

# PERBANDINGAN AKTIVITAS PENGHAMBATAN ENZIM TIROSINASE OLEH FRAKSI ETIL ASETAT DAUN PATIKALA (*Etilingera elatior*) DAN HIDROKUINON SECARA *In Vitro*

1| Selfyana Austin Tee, 2| Apriyanto, 3| Musdalipah, 4| Elfirah  
Email Korespondensi : [musdalipahapt@gmail.com](mailto:musdalipahapt@gmail.com)

## ABSTRACT

*Etilingera* is one of the genus Zingiberaceae which consists of 150 - 200 species in the world, and there are 48 species that grow in Sulawesi and 14 species of which are scattered in Sulawesi. Patikala (*Etilingera elatior*) has a bioactive compound in the form of flavonoids. Withdrawal of flavonoid compounds in plants is carried out using ethyl acetate solvents. One of the enzymes in the body is the tyrosinase enzyme. The tyrosinase enzyme is the main pathway in the pigmentation process, causing melanin pigment. This study aims to compare the inhibitory activity of the tyrosinase enzyme in the patikala fraction of ethyl acetate (*Etilingera elatior*) and hydroquinone *in vitro*. The research method used was a quasi experimental consisting of the treatment group and the control group with measurements made after the treatment was given (posttest only design with non equivalent group). Concentration of ethyl acetate fraction of patikala leaves used were 7.8125 µg / mL, 15,625 µg / mL, 31.25 µg / mL, 62.5 and 125 µg / mL with positive control of hydroquinone, respectively. Based on the results obtained, Inhibitory activity of the tyrosinase enzyme by the patikala leaf ethyl acetate fraction with a concentration of 125 µg. The inhibitory activity of the tyrosinase enzyme by both samples increased with increasing concentration.

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Patikala Leaf;  
Fraction;  
Ethyl Acetate;  
Hydroquinon.

### DOI:

[10.24252/kesehatan.v13i1.10309](https://doi.org/10.24252/kesehatan.v13i1.10309)

## Pendahuluan

Tanaman genus *etlingera* merupakan salah satu bahan alam yang melimpah di Sultra tetapi belum dimanfaatkan, sehingga perlu dilakukan kajian dari berbagai aspek (1). *Etilingera elatior* dikenal dengan nama kecombrang (Ind.), wualae (suku Tolaki), pacikala (suku Bugis). Masyarakat di Sulawesi menggunakan buah *E. elatior* sebagai campuran masakan berbahan baku ikan seperti kapurung (Bugis) dan sinonggi (Tolaki). Daun dan rhizoma tanaman *E. elatior* memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri dan penghambat enzim tirosinase (2). Ekstrak air bunga tanaman ini juga bersifat antioksidan (27) dan ekstrak bijinya bersifat sitotoksik terhadap sel murine leukemia P-388 (3). Potensi yang ditunjukkan oleh *E. elatior* tidak terlepas dari kandungan kimia yang dimilikinya. Daun *E. elatior* menghasilkan turunan asam sinamat seperti asam 3-O-kafeoilkuinat, asam 5-O- kafeoilkuinat (asam klorogenat, and asam 5-O- kafeoilkuinat-metil ester (4).

Enzim adalah protein yang memiliki aktivitas katalis, yaitu mempercepat reaksi kimia pada sistem biologis. Salah satu enzim yang berada dalam tubuh adalah enzim tirosinase. Enzim tirosinase merupakan jalur utama dalam proses pigmentasi sehingga menimbulkan pigmen (5). Enzim tirosinase dapat menjadi penentu laju katalis dalam proses melanogenesis, yaitu hidroksilasi L-tirosin menjadi L-DOPA dan katalisator perubahan L-DOPA menjadi L-dopaquinone<sup>2</sup>. Permasalahan yang terjadi pada kulit begitu kompleks, antara lain kelainan pigmentasi seperti hiperpigmentasi. Hiperpigmentasi adalah suatu keadaan bertambahnya jumlah melanin pada lapisan kulit yang mengakibatkan perubahan warna kulit menjadi lebih gelap (6).

Dewasa ini, diberbagai negara khususnya di Indonesia biaya pelayanan kesehatan semakin meningkat (7). Salah satunya ialah hiperpigmentasi. Di Indonesia hiperpigmentasi yang banyak terjadi yaitu melasma. Melasma adalah salah satu kelainan pigmentasi akibat peningkatan jumlah melanin didalam epidermis maupun dermis berupa bercak cokelat, abu-abu atau biru ireguler di wajah dan leher. Hiperpigmentasi dapat mengakibatkan beban psikologis yang mendalam bagi pasien, terutama ketika terletak pada wajah, leher, atau tangan (8).

