

Original Research

## UJI AKTIVITAS INHIBITOR ENZIM TIROSINASE DAN UJI ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL BUAH HARENDONG (*Melastoma malabathricum* L.) SECARA *IN VITRO*

### INHIBITOR OF TYROSINASE ENZYM ACTIVITY ASSAY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY ASSAY OF HARENDONG (*Melastoma malabathricum* L.) ETHANOL EXTRACT *IN VITRO*

Firganta Ripaldo<sup>1</sup>, Zuraida Sagala<sup>2\*</sup>

<sup>1,2</sup>Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Jakarta Utara, Indonesia, 14350

\*E-mail : [zoerasagala@gmail.com](mailto:zoerasagala@gmail.com)

Diterima: 11/09/2019

Direvisi: 03/10/2019

Disetujui: 06/11/2019

#### Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas inhibitor enzim tirosinase dan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol buah harendong (*Melastoma malabathricum* L.) secara *In vitro*. Penelitian ini dimulai dengan proses maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian di evaporasi pada suhu 40-50°C dan menghasilkan 71,1 g ekstrak pekat dari 500 g sampel dengan total rendemen sebesar 14,22%. Selanjutnya, ekstrak diuji aktivitas inhibitor enzim tirosinase dan aktivitas antioksidannya. Pada percobaan aktivitas inhibitor enzim tirosinase digunakan asam kojat sebagai kontrol positif dan digunakan dua substrat yaitu L-DOPA dan L-Tyrosine. Nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh dari ekstrak etanol buah harendong pada substrat L-DOPA yaitu 996,917 ppm dan pada substrat L-Tyrosin yaitu 192,157 ppm menunjukkan bahwa aktivitas inhibitor enzim tirosinase cukup kuat atau sedang pada substrat L-Tyrosine dan sangat lemah pada substrat L-DOPA. Pada percobaan aktivitas antioksidan metode yang digunakan adalah metode DPPH dan digunakan Vitamin C sebagai kontrol positif. Nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh sebesar 10,20 ppm yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah harendong berpotensi sangat kuat sebagai aktivitas antioksidan.

**Kata Kunci** : *Melastoma malabathricum* L.; Enzim Tirosinase; Antioksidan; IC<sub>50</sub>.

#### Abstract

The purpose of this study was to study the tyrosinase enzyme inhibitor activity and antioxidant activity of the ethanol extract of harendong fruit (*Melastoma malabathricum* L.) in vitro. The research began with a maceration process using 96% ethanol, then evaporated at 40-50°C and produced 71.1 g of concentrated extract from 500 g of sample with a total yield of 14.22%. Furthermore, the extract activity inhibits the tyrosinase enzyme and its antioxidant activity. In the inhibitor activity experiments, the tyrosinase enzyme uses kojic acid as a positive control and two substrates, L-DOPA and L-Tyrosine, are used. The IC<sub>50</sub> value obtained from the ethanol extract of harendong fruit on the L-DOPA substrate is 996,917 ppm and on the L-Tyrosin substrate which is 192.157 ppm produces a working inhibitor of the tyrosinase enzyme which is quite strong or moderate on the L-Tyrosine substrate and also very good on the L-Tyrosin substrate which is 192.157 ppm. DOPA In the trial of antioxidant activity the method used was the DPPH method and Vitamin C was used as a positive control. The IC<sub>50</sub> value obtained was 10.20 ppm which showed the ethanol extract of harendong fruit proved very strong as an antioxidant activity.

**Keywords** : *Melastoma malabathricum* L.; Tyrosinase enzyme; Antioxidant; IC<sub>50</sub>.

## PENDAHULUAN

Kosmetik adalah bahan yang dipergunakan pada badan manusia dengan maksud untuk membersihkan, memelihara, menambah daya tarik atau mengubah rupa dan tidak termasuk golongan obat [1].

Kosmetika pemutih kulit adalah salah satu jenis produk kosmetika yang mengandung bahan aktif yang menghambat pembentukan pigmen *melanin* atau menghilangkan *melanin* yang sudah terbentuk sehingga akan memberikan warna kulit yang lebih putih. Kosmetika pemutih biasanya mengandung zat aktif pemutih seperti asam kojat, asam askorbat, hidrokuinon, merkuri, dan lain-lain. Dampak positif penggunaan kosmetika pemutih diantaranya yaitu kulit menjadi putih bersih dan bersinar. Namun keterbatasan pengetahuan tentang produk kosmetika pemutih membuat masyarakat tidak tahu dampak negatif yang mungkin timbul jika produk tersebut digunakan secara berlebihan [2].

Asam kojat merupakan salah satu inhibitor tirosinase yang baik namun mempunyai beberapa efek samping seperti alergi [3]. Serta berhubungan dengan tumor hati pada *heterozygous mice deficient P53* [4]. Asam askorbat sering digunakan sebagai antioksidan karena kemampuannya menekan proses *o-dopaquinone* menjadi *dopa*, sehingga menghambat pembentukan melanin. Hidrokuinon secara luas digunakan sebagai bahan pemutih yang efektif namun sering terjadi iritasi kulit, dermatitis dan peningkatan insiden okronis [5]. Sedangkan pemakaian krim merkuri dalam jangka panjang dapat menyebabkan kulit menjadi biru kehitaman dan memicu terjadinya kanker.

Salah satu tanaman yang diduga dapat digunakan sebagai tanaman obat dan kosmetik adalah tanaman harendong (*Melastoma malabathricum* L.). Tanaman ini tumbuh sebagai tanaman liar sehingga mudah didapat dan penelitian terkait uji aktivitas inhibitor enzim tirosinase serta aktivitas antioksidan bagian buah harendong (*Melastoma malabathricum* L.) belum pernah dilakukan.

Secara empiris, buah harendong (*Melastoma malabathricum* L.) dapat digunakan sebagai analgetik, antipireutik, antiinflamasi, antidiare, diuretik, obat kumur, obat bisul dan borok (obat luar). Hal tersebut diduga dipengaruhi oleh adanya kandungan senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder terbagi menjadi tiga kelompok utama, yaitu komponen-komponen polifenol termasuk flavonoid dan fenol, terpenoid serta alkaloid [6]. Flavonoid termasuk polifenol alami yang memiliki kemampuan depigmentasi kulit dengan cara menghambat langsung aktivitas tirosinase saat melanogenesis. Ikatan flavonoid dengan tembaga serta aktivitas antioksidannya diduga berperan dalam menghambat kerja enzim tirosinase [7].

