

**ISOLASI DAN BIOINHIBITOR AKTIVITAS ENZIM TIROSINASE
DARI EKSTRAK ETIL ASETAT PADI HITAM (*Oryza Sativa L Indica*)**

**ISOLATION AND BIOINHIBITOR TYROSIANSE ENZYM OF ETHYL
ACETATE EXTRACT FROM BLACK RICE (*Oryza sativa L Indica*)**

Agus Rochmat*, LBS Kardono, Dewi Puspa Lotulung

Program Studi Ilmu Farmasi Kimia, Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila Jakarta

*agus_rochmat@untirta.ac.id

ABSTRAK

Melanin merupakan pigmen warna pada kulit, rambut, lapisan koroid mata, dan sel-sel tumor tertentu. Proses pembentukan melanin pada tubuh manusia dapat direduksi dengan beberapa mekanisme, seperti antioksidan, inhibitor enzim tirosinase, dan aktivitas hormonal. Proses pembentukan melanin atau pigmen pada kulit manusia terjadi dengan bantuan biokatalis (enzim) dan sinar ultraviolet (UV) yang terdapat dalam matahari. Biokatalis yang berperan dalam reaksi pencoklatan ini adalah tirosinase yang dapat ditemukan pada hewan, tumbuhan dan manusia. Proses ekstraksi padi hitam menggunakan metanol kemudian dilanjutkan pemisahan menggunakan kromatografi kolom. Hasil rendemen fraksi etil asetat diperoleh 3,26 %. Rendemen terbesar diperoleh 4,1 mg dengan karakteristik: panjang gelombang maksimum sinar UV pada 298 nm, nama senyawa isovanillic acid dan IC₅₀ uji inhibisi tirosinase sebesar 107,91 ppm.

Kata kunci: padi hitam, enzim tirosinase, isovanillic acid.

ABSTRACT

Melanin is a color pigment in the skin, hair, eye choroid layers, and certain tumor cells. The process of melanin formation in the human body can reduced by several mechanisms, such as antioxidants, tyrosine enzyme inhibitors, and hormonal activity. The process of formation of melanin or pigment in human skin occurs with the help of biocatalysts (enzymes) and ultraviolet (UV) rays found in the sun. Biocatalysts that play a role in this browning reaction are tyrosine which can found in animals, plants and humans. The process of extracting black rice using methanol then continued by separation using column chromatography. The yield of ethyl acetate fraction was 3.26%. The highest yield was 4.1 mg with the characteristics: maximum wavelength of UV light at 298 nm, the name of the isovanillic acid compound and IC₅₀ tyrosine inhibition test of 107.91 ppm

Keywords: black rice, tyrosine enzym, isovanillic acid

PENDAHULUAN

Melanin merupakan pigmen warna pada kulit, rambut, lapisan koroid mata, dan sel-sel tumor tertentu. Pigmen melanin yang diproduksi pada sel melanosit terdiri dari dua jenis, yaitu eumelanin (pigmen-cokelat hitam), dan feomelanin (pigmen kuning-merah). Pada keadaan normal produksi pigmen melanin stabil, akan tetapi pada keadaan tertentu produksi melanin berubah, misalnya terkena sinar matahari, perubahan hormonal, pengaruh rokok dan alkohol.

Proses pembentukan melanin pada tubuh manusia dapat direduksi dengan beberapa mekanisme, seperti antioksidan, inhibitor enzim tirosinase, dan aktivitas hormonal (Prota and Thomson, 1976). Proses pembentukan melanin atau pigmen pada kulit manusia terjadi dengan bantuan biokatalis (enzim) dan sinar ultraviolet (UV) yang terdapat dalam matahari. Biokatalis yang berperan dalam reaksi pencoklatan ini adalah tirosinase yang dapat ditemukan pada hewan, tumbuhan dan manusia (Chang, 2009).

