

Inhibition test of tyrosinase activity from Zingiberaceae

Uji inhibisi aktivitas enzim tirosinase beberapa jenis tumbuhan Zingiberaceae

Arini Aprilliani*, Asep Gana Suganda, Rika Hartati

Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung

*Corresponding author. Email: arini.aprilliani25@gmail.com

Abstract

Background: Long-term continuous exposure to ultraviolet will cause hyperpigmentation. One of the methods to prevent hyperpigmentation is by inhibiting tyrosinase activity. A number of Zingiberaceae, such as turmeric, galangal, and bangle hantu, can inhibit tyrosinase activity.

Objective: This study aimed to test the inhibition of tyrosinase activity by the rhizomes of several Zingiberaceae plants. In addition, the fractions of selected plants were also tested.

Methods: Extraction by maceration used 96% ethanol, and fractionation used n-hexane and ethyl acetate. In vitro tyrosinase inhibition test employed alpha-arbutin as the positive control.

Results: Test on 19 samples showed the presence of tyrosinase inhibitory activity. The ethanolic extracts of kecombrang, kunci pepet, bangle hitam, temu giring, and red ginger provided the highest level of inhibition against tyrosinase activity with the percentage of inhibition at $22.50 \pm 1.46\%$, $20.75 \pm 0.04\%$, $19.96 \pm 0.03\%$, $18.85 \pm 0.11\%$, and $18.63 \pm 0.06\%$, respectively. The IC_{50} of kecombrang extract (761.75 ± 23.1 mg/L) was higher than that of n-hexane (575.37 ± 4.1 mg/L), ethyl acetate (542.39 ± 12.4 mg/L), and water fraction (587.40 ± 2.6 mg/L).

Conclusion: The three fractions had better levels of IC_{50} than the extract. The ethyl acetate fraction had a significantly higher level of tyrosinase inhibition than the water fraction and n-hexane fraction of kecombrang rhizome.

Keywords: tyrosinase, Zingiberaceae, alpha-arbutin, kecombrang

Intisari

Latar belakang: Paparan sinar UV secara terus menerus dalam jangka lama akan menyebabkan hiperpigmentasi pada kulit. Salah satu pencegahan hiperpigmentasi adalah dengan penghambatan aktivitas tirosinase. Beberapa suku Zingiberaceae seperti kunyit, lengkuas dan bangle hantu dapat menghambat aktivitas tirosinase.

Tujuan: Tujuan penelitian adalah untuk menguji inhibisi aktivitas enzim tirosinase dari rimpang beberapa jenis tumbuhan anggota suku Zingiberaceae. Selain itu, dilakukan pula terhadap hasil fraksinasi tumbuhan terpilih.

Metode: Ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96 % dan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat. Uji penghambatan tirosinase secara *in vitro* dengan kontrol positif menggunakan alpha-arbutin.

Hasil: Hasil uji terhadap 19 sampel tumbuhan menunjukkan adanya aktivitas inhibisi tirosinase. Ekstrak etanol rimpang kecombrang, kunci pepet, bangle hitam, temu giring dan jahe merah memberikan nilai inhibisi tertinggi terhadap aktivitas tirosinase dengan persen inhibisi masing-masing sebesar $22,50 \pm 1,46 \%$, $20,75 \pm 0,04 \%$, $19,96 \pm 0,03 \%$, $18,85 \pm 0,11 \%$, $18,63 \pm 0,06 \%$. IC_{50} ekstrak rimpang kecombrang ($761,75 \pm 23,1$ mg/L) lebih tinggi dibandingkan IC_{50} yang dihasilkan oleh fraksi n-heksana rimpang kecombrang ($575,37 \pm 4,1$ mg/L), fraksi etil asetat rimpang kecombrang ($542,39 \pm 12,4$ mg/L) dan fraksi air rimpang kecombrang ($587,40 \pm 2,6$ mg/L).

Kesimpulan: Sehingga dapat disimpulkan bahwa ketiga hasil fraksi memiliki IC_{50} lebih baik dibandingkan ekstrak. Fraksi etil asetat rimpang kecombrang memiliki penghambatan tirosinase lebih baik secara signifikan dibandingkan fraksi air rimpang kecombrang dan fraksi n-heksana rimpang kecombrang.

Kata kunci: tirosinase, Zingiberaceae, alpha-arbutin, kecombrang.

1. Pendahuluan

Kulit merupakan bagian terluar pada tubuh manusia yang berperan penting dalam proteksi tubuh. Salah satu fungsi kulit adalah melindungi tubuh dari paparan sinar UV. Paparan sinar UV secara terus menerus dalam jangka lama akan menyebabkan hiperpigmentasi pada kulit. Hiperpigmentasi adalah gangguan pada pigmen kulit yang disebabkan karena adanya peningkatan produksi melanin dan pendistribusian melanin yang tidak merata, pada kondisi ini akan menyebabkan penggelapan pada kulit dan timbulnya noda-noda hitam pada bagian tertentu (Adhikari dkk., 2008). Salah satu pencegahan hiperpigmentasi adalah dengan menghambat pembentukan melanin dengan cara melakukan penghambatan aktivitas tirosinase (Woolery-Lloyd & Kammer, 2011).

Tirosinase adalah enzim yang berperan mengkatalisis dua reaksi utama dalam biosintesis melanin, yaitu hidroksilasi L-tirosin menjadi L-dopa dan oksidasi L-dopa menjadi dopakuinon selanjutnya dopakuinon akan berpolimerisasi membentuk dopakrom yang kemudian menjadi melanin (Chang dkk., 2005). Penghambat tirosinase yang telah populer di masyarakat adalah hidrokuinon dan asam kojat. Namun hidrokuinon dan asam kojat diketahui bersifat karsinogenik (Germanas dkk., 2007; Miyazawa & Tamura, 2007). Maka sekarang ini banyak yang berupaya mencari senyawa baru penghambat enzim tirosinase.

Di Indonesia secara turun-temurun kunyit digunakan sebagai bahan dasar lulur jawa (Jumarani, 2009). Wanita Nepal juga menggunakan kunyit dan jahe secara topikal untuk mengatasi bintik-bintik gelap (Adhikari dkk., 2008). Selain itu beberapa penelitian telah melaporkan aktivitas penghambatan enzim tirosinase dari suku zingiberaceae seperti daun kunyit, daun bangle hantu, rimpang dan daun lengkuas (Shirota dkk., 1994; Batubara dkk., 2016).

Berdasarkan pendekatan taksonomi dipilihlah Sembilan belas tumbuhan dari suku zingiberaceae yang akan diuji dalam penghambatan enzim tirosinase, yaitu sebagai berikut: Lengkuas merah (*Alpinia purpurata* (Vieill.) K.Schum.), Temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.), Temu giring (*Curcuma heyneana* Valetton & Zijp), Temu mangga (*Curcuma mangga* Valetton & Zijp), Temu putri (*Curcuma petiolata* Roxb), Temu pinggang (*Curcuma purpurascens* Blume), Temu glenyeh (*Curcuma soloensis* Valetton), Temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.), kunyit putih (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe), Kapulaga (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton), Kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.Sm.), Kencur (*Kaempferia galanga* L.), Kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L.), Lempuyang pahit (*Zingiber amaricans* Blume), Lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* L.), Bangle (*Zingiber montanum* (J.Koenig) Link ex A.Dietr.), Jahe merah (*Zingiber officinale* Roscoe), Bangle hitam (*Zingiber ottensii* Valetton), Lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.).

Penelitian ini bertujuan untuk menguji inhibisi aktivitas enzim tirosinase dari rimpang beberapa jenis tumbuhan anggota suku zingiberaceae. Selain itu, dilakukan pula terhadap hasil fraksinasi tumbuhan terpilih.

1. Metode penelitian

1.1. Bahan

Bahan yang digunakan adalah Lengkuas merah (*Alpinia purpurata* (Vieill.) K.Schum.), Temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.), Temu giring (*Curcuma heyneana* Valetton & Zijp), Temu mangga (*Curcuma mangga* Valetton & Zijp), Temu putri (*Curcuma petiolata* Roxb), Temu pinggang (*Curcuma purpurascens* Blume), Temu glenyeh (*Curcuma soloensis* Valetton), Temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.), kunyit putih (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe), Kapulaga (*Eletaria cardamomum* (L.) Maton), Kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R.M.Sm.), Kencur (*Kaempferia galanga* L.), Kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L.), Lempuyang pahit (*Zingiber amaricans* Blume), Lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* L.), Bangle (*Zingiber montanum* (J.Koenig) Link ex A.Dietr.), Jahe merah (*Zingiber officinale* Roscoe), Bangle hitam (*Zingiber ottensii* Valetton), Lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.), etanol 96%, n-heksana, etil asetat, air suling, kalium dihidrogen fosfat, natrium hidroksida, L-dopa, *tyrosinase from mushroom* (sigma Aldrich), arbutin, dimetil sulfoksida, amonia, kloroform, bismuth subnitrat, asam nitrat, kalium iodida, hidrogen klorida, merkuriium (II) klorida, kalium iodida, serbuk magnesium, amil alkohol, besi (III) klorida, formaldehid, asam klorida, natrium asetat, gelatin, eter, asam asetat anhidrat, asam sulfat.

1.2. Alat

Alat yang digunakan adalah oven, alat penggiling simplisia, timbangan analitik, seperangkat alat maserasi, *rotavapor*, penangas air, tabung reaksi, pipet tetes, cawan porselin, *freeze dryer*, *well-microtiter plate*, *microplate reader*, mikropipet, batang pengaduk, vial, corong, mortar, corong pisah, dan alat-alat gelas lain yang umum digunakan.

1.3. Penyiapan Bahan

Penyiapan bahan meliputi pengumpulan tumbuhan. Tumbuhan dipilih berdasarkan pendekatan taksonomi. Sebanyak tujuh belas tumbuhan diperoleh dari Kebun Percobaan Tumbuhan Obat Manoko Lembang, Kabupaten Bandung Barat, Provinsi Jawa barat kemudian dilakukan sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering dan penggilingan. Dua tumbuhan diperoleh dari Toko Jamu dan Rempah Babah Kuya berupa simplisia meliputi kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) dan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*), kemudian dilakukan sortasi kering dan penggilingan.

1.4. Ekstraksi

Sebanyak 20 gram simplisia diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 100 ml. Dilakukan perendaman selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam lalu maserat dipisahkan. Proses penyarian diulangi sebanyak satu kali dengan jenis pelarut yang sama dengan volume pelarut sebanyak 50 ml. Maserat lalu dipekatkan menggunakan penguap vakum putar. Ekstrak kental selanjutnya dikeringkan dengan pengering beku dan siap digunakan untuk bahan uji.

1.5. Uji penghambatan aktivitas tirosinase secara *in vitro*

Uji penghambatan aktivitas tirosinase secara *in vitro* menggunakan metode Chan dkk, (2008).

1. Pembuatan Larutan uji

a. Pembuatan dapar fosfat pH 6,8

Untuk menyiapkan 1 liter dapar fosfat, kalium dihidrogen fosfat ditimbang 6,8 gram dimasukan kedalam labu ukur 250 ml, ditambahkan air suling hingga garis batas. Lalu kocok hingga homogen, kemudian natrium hidroksida ditimbang 2 gram dimasukan ke labu ukur 250 ml, ditambahkan air suling hingga garis batas, dikocok hingga homogen. Larutan kalium dihidrogen fosfat dimasukan ke beaker glass 1 liter yang telah dikalibrasi. Kemudian pH dicek menggunakan pH meter. 20 ml larutan natrium hidroksida ditambahkan kedalam beaker glass yang berisi larutan kalium dihidrogen fosfat dan ditambahkan air suling mendekati 1 liter. Natrium hidroksida ditetesi terus menerus hingga diperoleh pH 6,8.

b. Pembuatan larutan L-dopa

Sebanyak 39,438 mg L-dopa dilarutkan dalam 10 ml dapar fosfat sehingga konsentrasi L-dopa 20 mM. Lalu diencerkan hingga konsentrasi 10 mM.

c. Pembuatan Larutan Tirosinase

Enzim dalam kemasan adalah 25 KU (tyrosinase sigma T3824). Total unit 25.000 Unit. Unit/mg Solid dalam CoA = 2687 U/mg (berat dalam vial 9,3 mg). Serbuk Enzim 25 KU dilarutkan dalam 10 ml dapar fosfat. Sehingga konsentrasi yang didapatkan 2500 U/ml. Selanjutnya untuk uji inhibisi aktivitas tirosinase dibuat larutan enzim dengan konsentrasi 31 U/ml.

d. Pembuatan larutan kontrol positif (*arbutin*)

Dibuat larutan induk 1000 ppm dengan cara 10 mg arbutin dilarutkan dalam 10 ml dapar fosfat. Kemudian diencerkan menjadi 900, 700, 500, 300, 100 ppm.

Pengujian penghambatan aktivitas tirosinase dilakukan oleh 19 ekstrak kering. Larutan uji dibuat konsentrasi 500 ppm dalam dimetil sulfoksida 10% dengan cara 5 mg ekstrak ditambah 1 ml dimetil sulfoksida kemudian ditambah 9 ml dapar fosfat. Sejumlah 80 µL larutan buffer fosfat, 40 µL larutan uji, 40 µL larutan enzim tirosinase dan 40 µL larutan L-dopa dimasukan kedalam *well-microtiter plate*. Masing masing sampel dibuat kontrol dimana tidak

ditambahkan larutan L-dopa. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Campuran diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 410 nm.

Tabel 1 Prosedur uji penghambatan aktivitas tirosinase

Bahan	Plate (µL)					
	S ₁	S ₀	B ₁	B ₀	A ₁	A ₂
Laruta buffer fosfat	80	120	120	160	80	120
Larutan Uji	40	40	-	-	-	-
Larutan arbutin	-	-	-	-	40	40
Larutan enzim tirosinase	40	40	40	40	40	40
Larutan L-dopa	40	-	40	-	40	-

Inkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit

Keterangan :

- S₁ : larutan uji
 S₀ : kontrol larutan uji
 B₁ : blanko
 B₀ : kontrol blanko
 A₁ : arbutin (kontrol positif)
 A₀ : kontrol arbutin

Uji penghambatan aktivitas tirosinase ditentukan dengan mengukur absorbansi menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang optimum. Absorbansi yang terukur merupakan absorbansi pembentuk dopakrom (Chan dkk., 2008). Dari absorbansi pengukuran ini dapat dihitung persentase inhibisi tirosinase menurut metode Chang dkk. (2005) dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi tirosinase} = \frac{(B_1 - B_0) - (S_1 - S_0)}{(B_1 - B_0)} \times 100$$

Keterangan:

- B₁ = absorbansi blanko
 B₀ = absorbansi kontrol blanko
 S₁ = absorbansi larutan uji
 S₀ = absorbansi kontrol larutan uji

1.6. Uji IC₅₀ Tumbuhan terpilih

Nilai IC₅₀ adalah nilai yang menunjukkan besarnya konsentrasi bahan uji yang dapat menghambat aktivitas tirosinase sebesar 50 %. IC₅₀ diuji dengan menggunakan persamaan

regresi linear, konsentrasi sampel (dalam logaritma) sebagai sumbu x dan persen penghambatan (% inhibisi) sebagai sumbu y. Dari persamaan $y = a+bx$ dapat dihitung nilai IC_{50} .

Lima sampel terpilih masing-masing dibuat konsentrasi 100, 300, 500, 700 dan 900 ppm. Arbutin digunakan sebagai kontrol positif. Ekstrak terpilih yang memiliki Nilai IC_{50} terbaik kemudian difraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair. kemudian masing-masing fraksi dilakukan pengujian Nilai IC_{50} .

1.7. *Penapisan Fitokimia Tumbuhan Terpilih*

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, dan steroid/triterpenoid.

1.8. *Alkaloid*

Sebanyak 2 g sampel digerus dalam mortar bersama dengan amonia 25%. Selanjutnya ditambahkan 20 mL kloroform ke dalam mortar lalu digerus dengan kuat. Campuran kemudian disaring dan filtrat yang diperoleh diteteskan pada kertas saring lalu ditetesi pereaksi Dragendorff. Warna jingga yang teramati menunjukkan adanya alkaloid pada sampel. Sisa filtrat diekstraksi sebanyak 2 kali dalam corong pisah dengan HCl 10%. Lapisan air dipisahkan dari lapisan organik. Lapisan air diambil lalu dimasukkan ke tabung reaksi untuk diuji dengan pereaksi Mayer dan Dragendorff. Hasil positif apabila terdapat endapan putih dengan pereaksi Mayer dan endapan merah dengan pereaksi Dragendorff (Juarna, 2018).

1.9. *Flavonoid*

Sebanyak 2 g sampel dipanaskan dalam 100 mL air selama 15 menit kemudian disaring dan filtratnya ditampung (filtrat A). Sebanyak 5 mL filtrat A diambil kemudian ditambahkan dengan 0,1 g serbuk magnesium, 1 mL HCl, 5 mL amil alkohol, lalu dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif bila terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Juarna, 2018).

1.10. *Saponin*

Sebanyak 10 ml filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tabung dikocok kuat selama 10 detik, jika terbentuk busa yang dapat bertahan selama 1 menit diduga mengandung saponin. Kemudian diteteskan larutan HCl 2 N ke dalam tabung reaksi. Apabila busa tidak hilang maka hal tersebut menunjukkan bahwa sampel positif mengandung saponin (Juarna, 2018).

1.11. *Tanin*

Dimasukkan filtrat A masing-masing sebanyak 5 mL ke dalam tiga buah tabung reaksi. Pada tabung pertama, sampel diuji dengan larutan $FeCl_3$ kemudian diamati adanya warna hijau biru yang menjadi tanda keberadaan senyawa golongan fenol. Pada tabung kedua ditambahkan gelatin sebagai pereaksi spesifik untuk tanin. Terbentuknya endapan putih menandakan keberadaan tanin dalam sampel. Pada tabung ketiga ditambahkan pereaksi Stiasny kemudian dipanaskan selama 10 menit. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tanin

katekat Endapan disaring, filtrat ditambahkan natrium asetat hingga jenuh dan ditambahkan beberapa tetes larutan besi (III) klorida, terbentuk warna biru hitam menunjukkan adanya senyawa tanin galat (Juarna, 2018).

1.12. *Kuinon*

Sebanyak 5 ml filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan 1 tetes NaOH 6 N. Terbentuknya warna merah menunjukkan hasil positif terhadap pengujian kuinon (Juarna, 2018)

1.13. *Steroid/triterpenoid*

Sebanyak 1 g sampel dimaserasi dengan 20 ml n-heksana selama 2 jam kemudian disaring lalu filtratnya ditampung. Sebanyak 5 ml filtrat diuapkan di cawan penguap. Pereaksi Liebermann-Burchard ditambahkan ke dalam residu hasil penguapan. Terbentuknya warna hijau menunjukkan adanya steroid dan terbentuknya warna merah sampai violet menunjukkan adanya triterpenoid dalam sampel (Juarna, 2018).

2. Hasil dan pembahasan

2.1. *Penyiapan Bahan*

Tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas 19 jenis tumbuhan anggota suku zingiberaceae yang dipilih berdasarkan pendekatan taksonomi. Sebanyak tujuh belas tumbuhan diperoleh dari Kebun Percobaan Tumbuhan Obat Manoko Lembang, Kabupaten Bandung Barat, Provinsi Jawa barat, meliputi Lengkuas merah (*Alpinia purpurata* (Vieill.) K.Schum.), Temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.), Temu giring (*Curcuma heyneana* Valetton & Zijp), Temu mangga (*Curcuma mangga* Valetton & Zijp), Temu putri (*Curcuma petiolata* Roxb), Temu pinggang (*Curcuma purpurascens* Blume), Temu glenyeh (*Curcuma soloensis* Val.), Temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.), Kapulaga (*Eletaria cardamomum* (L.) Maton), Kecombrang (*Etingera elatior* (Jack) R.M.Sm.), Kencur (*Kaempferia galanga* L.), Lempuyang pahit (*Zingiber amaricans*), Lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* L.), Bangle (*Zingiber montanum* (J.Koenig) Link ex A.Dietr.), Jahe merah (*Zingiber officinale* Roscoe), Bangle hitam (*Zingiber Ottensii* Val.), Lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.) dan dua tumbuhan diperoleh dari Toko Jamu dan Rempah Babah Kuya berupa simplisia kering meliputi kunyit putih (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe), dan Kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L.), Pengumpulan tumbuhan dilakukan pada bulan Desember 2017, kemudian dilakukan sortasi basah pada 17 simplisia yang didapatkan dari Kebun Percobaan Tumbuhan Obat Manoko Lembang untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Misalnya pada simplisia yang dibuat dari rimpang, bahan-bahan asing seperti tanah, kerikil, rumput, batang, daun, serta pengotor-pengotor lainnya harus dibuang.