<sup>1,2,3,4</sup> Politeknik Bina Husada Kendari, Indonesia

Pembentukan melanin dapat dihambat dengan cara menghambat enzim tirosinase. Salah satu tumbuhan yang mampu menghambat enzim tirosinase adalah Patikala (*Etilingera elatior*). Patikala (*Etilingera elatior*) memiliki senyawa bioaktif berupa flavonoid (9). Kandungan flavonoid pada tanaman memiliki efek antioksidan dan ampuh menghambat secara langsung aktivitas tirosinase pada proses melanogenesis. Penarikan senyawa flavonoid pada tanaman dilakukan dengan menggunakan fraksi etil asetat yang merupakan pelarut semi polar yang dapat menarik senyawa flavonoid. Berdasarkan penelitian Handayani (10) ekstrak metanol daun Patikala memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai  $IC_{50}$  30,65 mg/mL.

## Metode Penelitian

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah Plat mikro-96 sumuran, inkubator, beaker, labu ukur, corong pisah, *Rotary Vacum Evaporator*, *microplate reader*, pH meter, bejana maserasi, batang pengaduk, pipet mikro, *microtube* 1,5 mL, timer, timbangan analitik, *vortex*, dan *rotator mixer*. Bahan yang digunakan yaitu Daun patikala (*Etilingera elatior*), ekstrak kental daun patikala, fraksi etil asetat daun patikala, etanol 96%, etil asetat, *n*-heksan,  $KH_2PO_4$ , NaOH, L-DOPA, enzim tirosinase, aquades, DMSO, dan hidrokuinon.

### Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Dipetik sampel daun patikala satu persatu menggunakan pisau pada jam 09.00-11.00 WITA. Disortasi basah dan dicuci sampel dengan air mengalir, kemudian ditiriskan dan dianginkan. Dirajang daun patikala dan dikeringkan sampel di bawah sinar matahari ditutupi kain hitam. Disortasi kering sampel kemudian ditimbang simplisia dan diserbukkan.

### Pembuatan ekstrak

Dimasukkan serbuk daun patikala ke dalam wadah maserasi. Ditambahkan pelarut etanol 96% hingga serbuk simplisia terendam. Dibiarkan selama 3-5 hari sambil sesekali diaduk. Setelah proses ekstraksi pertama selesai, ampasnya dimaserasi kembali dengan cairan penyari yang baru. Ekstrak yang diperoleh lalu dipisahkan dengan menggunakan alat *Rotary Vacum Evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

### Fraksinasi

Ditimbang ekstrak kental daun patikala 10 gram. Dilarutkan dengan aquades sebanyak 5 mL. Dipartisi dengan 15 mL pelarut *n*-heksan dalam corong pisah sebanyak 3 kali, dan ekstrak *n*-heksan ditampung. Dipartisi residu dengan pelarut etil asetat sebanyak 15 mL sebanyak 3 kali. Diuapkan ekstrak etil asetat hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat.

### Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 6,8

Ditimbang 0,68045 gram  $KH_2PO_4$  kemudian dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 mL (larutan stok A). Kemudian sebanyak 0,2 gram NaOH ditimbang dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 mL (larutan stok B). Sebanyak 50 mL larutan stok A dimasukkan ke dalam beaker. Dipipet sebanyak 22,4 ml NaOH kemudian dimasukkan ke dalam beaker yang sama. Diukur pH, jika pH telah menapai 6,8 maka dicukupkan dengan aquades hingga 100 mL. Jika pH belum mencapai 6,8 maka ditambahkan NaOH sedikit demi sedikit hingga mencapai pH yang diinginkan.

### Pembuatan Larutan L-DOPA 2 mM

Ditimbang 0,00394 gram L-DOPA. Ditambahkan 10 mL larutan dapar fosfat.

## Pembuatan Larutan Tirosinase

Enzim tirosinase 25 KU dilarutkan dengan 2 mL dapar fosfat. Dipipet 400 µL kemudian dimasukkan ke dalam eppendorf dan ditambahkan 600 µL dapar fosfat. Diperoleh 5000 Unit/mL. Dipipet 50 µL larutan enzim tirosinase 5000 Unit/ml kemudian ditambahkan 950 µL dapar fosfat. Diperoleh 250unit enzim/mL dalam 1 *microtube*. Enzim tirosinase yang tidak digunakan, disimpan dalam freezer -20° C.