Senyawa yang berasal dari bahan alam telah dilaporkan dapat menghambat enzim tirosinase, seperti senyawa yang berasal dari golongan flavonol (kuersetin, mirisetin, kaempferol), golongan isoflavon, flavanol, kalkon, dan stilbenoid (Chang, 2009). Senyawa ini sebagian besar diperoleh dari tanaman seperti dari ekstrak tumbuhan andalas (*Morus macroura*) dan beberapa spesies *Dipterocarpaceae*, seperti *Shorea assamica*, *S. seminis*, *Vatica umbonata*, dan *Dryobalanops oblongifolia* (Hakim et., al, 2008). Dari ekstrak kayu *Artocarpus incisus* dan *A. heterophyllus* diperoleh senyawa isoartokarpesin dan kloroforin yang memiliki aktivitas inhibisi yang sama dengan asam kojat (Supriyanto, 2009), sedangkan dari tumbuhan mulberri (*Broussonetia papyrifera*) berhasil diisolasi sejumlah senyawa diantaranya

adalah golongan senyawa flavon, kuersetin, flavonol, dan luteolin (Zhen et., al, 2008).

Padi adalah tanaman sereal utama di negara berkembang. Hal ini dikonsumsi sebagai makanan pokok oleh lebih dari satu-setengah dari populasi dunia dan sekitar 95% diproduksi di Asia (Zhen et., al, 2008). Meskipun banyak dikonsumsi sebagai nasi putih, ada banyak kultivar khusus beras yang mengandung pigmen warna, seperti beras hitam, beras merah dan beras ungu. Nama varian padi merujuk pada warna kernel (seperti warna hitam, merah atau ungu) yang dibentuk dari antosianin pada lapisan beras yang berbeda dari pericarp, biji mantel dan aleuron (Miyazawa, 2007).

Padi hitam varian *Oryza sativa* L. indica dari Jepang memiliki biji-bijian berwarna gelap ungu (Park et., al, 2008). Pigmen antosianin, cyanidin-3-glukosida dan peonidin-3-glukosida, diisolasi dari tanaman ini. Berbagai senyawa lain, seperti asam fenolat, asam ferulat, asam vanilat, *protocatechuic acid*, *phenolic ester* γ -*oryzanol acid*, asam fitat, dan inositol yang ditemukan dari dedak beras ini. Asam fenolat bertindak sebagai antioksidan, *radical oxygen scavenger*, penghambat sitokrom P450 hati, agen antibakteri, dan antiinflamasi (Park et., al, 2008). Pada berasnya mengandung banyak protein, berbagai asam amino, dan vitamin. Adapun mineral, mengandung lebih banyak zat besi dan kalsium.

Penggunaan lulur beras secara tradisional, dipercaya oleh masyarakat Indonesia dapat memutihkan kulit. Maka, kandungan senyawa antioksidan pada beras hitam diduga memiliki aktifitas pencerah kulit (*whiening agent*).

METODOLOGI

Bahan – bahan yang digunakan adalah padi hitam yang diperoleh dari Sleman Yogyakarta, etanol hasil destilasi,

metanol (pa, MERCK), butanol (pa, MERCK), heksana (pa, MERCK), etilasetat (pa, MERCK), DPPH (1-difenil-2-pikrilhidrazin, Sigma Aldrich), asam askorbat (pa, MERCK), arbutin (pa Sigma Aldrich), HCl (pa, MERCK), Na₂CO₃ (pa, MERCK), air destilasi, air bidestilasi, L Tyrosine (pa, MERCK), Tirosinase Enzym (Mushroom, Sigma Aldric), dan larutan buffer fosfat pH 6,8 (MERCK).

Alat yang digunakan adalah: Oven, *climatic chamber*, timbangan analitik, alat tumbuk padi, saringan 2 mm, *destilator*, kuvet, *beaker glass*, botol gelap, labu ukur, stirrer, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu-1800, GC-MS Agilent, Spektrofotometer JEOL 400 Mhz, *Centrifuge*, pH meter, *sonicator*, botol 10 ml, *micropipette 1ml*, *micropipette 500 µl*, botol Erlenmeyer 250 mL, tabung reaksi, pipet gondok, *vacuum dryer*, labu ukur 100 ml, stop watch dan inkubator.