Setelah dilakukan sortasi basah 17 simplisia dicuci guna menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih yang mengalir. Perajangan bahan simplisia dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan dan penggilingan. Pengeringan bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu lama. Sortasi kering dilakukan pada 19 simplisia untuk memisahkan benda-benda asing dan pengotor-pengotor lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Simplisia kemudian diperkecil dengan cara penggilingan menggunakan *hammer mill* dan serbuk yang diperkecil disimpan dalam wadah kering, tertutup rapat pada suhu kamar untuk digunakan pada tahap penelitian selanjutnya.

2.2. Ekstraksi

Simplisia diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Metode maserasi merupakan ekstraksi cara dingin yang dilakukan dalam suhu ruang dan relatif aman digunakan untuk senyawa yang tahan atau tidak tahan terhadap pemanasan, metode ini dipilih karena senyawa yang terkandung dalam simplisia belum diketahui komponennya, sehingga belum diketahui kestabilan komponennya. Dipilihnya etanol 96% sebagai pelarut karena etanol 96% merupakan salah satu pelarut pilihan utama untuk mengekstraksi metabolit sekunder yang belum diketahui strukturnya, pelarut ini memiliki *extracting power* (daya ekstraksi) sehingga dapat menyari hampir semua metabolit sekunder (Saifudin, 2014).

2.3. Uji penghambatan tirosinase secara *in vitro*

Uji penghambatan aktivitas tirosinase dilakukan dengan menggunakan arbutin sebagai kontrol positif. Arbutin digunakan karena merupakan senyawa yang umum digunakan sebagai agen pemutih kulit dan penghambat enzim tirosinase yang sering juga dipakai sebagai kontrol positif untuk perbandingan kekuatan inhibisi aktivitas enzim tirosinase (Parvez dkk., 2007). Dari hasil pengujian persentase inhibisi pada **tabel 2** didapatkan lima tumbuhan yang memiliki penghambatan enzim tirosinase tertinggi yaitu rimpang kecombrang ($22.50 \pm 1.456\%$), rimpang kunci pepet ($20.75 \pm 0.040\%$), rimpang bangle hitam ($19.96 \pm 0.035\%$), rimpang temu giring ($18.85 \pm 0.112\%$) dan rimpang jahe merah ($18.63 \pm 0.060\%$). kelima tumbuhan terpilih masing-masing dibuat konsentrasi 100, 300, 500, 700 dan 900 ppm untuk selanjutnya di uji IC_{50} .

Pada tabel 2 dan tabel 3 dapat dilihat bahwa tumbuhan kecombrang memiliki persentase inhibisi aktivitas tirosinase tertinggi dibandingkan tumbuhan lainnya dengan nilai penghambatan sebesar (22.50%) dan memiliki nilai IC_{50} sebesar 761.75 ± 23.13 ppm, hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa daun kecombrang memiliki aktivitas inhibisi tirosinase yang kuat. Telah dilaporkan juga beberapa penelitian yang membuktikan bahwa suku zingiberaceae lainnya berpotensi dalam menghambat aktivitas tirosinase yaitu rimpang dan daun lengkuas, rimpang dan daun temu kunci, daun temu ireng, rimpang dan daun kunyit, daun temu lawak, daun kunyit putih, daun dan buah kapulaga,

rimpang dan daun jahe emprit (Batubara dkk., 2016, Kamkaen dkk., 2007, Khanom dkk., 2003 dan Panich dkk., 2010)

Tabel 2 Persentase inhibisi aktivitas tirosinase rimpang 19 jenis tumbuhan anggota suku zingiberace

Nama Simplisia	% Inhibisi ± SD
Lengkuas merah	11.68 ± 0.16
Temu hitam	13.98 ± 1.24
Temu giring	18.85 ± 0.11
Temu mangga	11.08 ± 0.28
Temu putri	15.27 ± 0.13
Temu pinggang	17.59 ± 0.08
Temu gleyeh	13.14 ± 0.32
Temu lawak	15.51 ± 0.22
Kunyit putih	13.67 ± 2.12
Kapulaga	12.34 ± 0.45
Kecombrang	22.50 ± 1.46
Kencur	14.16 ± 0.55
Kunci pepet	20.75 ± 0.04
Lempuyang pahit	16.37 ± 0.96
Lempuyang wangi	14.68 ± 1.23
Bangle	15.06 ± 0.58
Jahe merah	18.63 ± 0.06
Bangle hitam	19.96 ± 0.03
Lempuyang gajah	17.18 ± 0.77
Arbutin (control positif)	61.52 ± 0.36

