

Original Research**UJI AKTIVITAS PENGHAMBAT ENZIM TIROSINASE DARI FRAKSI BUTANOL DAUN AREUY KIKUNTI (*Pothos junghuhnii de Vreise*) SECARA IN VITRO****INHIBITOR TYROSINASE ENZYME ACTIVITY TEST OF AREUY KIKUNTI'S LEAVES IN VITRO (*Pothos junghuhnii de Vreise*)**

*Purwati¹ *, Billy Mintje²*

Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Jakarta Utara, Indonesia, 14350

**E-mail: purwati@uta45jakarta.ac.id*

Diterima: 09/05/2022

Direvisi: 17/05/2022

Disetujui: 29/06/22

Abstrak

Melasma merupakan hipermelanosis yang secara general berbentuk simetris berupa makula yang tidak rata. Melasma memiliki warna coklat muda hingga coklat tua akibat adanya sinar ultra violet dan berlebihnya aktivitas enzim tirosinase. Di Indonesia, kebanyakan masyarakat lebih memilih mengobati melasma dengan menggunakan tanaman obat tradisional. Tujuan dari penelitian ini guna mengamati fraksi butanol dari daun Areuy kikunti (*Pothos junghuhnii de Vreise*) apakah dapat menjadi inhibitor atau penghambat enzim tirosinase dengan menggunakan metode analisis IC_{50} dan asam kojat sebagai kontrol positifnya. Didapat nilai IC_{50} untuk hasil fraksi butanol yaitu sebesar 12.598,00 sedangkan untuk hasil fraksi air yaitu 46.340,4 pada. Dari nilai IC_{50} yang didapat menunjukkan bahwa fraksi butanol tidak memiliki kekuatan inhibisi terhadap enzim tirosinase.

Kata kunci: Inhibitor tirosinase; *Pothos junghuhnii de Vreise*; Enzim Tirosinase

Abstract

Melasma is a hypermelanosis that is generally symmetrical in the form of uneven macules. Melasma has a light brown to dark brown color due to the presence of ultra violet light and excess activity of the tyrosinase enzyme. In Indonesia, most people prefer to treat melasma by using traditional medicinal plants. The purpose of this study was to observe the butanol fraction of Areuy kikunti leaves (*Pothos junghuhnii de Vreise*) to determine whether it could be an inhibitor of the tyrosinase enzyme using the IC_{50} analysis method and kojic acid as the positive control. The IC_{50} value for the butanol fraction was 12.598,000 while the water fraction was 46.340,4. From the IC_{50} value obtained, it shows that the butanol fraction has no inhibitory power against the tyrosinase enzyme.

Keywords: Tyrosinase inhibitor; *Pothos junghuhnii de Vreise*; Tyrosinase Enzym

PENDAHULUAN

Kulit ialah kumpulan bagian tubuh yang letaknya di semua bagian atas luar tubuh manusia. Kulit berfungsi krusial sebagai organ yang melindungi seseorang dari beragaman rangsangan dan gangguan eksternal. Peran pokoknya yaitu melakukan perlindungan bagi kulit terhadap bahaya sinar ultra violet. Kulit merupakan bagian tubuh paling banyak terkena radikal bebas dari sinar ultraviolet (UV) yang berasal dari paparan sinar matahari dan dapat menyebabkan hiperpigmentasi dan melasma [1].

Hiperpigmentasi terjadi karena pigmen pada kulit mengalami kelebihan yang bisa disebabkan karena terpaparnya sinar ultraviolet pada kulit tersebut sehingga sering kali dikeluhkan oleh masyarakat terutama yang memiliki atensi pada estetika kulit. Sinar ultraviolet tersebut yang akan merangsang enzim tirosinase untuk aktif dan membuat produksi melanin menjadi cepat [2]. Hiperpigmentasi lebih sering terjadi pada tipe warna kulit yang lebih gelap .khususnya ras Hispanik, Asia, atau Afro-Amerika [3].

Melasma merupakan kondisi hipermelanosis kronik, yang biasanya rekuren, dan seringnya sulit untuk ditangani yang telah mempengaruhi jutaan orang di seluruh dunia. Walaupun melasma tidak berhubungan dengan mortalitas, namun dapat memengaruhi morbiditas penderita terutama dalam hal psikologis. Enzim yang berfungsi sebagai proses pembuatan melanin adalah enzim tirosinase, yang juga memiliki peran terhadap proses pigmentasi kulit atau melanogenesis [4].