## Penyiapan Sampel dan Kontrol Positif

Fraksi etil asetat daun patikala (*Etlintera elatior*) ditimbang 0,5 mg. Dilarutkan dengan 50 µL DMSO 100% kemudian ditambahkan 950 µL larutan dapar fosfat. Diperoleh larutan stok ekstrak 500 µg/mL. Dibuat seri konsentrasi sampel 7,8125 µg/mL hingga 125 µg/mL dengan cara pengenceran bertingkat. Pembuatan kontrol positif dilakukan dengan cara ditimbang 8 mg hidrokuinon. Dilarutkan dengan 50 µL DMSO 100% kemudian ditambahkan 950 µL larutan dapar fosfat. Diperoleh larutan stok hidrokuinon 8000 µg/mL. Dibuat seri konsentrasi hidrokuinon 31,25 µg/mL hingga 2000 µg/mL dengan cara pengenceran bertingkat.

## Pengujian Penghambatan Enzim Tirosinase

Dipipet 50 µL fraksi etil asetat daun patikala dimulai dari konsentrasi sampel yang terendah. Dimasukkan ke dalam *well* sampel dan *well* kontrol warna sampel fraksi etil asetat daun patikala. Dipipet 50 µL hidrokuinon dimulai dari konsentrasi hidrokuinon yang terendah. Dimasukkan ke dalam *well* hidrokuinon dan *well* kontrol warna hidrokuinon. Dipipet 90 µL larutan dapar ke dalam *well* semua *well* yang digunakan (*well* sampel, *well* kontrol warna sampel, *well* hidrokuinon, *well* kontrol warna hidrokuinon, *well* L-DOPA). Dipipet 30 µL enzim tirosinase. Dimasukkan ke dalam *well* sampel, *well* hidrokuinon, dan *well* L-DOPA. Diinkubasi selama 30 menit. Dipipet 30 µL L-DOPA. Dimasukkan ke dalam *well* sampel, *well* hidrokuinon, dan *well* L-DOPA. Dihomogenkan di atas rotator mixer selama 5 menit. Diukur serapannya menggunakan panjang gelombang 490 nm. Untuk menentukan persen inhibisi dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi Tirosinase} = \left[ \frac{A-B}{A} \right] \times 100\%$$

Keterangan :

A = serapan larutan kontrol negatif

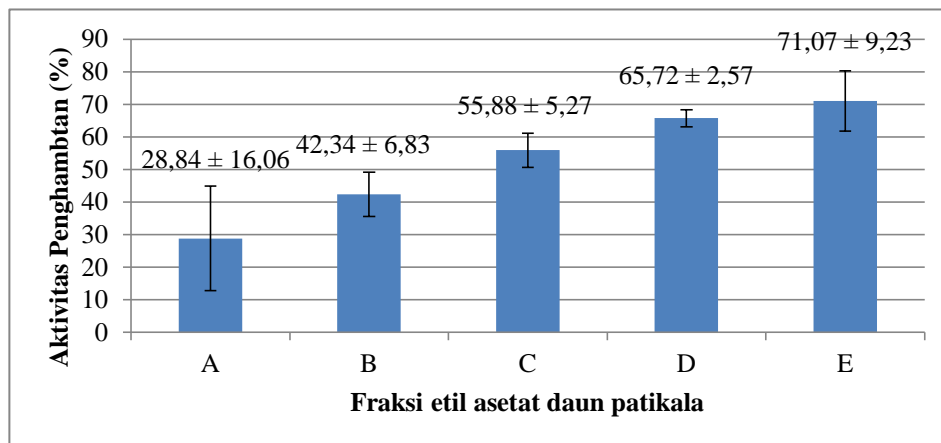
B = serapan larutan sampel yang telah dikurangi serapan kontrol warna sampel

## Hasil dan Pembahasan

Daun patikala diekstraksi menggunakan metode maserasi yang merupakan salah satu metode ekstraksi dingin menggunakan pelarut etanol 96%. Keuntungan dari metode maserasi yaitu pengerjaannya yang sederhana serta alat yang digunakan mudah diperoleh. Ekstrak etanol daun patikala yang diperoleh kemudian difraksinasi menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat dengan metode partisi cair-cair. Pemilihan etil asetat sebagai pelarut dikarenakan senyawa kimia flavonoid pada tanaman dapat ditarik menggunakan pelarut etil asetat yang merupakan pelarut semi polar yang dapat menarik senyawa flavonoid. Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan komponen penyusun daun patikala berdasarkan tingkat kepolarannya menjadi lebih sederhana. Proses fraksinasi dengan pelarut organik yang berbeda tingkat kepolarannya akan mempengaruhi jenis dan kadar senyawa yang terekstrak.