Ekstraksi Perkolasi Simplisia Padi Hitam

Sebanyak 5 kg simplisia padi hitam diperkolasi dengan metanol teknis yang telah didestilasi, dengan laju 5 ml/menit hingga warna filtrate yang dihasilkan tidak berwarna. Filtrat dipekatkan dengan destilasi vakum dan dilanjutkan pengering putar menjadi ekstrak kental. Ekstrak kental ini disebut ekstrak metanol. Sebanyak 100 gram Ekstrak metanol dilarutkan dengan air 1:1 dan disonikasi hingga terlihat homogen. Kemudian dipartisi berturut – turut dengan etil asetat. Filtrat fraksi dipekatkan dengan pengering putar hingga 95 % pelarut hilang.

Kromatografi Kolom Ekstrak Etil Asetat

Ekstrak pekat etil asetat padi hitam ditotolkan pada pelat KLT. Setelah kering, langsung dielusi dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan uap eluen pengembang. Eluen yang digunakan adalah heksana:etil asetat:metanol. Sampai diperoleh pola

pemisahan spot yang terpisah dengan baik. Penentuan eluen terbaik dijadikan dasar eluen untuk pemisahan di kromatografi kolom. Hasil kolom ditampung setiap 5 ml hingga semua eluen habis digunakan. Sample filtrate dilakukan KLT kembali dan pola spot yang mirip digabung jadi satu. Hasilnya dikeringkan menggunakan pengering putar. Hasil rendemen terbanyak dilanjutkan pengujian spektro NMR, dan uji inhibisi enzim tirosinase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

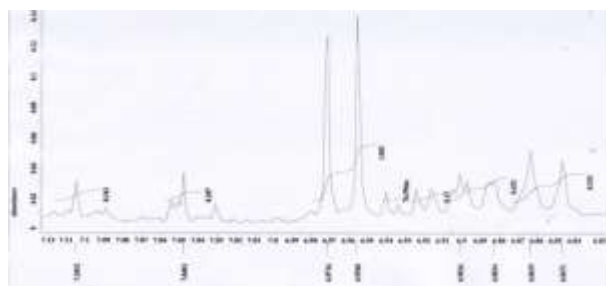
Hasil rendemen dari 100 gram ekstrak kental methanol yang dipartisi menggunakan air:etil asetat diperoleh 3,26 gram fraksi etil asetat. Perolehan rendemen sangat dipengaruhi akan waktu tinggal pelarut yang bersentuhan dengan sample. Lama ekstraksi ini menentukan jumlah komponen yang dapat diekstraksi dari suatu bahan (Bombardelli, 1991). Semakin lama waktu ekstraksi maka kesempatan untuk bersentuhan antara bahan baku dan pelarut semakin besar, sehingga kelarutan komponen bahan aktif dalam larutan meningkat, dengan demikian rendemen ekstrak juga akan semakin bertambah hingga larutan mencapai titik jenuh.

Pada metode ekstraksi perkolasi, kontak antara pelarut dan bahan hanya berlangsung singkat, laju ekstraksi komponen bahan juga berkurang dan kemampuan pelarut untuk melarutkan komponen ekstrak dalam bahan hanya sedikit. Hal ini ditunjukkan dengan sedikitnya rendemen ekstrak yang diperoleh yakni: 3,26 %. Meskipun, kendala ini dapat diatasi dengan laju filtrat 1 – 5 ml/menit (Bombardelli, 1991).

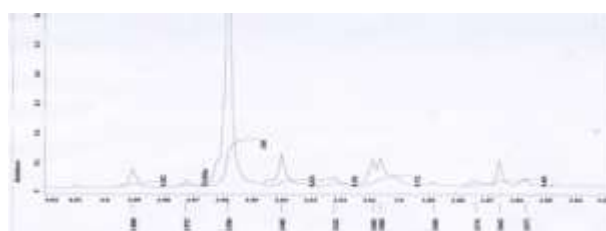
Isolasi Senyawa Fraksi Etil Asetat

Fraksi Etil Asetat yang diambil dengan kode G14 dipreparasi ulang dengan melarutkan dalam metanol:etil asetat kemudian dilakukan pemanasan 48 °C hingga terlihat ada butiran Kristal yang terbentuk. Kristal yang terbentuk

dipisahkan dan dilakukan pencucian dengan etil asetat hingga semua pengotor hilang. Kemudian dilarutkan dalam metanol dan dilakukan identifikasi dengan