Antioksidan merupakan suatu zat pada konsentrasi kecil mampu menghambat atau mencegah oksidasi substrat pada radikal bebas secara signifikan. Antioksidan sintetik seperti BHA (*butylated hidroxy aniline*) dan BHT (*butylated hidroxy toluen*) telah diketahui memiliki efek samping yang besar seperti kerusakan hati [8]. Di sisi lain, alam menyediakan sumber antioksidan yang efektif dan relatif aman seperti flavonoid, asam askorbat, beta karoten, dan lain-lain. Hal tersebut mendorong semakin banyak dilakukan eksplorasi bahan alam sebagai sumber antioksidan.

Pigmen melanin merupakan suatu pigmen yang dapat melindungi kulit dari paparan sinar matahari. Dalam proses pembentukan melanin (melanogenesis), enzim tirosinase berperan sebagai katalis pada dua reaksi yang berbeda yaitu proses hidroksilasi tirosin menjadi dihidroksi-fenilalanin (L-DOPA) dan oksidasi L-DOPA menjadi DOPA kuinon.

Tirosinase pada jaringan kulit diaktifasi oleh radiasi sinar UV matahari sehingga mempercepat proses produksi melanin. Sehingga produksi melanin menjadi berlebih dan menyebabkan hiperpigmentasi kulit berwarna cokelat [9].

Upaya mencegah produksi melanin yang berlebih dapat digunakan senyawa antioksidan atau suatu inhibitor tirosinase. Kombinasi antioksidan dan inhibitor tirosinase dapat ditemukan dari bahan alam ataupun senyawa sintetik [10]. Sehingga peneliti tertarik untuk mengembangkan produk kosmetika antioksidan dan inhibitor tirosinase yang berasal dari bahan alam karena relatif aman digunakan.

## **METODE**

### *Sampel (Bahan) Penelitian*

Buah Harendong, Asam Kojat, Enzim Tyrosinase, Substrat L-Dopa dan L-Tyrosine, Pelarut Etanol 96%, Kuercetin, DMSO, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH, AlCl<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COONa, Pereaksi (Mayer, Dragendorff, Bouchardad), HCl 2N, Serbuk Mg, FeCl<sub>3</sub>, Aquadest, Aq bebas CO<sub>2</sub>, Asam Askorbat dan 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil.

### *Prosedur Kerja*

#### **Penyiapan Simplisia**

Sampel segar diambil sebanyak 2 kg buah harendong dari Balitro, Bogor dan telah di Determinasi oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Kebun Raya Bogor, Jalan Ir. H. Juanda No. 13, Bogor (Jawa Barat), Indonesia. Semua bahan dipisahkan dari kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dan dicuci hingga bersih. Semua sampel ditiriskan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40-50°C selama 4-5 hari hingga kadar air tetap. Sampel kering lalu dihaluskan dengan *blender* dan diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh. Simplisia yang didapat dibungkus dengan plastik dan disimpan untuk pengujian selanjutnya [11].

#### **Ekstraksi**

Ekstraksi buah harendong menggunakan metode maserasi [12]. Proses ekstraksi pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 500 g buah Harendong kering yang telah menjadi bentuk simplisia ditambahkan pelarut dengan perbandingan 1:10, dimasukkan ke dalam Labu Erlenmeyer 500 mL, lalu didiamkan selama 24 jam pada maserator yang dilengkapi *shaker*. Maserat dipisahkan dan proses diulang tiga kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Semua maserat dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C sampai diperoleh ekstrak kental buah harendong.

#### **Pengujian Parameter Spesifik Ekstrak**

##### *Pengamatan Organoleptik*

Ekstrak kental yang didapat dilakukan uji organoleptik dengan cara melakukan pengamatan dengan panca indera terhadap ekstrak kental yang telah didapat, meliputi: bentuk, warna, bau dan rasa.

### *Pengamatan Rendemen*

Rendemen adalah perbandingan antara berat ekstrak kental yang didapat dengan berat awal simplisia. Ekstrak kental yang telah didapat ditimbang bobotnya untuk menghitung nilai rendemen.

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

### **Analisis Kandungan Total Flavonoid**

Penetapan kandungan total flavonoid yang terdapat dalam ekstrak menggunakan kuersetin sebagai pembanding untuk membuat kurva kalibrasi. Kuersetin ditimbang seksama 10 mg, dilarutkan dengan etanol 96% hingga diperoleh volume larutan 10 mL (10.000 µg/mL) dalam labu ukur, kemudian dibuat pengenceran 50, 40, 30, 20, dan 10 µg/mL. Dari konsentrasi terpilih tersebut diambil secara berurutan 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; dan 0,1 mL larutan menggunakan mikropipet, lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, ditambahkan etanol 96% sebanyak 3 mL, 0,2 mL AlCl<sub>3</sub> 10%, 0,2 mL Na-asetat 1 M, dan aquades hingga volume 10 mL.

Ekstrak etanol buah harendong ditimbang seksama 200 mg, ditambahkan 1 mL HMT, kemudian ditambahkan 20 mL aseton dan 2 mL HCl. Selanjutnya dihidrolisis dengan refluks selama 30 menit. Campuran disaring menggunakan kapas dan didapatkan filtrat, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL. Residu di refluks kembali dengan 20 mL aseton selama 30 menit dan disaring. Filtrat dicampurkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aseton hingga 100 mL. Campuran filtrat diambil 20 mL dan dimasukkan kedalam corong pisah kemudian ditambahkan 20 mL aquadest. Kemudian ekstraksi kembali sebanyak tiga kali masing-masing 15 mL etil asetat. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan ditambahkan etil asetat hingga 50 mL di labu ukur. Pengukuran dilakukan selama 30 menit setelah penambahan AlCl<sub>3</sub> pada panjang gelombang 425 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis [13]. Pemilihan panjang gelombang 425 nm berdasarkan hasil pembacaan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan rentang 415-440 nm [14].

### **Uji Antioksidan**

#### *Pembuatan Stok DPPH 125 µg*

DPPH ditimbang sebanyak 2,5 mg dilarutkan dengan etanol p.a kedalam labu ukur, ditara hingga volume 50 mL. Kemudian labu ukur dilapisi dengan aluminium foil.