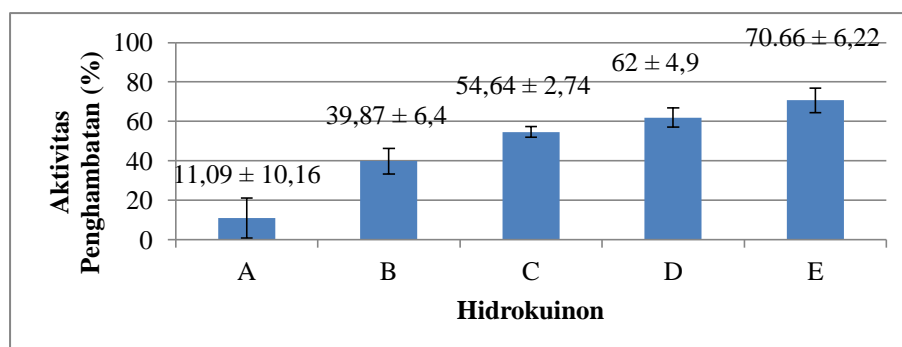
Uji penghambatan enzim tirosinase dilakukan pada panjang gelombang maksimum 490 nm dengan penambahan L-DOPA pada tiap *well* pengujian sebanyak 250 U/mL pada suhu 37°C dan diinkubasi selama 30 menit. Tujuan dilakukan inkubasi adalah menjaga suhu tetap optimum

untuk kecepatan reaksi enzim. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah hidrokuinon. Pemilihan hidroquinon dikarenakan hidroquinon merupakan bahan pemutih yang sangat sering digunakan pada krim pemutih, terutama untuk melasma dan kelainan hiperpigmentasi dengan mekanisme kerja menghambat kerja enzim tirosinase, merusak sel melanosit secara langsung, mempercepat degradasi melanosom, dan menghambat sintesis enzim melanogenesis (11). Kadar hidrokuinon yang diperbolehkan beredar di pasaran yaitu 2%, lebih dari itu dipergunakan sebagai obat dan harus dengan resep dan pengawasan dokter (12).



Gambar 1 Aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh fraksi etil asetat daun patikala dengan seri konsentrasi A=7.8125 µg/ml, B=15.625 µg/ml, C=31.25 µg/ml, D=62.5 µg/ml dan E= 125 µg/ml.

Konsentrasi sampel yang digunakan berturut-turut yaitu 7.8125 µg/mL, 15.625 µg/mL, 31.25 µg/mL, 62.5 µg/mL dan 125 µg/mL. Dari konsentrasi sampel di atas terdapat penurunan aktivitas enzim tirosinase yang diperoleh dengan persen hambatan berturut-turut yaitu 28.84%, 42.34%, 55.88%, 65.72%, dan 71.07%. Gambar 1 menunjukkan aktivitas penghambatan enzim tirosinase dari fraksi etil asetat daun patika yang meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi sampel.



Gambar 2 Aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh hidrokuinon dengan seri konsentrasi hidrokuinon yang digunakan; A= 31,25 µg/ml, B=125 µg/ml, C= 500 µg/ml, D= 1.000 µg/ml dan E=2.000 µg/ml.

Konsentrasi hidrokuinon yang digunakan yaitu berturut-turut 31,25 µg/mL, 125 µg/mL, 500 µg/mL, 1.000 µg/mL, 2.000 µg/mL. Dari konsentrasi hidroquinon di atas diperoleh persen hambatan berturut-turut yaitu 11.09%, 39.87%, 54.64, 62.00%, dan 70.66%. Gambar 2 menunjukkan aktivitas penghambatan enzim tirosinase dari hidrokuinon yang meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi hidrokuinon yang digunakan. Kontrol hidrokuinon dimulai dari konsentrasi 31,25 µg/mL dikarenakan pada konsentrasi di bawah 31,25 µg/mL hidrokuinon masih belum memberikan perubahan warna yang menandakan hidrokuinon belum memberikan efek penghambatan terhadap enzim tirosinase. Sampel yang memiliki aktivitas

inhibitor tirosinase akan menurunkan intensitas warna coklat keunguan. Warna coklat keunguan merupakan warna dari dopakrom yang terbentuk sehingga dapat diukur penghambatannya.