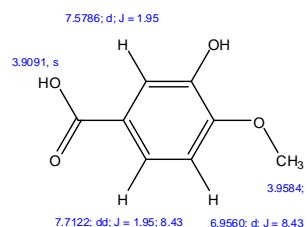
Gambar 1. Spektra H-NMR Kristal Etil Asetat G14 pada δ 6,83 – 7,12



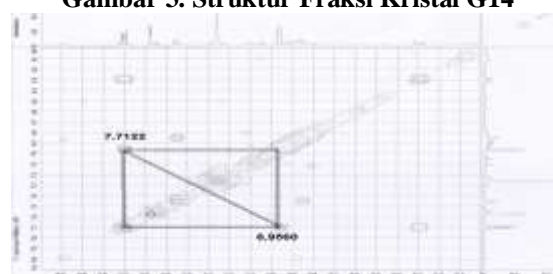
Gambar 2. Spektra H-NMR Kristal Etil Asetat G14 pada δ 3,89 – 4,62

Dari gambar 1 Spektra H-NMR Kristal Etil Asetat G14 pada δ 6,83 – 7,12, terlihat nilai pergeseran kimia δ , pola hidrogen aromatik muncul pada δ 7.7122 (1H,dd, $J = 1.95; 8.43$) berbentuk meta dengan δ 7.5785 (1H,d; $J = 1.95$) dan orto dengan δ 6.9560 (1H,d; $J = 8.43$). Sementara pada gambar 2 Spektra H-NMR Kristal Etil Asetat G14 pada δ 3,89 – 4,62; Gugus metoksi terlihat pada nilai pergeseran kimia, δ 3,9584 (3H, s). Gugus karboksilat terlihat pada nilai δ 3,9091 (1H, s). Dari data – data ini dirangkai dengan software ChemOffice v10.0 diperoleh gambar struktur yang diduga dan memiliki bobot molekul 168.

KLT. Hasilnya Nampak bercak spot yang berwarna merah muda. Setelah kering diperoleh sebanyak 4,1 mg dan dilanjutkan identifikasi menggunakan spektro NMR.

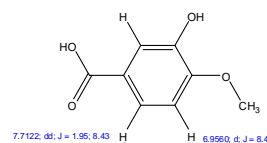


Gambar 3. Struktur Fraksi Kristal G14



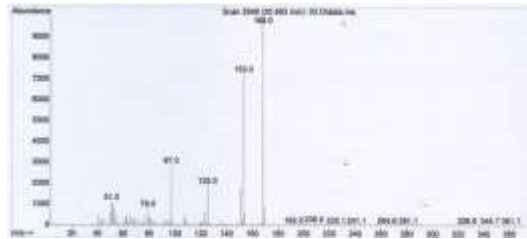
Gambar 4. Spektra H-COSSY Fraksi G14

Hasil H-COSSY untuk kristal fraksi Etal Asetat G14 ini hanya diperoleh informasi bahwa δ 7,7122 bertetangga langsung dengan δ 6,9560. Sementara δ 7,4619 yang bertetangga dengan δ 6,8471 memiliki integral 0,175 dan 0,535. Nilai integral dibawah 1, diduga merupakan pengotor yang ikut terdeteksi. Hal yang sama terjadi pada δ 6,3179 memiliki integral 0,178 yang bertetangga dengan δ 7,7122.

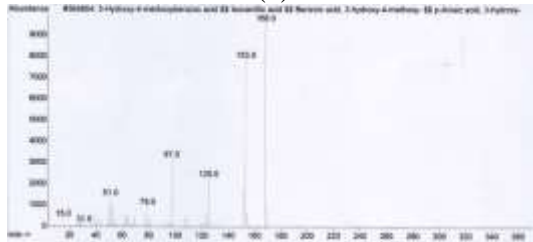


Gambar 5. H-COSSY δ 6,9560 dengan δ 7,7122

Informasi struktur ini diperkuat dengan hasil analisis GCMS untuk sample G14 pada retention time 20,99 menit diperoleh struktur *isovanillic acid* dengan luas peak 33,45, kemiripan 97 % dan bobot molekul 168.