#### *Preparasi Sampel dan Vitamin C*

Sampel dan vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan DMSO sebanyak 1 mL. Selanjutnya disonikasi hingga larut, kemudian divorteks.

### *Perlakuan Uji*

Sampel sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dimasukkan kedalam microplate. Untuk sampel ulangan 1 dan 2 ditambahkan DPPH sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dan untuk kontrol negatifnya hanya ditambahkan etanol p.a sebanyak 100  $\mu\text{L}$ . Kemudian, di inkubasi di suhu ruangan pada kondisi gelap selama 30 menit. Lalu diukur di alat elisa pada panjang gelombang 517 nm. Untuk blanko, pada ulangan 1 dan 2 hanya berisi 100  $\mu\text{L}$  etanol p.a dan ditambahkan DPPH sebanyak 100  $\mu\text{L}$ . Sedangkan untuk kontrol negatifnya hanya berisi etanol p.a sebanyak 200  $\mu\text{L}$ .

### **Penyiapan Larutan Pereaksi**

#### *Pembuatan Larutan NaOH 1 M*

Sebanyak 4 g serbuk NaOH (BM=40) ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades bebas  $\text{CO}_2$ .

#### *Pembuatan Larutan Dapar Fosfat 50 mM pH 6,5*

Sebanyak 3,402 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (BM=136,09) ditimbang, kemudian dilarutkan ke dalam 450 mL akuades bebas  $\text{CO}_2$ . Nilai pH diatur hingga 6,5 dengan cara penambahan larutan 1 M NaOH kurang lebih 25 mL. Lalu ditambahkan akuades bebas  $\text{CO}_2$  hingga 500 mL.

#### *Pembuatan Larutan Substrat L-DOPA 2 mM*

Sebanyak 3,94 mg L-DOPA (BM=197,19) ditimbang, dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, dilarutkan dalam 10 mL 50 mM dapar fosfat pH 6,5, sehingga diperoleh larutan L-DOPA dengan konsentrasi 2 mM. Larutan L-DOPA dihindarkan dari cahaya.

#### *Pembuatan Larutan Enzim Tirosinase 333 Unit/mL*

Konsentrasi larutan tirosinase yang digunakan pada uji penghambatan aktivitas tirosinase mengacu pada penelitian Batubara. 2010 [15], yaitu 333 Unit/mL. Sebanyak 5 mg (5771 Unit/mg) tirosinase ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL, dilarutkan dengan 50 mM dapar fosfat pH 6,5. Tirosinase yang terlarut memiliki aktivitas 5771 Unit/mL. Larutan ini digunakan sebagai larutan stok. Larutan stok dipipet sebanyak 577  $\mu\text{L}$ , kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, sehingga diperoleh tirosinase dengan aktivitas 333 Unit/mL. Larutan tirosinase (333 Unit/mL) dan larutan stok tirosinase (5771 Unit/mL) disimpan pada suhu  $-20^\circ\text{C}$ .

#### *Pembuatan Larutan Asam Kojat sebagai Kontrol Positif*

Sebanyak 5 mg serbuk asam kojat ditimbang, dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, dilarutkan dalam 50 mM larutan dapar fosfat pH 6,5, sehingga didapatkan larutan asam kojat dengan konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$ . Sebanyak 5,0 mL larutan asam kojat 500  $\mu\text{g/mL}$  dipipet, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, didapatkan larutan asam kojat dengan konsentrasi 250  $\mu\text{g/mL}$ . Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga didapatkan larutan asam kojat dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; dan 7,8125  $\mu\text{g/mL}$  sebagai variasi konsentrasi pada pengujian untuk mendapatkan nilai  $\text{IC}_{50}$ .

*Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol 96% Buah Harendong*

Sebanyak 400 mg ekstrak kental buah harendong ditimbang seksama dan dilarutkan dalam 1 mL DMSO, ditambahkan dapar fosfat 50 mM pH 6,5 hingga diperoleh volume 10 mL (4.000 µg/mL) dalam labu ukur. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga diperoleh variasi konsentrasi larutan ekstrak 2.000; 1.000; 500; 250; 125; 62,5 dan 31,25 µg/mL pada pengujian untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub>. Variasi konsentrasi tersebut diperoleh melalui orientasi konsentrasi.

**Tabel 1.** Prosedur Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Buah Harendong dan Asam Kojat dengan Menggunakan Substrat L-DOPA dan L-Tyrosine

No	Bahan	Volume (µL)				
		B	KB	S	KS	KS+E
1	Larutan Dapar Fosfat (pH 6,5)	70	210	-	140	110
2	L-DOPA dan L-Tyrosine (2mM)	110	-	110	-	-
3	Larutan sampel dan Asam Kojat	-	-	70	70	70
4	Enzim Tyrosinase (333 U/mL)	30	-	30	-	30
Inkubasi pada suhu 25-30°C selama 30 menit						
Ukur absorbansi pada λ = 510 nm dengan <i>microplate reader</i>						

**Teknik Analisis Data**

Menurut metode Chang. 2002 [16] dalam Nawawi. 2012 [17], persentase inhibisi dihitung dengan cara membandingkan absorbansi larutan blanko yang telah dikurangi absorbansi sampel terhadap absorbansi blanko.

$$\text{Persentase inhibisi} = \frac{(A-B)}{A} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan : A = Absorbansi blanko dikurangi absorbansi kontrol blanko.

B = Absorbansi sampel (asam kojat/ekstrak etanol buah Harendong) 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 R<sup>2</sup>. Nilai a dan b dimasukkan ke dalam persamaan matematika y = a + bx, kemudian nilai IC<sub>50</sub> diperoleh dari x setelah mengganti y dengan angka 50. Aktivitas potensi relatif ekstrak dihitung dengan membagi nilai IC<sub>50</sub> asam kojat dengan nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol buah Harendong yang diuji pada waktu yang sama.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Karakteristik Ekstrak Buah Harendong (*Melastoma malabathricum* L.)**

Proses ekstraksi pada penelitian ini menggunakan cara dingin yaitu dengan metode maserasi. Metode ini mempunyai beberapa kelebihan dibanding metode ekstraksi lainnya yaitu merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana, tidak memerlukan peralatan yang rumit, relatif murah, dan menghindari kerusakan komponen senyawa yang tidak tahan panas [18]. Prinsip maserasi adalah pelarutan zat aktif hingga tercapai keseimbangan konsentrasi didalam dan diluar sel.



