

PENGUJIAN AKTIVITAS INHIBITOR ENZIM TIROSINASE EKSTRAK N-HEKSAN DARI UMBI WORTEL (*Daucus carrota L.*)

Syamsuri Syakri, Khaerani, Hasrawati

Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Alauddin Makassar
Jl. H.M. Yasin Limpo No. 36 Samata, Kab. Gowa, Sulawesi Selatan 92113
Email: syamsurisyakri@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang Pengujian aktivitas tirosinase ekstrak n-heksan dari umbi wortel (*Daucus carrota L.*) mengandung senyawa flavonoid dan betakaroten golongan senyawa terpen yang merupakan senyawa yang dapat berpotensi untuk menghambat adanya tirosinase. Adanya inhibitor akan mengurangi dan menghentikan aktivitas tirosinase dalam memproduksi melanin yang nantinya akan mempengaruhi warna kulit. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas n-heksan umbi wortel (*Daucus carrota L.*) dalam menghambat reaksi tirosin-tirosinase melalui nilai IC_{50} dengan konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, dan 50 ppm. Pada penelitian ini, pengujian aktivitas enzim tirosinase memberikan hasil akhir berupa DOPAchrome yang dapat menyerap energi sinar tampak yang dilakukan dengan menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 490 nm, dengan menggunakan asam kojat sebagai control positif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carrota L.*) memiliki aktivitas sebagai inhibitor tirosinase dengan rata-rata persen inhibitor berturut-turut yaitu 39,7 %, 40,2 %, 42,3 %, 42,3 %, 46,8 %, 47 %, 47,8 %, 48,5 %, dan 48,9 %. Ekstrak n-heksan umbi wortel memiliki nilai IC_{50} yaitu 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sedangkan asam kojat memiliki nilai IC_{50} sebesar 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Umbi wortel memiliki aktivitas sebagai inhibitor tirosinase namun tidak lebih besar dibandingkan dengan asam kojat.

Kata kunci: Umbi wortel, tirosinase, IC_{50}

PENDAHULUAN

Indonesia termasuk dalam daerah sekitar katulistiwa dan daerah tropis dengan luas daratan hampir 2 juta, dikaruniai penyinaran matahari lebih dari 6 jam dalam sehari atau sekitar 2.400 jam dalam setahun. Matahari adalah sumber energi utama yang memancarkan energi yang luar biasa besarnya ke permukaan bumi (Manan, 2009). Matahari mempunyai peranan yang sangat penting bagi keberlangsungan makhluk hidup, disamping fungsinya tersebut matahari memiliki radiasi sinar UV yang dapat berbahaya bagi kulit seperti warna kulit menjadi lebih gelap, eritema dan kulit terbakar.

Melanin adalah zat yang memberikan warna coklat atau coklat kehitaman pada kulit. Pembentukan melanin akan lebih cepat apabila enzim tirosinase bekerja secara aktif dengan dipicu oleh sinar ultraviolet. Pembentukan melanin dapat dihambat dengan beberapa cara, diantaranya menurunkan sintesis tirosinase, menurunkan transfer tirosinase dan menghambat aktivitas tirosinase (Hartanti dan Setiyawan 2009)

Zat aktif yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor tirosinase berguna untuk mengurangi efek hiperpigmentasi. Senyawa yang menjadi inhibitor tirosinase adalah senyawa golongan flavonoid yang biasanya banyak terdapat pada tumbuhan. Selain

beberapa senyawa turunan flavonoid, hidroquinon, arbutin dan asam askorbat atau lebih dikenal dengan vitamin C juga dapat menghambat aktivitas enzim tirosinase.

Wortel dengan nama latin *Daucus carota L* termasuk sayur-sayuran yang memiliki berbagai macam manfaat. Selain bahan makanan dan obat-obatan, umbi atau akar wortel dapat digunakan untuk keperluan kosmetik. Wortel mengandung keratenoid yang berfungsi sebagai antioksidan (Cahyono,2006).

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak umbi wortel (*Daucus carota L*) mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, dan terpenoid (Widya, 2011). Berdasarkan uraian diatas sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carota L.*) dapat menghambat enzim tirosinase.

