kecil.

Tabel 5. Persentase (%) Inhibisi *Monophenolase* Asam Kojat

Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	Regresi Linier
Asam Kojat (<i>Monophenolase</i>)	500	95,942	$y = 23,128\ln(x) - 38,482$ $R^2 = 0,9574$
	250	95,049	
	125	80,682	
	62,5	63,393	
	31,25	31,656	
	15,625	21,997	
	7,8125	11,364	

Nilai IC_{50} asam kojat oleh substrat *L-Tyrosine* yang didapat yaitu sebesar 45,924 ppm. Kurva % inhibisi asam kojat dengan *L-Tyrosine* (*monophenolase*) dapat dilihat pada (Gambar 4) dan dengan persamaan regresi linier yaitu $y = 23,128\ln(x) - 38,482$ (Tabel 5).

Tabel 6. Persentase (%) Inhibisi *Diphenolase* Asam Kojat

Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	Regresi Linier
Asam Kojat (<i>Diphenolase</i>)	500	94,219	$y = 23,5\ln(x) - 48,885$ $R^2 = 0,9867$
	250	84,531	
	125	66,823	
	62,5	48,542	
	31,25	30,000	
	15,625	9,271	
	7,8125	4,639	

Nilai IC_{50} asam kojat oleh substrat L-DOPA yang didapat yaitu sebesar 67,199 ppm. Kurva % inhibisi asam kojat dengan L-DOPA (*diphenolase*) dapat dilihat pada gambar 5. Semakin besar nilai IC_{50} yang didapatkan dari ekstrak maka potensi aktivitas penghambatan akan semakin kecil. Faktor yang mempengaruhi besarnya nilai IC_{50} yaitu pH, suhu, konsentrasi substrat, konsentrasi sampel, dan jenis pelarut yang digunakan [20].

Menurut (Moon, Yim, Song, Lee, & Hyun, 2010) [22], aktivitas penghambatan tinggi memiliki nilai $IC_{50} < 50$ ppm, aktivitas penghambatan rendah memiliki $IC_{50} < 60\%$ pada konsentrasi 500 ppm, dan tidak memiliki aktivitas penghambatan dengan nilai $IC_{50} < 30\%$ pada konsentrasi 500 ppm. Hasil nilai IC_{50} dari ekstrak dengan substrat L-DOPA maupun *L-Tyrosine* menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak memiliki potensi sebagai inhibitor enzim tirosinase, karena nilai IC_{50} yang diperoleh yaitu sebesar 5364,186 ppm pada *L-Tyrosine* dan 5568,362 ppm pada L-DOPA. Jika dibandingkan dengan asam kojat, nilai potensi relatif dari ekstrak daun Bidara Arab sebesar $8,561 \times 10^{-3}$ kali pada substrat *L-Tyrosine* dan $12,06 \times 10^{-3}$ kali pada substrat L-DOPA. Saat ini penggunaan asam kojat dibatasi karena dapat menyebabkan iritasi pada kulit dan mampu memasuki aliran darah sistemik, sehingga dapat menimbulkan gangguan pada kelenjar tiroid [23].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% daun bidara arab (*Ziziphus spina-christi* L.) memiliki nilai IC_{50} 5364,186 ppm pada L-Tirosin dan 5568,362 ppm pada L-DOPA. Ekstrak etanol daun bidara arab memiliki potensi yang sangat lemah sebagai inhibitor enzim tirosinase dengan nilai potensi relatif sebesar $8,561 \times 10^{-3}$ kali pada substrat *L-Tyrosine* dan $12,06 \times 10^{-3}$ kali pada substrat L-DOPA.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan Terima Kasih disampaikan kepada Pihak Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka yang telah membantu dalam usaha memperoleh data pengujian enzim tirosinase yang saya perlukan.