Setelah didapatkan ekstrak etanol 96% buah harendong, perlu dilakukan pemeriksaan karakteristik ekstrak meliputi uji organoleptis dan perhitungan nilai rendemen. Hasil uji karakteristik ekstrak terlihat pada Tabel 2.



A B  
Gambar 1. A. Buah Harendong; B. Ekstrak Buah Harendong

Tabel 2. Uji Karakteristik Ekstrak Etanol 96% Buah Harendong (*Melastoma malabathricum* L.)

No	Uji Karakteristik	Ekstrak Etanol 96% Buah Harendong ( <i>Melastoma malabathricum</i> L.)
1	Organoleptis : a. Bentuk b. Warna c. Bau	Kental Coklat Kemerahan Khas Buah Harendong
2	Rendemen	14,22%

#### Uji Organoleptis

Uji organoleptis merupakan pengujian terhadap penampilan fisik dari ekstrak etanol buah harendong, meliputi parameter bentuk, warna, dan bau dari ekstrak tersebut. Pengamatan dilakukan menggunakan panca indera dan hasilnya terlihat pada tabel 2.

#### Perhitungan Rendemen

Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal. Ekstrak kental yang diperoleh dengan mengekstrak sebanyak 500 g serbuk simplisia buah harendong menghasilkan ekstrak kental etanol sebanyak 71,1, sehingga diperoleh nilai rendemen dari ekstrak etanol sebesar 14,22% terlihat pada tabel 2.

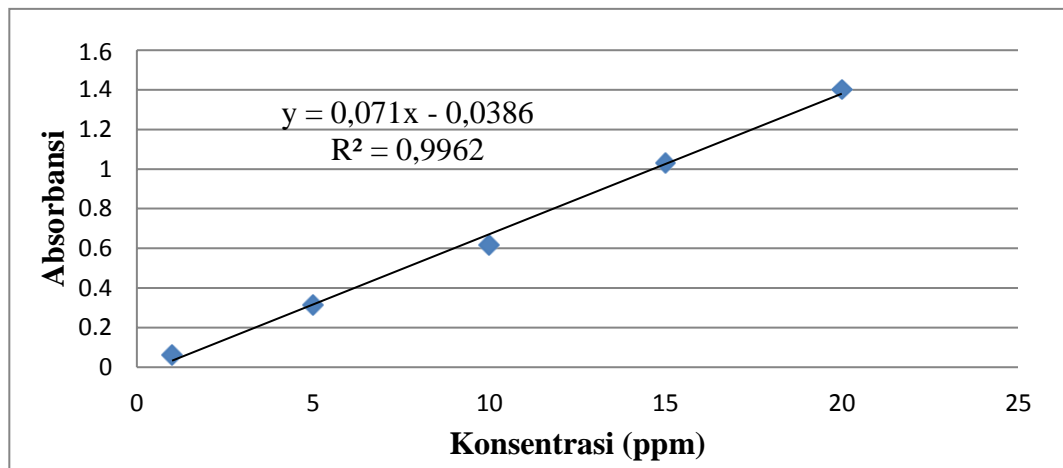
$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat Hasil Ekstraksi}}{\text{Berat Awal Simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{71,1 \text{ g}}{500 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 14,22\% \end{aligned}$$

#### Uji Kandungan Total Flavonoid

Kandungan total flavonoid dalam ekstrak dinyatakan sebagai *Quercetin Equivalent* yaitu mg ekivalen kuercetin tiap g ekstrak yang didapat dari persamaan kurva baku kuercetin [19].

**Tabel 3.** Data Konsentrasi dan Absorbansi Kuercetin

No	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi	Persamaan Regreasi Linier
1	1	0,062	$y = 0,071x - 0,0386$ $R^2 = 0,9962$
2	5	0,314	
3	10	0,616	
4	15	1,03	
5	20	1,404	



**Gambar 2.** Kurva Kalibrasi Kuercetin

Berdasarkan Gambar 2. persamaan kurva baku diperoleh dari regresi linier antara kadar kuercetin (x) dan absorbansi (y). Nilai  $R^2$  yang diperoleh sebesar 0,9962 yang menandakan bahwa seri konsentrasi cukup linier. Perlakuan sampel dilakukan sebanyak dua kali (duplo) dengan hasil absorbansi 0,109 dan 0,110. Setelah dilakukan perhitungan dengan mengalikan faktor pengenceran, didapat kandungan total flavonoid ekstrak etanol buah harendong sebesar 4,310 mg EQ dalam 1 gekstrak (tabel 4.).

**Tabel 4.** Hasil Analisa Kandungan Total Flavonoid Ekstrak Etanol Buah Harendong (*Melastoma malabathricum* L.)

No	Berat Sampel (g)	Absorbansi	Kadar Flavonoid (MgEQ/ 1g Ekstrak)
1	0,3025	0,109	4,295
2	0,3025	0,110	4,324
	Rata-Rata Kadar Flavonoid (Mg EQ/1g Ekstrak)		4,310



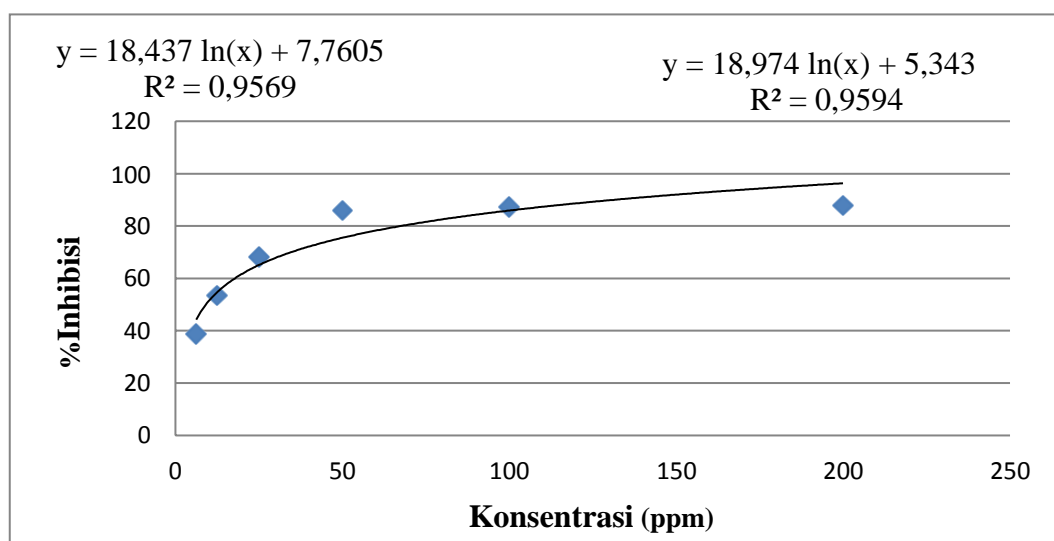
Pembandingan yang digunakan untuk ekstrak etanol buah harendong adalah kuercetin. Pemilihan kuercetin sebagai standar pengukuran karena kuercetin merupakan suatu senyawa flavonol terbesar [20]. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum 425 nm. Pemilihan panjang gelombang 425 nm berdasarkan hasil pengukuran panjang gelombang maksimum menggunakan larutan standar kuercetin. Penetapan panjang gelombang maksimum merupakan faktor paling penting dalam analisis kimia dengan metode spektrofotometri. Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan karena perubahan absorbansi untuk setiap satuan kadar adalah paling besar pada panjang gelombang maksimal. Selain itu, pita serapan di sekitar panjang gelombang maksimal adalah data dan pengukuran ulang memberikan kesalahan yang kecil, sehingga memenuhi hukum Lambert-Beer [21].

### Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Harendong (*Melastoma malabathricum* L.)

Pada penelitian ini pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil*). DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang tidak membentuk dimer akibat delokalisasi dari elektron bebas pada seluruh molekul. Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode ini didasarkan pada hilangnya warna ungu akibat tereduksinya DPPH oleh senyawa antioksidan dalam sampel sehingga menghasilkan senyawa *diphenylpicrylhydrazine* yang berwarna kuning terang/pucat yang diukur pada panjang gelombang 517 nm.

Aktivitas antioksidan hasil penelitian ini dinyatakan dalam  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi zat antioksidan yang menghasilkan persen penghambatan DPPH sebesar 50%. Nilai  $IC_{50}$  diperoleh melalui persamaan linier antara persen inhibisi dengan konsentrasi sampel. Semakin rendah nilai  $IC_{50}$  maka daya hambat antioksidan terhadap radikal bebas semakin tinggi.

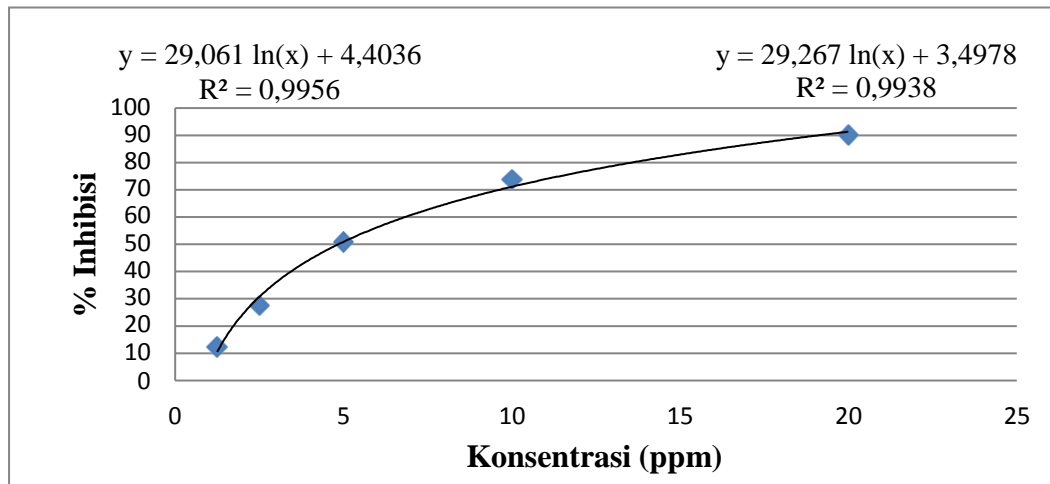
Molyneux menyatakan bahwa suatu zat mempunyai sifat antioksidan bila nilai  $IC_{50}$  kurang dari 200 ppm. Bila nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh antara 200-1000 ppm, maka zat tersebut kurang aktif namun masih berpotensi sebagai antioksidan [22].



Gambar 3. Grafik Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Harendong

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol buah harendong dapat dilihat pada gambar 3. Persamaan regresi linier yang diperoleh adalah  $y = 18.437 \ln(x) + 7.7605$  dan  $y = 18.947 \ln(x) + 5.343$ . Dari persamaan regresi linier tersebut maka dapat diperoleh rata-rata nilai  $IC_{50}$  sebesar 10.20 ppm, hal ini menunjukkan bahwa buah harendong mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

### Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin C



**Gambar 4.** Grafik Aktivitas Antioksidan Vitamin C

Pada grafik diatas persamaan regresi linier yang diperoleh adalah  $y = 29.061 \ln(x) + 4.4036$  dan  $y = 29.267 \ln(x) + 3.4978$ . Dari persamaan regresi linier tersebut maka dapat diperoleh rata-rata nilai  $IC_{50}$  sebesar 4,85 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Semakin rendah nilai  $IC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan sebagai peredam radikal bebas [23].

Jika membandingkan hasil  $IC_{50}$  ekstrak etanol buah harendong terhadap vitamin C, aktivitas antioksidan vitamin C dua kali lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol buah harendong, hal ini dikarenakan vitamin C sudah dalam senyawa murni sedangkan flavonoid dan zat lain yang bersifat antioksidan masih merupakan senyawa kompleks atau masih terdiri dari berbagai macam zat dalam buah harendong. Namun dari hasil ini, dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak etanol buah harendong dengan aktivitas antioksidan dari vitamin C sama-sama memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

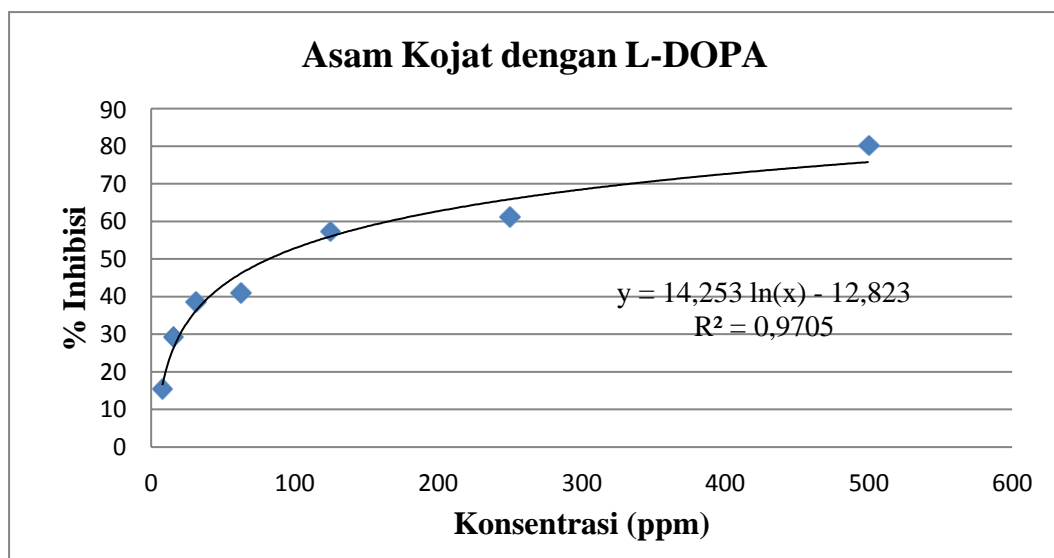
### Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase pada Asam Kojat Sebagai Kontrol Positif Pengujian

Pengujian asam kojat sebagai kontrol positif dilakukan untuk memastikan bahwa metode yang digunakan yaitu dengan membandingkan nilai  $IC_{50}$  yang didapat dengan nilai  $IC_{50}$  dari hasil studi literatur. Asam kojat dipilih sebagai kontrol positif karena asam kojat merupakan senyawa yang digunakan secara luas sebagai pemutih sampai saat ini [24]. Selain itu, asam kojat memiliki kestabilan yang paling besar dalam produk kosmetik [25]. Pada pengujian penghambatan enzim tirosinase ini, terdapat empat jenis larutan yang diuji, yaitu larutan asam kojat/ ekstrak, larutan kontrol asam kojat/ ekstrak, larutan blanko dan larutan kontrol blanko. Larutan blanko merupakan larutan tanpa adanya penghambatan baik dari asam kojat maupun ekstrak. Larutan kontrol dibuat sebagai faktor koreksi yaitu tanpa adanya penambahan enzim dan substrat.

Prinsip pengujian aktivitas inhibitor tirosinase adalah terhambatnya pembentukan produk dopakrom hasil reaksi substrat L-DOPA dan enzim tirosinase. Hambatan pembentukan dopakrom ditandai dengan menurunnya intensitas warna yang diukur dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang maksimum 510 nm. *Microplate reader* merupakan teknik pengukuran spektrofotometer yang melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu melalui sumuran berisi sampel lalu diukur intensitas cahaya yang ditransmisikan, sehingga diperoleh absorbansi. Absorbansi tersebut digunakan untuk menghitung besarnya penghambatan reaksi L-DOPA dan L-Tyrosine.

**Tabel 5.** Persentase Pengambatan Aktivitas Enzim Tirosinase Oleh Asam Kojat dengan Substrat L-DOPA

No	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata % inhibisi	IC <sub>50</sub>
1	500	80,150	82,140
2	250	61,169	
3	125	57,234	
4	62,5	41,030	
5	31,25	38,542	
6	15,625	29,167	
7	7,8125	15,509	

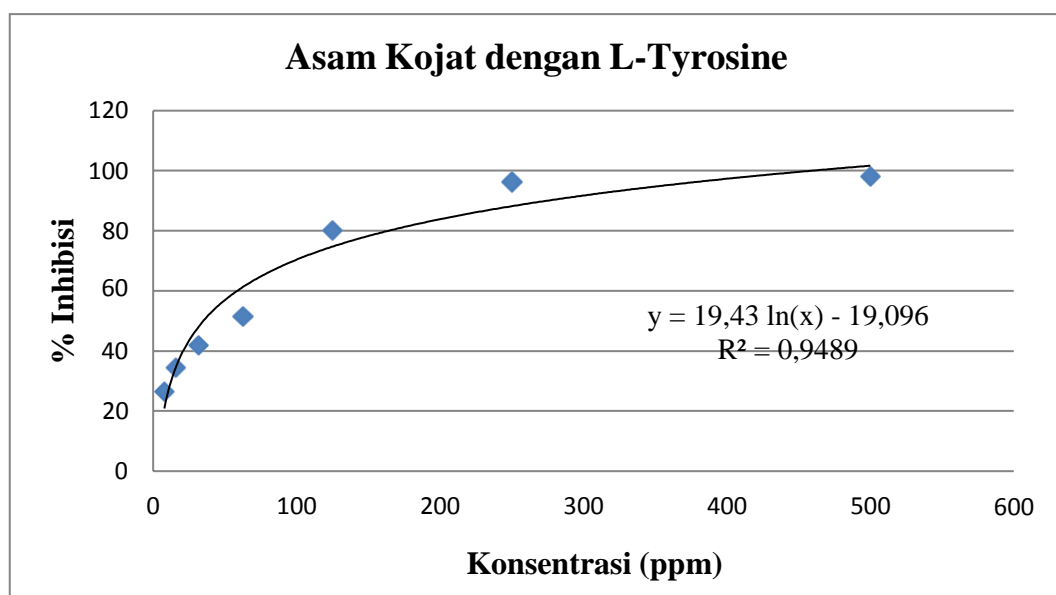


**Gambar 5.** Kurva Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase oleh Asam Kojat dengan Substrat L-DOPA

Berdasarkan hasil pengujian didapat IC<sub>50</sub> asam kojat dengan substrat L-DOPA sebesar 82.140 ppm dan IC<sub>50</sub> asam kojat dengan substrat L-Tyrosine sebesar 35.017 ppm (Tabel 5. dan Tabel 6.). Asam kojat menunjukkan penghambatan secara kompetitif dengan kemampuannya membentuk khelat logam tembaga pada situs aktif enzim tirosinase [26]. Semakin tinggi konsentrasi asam kojat yang digunakan, maka semakin tinggi kemampuan inhibisinya. Kemampuan inhibisi yang tinggi ditandai dengan penurunan pembentukan dopakrom dan penurunan intensitas warna yang terbentuk.

**Tabel 6.** Persentase Pengambatan Aktivitas Enzim Tirosinase oleh Asam Kojat dengan Substrat L-Tyrosine

No	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata % inhibisi	IC <sub>50</sub>
1	500	98,099	35,017
2	250	96,364	
3	125	80,165	
4	62,5	51,488	
5	31,25	41,736	
6	15,625	34,380	
7	7,8125	26,529	

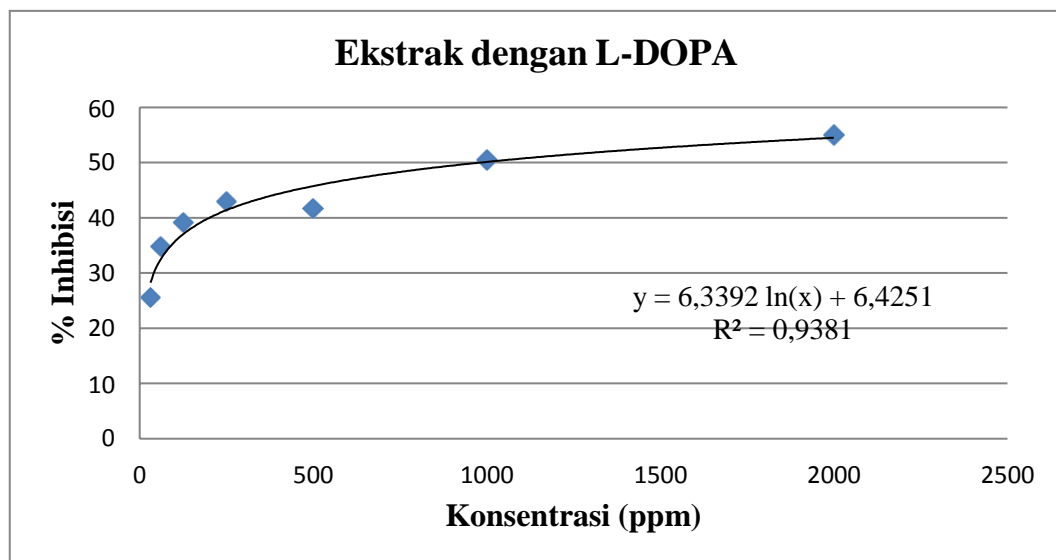


**Gambar 6.** Kurva Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase oleh Asam Kojat dengan Substrat L-Tyrosine

**Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Buah Harendong (*Melastoma malabathricum* L.)**

**Tabel 7.** Persentase Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Buah Harendong (*Melastoma malabathricum* L.) dengan substrat L-DOPA

No	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata % inhibisi	IC <sub>50</sub>
1	2000	55,093	966,917
2	1000	50,463	
3	500	41,725	
4	250	42,940	
5	125	39,063	
6	62,5	34,838	
7	31,25	25,579	

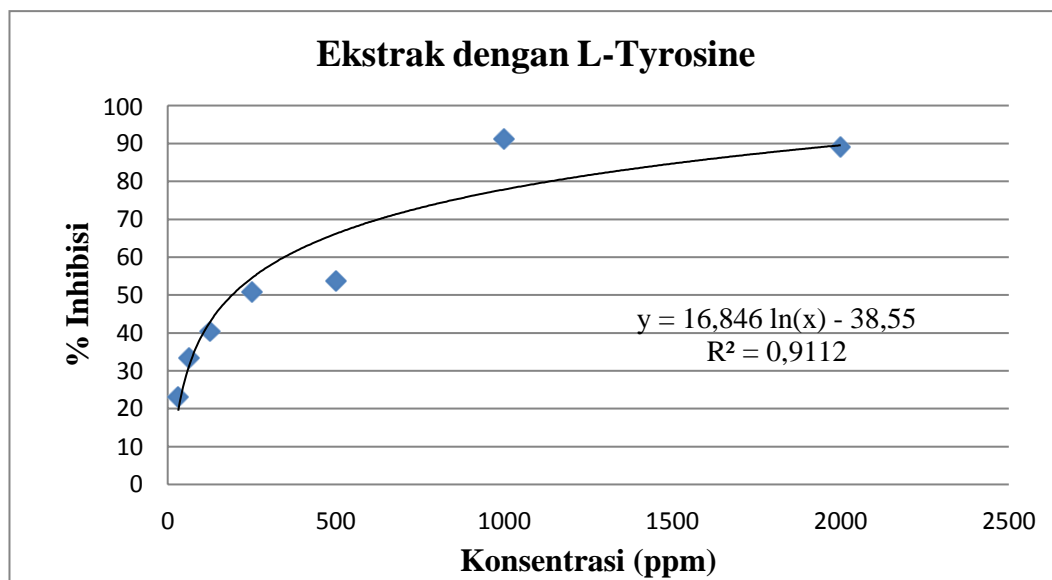


**Gambar 7.** Kurva Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Buah Harendong (*Melastoma malabathricum* L.) dengan Substrat L-DOPA

Uji penghambatan aktivitas tirosinase ekstrak dilakukan untuk melihat kemampuan ekstrak etanol buah harendong sebagai inhibitor enzim tirosinase. Buah harendong dapat berperan sebagai inhibitor enzim tirosinase karena adanya kandungan senyawa flavonoid. 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 pengkhelat logam tembaga (Cu) dari struktur enzim tirosinase. Pada umumnya satu molekul enzim tirosinase mengandung dua atom Cu yaitu CuA dan CuB yang terikat dengan 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.