METODE PENELITIAN

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Batang pengaduk, Bejana maserasi, Cawan porselin, Deksikator, Erlenmeyer, Gelas kimia, Gelas arloji, Gelas ukur, Hot plate, Mikro Pipet, Mikro Plate Reader 96 Well, Oven, Ph Meter, Pipet, Sendok besi, Tabung endorf, Tabung reaksi, Timbangan Analitik, Vial.

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Air suling, Aluminium foil, Asam asetat anhidrat (AC_2O), Asam klorida (HCL) 2 N, Asam kojic, Asam sulfat pekat (H_2SO_4), Besi (III) klorida ($FeCl_3$), Dimetilsulfoksida (DMSO), Ekstak N-heksan umbi wortel, Eter, Enzim tirosinase 25 KU mushroom, Heksan, Kalium Hidroksida (KOH), Kalium Dihidrogen Pospat (KH_2PO_4), Kertas perkamen, Kertas saring, L-Tirosin, Magnesium (Mg), Natrium klorida (NaCl), Pereaksi Dragendorf, Pereaksi mayer, Pereaksi wagner..

Prosedur Penelitian.

Ekstraksi Sampel

Sampel wortel (*Daucus carota L*) dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian dikupas lalu dipisahkan dari kulitnya kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu $50^{\circ}C$ kurang lebih 32 jam. Kemudian simplisia yang sudah kering dirajang kecil-kecil, setelah itu di haluskan dan diayak dengan ayakan 50 mesh. Setelah itu di timbang untuk selanjutnya diekstraksi.

Metode ekstraksi yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu ekstraksi metode maserasi karena suhu yang terlalu tinggi dapat merusak komponen senyawa keratenoid pada wortel (Maleta dkk, 2018). Simplisia yang telah diserbukkan kemudian ditimbang dan

dimasukkan kedalam wadah. Ditambahkan pelarut n-heksan hingga menutupi simplisia, ditutup dan didiamkan selama 3 hari sambil beberapa kali diaduk, disaring kemudian sari di pekatkan dan diuapkan.

Identifikasi Golongan Senyawa

Alkaloid. Ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carota l*) 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml HCl 2N kemudian dipanaskan selama 2-3 menit, didinginkan dan ditambahkan NaCl untuk mendapatkan protein-proteinnnya kemudian disaring. Ditambahkan 2 ml HCl 2N ke dalam filtrat. Dipisahkan menjadi 3 bagian dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi (I) ditambahkan dragendorf menghasilkan endapan merah jingga, tabung reaksi (II) ditambahkan mayer menghasilkan endapan putih kekuningan, dan tabung reaksi (III) ditambahkan wagner menghasilkan endapan coklat.

Flavonoid. Ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carota l*) 0,5 g ditambahkan aquades dan ditambahkan heksan dan dikocok. Kemudian akan terpisah menjadi 2 lapisan dimana ekstrak etanol dalam air akan berada dibawah dan lapisan heksan akan berada di atas. Lapisan heksan dipisahkan sementara lapisan air ditambahkan etanol kemudian dipisahkan menjadi 2 bagian. Bagian pertama ditambahkan 0,5 ml HCl pekat, kemudian dipanaskan di atas penangas selama 15 menit. Positif bila berwarna merah terang atau violet. Bagian kedua ditambahkan 0,5 ml HCl pekat kemudian ditambahkan 3 - 4 potong magnesium, amati perubahan warna yang terjadi pada tiap lapisan. Jika warna merah berarti positif mengandung flavonoid. Merah pucat-merah tua mengandung flavon.

Glikosida. Ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carota l*) 0,2 g diuapkan di atas penangas air, lalu ditambahkan 3 ml asam asetat dengan sedemikian pemanasan, kemudian didinginkan. Selanjutnya, larutan ini ditambah larutan besi (III) klorida 0,3M, lalu dengan hati-hati ditambahkan campuran 3 ml asam sulfat dan 1 tetes besi (III) klorida 0,3M sehingga akan terbentuk cincin warna merah coklat pada batas cairan. Setelah beberapa menit di atas cincin akan berwarna biru hijau, ini menunjukkan adanya glikosida dan glikon gula 2-deoksi (Hanani, 2015).