(a)



(b)

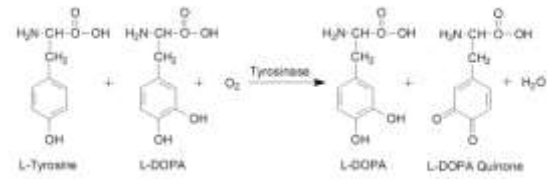
Gambar 6. Spektra GCMS senyawa fraksi Etil Asetat G14 (a) dan referensi isovanillic acid (b)

Pada scanning UV sample fraksi Etil Asetat G14 yang dilarutkan dalam metanol pada konsentrasi 125 µg/ml, lebar kuvet 1 cm dan 2 ml diperoleh beberapa panjang gelombang. Sample kristal G14-K diduga masih belum murni, ini terlihat pola spektra UV yang terlihat masih melebar. Namun, hasil perhitungan manual yang mengacu pada silverstein *et. al*, 2005, diperoleh panjang gelombang maksimum 282 nm. Sementara hasil scanning UV menggunakan spektrofotometer UV-Vis diperoleh panjang gelombang maksimum 298 nm. Perbedaan ini dimungkinkan adanya efek batokrom akibat adanya gugus kromofor yang berdekatan (silverstein *et. al*, 2005).

Pengujian Inhibisi Tirosinase

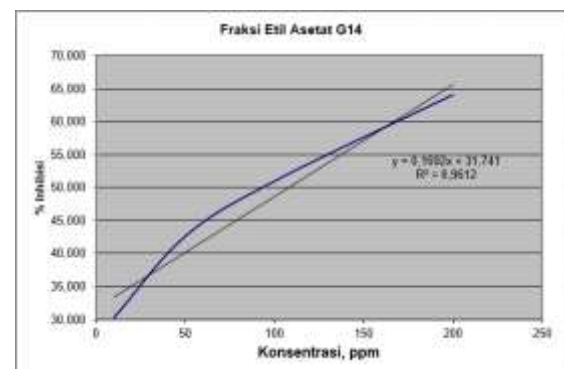
Inhibitor tirosinase dapat bekerja secara kompetitif dan non-kompetitif dengan substrat tirosinase, yaitu L-tirosin dan L-DOPA. Inhibitor tirosinase yang spesifik akan berikatan kovalen dengan enzim tirosinase sehingga enzim menjadi tidak aktif selama reaksi katalitik berlangsung (Chang, 2009).

Mekanisme reaksi pengujian inhibisi tyrosinase digambarkan:



Gambar 7. Reaksi *Over all* L-Tirosin (Chang, 2009)

Kristal Etil Asetat G14 mengandung senyawa asam 3-hidroksi-4-metoksi-benzoat atau dikenal sebagai *isovanillic acid*. Miyazawa *et. al*, 2003 menyebutkan senyawa ini diduga memiliki kemampuan inhibisi tirosinase (Miyazawa *et. al*, 2003 dan Park *et. al*, 2008). Hal ini terbukti dalam pengujian sample ini bahwa *isovanillic acid* memiliki kemampuan inhibisi tirosinase mulai konsentrasi 30 ppm dan terus naik kemampuannya seiring naiknya konsentrasi dan nilai IC₅₀ sebesar 107,91 ppm.



Gambar 8. Grafik IC₅₀ sample G14

Tingginya nilai IC₅₀ fraksi etil asetat G14 pada pengujian inhibisi enzim tirosinase, menunjukkan bahwa senyawa isovanillic acid merupakan bioinhibitor terhadap enzim tirosinase yang berperan pada proses pemutihan kulit.