**Tabel 8.** Persentase Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Buah Harendong (*Melastoma malabathricum* L.) dengan substrat L-Tyrosine

No	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata % inhibisi	IC <sub>50</sub>
1	2000	89,008	192,157
2	1000	91,157	
3	500	53,636	
4	250	50,774	
5	125	40,331	
6	62,5	33,388	
7	31,25	22,975	



**Gambar 8.** Kurva Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Buah Harendong (*Melastoma malabathricum* L.) dengan Substrat L-Tyrosine

Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol buah harendong dengan substrat L-DOPA sebesar 966.917 ppm menandakan bahwa ekstrak tersebut berpotensi sangat lemah sebagai inhibitor tirosinase. Sedangkan ekstrak etanol buah harendong dengan substrat L-Tyrosine menghasilkan IC<sub>50</sub> sebesar 192.157 ppm yang berarti bahwa ekstrak tersebut cukup kuat sebagai inhibitor tirosinase. Hal ini sebanding dengan hasil pengujian total flavonoid ekstrak etanol buah harendong yaitu hanya 4,310 mg EQ dalam 1 g ekstrak. Keamanan adalah pertimbangan utama dalam pemilihan senyawa sebagai inhibitor tirosinase. Penggunaan asam kojat mulai dibatasi karena menyebabkan iritasi kulit dan kemampuannya masuk ke aliran darah sistemik, sehingga dapat menimbulkan gangguan pada kelenjar tiroid. Oleh karena itu, buah harendong dengan kandungan senyawa alami yaitu flavonoid masih memiliki peluang untuk dikembangkan sebagai inhibitor tirosinase.



## KESIMPULAN

Ekstrak etanol buah harendong (*Melastoma malabathricum* L.) mempunyai aktivitas inhibitor enzim tirosinase yang cukup kuat pada substrat L-Tyrosine dengan total nilai IC<sub>50</sub> yang didapat sebesar 192.197 ppm. Dan pada uji aktivitas antioksidan nilai IC<sub>50</sub> ekstrak buah harendong (*Melastoma malabathricum* L.) yang didapat yaitu sebesar 10.20413 ppm yang menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia. *Materia Medika Indonesia*, Jilid I: Jakarta. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan; 1976. Hal. 118.
2. Scientific Committee on Consumer Products European Commission (SCCPEC). 2008. *Opinion on Kojic Acid*. European Commission Health & Consumer Protection. Brussels. Hlm: 1-79.
3. Nakagawa M, Kawai K. 1995. Contact allergy to kojic acid in skin care product. *Contact Dermatitis*. 32: 9-13.
4. Takizawa T, Mitsumori K, Tamura T, Nasu M, Ueda M, Imai T, Hirose M. 2003. Hepatocellular tumor induction in heterozygous mice P53-deficient CBA mice by a 26-week dietary administration of kojic acid. *Toxicol Sci*. 73: 287-293.
5. Nico S, Jana V, Stan P. 2009. The hunt for Natural skin whitening agents. *Int. J. Mol. Sci*. 10: 5326-5349.
6. Crozier A, Clifford MN, Ashishara H. 2006. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure, And Role In The Human Diet*. Iowa: Blackwell Publishing Ltd.
7. Ohguchi K, Tanaka T, Kido T. *Effect of Hydroxystilbene Derivatives on Tyrosinase Activity*. Biochemistry Biophysical Research Community. 2003; 307 (4): 861-63.
8. Kikuzu, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., & Taniguchi, H. 2002. Antioxidants properties of ferulic acid and it's related compound. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50 (7), 2161-2168.
9. Fais, A., Corda, M, Era, B., Fadda, M.B., Quezada, E., Santana., Picciau, C., et al. 2009. Tyrosinase inhibitor Activity of coumarin-Resveratrol Hybrid. *Molecules*, 2514-2520.
10. Woolery-Lloyd, H. Dan Kammer, J. N. 2011. Treatmen of hyperpigmentation In Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery. 171-175.
11. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. *Pedoman Teknologi Formulasi Sediaan Berbasis Ekstrak*, Volume I. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia; 2012. Hal: 7-14.
12. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2000. 9-11,16.
13. Chang, T. (2012). Natural melanogenesis inhibitors acting trough the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials*, 5(9), 1661-1685.

14. Chang T. 2012. Tyrosinase and Tyrosinase Inhibitors. *Journal Biocatalysis and Biotransformation* 1(2): 1-2.
15. Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T, Rahmniwati M, Djauhari E. 2010. *Potency of Indonesia medicinal plants as tyrosinase inhibitors and antioxidant agent*. *Journal of Biologi Science*, 10: 38-144.
16. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern Jc, 2002. *Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorometric Methods*. *Journal of Food and Drugs Analysis* 10(3): 178-182.
17. Nawawi RH. 2012. Uji Aktivitas, Stabilitas Fisik, dan Keamanan Sediaan Gel Pencerah Kulit yang Mengandung Ekstrak Jamur Tiram (*Pleurotus ostreatus*) Tesis. Universitas Indonesia. Depok.
18. Indriani, N., 2007, *Aktivitas Antibakteri Daun Senggugu (Clerodendron serratum (L.) Spr.)*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB, Bogor.
19. Chowdhury Roy A., Bhattacharyya K.A., and Chattopadhyay P. 2012. Study on functional properties of raw and blended Jackfruit seed flour (a non-conventional source)for food. Application. *Indian Journal of Natural Products and Resource*, 3(3): 347-353.
20. Agestia R dan Sugranni, A. 2009. *Kimia Organik Bahan Alam Flavonoid (Quercetin)*, Makalah. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanudin.
21. Mulya dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*, hal. 111, Airlangga University press, Surabaya.
22. Molyneux, P. 2004. *The use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity*. *Songklanakarin J. Sci Technol.* 26, 211-219.
23. Niken Nurkusmawati. 2013. *Formulasi Masker Gel Peel-Off Serbuk Perasan Buah Jeruk Lemon dengan Pembentuk Gel PVA*. Jakarta.
24. Moon J-Y, Yim E-Y, Song G, Lee NH, Hyun C-G. (2010).Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants. *EurAsia J Biosci* 4, 6, 41-53.
25. Miyazawa M, and Tamura N. 2007. Inhibitory Compound of Tyrosinase Activity from The Sprout of Polygonum Hydropiper L. (benitade), *Biology Pharmaceutical bulletin.* 30 (3), 505-597.
26. Chang T. 2009. *An updated review of tyrosinase inhibitor*. *International Journal of molecular science*: 2440-2476.