Saponin. Ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carota l*) sebanyak 0,5 g ditambahkan 10 ml air panas kemudian didinginkan, selama 10 detik larutan dikocok dengan kuat kemudian didiamkan selama 10 detik. Terbentuk buih setinggi 1-10 cm dan buih tidak hilang bahkan setelah penambahan 1 tetes HCl 2N jika ekstrak positif mengandung saponin (Ditjen POM, 1995).

Fenol. Ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carota l*) sebanyak 0,2 gram ditambahkan dengan larutan FeCl₃ 1%. Hasil ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru tua, biru, biru kehitaman, atau hijau kehitaman (Harborne, 1987).

Penentuan Aktivitas Inhibitor tirosinase.

Uji penghambatan aktivitas enzim tirosinase berdasarkan metode Miyazawa dan Tamura (2006) dengan modifikasi tertentu. Sebanyak 50 µl L-Tirosin 1 mM, 50 µl larutan dapar fosfat 50 mM (pH 6,8), 20 µl larutan enzim tirosinase dan 100 µl larutan sampel dimasukkan ke dalam sumuran pada *microplate*. Campuran tersebut diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar, kemudian diukur serapannya menggunakan *microplate reader* (ELISA) pada panjang gelombang 490 nm. Dilakukan pengujian blanko tanpa penambahan enzim yaitu digunakan Sebanyak 170 µl larutan dapar fosfat (pH 6,8), 50 µl L-Tirosin 1 mM. Kontrol negatif menggunakan campuran tersebut diatas tanpa penambahan sampel dan untuk kontrol positif menggunakan asam kojat sebagai pengganti sampel. Langkah-langkah tersebut diatas dilakukan secara triplo.

Penentuan persentase penghambatan aktivitas tirosinase berdasarkan rumus :

$$\% \text{ penghambatan Tirosinase} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Absorbansi sampel tanpa penambahan inhibitor.

B = Absorbansi sampel dengan penambahan inhibitor.

Aktivitas penghambatan dari sampel uji ditentukan dengan IC₅₀ yaitu konsentrasi dimana sampel uji menghambat aktivitas tirosinase sebesar 50%. IC₅₀ dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier, log konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan probit % inhibisi sebagai sumbu y, dari persamaan $y = bx \pm a$ dapat dihitung nilai IC₅₀.

Rumus IC₅₀ $y = ax + b$

$$x = (50 - a) : b$$

Keterangan:

a = slope

b = intersep

Nilai IC₅₀ di bawah 100 µg/mL menunjukkan potensi penghambatan aktivitas tirosinase yang paling kuat, nilai IC₅₀ 100-450 µg/mL menunjukkan potensi penghambatan yang kurang kuat, dan 450-700 µg/mL menunjukkan potensi penghambatan aktivitas tirosinase sangat lemah (Zuraida et al, 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Tabel 1. Hasil Ekstraksi umbi wortel (*Daucus carota l*) dengan Metode Maserasi

Berat Simplisia yang diekstraksi	Jenis Ekstrak	Berat Ekstrak	Persen (%) Rendamen
150 gram	Ekstrak Kental	1,6 gram	1,06 %

Tabel 2. Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carota* L.)

Golongan Senyawa	Ekstrak n-heksan umbi wortel (<i>Daucus carota</i> L.)
Alkaloid	-
Flavonoid	+
Glikosida	-
Saponin	-
Terpenoid	+
Fenol	-

Keterangan :

- (+) Terdapat golongan senyawa tertentu
 (-) Tidak terdapat golongan senyawa tertentu.

Tabel 3. Hasil Persen Inhibitor Ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carota* L.)

Sampel	Konsentrasi	Persen (%) Inhibitor
Sampel	10 ppm	39.7 %
	15 ppm	40.2 %
	20 ppm	42.3 %
	25 ppm	42.3 %
	30 ppm	46.8 %
	35 ppm	47 %
	40 ppm	47.8 %
	45 ppm	48.5 %
	50 ppm	48.9 %

Tabel 4. Hasil Persen Inhibitor Kontrol Positif Asam Kojat

Sampel	Konsentrasi	Persen (%) Inhibitor
Asam Kojat	10 ppm	48.3 %
	15 ppm	49.3%
	20 ppm	49.6 %
	25 ppm	49.8 %
	30 ppm	52.9 %
	35 ppm	53 %
	40 ppm	53 %
	45 ppm	54.4 %
	50 ppm	48.9 %

Tabel 5. Hasil Nilai IC₅₀ Ekstrak N-Heksan Umbi Wortel (*Daucus carota* L.)

Sampel	Nilai IC50 ($\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak Umbi Wortel	50
Asam Kojat	20

Pembahasan

Melanin merupakan pigmen yang dihasilkan oleh melanosit dari polimerisasi dan oksidasi pada proses melanogenesis dan pembentukannya memerlukan adanya enzim tirosinase (Damayanti, 2004). Melanogenesis merupakan serangkaian proses kompleks pembentukan melanin. Pigmen melanin diproduksi di dalam melanosit dengan bantuan katalis enzim tirosinase (Fitrie, 2004). Enzim tirosinase berfungsi dalam oksidasi pada proses melanogenesis. Faktor genetik mempengaruhi ukuran satuan melanin epidermis dan melanosom serta produksi melanin. Faktor lingkungan seperti pajanan sinar matahari meningkatkan kegiatan enzim tirosinase sehingga meningkatkan produksi melanin dan penimbunannya di dalam keratinosit sehingga mencoklat (*tanning*) (Damayanti, 2004)

Penghambatan tirosinase merupakan salah satu strategi untuk mencegah hiperpigmentasi kulit. Tirosinase merupakan enzim yang berperan dalam biosintesis melanin. Enzim ini mengkatalisis reaksi hidroksilasi tirosin menjadi L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), yang kemudian dikonversi menjadi senyawa reaktif dopakuinon. Hal ini dapat menyebabkan kulit tampak menjadi tampak lebih cerah. (Nerya dkk, 2004)

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah umbi wortel (*Daucus carota L.*). Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak umbi wortel (*Daucus carota L.*) mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, dan terpenoid (Widya, 2011). Sampel umbi wortel diekstraksi dengan metode maserasi. Digunakan metode maserasi karena metode ini terbilang mudah dan efektif serta aman untuk menghindari kerusakan senyawa pada umbi wortel yang bersifat termolabil.

Berdasarkan uji identifikasi golongan senyawa ekstrak n-heksan umbi wortel tidak mengandung golongan senyawa alkaloid karena tidak terdapat endapan merah jingga, tidak terdapat endapan merah kekuningan pada pereaksi mayer dan pada pereaksi wegner tidak terdapat endapan coklat. Pada pengujian selanjutnya mengandung senyawa flavonoid ditandai dengan warna merah pada hasil reaksi, tidak mengandung glikosida ditandai dengan tidak terbentuk cincin biru hijau pada hasil reaksi, tidak mengandung golongan senyawa saponin karena tidak terdapat buih bahkan pada saat penambahan HCl 2N, mengandung golongan senyawa terpen ditandai pada hasil reaksi terbentuk warna hijau, dan tidak mengandung senyawa fenol ditandai pada hasil reaksi tidak terbentuk warna hijau, merah ungu, biru tua, biru kehitaman atau hijau kehitaman.

Pada pengujian inhibitor tirosinase terhadap sampel umbi wortel (*Daucus carota L.*) menggunakan alat *microplate reader* (ELISA). Metode ini dipilih karena relatif sederhana,

ekonomis, memiliki sensitivitas yang cukup tinggi dan menggunakan jumlah sampel yang sedikit. Penelitian ini menggunakan enzim tirosinase yang disintesis dari jamur dan L-tirosin sebagai substratnya. sebagai kontrol positifnya digunakan asam kojat. Hal ini dikarenakan asam kojat memiliki tingkat kestabilan yang tinggi. Penggunaan asam kojat sebagai kontrol positif sangat disarankan sebagai pembandingan kekuatan penghambatan tirosinase yang baik dengan bahan baru yang ditemukan ataupun dengan kekuatan penambahan bahan lain (Kurniasari, 2018)