Dengan tidak terkontrolnya enzim tirosinase yang berlebih, akan memperbesar kemungkinan terjadinya melasma. Salah satu tanaman yang diduga dapat menghambat kerja enzim tirosinase dan menghambat terjadinya melasma adalah tanaman areuy kikunti (*Pothos junghuhnii de Vreise*). Pada daun dan batang areuy kikunti terdapat kandungan flavonoid sebagai inhibitor tirosinase yang mampu menghambat aktivitas enzim tirosinase, sehingga dapat mencegah terjadinya hiperpigmentasi dan melasma [5].

Berdasarkan studi empiris yang sudah dilakukan oleh peneliti sebelumnya, tanaman ini biasa digunakan untuk pengobatan panas dalam, dengan cara merebus daun areuy kikunti oleh masyarakat kampung Adat Urug, Kecamatan Sukajaya, Kabupaten Bogor, dari 29 tumbuhan dengan melakukan skrining dan uji antimikroba, tumbuhan yang diketahui memiliki potensi tinggi adalah Areuy Kikunti (*Pothos junghuhnii de Vriese*) [6].

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah fraksi butanol dari tanaman areuy kikunti (*Pothos junghuhnii de Vreise*) dapat menghambat kerja enzim tirosinase.

METODE

Sampel (Bahan) Penelitian

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian yaitu: daun Areuy kikunti, aquadest, air bersih, etil asetat (*Merck*), metanol p.a (*Merck*), butanol, lempeng kromatografi lapis tipis, HCl pekat, alkohol, asam asetat (*Merck*).

Prosedur kerja

Metode penelitiannya merupakan penelitian eksperimen dengan metode analisis IC₅₀.

Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Areuy Kikunti (Pothos junghuhnii de Vriese)

Daun Areuy Kikunti (*Pothos junghuhnii de Vriese*) sebanyak 3 kg sudah dikeringkan, lalu ditimbang dan dimaserasi selama sembilan hari, dimasukkan ke dalam bejana dengan pelarut metanol dan terhindar dari cahaya, serta sering dilakukan pengadukan. Selanjutnya ampas dipisahkan dari maserat menggunakan kertas saring. Maserat yang sudah terpisah tersebut diletakkan di bejana dan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga didapatkan ekstrak metanol daun Areuy kikunti kental.

Fraksinasi Ekstrak Daun Areuy Kikunti

Ekstrak metanol daun Areuy Kikunti dilarutkan dengan metanol : air dengan perbandingan 3:1, dikarenakan ekstrak yang didapat dalam bentuk ekstrak cair yaitu sebanyak 300 mL, sehingga tidak perlu ditambahkan dengan metanol tetapi ditambah air 100 mL sehingga campuran tersebut berjumlah 400 mL, setelah tercampur, fraksi metanol : air difraksinasi dengan butanol yang perbandingannya adalah 1:1. Lapisan butanol (bagian lapisan atas) dikeluarkan dari corong pisah lalu ditampung. Fraksi metanol : air di fraksinasi kembali dengan butanol hingga fraksi butanol berwarna jernih, fraksi butanol yang telah ditampung dipekatkan dengan alat rotary evaporator.

Pada proses fraksinasi, pengocokan dilakukan selama 2-3 menit agar dalam penarikan pelarut terhadap kandungan kimia yang ada dalam sampel tertarik dengan maksimal. Terbentuknya 2 lapisan pada saat proses pemisahan dikarenakan adanya perbedaan berat jenis antara fraksi metanol : air dan pelarut butanol. Berat jenis fraksi butanol lebih rendah dari berat jenis fraksi metanol : air, maka fraksi butanol yang berada di lapisan atas. Fraksinasi butanol berupa lapisan berwarna coklat, yang selanjutnya akan dilakukan pemekatan melalui alat rotary evaporator diperoleh ekstrak kental butanol sejumlah 25,7g dengan rendemen yaitu 0.73% . Selanjutnya hasil tersebut diuapkan diatas *waterbath* dengan suhu 50°C hingga mengental. Hasil fraksi yang sudah kental digunakan dalam uji aktivitas inhibitor tirosinase [7].