DAFTAR RUJUKAN

1. Mulyaningsih, Tri. 2017. *Uji Aktivitas Inhibisi Terhadap Enzim Tirosinase Dari Ekstrak Etanol Daun Kemangi (Ocimum americanum L.) secara In Vitro*, Skripsi. Jakarta: Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta.
2. Erdman, V.A.; Barciszewski, J. 2010. *RNA Technologies and Their Applications*. Heidelberg: Springer- Verlag, 227-254.
3. Cayce, K.A., McMichael, A.J., dan Feldman, S.R. 2004. *Hyperpigmentation: an Overview of the Common Afflictions*. Dermatol Nursing/Dermatology Nurse's Assosiation, New Jersey. 400-416.
4. Glukhov, E. (2005). [No Title]. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960–33967.
5. Chang, T. S. (2009). An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 10(6). 2440–2475.
6. Miyazawa, M. 2007. *Inhibitory Compound of Tyrosinase Activity from the Sprout of Polygonum hydropiper L. (Benitade)*. *Biology Pharmacheutical Bulletin*. 30(3):595-597.
7. Haeria; Hermawati., dan Ugi, A.T. (2016). Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.). *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*. Makasar: Universitas Islam Negeri Alauddin. 1(2): 57-61.
8. Putri, R.A.Z. 2017 *Uji Aktivitas Daun Bidara Arab (Ziziphus spina-christi L.) sebagai Antikanker pada Sel Kanker Kolon (WiDr) melalui Metode MTT dan Identifikasi Senyawa Aktif dengan Metode LC-MS*. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Ibrahim.
9. Nugrahawati, Fauziah. 2016. *Uji Aktivitas Antipiretik Ekstrak Daun Bidara (Ziziphus Spina-Christi L.) terhadap Mencit Jantan (Mus musculus)*. Skripsi. Makassar: Universitas Islam Negeri Alauddin.
10. Baghazadeh-Daryaii, L.; Sharifi-Sirchi, G. R.; Samsampoor, D. Morphological, Phytochemical and Genetic Diversity of *Ziziphus spina-christi* (L) Des. in South and Southeastern of Iran. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2017, 99–107.
11. Sakna, ST.; Mocan, A.; Sultani, H.N.; El-fiky, N.M.; Wessjohann, L.A.; dan Farag, M.A. Metabolites profiling of *Ziziphus* leaf taxa via UHPLC/PDA/ESI-MS in relation to their biological activities. *Food Chemistry*, 2019, 293, 233–246.

12. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Suplemen II Farmakope Herbal Indonesia*, Edisi I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
13. Batubara, I., Darusman, L.K., Mitsunaga, T., Rahmniwati, M., dan Djauhari. (2010). Potency of Indonesia Medicinal Plants as Tyrosinase Inhibitors and Antioxidant Agent. *Journal of Biology Science*. 10:138-144.
14. Saifudin, A., Rahayu, V., Teruna, H.Y. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam Edisi Pertama*. Yogyakarta: Graha Ilmu. Halaman 1-75.
15. Eka, A., dan Aprival, H. 2010. *Pengaruh Konsentrasi Etanol, Suhu, dan Jumlah Stage pada Ekstraksi Oleoresin Jahe (Zingiber officinale Rosc.) secara Batch*. Skripsi. Semarang: Universitas Diponegoro.
16. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
17. Sulaiman, C., Balachandran, I., & ran. (2012). Total phenolics and total flavonoids in selected Indian medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(3), 258.
18. Azizah, D.N.; Kumolowati, E.; Faramayuda, F. *Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl₃ pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (Theobroma Cacao L.)*. 2014. 2(2), 45–49.
19. Garcia-molina F, Varon R, Garcia-rui PA, Mun J L, Rodri JN, Tudela J, dan Garcia-ca F. Critical Review Suicide Inactivation of the Diphenolase and Monophenolase Activities of Tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010 July;62-539–547.
20. Rukmana, Ade, Lina. 2016. *Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase dari Fraksi n-Heksan Daun Sukun (Artocarpus altilis (Park) Forberg)*. Skripsi. Jakarta: Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta.
21. Muddathir AM, Yamauchi K, Batubara I, Mohieldin EAM, dan Mitsunaga T. Anti-tyrosinase, total phenolic content and antioxidant activity of selected Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*. 2017;109, 9–15.
22. Moon JY, Yim EY, Song G, Lee NH, dan Hyun CG. Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants. *EurAsian Journal of Biosciences*. 2010; 3, 41–53.
23. Mulyaningsih, Tri. 2017. *Uji Aktivitas Inhibisi Terhadap Enzim Tirosinase Dari Ekstrak Etanol Daun Kemangi (Ocimum americanum L.) secara In Vitro*, Skripsi. Jakarta: Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta.