

UJI AKTIVITAS INHIBISI TIROSINASE SECARA IN-VITRO GEL EKSTRAK DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia*)

HARDI ASTUTI WITASARI^{1*}, NADIA SALSABILA²

¹Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

²Program Studi S1 Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan

e-mail: hardi.witasari@pharm.uad.ac.id

ABSTRAK

Latar belakang: Daun binahong memiliki aktivitas untuk menghambat enzim tirosinase dan mengandung metabolit sekunder salah satunya adalah senyawa flavonoid. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah gel dengan kandungan ekstrak daun binahong.

Tujuan: Untuk mengetahui apakah sampel gel ekstrak daun binahong memiliki aktivitas penghambatan enzim tirosinase.

Metode: Digunakan spektrofotometri dengan mengukur serapan dopakrom menggunakan mikroplate-reader. Sampel dengan variasi konsentrasi 50.000; 60.000; 70.000; 80.000; dan 90.000 µg/ml didapatkan hasil berupa persenhambatan dengan nilai akhir IC₅₀. Asam kojat digunakan sebagai kontrol positif.

Hasil: Uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase yang telah dilakukan dengan membaca serapan dopakrom pada panjang gelombang maksimum yaitu 450 nm. Nilai IC₅₀ pada uji sampel didapatkan hasil sebesar 36.781 ± 686,66 µg/ml, sedangkan nilai IC₅₀ asam kojat adalah sebesar 19,849 ± 0,715 µg/ml.

Kesimpulan: Sampel gel ekstrak daun binahong yang di uji terbukti memiliki aktivitas penghambatan enzim tirosinase dengan nilai IC₅₀ sebesar 36.781 ± 686,66 µg/ml, sedangkan pada kontrol positif asam kojat memiliki nilai IC₅₀ sebesar 19,849 ± 0,715 µg/ml.

Kata kunci: Daun binahong, gel, in-vitro, melanogenesis, penghambat enzim tirosinase

PENDAHULUAN

Pemutih atau pencerah kulit adalah salah satu produk kosmetik yang digunakan untuk mencerahkan atau menghilangkan pewarnaan kulit yang tidak diinginkan [1], karena kulit yang cerah diasumsikan dengan indikasi terlihat lebih muda dan cantik [2]. Beberapa penelitian di Indonesia menunjukkan bahwa 55% dari 85% wanita yang berkulit gelap ingin agar kulitnya menjadi lebih putih. Penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa 70%-80% perempuan di Asia (yaitu: Cina, Thailand, Taiwan, dan Indonesia) menginginkan kulit yang lebih putih. Perubahan warna pada kulit menjadi lebih cerah dipengaruhi oleh jenis dan jumlah melanin yang disinkronkan dan disimpan di dalam melanosom.

Melanogenesis adalah proses fisiologis dalam sintesis pigmen melanin yang bertanggungjawab terhadap pigmentasi pada kulit dan mencegah kerusakan kulit di bawah kondisi normal [3]. Selain itu, pemahaman mendalam tentang sintesis melanin juga akan berkontribusi pada pengembangan kosmetik dan obat-obatan. Salah satu cara untuk mencegah atau menghambat pembentukan melanin adalah dengan melakukan penghambatan aktivitas tirosinase [4]. Enzim yang berperan pada jalur sintesis melanin adalah tirosinase. Tirosinase berperan mengkatalis dua reaksi yaitu hidroksilasi tirosin menjadi dihidroksi-fenilalamin (L-DOPA) dan oksidasi L-Dopa menjadi

dopakuinon. Radiasi sinar UV matahari juga berpengaruh mempercepat proses produksi melanin dengan mengaktifasi tirosinase pada jaringan kulit [5]. Salah satu inhibitor tirosinase yang sering dipakai pada produk kosmetik adalah asam kojat, namun penggunaan asam kojat mulai dibatasi karena menyebabkan iritasi kulit dan kemampuannya masuk ke aliran darah sistemik, sehingga dapat menimbulkan gangguan pada kelenjar tiroid [6]. Berdasarkan alasan tersebut maka bahan alam dapat digunakan sebagai pilihan yang tepat untuk meminimalisir efek yang tidak diinginkan pada kosmetik pencerah kulit.

Anredera cordifolia (Ten.) Steenis atau daun binahong merupakan tanaman merambat yang biasa digunakan secara empiris untuk mengobati penyakit seperti luka, hiperkolesterol, hipertensi dan digunakan sebagai pendamping pengobatan kanker [7]. Daun binahong juga terbukti mengandung flavonoid, saponin, alkaloid dan vitamin C [8] dan berperan sebagai penghambat enzim tirosinase. Flavonoid menghambat secara langsung aktivitas tirosinase pada proses melanogenesis sehingga pembentukan dopakrom dapat dicegah.

Penelitian yang dilakukan oleh Wahyuningsih (2013), ekstrak etil asetat daun binahong memiliki aktivitas penghambatan melanin dengan nilai IC_{50} sebesar 299,1 $\mu\text{g/ml}$, aktivitas penghambatan melanin ekstrak etil asetat daun binahong dikatakan lebih rendah dibanding kontrol positif hidroquinon dengan nilai IC_{50} sebesar 16,34 $\mu\text{g/ml}$. Semakin besar nilai IC_{50} maka aktivitas penghambatan terhadap melanin akan semakin kecil [9].

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah gel ekstrak daun binahong. Bentuk sediaan semi solid banyak diminati karena keunggulannya sebagai produk siap pakai dan lebih praktis. Bentuk sediaan semi solid memiliki konsistensi dan wujud antara solid dan liquid. Sediaan ini juga memiliki keunggulan dalam hal adhesivitas sediaan sehingga memberi waktu tinggal yang relatif lebih lama. Beberapa contoh sediaan semi solid adalah krim, pasta, dan gel. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas penghambatan enzim tirosinase dengan parameter nilai IC_{50} dari sampel gel ekstrak daun binahong [10].

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kompor listrik (Maspion), pH meter, beker glass, labu alas bulat, labu takar berbagai ukuran, pipet volume, tabung reaksi, microplate (Iwaki pyrex), mikropipet, pipet tetes, *microplate reader* (Biochrom), rak tabung reaksi, dan timbangan analitik (Mettler Toledo).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aqua demineralisata (*One Lab*); dinatrium hidrogen fosfat (Merck); natrium dihidrogen fosfat (Merck); NaOH (Merck); L-Tirosin (Sigma Aldrich); *mushroom tyrosinase* (Sigma Aldrich); dan asam kojat (Sigma Aldrich).

PROSEDUR PENELITIAN

Uji kandungan flavonoid gel ekstrak daun binahong

Uji kandungan flavonoid pada gel ekstrak daun binahong dilakukan dengan menambahkan NaOH ke dalam larutan dan warna larutan menjadi kuning [11].

Uji pendahuluan aktivitas enzim tirosinase

Uji pendahuluan dilakukan dengan penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom

dengan menggunakan *microplate reader*. Selanjutnya dilakukan penentuan konsentrasi enzim tirosinase optimal menggunakan panjang gelombang maksimum pada *microplate reader*. Setelah itu ditentukan konsentrasi substrat optimal yang dibaca pada panjang gelombang maksimum pada *microplate reader*.

Uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase

Sebanyak 80 µl enzim tirosinase 310 U/ml dan 80 µl sampel gel ekstrak daun binahong dimasukkan ke dalam *microplate*, ditambahkan 40 µl L-Tirosin 2,5 mM, dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Pada konsentrasi 50.000 µg/ml, larutan diambil sebanyak 80 µl kemudian ditambahkan dengan larutan dapar fosfat pH 6,5 hingga volume total *microplate* 200 µl sehingga didapatkan konsentrasi akhir 20.000 µg/ml. Cara yang sama dilakukan pada larutan sampel gel ekstrak daun binahong dengan konsentrasi 60.000; 70.000; 80.000; dan 90.000 µg/ml untuk membuat konsentrasi 24.000; 28.000; 30.000; dan 32.000 µg/ml. Baca serapan dopakrom pada panjang gelombang maksimum.

Pada uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase pada standar asam kojat Sebanyak 80 µl enzim tirosinase 310 U/ml dan 80 µl sampel atau dimasukkan ke dalam *microplate*, lalu ditambahkan 40 µl L-Tirosin 2,5 mM, dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Pada konsentrasi 2 µg/ml, larutan diambil sebanyak 80 µl kemudian ditambahkan dengan larutan dapar fosfat pH 6,5 hingga volume total *microplate* 200 µl sehingga didapatkan konsentrasi akhir 0,8 µg/ml. Cara yang sama dilakukan pada larutan asam kojat dengan konsentrasi 5, 20, 40, dan 80 µg/ml untuk membuat konsentrasi 2; 8; 16; dan 32 µg/ml. Baca serapan dopakrom pada panjang gelombang maksimum.

Analisis Data

Analisis hasil yang digunakan adalah dengan menghitung persen hambatan tirosinase dari seri larutan yang telah diuji.

Lalu pengukuran IC_{50} dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi sampel gel ekstrak daun binahong, kemudian diukur serapannya dan dihitung % penghambatannya. Plot ke dalam kurva antara konsentrasi ekstrak vs % inhibisi. Dari persamaan linear yang didapat dari kurva tersebut, dapat dihitung IC_{50} , yaitu konsentrasi ekstrak yang mempunyai aktivitas penghambatan terhadap tirosinase sebesar 50%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji kandungan flavonoid pada gel ekstrak daun binahong bertujuan untuk memastikan bahwa sampe gel ekstrak daun binahong terbukti mengandung flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa yang diduga berperan besar dalam penghambatan enzim tirosinase pada penelitian ini [11]. Hasil uji kandungan flavonoid ditampilkan pada Tabel I.

Tabel I. Hasil Uji Kandungan Flavonoid Gel Ekstrak Binahong

Bahan uji	Zat pendeteksi	Hasil	Intepretasi
Gel ekstrak binahong	Larutan NaOH	Warna kuning	(+) mengandung flavonoid

Berdasarkan Tabel I, diketahui bahwa sampel gel ekstrak daun binahong positif mengandung flavonoid. Flavonoid merupakan komponen fitokimia yang memiliki struktur dasar C6- C3-C6. Flavonoid akan bereaksi dengan basa, seperti amoniak atau NaOH menghasilkan warna kuning yang kuat. Komponen fenol termasuk juga flavonoid dapat berperan sebagai substrat enzim alternatif karena menunjukkan afinitas yang baik dengan enzim, sehingga pembentukan dopakrom dapat dicegah [12].

Uji pendahuluan dilakukan sebelum melakukan uji penghambatan enzim. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kondisi-kondisi optimal yang akan digunakan pada saat uji penghambatan enzim. Variabel yang akan dioptimasi pada penelitian ini adalah konsentrasi reaktan, yaitu konsentrasi enzim dan konsentrasi substrat optimal yang akan digunakan saat uji penghambatan enzim tirosinase. Suhu dan pH yang disesuaikan dengan petunjuk penggunaan enzim yaitu pada 37°C dan pH 6,5 [6,13.14]. Hasil uji pendahuluan dirangkum pada tabel II.

Tabel II. Rangkuman Hasil Uji Pendahuluan

No	Komponen Uji	Hasil
1	Panjang gelombang	450 nm
2	Konsentrasi enzim	310 U/ml
3	Konsentrasi substrat	2,5 mM

Berdasar hasil uji pendahuluan yang disajikan pada Tabel II, diketahui keadaan yang harus dipenuhi untuk pengujian inhibitor enzim tirosinase. Tirosinase adalah enzim yang berperan dalam pembentukan pigmen kulit atau dikenal dengan proses melanogenesis. Dalam proses melanogenesis, tirosinase berperan sebagai katalis pada dua reaksi yang berbeda yaitu proses hidrosilasi L-Tirosin menjadi dihidroksi-fenilalanin (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. Tirosinase pada jaringan kulit diaktifasi oleh adiasi sinar UV matahari sehingga mempercepat proses produksi melanin [5].

Inhibitor tirosinase dibutuhkan dan berperan penting sebagai penghambat produksi melanin pada lapisan epidermis dan membuat kulit tampak lebih cerah. Pengujian inhibitor tirosinase dapat dilakukan dengan mengukur kemampuan suatu senyawa untuk menghambat fase monofenolase (substrat L-tirosin) dan difenolase (substrat L-DOPA), dengan arbutin dan asam kojat sebagai kontrol positif. Salah satu senyawa kimia yang dapat menghambat aktivitas tirosinase adalah senyawa polifenol yang merupakan kelompok flavonoid [15].

Hasil pengujian menunjukkan bahwa sampel gel ekstrak daun binahong terbukti memiliki kandungan flavonoid pada uji flavonoid, lalu dilanjutkan untuk di uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase. Penelitian dilakukan dengan menggunakan *microplate reader* sehingga enzim yang diperlukan hanya sedikit. Hasil uji ditampilkan pada Tabel III.

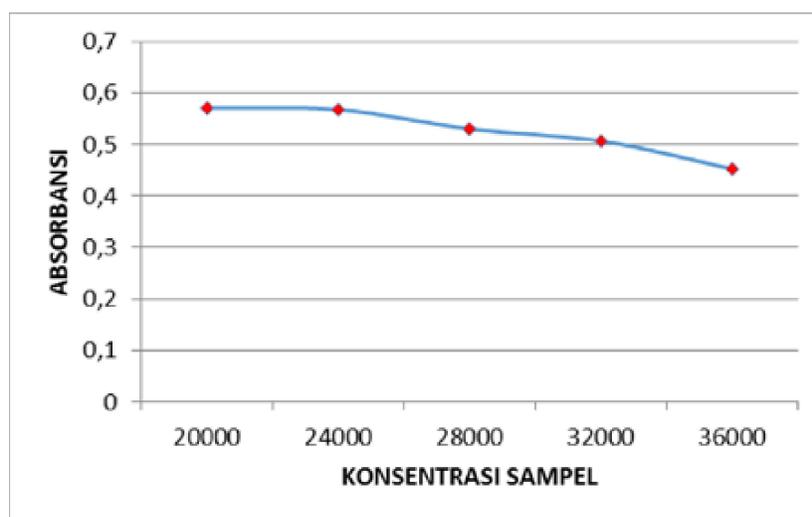
Tabel III. Aktivitas penghambatan enzim tirosinase

No	Bahan	NILAI IC ₅₀ (µg/ml) ±SD
1	Asam Kojat	19,849 ± 0,715
2	Gel Ekstrak Daun Binahong	36781 ± 686,663

Data pada tabel III menunjukkan bahwa asam kojat sebagai control positif mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 19,849 µg/ml sedangkan sampel uji gel yang mengandung ekstrak binahong sebesar

36.781 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} ini menyatakan dimana konsentrasi suatu senyawa menghambat aktivitas enzim tirosinase sebanyak 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin kecil konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat aktivitas enzim tirosinase sebanyak 50% sehingga, semakin kecil nilai IC_{50} pada suatu larutan atau senyawa yang diuji maka dapat dinyatakan semakin kuat juga potensi penghambatan aktivitas enzim tirosinase dalam larutan atau senyawa tersebut. Data dari tabel III menunjukkan kontrol asam kojat memiliki aktivitas pengambatan yang kuat, sedangkan nilai IC_{50} pada sampel gel ekstrak daun binahong adalah lemah.

Hasil uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase gel ekstrak daun binahong adalah positif meskipun masuk kategori lemah. Hal ini dibuktikan dalam grafik absorbansi sampel vs variasi konsentrasi sampel gel ekstrak daun binahong yang ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik konsentrasi sampel gel ekstrak daun binahong vs absorbansi

Grafik pada Gambar 1 menunjukkan bahwa setiap penambahan konsentrasi sampel gel ekstrak binahong terdapat penurunan nilai absorbansi, semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka semakin tinggi kemampuan inhibisinya. Kemampuan inhibisi ditandai dengan penurunan pembentukan dopakrom dan penurunan intensitas warna yang terbentuk [16]. Hal ini menunjukkan bahwa gel ekstrak daun binahong memiliki potensi sebagai penghambatan aktivitas tirosinase, walaupun berpotensi lemah, dengan nilai IC_{50} yang cukup besar. Hal ini sebanding dengan hasil pengujian kandungan total flavonoid pada ekstrak etanol daun binahong yang sangat kecil yaitu hanya 7,81 mg/kg (kering) dan 11,263 mg/kg (segar) [7]. Penelitian lain terkait penghambatan aktivitas enzim tirosinase pada daun pepaya yang mengandung flavonoid juga menunjukkan hasil berpotensi sebagai inhibitor tirosinase dengan nilai IC_{50} sebesar 12158,87 $\mu\text{g/ml}$ [16].

Walaupun memiliki potensi penghambatan enzim tirosinase yang lemah, keamanan adalah pertimbangan utama dalam pemilihan senyawa sebagai inhibitor tirosinase pada produk kosmetik. Penggunaan asam kojat mulai dibatasi karena menyebabkan iritasi kulit dan kemampuannya masuk ke aliran darah sistemik, sehingga dapat menimbulkan gangguan pada kelenjar tiroid [4]. Oleh karena itu, daun binahong (*Anredera cordifolia*) dengan kandungan senyawa alami salah satunya yaitu flavonoid masih memiliki peluang untuk dikembangkan sebagai inhibitor tirosinase di masa yang akan datang [15].

KESIMPULAN

Gel ekstrak daun binahong memiliki aktivitas penghambatan enzim tirosinase dengan nilai IC_{50} sebesar 36.781 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan nilai IC_{50} , gel ekstrak binahong terkategori lemah dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sanjeeva, K.K.A., Kim, E.A., Son, K.T., Jeon, Y.J. Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications isolated of phlorotannins from brown seaweeds: a review. 2016. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 162: 100-105
2. Smit N, Vicanova J, Pavel S. The hunt for natural skin whitening agents. 2009. *International Journal of Molecular Sciences*. 10(12): 5326-5349.
3. Pintus, F., & Span, D. Antityrosinase activity of Euphorbia characias extracts. 2015. *Peerj*, (5):1305.
4. Lloyd, H.W., Jenna, N., & Kammer, BA. Treatment of Hyperpigmentation Semin Cutan. 2011. *Med Surg*, 30:171-175.
5. Fais, A., Corda, M., Era, B, Fad da, M.B, Quezada, E, Santana L, Picciau, C., et al. Tyrosinase Inhibitor Activity of Coumarin-Resveratrol Hybrid. 2009. *Molecules*, 2514-2520.
6. Rauniyar, R., Talkad, M.S., Sahoo, S., Singh, A., Harlalka, P. Anti- Tyrosinase Activity Of *Stachytarpheta cayennensis* in Vitro. 2014. *International Journal Of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3(7): 14259-14266
7. Selawa, W., Runtuwene, M.R.J, Citraningtyas, G. Kandungan Flavonoid dan Kapasitas Antioksidan total ekstrak etanol Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis). 2013, *Jurnal Ilmiah Farmasi UNSRAT*, 2(1), Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT, Manado
8. Patria, A., D, K. Praseno dan S. Tana. Kadar hemoglobin dan jumlah eritrosit puyuh (*Coturnix coturnix japonica* linn.) setelah pemberian larutan kombinasi mikromineral (Cu, Fe, Zn, Co) dan vitamin (A, B1, B12, C) dalam air minum. 2013. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 21(1): 26 – 35
9. Wahyuningsih, Q. Aktivitas Penghambatan Tirosinase dari Ekstrak etil asetat Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (ten) Steen). 2013. Skripsi, Universitas Muhamadiyah Purwokerto, Jawa Tengah
10. Nurhanifah Hani Kajian. Pustaka Gel Anti Jerawat Dari Ekstrak Daun Binahong. 2013. Sekolah Tinggi Farmasi Bandung Sarjana Muda TA 2012/2013
11. Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H. Phytochemical Screening and Extraction: A Review 2011. *International Pharmaceutica Scientia*, 1(1): 98-106.
12. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chem, J.C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. 2002. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3): 178- 182.
13. Mahardika, H. Uji Penghambatan Tirosinase Secara In Vitro Serta Stabilitas Fisik dan Stabilitas Kimia Sediaan Krim yang Mengandung Asam Azelat. 2012. Skripsi, Fakultas MIPA Universitas Indonesia, Jakarta.
14. Nawawi, R.H. Uji Aktivitas, Stabilitas Fisik dan Keamanan Sediaan Gel Pencerah Kulit yang Mengandung Ekstrak Jamur Tiram (*Pleurotus ostreatus*). 2012. Tesis, Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia, Jawa Barat.
15. Öhretoğlu, D.Ş., Sari, S., Barut, B., Özel, A. Tyrosinase inhibition by some flavonoids: Inhibitory

- activity, mechanism by in vitro and in silico studies. 2018. Bioorganic Chemistry.
16. Sagala, Z., Pratiwi, R.W., Azmi, N.U. Uji Aktivitas Inhibisi Terhadap enzim Tirosinase dari ekstrak Daun Pepaya (*Carica Papaya* L.) Secara In vitro. 2019. Jurnal Penelitian farmasi Indonesia, 7(2), ISSN: 2656-3614.