Uji Aktivitas Inhibitor Tirosinase

Pembuatan Larutan Asam Kojat

Penimbangan secara seksama 5 miligram bubuk asam kojat yang selanjutnya akan melarutkan dapar fosfat sebesar 0,05 M ph 6,5 pada labu ukur sampai menyentuh volume 10 mL (500 µg/mL). Larutan asam kojat 500 µg/mL diambil sebesar 5 mL memakai pipet volume, melalui dapar fosfat 0,05 M pH 6,5 sampai volume 10 mL (250 µg/mL) pada labu ukur. Kemudian akan diencerkan sampai didapatkan variasi konsentrasi larutan asam kojat 125; 62,5; 31,25; 15,625; & 7,8125 µg/mL melalui orientasi konsentrasi dalam pengujian untuk menerima nilai IC_{50} [8].

Pengujian Asam Kojat

Berdasarkan penelitian terdahulu [5], menyatakan bahwa sejumlah 70 µL asam kojat ini memiliki fokus sebesar 7,8125 31,25; 15,625; 62,5; 125; 250; dan 500; µg/ml dituangkan ke 96 *well-microtiter plate*. Selanjutnya akan dilakukan penambahan dimana 30 µL larutan tirosinase 333 Unit/ml dan 110 µL larutan substrat L-DOPA 0,002 M. Selanjutnya akan dilakukan penginkubasian selama 30 menit dari kombinasi tersebut di suhu 37°, nantinya serapan yang dihasilkan akan ditindak lanjuti dengan mengukur menggunakan alat *microplate reader* yang di angka panjang gelombang sebesar 490 nm.

Pengujian Fraksi Butanol

Fraksi n-butanol akan dilarutkan terhadap DMSO sehingga diperoleh konsentrasi 20 mg/ml. Proses selanjutnya yaitu penyiapan larutan stok melalui pelarutan ekstrak pekat terhadap bufer fosfat 50 mM (pH 6.5) sehingga mencapai terfokus pada 600 µg/mL. Ekstrak yang didapat diuji dengan fokus 62.5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/ml, 500 µg/mL, 1000 µg/mL. Sejumlah 70 µL ekstrak sampel akan ditambahkan ke pelat tetes 96 sumur dan sumur-sumur ini akan ditambah 30 µL tirosinase (Sigma, 333 unit/ml dalam bufer fosfat). Lalu akan diteruskan proses inkubasi dengan kombinasi tersebut dalam waktu 5 menit yang nantinya akan dilakukan penambahan sejumlah 110 µL substrat (L-tirosin 2 mM atau L-DOPA 12 mM). Kombinasi tersebut akan dilakukan penginkubasian selama 30 menit di suhu 37° C. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi larutan pada setiap sumur melalui micro-plate reader guna dapat mencari jumlah persentase nilai konsentrasi hambat 50% dan inhibisi (IC₅₀) [9].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksi Butanol Daun Areuy Kikunti

Fraksinasi daun Areuy kikunti ini dilakukan untuk memisahkan fraksi butanol dan fraksi metanol : air. Pada saat proses pemisahan dengan corong pisah, campuran membentuk 2 lapisan. Terbentuknya 2 lapisan pada saat proses pemisahan dikarenakan adanya perbedaan berat jenis antara fraksi metanol : air dan pelarut butanol. Berat jenis fraksi butanol lebih rendah dari berat jenis fraksi metanol : air, maka fraksi butanol yang berada di lapisan atas. Lapisan atas yaitu fraksi butanol akan dipisahkan dari corong pisah dan selanjutnya dilakukan penampungan hingga fraksi butanol berwarna jernih dan akan dipisahkan melalui rotary vacuum evaporator.

Pada proses fraksinasi, pengocokan selama 2-3 menit agar dalam penarikan pelarut terhadap kandungan kimia yang ada dalam sampel tertarik dengan maksimal. Fraksi butanol berupa lapisan berwarna coklat (lapisan atas), lalu dipisahkan menggunakan alat rotary evaporator yang didapatkan dari ekstrak kental butanol sejumlah 25,7 g dan nilai rendemennya sejumlah 0.73%. Selanjutnya hasil tersebut diuapkan diatas waterbath dengan suhu 50°C hingga mengental. Hasil fraksi yang sudah kental digunakan dalam uji aktivitas inhibitor tirosinase.