Hasil uji aktivitas inhibitor tirosinase ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carrota L*) terhadap daya inhibitor dari beberapa konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, dan 50 ppm berturut turut adalah 39,7 %, 40,2 %, 42,3 %, 42,3 %, 46,8 %, 47 %, 47,8 %, 48,5 %, dan 48,9 %. adapun hasil inhibitor tirosinase dari control positif asam kojat dari beberapa konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, dan 50 ppm berturut turut adalah 48,3 %,49,3 %, 49.6 %, 49,8 %, 52.9 %, 53 %, 53 %, 54.4 %, dan 54.9 %. Hasil diperoleh dari perhitungan nilai absorbansi yang dilakukan secara triplo untuk setiap konsentrasi. Adapun hasil yang diperoleh dalam bentuk persentase bertujuan untuk mengetahui skala perbandingan aktivitas inhibitor enzim pada setiap konsentrasi sampel.

Pengujian asam kojat sebagai kontrol positif dilakukan untuk memastikan bahwa metode yang dipakai adalah benar dengan cara membandingkan nilai IC_{50} yang didapat dengan nilai IC_{50} dari hasil studi literatur. Hasil Nilai IC_{50} dari uji aktivitas inhibitor tirosinase menunjukkan nilai konsentrasi yang dapat menghambat 50% aktivitas enzim tirosinase (IC_{50}) yaitu 50 $\mu\text{g/mL}$. Namun aktivitas penghambatan tirosinase masih lebih rendah dibanding asam kojat sebagai kontrol positif yaitu menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 20 $\mu\text{g/mL}$.

Nilai IC_{50} di bawah 100 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan potensi penghambatan aktivitas tirosinase yang paling kuat, nilai IC_{50} 100-450 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan potensi penghambatan yang kurang kuat, dan 450-700 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan potensi penghambatan aktivitas tirosinase sangat lemah (Zuraida et al, 2019). Dari nilai IC_{50} sampel maka dapat disimpulkan bahwa potensi penghambatan aktivitas tirosinase dari ekstrak n-heksan umbi wortel menunjukkan penghambatan yang sangat kuat.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carrota L*) memiliki aktivitas sebagai inhibitor tirosinase.
2. Ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carrota L*) memiliki rata-rata persen inhibitor pada konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45

ppm, dan 50 ppm berturut turut adalah 39,7 %, 40,2 %, 42,3 %, 42,3 %, 46,8 %, 47 %, 47,8 %, 48,5 %, dan 48,9 %.

3. Ekstrak n-heksan umbi wortel (*Daucus carota L*) memiliki nilai IC₅₀ 50 µg/mL. Sedangkan nilai IC₅₀ asam kojat sebagai kontrol positif sebesar 20 µg/mL.

Sehingga dapat di simpulkan bahwa ekstrak n-heksan umbi wortel memiliki aktivitas yang sangat kuat sebagai inhibitor tirosinase.

KEPUSTAKAAN

- Cahyono, B. *Analisis Ekonomi dan Teknik Bercocok Tanam Sayuran*. Yogyakarta: Kanisius. 2006
- Damayanti N, Listiawan MY. *Fisiologi dan Biokimia Pigmentasi Kulit. Ilmu kulit dan Kelamin*. 2004
- Harbone, J.B. *Metode Fitokimia*. Penerbit ITB. Bandung. 1987
- Hanani, E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: EGC. 2015
- Hartanti, Lanny dan Setiyawan H.K. *Inhibitory Potential Of Some Synthtic Cinnamic Acid Derivativestowards tyrosinase Enzym*. Jakarta: UGM. 2009
- Nerya O, Musa R dkk. *Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers*. *Phytochemystri*: Elsevier. 2004
- Zuraida, Sagala. (2019). *Uji Aktivitas Inhibisi Terhadap Enzim Ekstrak Etanol Daun Pepaya (Carica papaya L.) Secara In Vitro*. Fakultas Farmasi Universitas 17 Agustus 1945: Jakarta.