## Kesimpulan

Perbandingan aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh Fraksi etil asetat daun patikala dengan konsentrasi 125 µg/mL sebesar 71,07% dan kontrol positif sebesar 39.87%. Aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh kedua sampel meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi.

## Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditujukan pada Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini hingga selesai pada skim Penelitian Dosen Pemula.

## Daftar Pustaka

1. Sahidin SS, Wahyuni W, Adryan F, Imran I. Potensi Antibakteri Ekstrak Metanol dan Senyawa Aromatik dari Buah Wualae (*Etlintera elatior*). J Kim Val [Internet]. 2019;5(1):1–7. Available from: <http://journal.uinjkt.ac.id/index.php/valensi/article/view/8658>
2. CE F, ML S, Susiarti S LD, Irawati C AJ. Inhibition of human pathogenic fungi by members of Zingiberaceae used by the Kenyah (Indonesian Borneo). Natl Cent Biotechnol Inf Search database. 2003;85(2–3):289–93.
3. A R, D S, T R, Adawiah. Profil fraksi sitotoksik terhadap sel murine leukemia P-388 dari ekstrak biji honje (*Etlintera elatior*). J Kim Val [Internet]. 2017;3(1):79–87. Available from: <http://journal.uinjkt.ac.id/index.php/valensi>
4. Chan EWC, Lim YY, Ling SK, Tan SP, Lim KK, Khoo MGH. Caffeoylquinic acids from leaves of *Etlintera* species (Zingiberaceae). LWT - Food Sci Technol. 2009 Jun 1;42(5):1026–30.
5. Ramsden CA, Riley PA. Mechanistic studies of tyrosinase suicide inactivation. Arkivoc [Internet]. 2010 Jul 30 [cited 2020 Sep 24];2010(1):260. Available from: <http://hdl.handle.net/2027/spo.5550190.0011.107>
6. Wahyuni R. Pengaruh Intervensi Iontophoresis Ser-C Dengan Terhadap Hiperpigmentasi Kulit Wajah [Internet]. Universitas Muhammadiyah Surakarta; 2012. Available from: <http://eprints.ums.ac.id/20567/>
7. Musdalipah M, Setiawan MA, Santi E. ANALISIS EFEKTIVITAS BIAYA ANTIBIOTIK SEFOTAXIME DAN GENTAMISIN PENDERITA PNEUMONIA PADA BALITA DI RSUD KABUPATEN BOMBANA PROVINSI SULAWESI TENGGARA. J Ilm Ibnu Sina [Internet]. 2018 Mar 31 [cited 2020 Sep 24];3(1):1–11. Available from: [http://jiis.akfar-isfibjm.ac.id/index.php?journal=JIIS&page=article&op=view&path\[\]=104](http://jiis.akfar-isfibjm.ac.id/index.php?journal=JIIS&page=article&op=view&path[]=104)
8. Moiolli EK, Bakus AD, Yaghmai D, Hernandez C. Treatment strategies for pigmentation disorders in skin of color. Cosmet Dermatology [Internet]. 2011;24(11):524–31. Available from: <https://www.mdedge.com/dermatology/article/70024/pigmentation-disorders/treatment-strategies-pigmentation-disorders-skin>
9. Chan EWC, Lim YY, Wong LF, Lianto FS, Wong SK, Lim KK, et al. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. Food Chem [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2020 Sep 24];109(3):477–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608001775>
10. Handayani V, Ahmad AR, Sudir M. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga dan Daun Patikala (*Etlintera elatior* (Jack) R.M.Sm) Menggunakan Metode DPPH. Pharm Sci Res [Internet]. 2014 Aug 21 [cited 2020 Sep 24];1(2):86–93. Available from: <http://psr.ui.ac.id/index.php/journal/article/view/3321>
11. Sofiana R, Wiraguna AAGP, Pangkahila W. Krim ekstrak etanol biji mengkudu (*Morinda citrifolia*) sama efektifnya dengan krim hidrokuinon dalam mencegah peningkatan jumlah melanin kulit marmut (*Cavia porcellus*) yang dipapar sinar ultraviolet B. J e-Biomedik [Internet]. 2017 Jan 18 [cited 2020 Sep 24];5(1). Available from:

<https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/ebiomedik/article/view/15017>

12. Badan POM RI. Kenalilah Kosmetika Anda, Sebelum Menggunakannya. Info POM. 2007;VII(4).