Tabel 3 IC₅₀ Ekstrak etanol Lima tumbuhan terpilih

Nama Simplisia	IC₅₀ (ppm)
Kecombrang	761.76 ± 23.13
Kunci pepet	907.98 ± 42.63
Bangle hitam	900.62 ± 17.80
Temu giring	777.13 ± 24.85
Jahe merah	940.71 ± 19.37
Arbutin (kontrol positif)	436.30 ± 18.78

2.4. Fraksinasi dan uji IC₅₀ fraksi tumbuhan terpilih

Ekstrak rimpang kecombrang difraksinasi dengan cara ekstraksi cair-cair (ECC) secara berturut turut menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat. Sebanyak 50 gram ekstrak etanol kering dilarutkan dalam 500 ml air suling panas, kemudian ditambahkan 500 ml n-heksana dan dikocok secara perlahan menggunakan corong pisah sampai terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan air dan n-heksana. Selanjutnya lapisan n-heksana dipisahkan, ECC menggunakan pelarut n-heksana diulang sebanyak dua kali dengan pelarut dan volume yang sama, lapisan n-heksana yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan penguap vakum putar. Selanjutnya 500 ml etil asetat ditambahkan pada lapisan air dan dikocok secara perlahan. Kemudian lapisan

etil asetat dipisahkan, ECC menggunakan pelarut etil asetat diulang sebanyak dua kali dengan pelarut dan volume yang sama kemudian dipekatkan menggunakan penguap vakum putar dan lapisan air yang diperoleh dikeringkan dengan alat pengering beku. Kemudian terhadap fraksi n-heksana rimpang kecombrang (FNRK), Fraksi etil asetat rimpang kecombrang (FERK) dan Fraksi air rimpang kecombrang (FARK) dilakukan uji IC_{50} , dengan hasil sbb:

Tabel 4 IC_{50} Fraksi N-heksana, Fraksi Etil asetat dan Fraksi air rimpang kecombrang

Sampel	IC_{50} (mg/L)
FNRK	575,37±4,1 ^a
FERK	542,39±12,4 ^b
FARK	587,40±2,6 ^a

Dari hasil uji IC_{50} fraksi pada **tabel 4** dapat dilihat bahwa fraksi etil asetat rimpang kecombrang memiliki penghambatan tirosinase lebih baik secara signifikan dibandingkan fraksi air rimpang kecombrang dan fraksi n-heksana rimpang kecombrang.

2.5. Penapisan Fitokimia Tumbuhan Terpilih

Penapisan fitokimia bertujuan mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan. Hasil penapisan fitokimia simplisia kecombrang mengandung senyawa senyawa flavonoid, fenol, tanin dan kuinon. Senyawa golongan flavonoid merupakan penghambat kuat terhadap aktivitas tirosinase seperti kaempferol, kuarsetin, kurarinon dan kushnol (Parvez dkk., 2007).

Tabel 5. Penapisan fitokimia simplisia kecombrang

Golongan	Simplisia
Flavonoid	+
Fenol	+
Tanin katekat	+
Tanin galat	-
Kuinon	+
Saponin	-
Alkaloid	-
Steroid/Triterpenoid	+

Keterangan: (+): Terdeteksi, (-): Tidak terdeteksi

3. Kesimpulan

Hasil uji terhadap 19 sampel tumbuhan menunjukkan adanya aktivitas inhibisi tirosinase. Ekstrak etanol rimpang kecombrang, kunci pepet, bangle hitam, temu giring dan jahe merah

memberikan nilai inhibisi tertinggi terhadap aktivitas tirosinase dengan persen inhibisi masing-masing sebesar $22,50 \pm 1,46 \%$, $20,75 \pm 0,04 \%$, $19,96 \pm 0,03 \%$, $18,85 \pm 0,11 \%$, $18,63 \pm 0,06 \%$. IC_{50} ekstrak rimpang kecombrang ($761,75 \pm 23,1$ mg/L) lebih tinggi dibandingkan IC_{50} yang dihasilkan oleh fraksi n-heksana rimpang kecombrang ($575,37 \pm 4,1$ mg/L), fraksi etil asetat rimpang kecombrang ($542,39 \pm 12,4$ mg/L) dan fraksi air rimpang kecombrang ($587,40 \pm 2,6$ mg/L) sehingga dapat disimpulkan bahwa ketiga hasil fraksi memiliki IC_{50} lebih baik dibandingkan ekstrak. Fraksi etil asetat rimpang kecombrang memiliki penghambatan tirosinase lebih baik secara signifikan dibandingkan fraksi air rimpang kecombrang dan fraksi n-heksana rimpang kecombrang. Simplisia rimpang kecombrang mengandung golongan senyawa flavonoid, kuinon, fenol, tanin katekat dan steroid/triterpenoid.

Daftar pustaka

- Adhikari, A., Devkota, H.P., Takano, A., Masuda, K., Nakane, T., Basnet, P., dan Skalko-Basnet, N. (2008): Screening of Nepalese crude drugs traditionally used to treat hyperpigmentation in vitro tyrosinase inhibition, *International Journal of Cosmetic Science*, **30**, 353 – 360.
- Batubara, I., Kartika, Y., dan Darusman, L.K. (2016): Relationship between zingiberaceae leaves compounds and its tyrosinase activity, *Biosaintifika*, **8** (3), 370 – 376.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, L.F., Lianto, F.S, Wong, S.K., Lim, K.K., Joe, C.E., Lim, T.Y. (2008): Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species, *Food Chemistry*, **109**, 477-483.
- Chang, T.S., Ding, H.Y., dan Lin, H.C. (2005): Identifying 6,7,4'-Trihydroxyisoflavone as a potent tyrosinase inhibitor, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **69**, 1999 – 2001.
- Germanas, J.P., Wang, S., Miner, A., Haob, W., dan Ready, J. M. (2007): Discovery of small-molecule inhibitors of tyrosinase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **17**, 6871-6875.
- Juarna, K.S. (2018) : *Antioxidant Activities Of Green Bean And Roasted Bean Arabica Coffee (Coffea Arabica L.) From Three Regions In Indonesia Using Dpph And Frap Methods*, Tesis Program Megister, Institut Teknologi Bandung, 18-20.
- Jumarani, L. (2009): *The essence of Indonesian spa (spa Indonesia gaya Jawa dan Bali)*, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 27.
- Kamkaen, N., Mulsri, N., dan Treesak, C. (2007): Screening of Some Tropical Vegetables for Anti-tyrosinase Activity, *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, **2** (1), 15-19.
- Khanom, F., Kayahara, H., Hirota, M., dan Tadasa, K. (2003): Super Scavenging and Tyrosinase Inhibitory Active Compound in Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **6** (24), 1997-2000.
- Miyazawa, M., dan Tamura, N. (2007): Inhibitory Compound of Tyrosinase Activity from the Sprout of *Polygonum hydropiper* L. (Benitade), *Journal Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **30**(3) 595—597.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H., dan Bae, H. (2007): Naturally occurring tyrosinase inhibitors mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries, *Phytotherapy Research*, **21**, 805 – 816.
- Panich, U., Kongtaphan, K., Onkoksoong, T., Jaemsak, K., Phadungrakwittaya, R., Thaworn, A., Akarasereenont, P., dan Wongkajornsilp, A. (2010): Modulation of antioxidant defense by *Alpinia galangal* and *Curcuma aromatica* extracts correlates with their inhibition of UVA-induced melanogenesis, *Cell Biol Toxicol*, **26**, 103-116.
- Saifudin, A. (2014): *Senyawa alam metabolit sekunder teori, konsep, dan teknik pemurnian*, Penerbit Deepublish, Yogyakarta, 46.

- Shirota, S., Miyazaki, K., Aiyama, R., Ichiko, M., dan Yokokura, T. (1994): Tyrosinase inhibitors from crude drugs, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **17** (2), 266 - 269.
- Woolery-Lloyd, H. dan Kammer, J. N. (2011): Treatment of hyperpigmentation, *Seminar In Cutaneous Medicine and Surgery*, **30**, 171-175.