Sampel	Bobot ekstrak (g)	% Rendemen	Warna
Fraksi Butanol	25.7	0.73	Coklat

Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase

Uji ini dilakukan guna mencari tahu bagaimana proses penghambatan berbagai konsentrasi ekstrak melalui pengamatan terhadap nilai persentase inhibisi dan untuk mencari tahu bagaimana penghambatan tersebut terhadap tyrosinase melalui pengamatan terhadap nilai IC₅₀. Penelitian ini menggunakan uji konsentrasi ekstrak yaitu 62,5ppm; 125ppm; 250ppm; 500ppm; 1000ppm. Berbagai jenis konsentrasi tersebut ditunjukkan guna mengamati sejauh mana penambahan konsentrasi ekstrak memiliki kontribusi terhadap kenaikan dan juga penghambatan enzim tirosinase.

Sejumlah 50 mg Ekstrak butanol daun areuy kikunti akan dilakukan pelarutan ke DMSO sehingga diperoleh konsentrasi 5.000 μ g/mL. Selanjutnya akan dilakukan pengenceran larutan stok ke buffer fosfat 50 mM (pH 6,5) sehingga didapatkan konsentrasi larutan ekstrak 62,5ppm; 125ppm; 250ppm; 500ppm; dan 1000ppm.

Selanjutnya akan dilakukan pengujian asam kojat dalam pelat tetes 96 sumur yang juga menjadi kontrol positif dengan konsentrasi yaitu 15,63ppm; 31,25ppm; 62,5ppm; 125ppm; 250ppm dan 500ppm. Lalu akan ditambahkan 30 μ L enzim tirosinase pada setiap 70 μ L ekstrak pengenceran (Sigma, 333 unit/mL dalam buffer fosfat). Nantinya Pelat tersebut akan dilakukan penginkubasian selama 5 menit di suhu 37°C, lalu dilakukan penambahan 110 μ L substrat L-DOPA 2 mM dan akan dilakukan penginkubasian di temperature sebesar 37°C dengan durasi selama 30 menit.

Larutan yang ada di sumur-sumur akan dilakukan pengukuran melalui multiwell plate-reader dengan panjang gelombang 510 nm guna mencari nilai IC₅₀ dan % inhibisi melalui pembadingan serapan sampel sebelum (A) dan sesudah (B) penambahan ekstrak.

Tabel 1. Hasil Penghambatan Aktivitas Tirosinase

No	Sampel	Konsentrasi (ppm)	%inhibisi	Persamaan linear	IC ₅₀
1	Fraksi butanol	62.5	-0.432	y = 0.004x + 0.3935 R ² = 0.9704	12.598,00
		125	0.000		
		250	0.931		
		500	1.830		
		1000	3.426		
2	Fraksi air	62.5	-0.699	y = 0.0011x - 0.9745 R ² = 0.6316	46.340,4
		125	-1.031		
		250	-1.031		
		500	0.033		
		1000	0.000		

Berdasarkan tabel diatas, diketahui bahwa hasil dari pengujian aktivitas inhibitor tirosinase ekstrak butanol terhadap tirosinase dengan konsentrasi 62.5-1000ppm menjelaskan bahwasanya apabila konsentrasi semakin besar maka % inhibisi akan semakin besar pula. Aktivitas penghambat (% inhibisi) tertinggi pada ekstrak butanol dikonsentrasi 1000ppm yaitu 3,426%. Sedangkan aktivitas inhibitor tertinggi pada fraksi air adalah pada 500ppm yaitu 0.03%. Aktivitas ekstrak butanol terhadap konsentrasi tertinggi 1000pm belum mampu melakukan penghambatan 50% aktivitas enzim. Berdasarkan hal tersebut maka masih belum bisa dicari tahu nilai IC₅₀. Tingkat

intensitas IC_{50} dikelompokkan dalam beberapa kategori, yaitu sangat kuat < 50 ppm, kuat $50 - 100$ ppm, sedang $100 - 250$ ppm, lemah $250 - 500$ ppm, dan sangat lemah > 500 ppm. Suatu senyawa yang dikatakan memiliki aktivitas inhibitor aktif jika nilai $IC_{50} < 1000$ ppm, sedangkan inhibitor tidak aktif jika nilai $IC_{50} > 1000$ ppm [10].