KESIMPULAN

1. Rendemen fraksi etil asetat padi hitam diperoleh 3,75 gram
2. Nama senyawa fraksi etil asetat G14 : isovanillic acid

3. Panjang gelombang maksimum hitung 282 nm dan alat spektro Uv – Vis: 298 nm

4. Hasil uji inhibisi tirosinase diperoleh nilai IC₅₀ pada konsentrasi 107,91 ppm

DAFTAR PUSTAKA

- Bombardelli, E. *Technologies for the Processing of Medicinal Plants*. Florida. CRC Press. 1991.
- Buck. *Food Additive User's Hand Book : Antioxidant*. Jim Smith Edition. Blackie & Sons Ltd. London. 1991; pp 149-183.
- Chang, T.S. An update review of Tirosinase inhibitor. *International Journal Molecular Science*. 2009; 10: 2440 – 2475.
- Hakim EH, Syah YM, Juliawati LD, Mujahidin D. Aktivitas antioksidan dan inhibitor tirosinase beberapa stilbenoid dari tumbuhan *Moraceae* dan *Dipterocarpaceae* yang berpotensi untuk bahan kosmetik. *Jurnal Matematika dan Sains*. 2008; 13:33 – 44.
- Kubo I, Nihei K, Tsujimoto K. Methyl p-coumarate, a melanin formation inhibitor in B16 mouse melanoma cells. *J Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2004; 12:5349-5354.
- Likhitwitayawuid K. Stilbenes with tirosinase inhibitory activity. *J Curr Sci* . 2008; 94:44-52.
- Masanori Koguchi, Masanori. Noriaki Saigusa, and Yuji Teramoto. Production and Antioxidative Activity of Mead Made From Honey and Black Rice (*Oryza sativa* var. *Indica* cv. *Shiun*). *J. Inst. Brew*. 2009; 115(3), 238–242.
- Mitsui T. *New Cosmetic Science*. Amsterdam: Elsevier Science B.V; 1997. hlm.21-24, h.148-150
- Miyazawa, M and Naotaka Tamura. Inibitor compound of tirosinase activity from the sprout of *Polygonium hydropiper* L. (Beniyade). *Biology Pharmaceutical Bulletin*. 2007; 30: 595 – 597.
- Miyazawa, Mitsuo. Teruo Oshima. Yumi Itsuzuki. Katsuya Koshio. Jun Anzai. Tirosinase Inhibitor from Black Rice Bran. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51 (24), pp 6953–6956.
- Molyneux, P., 2004, The Use of The Stable Free Radikal Diphenylpicrilhidrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *J. Sci. Technol.*, 26(2) : p. 211–219
- Park, Young Sam, Sun-Joong Kim, and Hyo-Ihl Chang. Isolation of Anthocyanin from Black Rice (Heugjinjubyeo) and Screening of its Antioxidant Activities. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*. 2008; Vol. 36, No. 1, 55–60.
- Pavia, Donald L. Gary M Lampman and George S Kriz. *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Srudents of Organic Chemistry*. Books/Cole Thomson Learning. USA. 2001.
- Pokorny, J., N. Yanishlieva, dan M. Gordon, (eds.). *Antioxidants in Food: Practical Applications*. Woodhead Publ. Ltd., Cambridge, England. 2001.
- Prakash, A. Rigelhof, F. Miller, E. *Antioxidant Activity*. Medalliaon Laboratories Analitical Progress. Vol 10. No.2. 2001.

Prota, G and R.H. Thomson. Melamin pigmentation in mammals. *Endeavor*: 1976; 35:32 – 38.

Rochmat, Agus. 2018. Pengembangan Salep Luka Bakar Ekstrak Flavonoid Daun Srikaya (*Annona squamosa* L). *Scientia* Vol 8 No. 1 (2018). *Scientia: Jurnal Farmasi dan Kesehatan*. p-ISSN : 2087-5045 e-ISSN : 2502-1834. Hal 1 -7.

Silverstein, RM. Webster, FX. And Kiemle, DJ. *Spectrometric Identification of Organic Compound*. 7th Edition. New York. John Wiley & Sons Inc. 2005.

Swantara, I made Dira. Sagung Chandra Yowani and Osamu Iitsuka. The Active Fractions from Ethanol Extracts of *Gracilaria Coronopifolia* J Agardh Are Potential Free Radical Scavenging Agents. *Journal of Applied Chemical Science* 2012, Vol. 4 issue 2: 18-27

Teramoto, Y. Koguchi, M. Wongwicharn, A. and Saigusa, N. Production and antioxidative activity of alcoholic beverages made from Thai ou yeast and black rice (*Oryza sativa* var. Indica cv. Shiun). *African Journal of Biotechnology*. 2011; Vol. 10(52), pp. 10706-10711.

Tranggono RI, Fatma L. *Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama; 2007. hlm.27-29, hlm. 47

Zheng ZP, Cheng KW, Chao J, Wu J, Wang M. Tirosinase inhibitor from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). *Journal Food Chemistry*. 2008; 106: 529 – 535.