Tabel 2. Hasil Skrining (Wahyuli, 2022)

No	Ekstrak	Identifikasi	Hasil
1	Ekstrak Metanol	Alkaloid	+
		Fenolik	+
		Steroid/Terpenoid	+
		Flavonoid	+
2	Fraksi Butanol	Alkaloid	-
		Fenolik	+
		Steroid/Terpenoid	+
		Flavonoid	+

Tabel 3. Hasil Inhibisi Asam Kojat Terhadap Enzim Tirosinase

No	Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	Persamaan linear	IC_{50} (ppm)
1	Kojic Acid	500	98.869	$y = 21.92\ln(x) - 24.58$ $R^2 = 0.98$	30.04
		250	92.715		
		125	83.999		
		62.5	69.528		
		31.25	50.566		

Berdasarkan dari tabel diatas menunjukkan kojic acid memiliki aktivitas enzim yang lebih baik dibandingkan ekstrak dari daun Areuy kikunti dengan pelarut butanol. Pada konsentrasi 500ppm, asam kojat mempunyai nilai inhibisi sejumlah 98,869%. Kurangnya konsentrasi berpengaruh terhadap kurangnya aktivitasi inhibisi. Kojic acid merupakan obat inhibitor tirosinase dan dipakai untuk penyembuhan penyakit melanin. Berdasarkan penelitian diatas, didapatkan data yaitu fraksi butanol memiliki IC_{50} sebesar 12.598,00ppm dan fraksi air memiliki IC_{50} sebesar

46.340,4ppm, dan dapat disimpulkan bahwa fraksi butanol dan fraksi air daun areuy kikunti tidak memiliki kekuatan inhibisi terhadap enzim tirosinase.

KESIMPULAN

Fraksi butanol dari daun areuy kikunti memiliki nilai IC_{50} sebesar 12.598ppm. Dari nilai IC_{50} -nya yang sangat besar, dapat disimpulkan bahwa fraksi butanol daun areuy kikunti tidak memiliki kekuatan inhibisi terhadap enzim tirosinase.

DAFTAR RUJUKAN

1. Draelos, Z., Dahl, A., Yatskayer, M., Chen, N., Krol, Y., & Oresajo, C. Dyspigmentation, skin physiology, and a novel approach to skin lightening. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2013, 12(4), 247–253.
2. Latifa N. P., Susilawati, Y., Farmasi, F., & Padjadjaran, U. Herbal Potensial Sebagai Anti Hiperpigmentasi. *Farmaka*. 2018, 16, 591–597.
3. Hindun, S., Rusdiana, T., Abdasah, M., & Hindritiani, R. Potensi limbah kulit jeruk nipis (*Citrus auronfolia*) sebagai inhibitor tirosinase. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2017, 4(2), 64.
4. Ikino, J. K., Nunes, D. H., da Silva, V. P. M., Sens, M. M., & Fröde, T. S. Melasma and assessment of the quality of life in Brazilian women. *J. Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2015, 90(2), 196–200.
5. Muhit M., Izumikawa M., U. K. Phenolic constituents of the Bangladeshi medicinal plant *Pothos scandens* and their anti-estrogenic, hyaluronidase inhibition, and histamine release inhibitory activities. *J. Phytochemistry*, 2016, 121, 30–37.
6. Astuti, M. A., Syahputra, G. S., Piter, P., & Arbain, D. Kajian Etnofarmasi dan Fitokimia Tumbuhan Obat Kampung Adat Urug, Kecamatan Sukajaya, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. *J. Tumbuhan Obat Indonesia*, 2021;14(1), 14–28.
7. Restiana, W. Isolasi senyawa utama dari fraksi butanol rimpang binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.)Steenis). Jakarta. 2019.
8. Sagala, Z., Pratiwi, R. W., Azmi, N. U., & Maap. Uji aktivitas inhibisi terhadap enzim tirosinase dari ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya* L .) secara in vitro. *J. Penelitian Farmasi Indonesia*, 2019;7(2), 34–38.
9. Batubara, I., & Adfa, M. Potensi daun kayu bawang (*Protium javanicum*) sebagai penghambat kerja enzim tirosinase. *J. Sains & Matematika*, 2013,1(2), 52–56.

10. Safithri, M., Setyaningsih, I., Tarman, K., Yuhendri, V. M., & Meydia, M. Potensi kolagen teripang emas sebagai inhibitor tirosinase. *J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 2018; 21(2), 296.