



POTENTIAL OF RED BETEL LEAVES (*Piper crocatum*) AS TYROSINASE INHIBITOR *IN SILICO* AND *IN VITRO*

Syahrul Mustopa¹, Mega Safithri^{1*}, Laksmi Ambarsari¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Sciences and Mathematics, IPB University, West Java, Indonesia

Submitted 26 August 2022; Revised 11 November 2022; Accepted 12 November 2022; Published 01 February 2024

*Corresponding author: safithri@apps.ipb.ac.id

Abstract

Melasma is a pigmentation disorder caused by excess melanin synthesis in the form of brown patches around the face or neck. Melasma can affect all racial groups, especially areas with high ultraviolet radiation. Substances that are often used to prevent hyperpigmentation are kojic acid, azelic acid and mercury, but these substances are carcinogenic if used continuously. Red betel (*Piper crocatum*) has active compounds that act as antioxidants such as flavonoids and phenols. This study aims to determine the potential of the active compound of red betel leaves against tyrosinase inhibition. This research was conducted using *in silico* and *in vitro* methods. The receptors used were tyrosinase with PDB code 5M8O, tropolone as native ligand, and kojic acid as comparison ligand. A total of 34 active compounds of red betel leaf from LC-MS and GC-MS analysis were used as test ligands. Molecular docking was performed using AutoDock Vina and AutoDock Tools, and visualized using Ligplot⁺ and PyMOL. *In vitro* tyrosinase inhibition used the tyrosinase activity assay kit ab252899 and kojic acid as a positive control. The catechin compound has the smallest binding free energy (ΔG), which is -6.7 kcal/mol, and the kinetics of inhibition is 12.12 M. *In vitro* test results, the water fraction has the largest tyrosinase inhibitory activity of 84.84% and kojic acid has an activity of 82.47% .

Keywords: Hyperpigmentation, Melasm, Molecular docking, *Piper crocatum*, Tyrosinase

Potensi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Inhibitor Tirosinase Secara *In silico* dan *In vitro*

Abstrak

Melasma adalah kelainan pigmentasi yang diakibatkan sintesis melanin berlebih berupa bercak coklat disekitar wajah atau leher. Melasma dapat mengenai semua kelompok ras, terutama daerah dengan radiasi ultraviolet tinggi. Zat yang sering digunakan untuk mencegah hiperpigmentasi adalah asam kojat, asam azelat, dan merkuri, akan tetapi zat tersebut bersifat karsinogen jika digunakan terus menerus. Sirih merah (*Piper crocatum*) memiliki senyawa aktif yang berperan sebagai antioksidan seperti flavonoid dan fenol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi senyawa aktif daun sirih merah terhadap penghambatan tirosinase. Penelitian ini dilakukan dengan metode *in silico* dan *in vitro*. Reseptor yang digunakan adalah tirosinase dengan kode PDB 5M8O, tropolon sebagai *native ligand*, dan asam kojat sebagai ligan pembanding. Sebanyak 34 senyawa aktif daun sirih merah hasil analisis LC-MS dan GC-MS digunakan sebagai ligan uji. Penambatan molekuler dilakukan dengan menggunakan *AutoDock Vina* dan *AutoDock Tools*, serta divisualisasikan menggunakan Ligplot⁺ dan PyMOL. Penghambatan tirosinase secara *in vitro* menggunakan kit *tyrosinase activity assay* ab252899 dan asam kojat sebagai kontrol positif. Senyawa katekin memiliki energi bebas pengikatan (ΔG) terkecil, yaitu $-6,7$ kkal/mol, dan kinetika inhibisi sebesar $12,12$ μ M. Hasil pengujian *in vitro*, fraksi air memiliki aktivitas inhibisi tirosinase terbesar yaitu $84,84\%$ dan asam kojat memiliki aktivitas sebesar $82,47\%$.

Kata Kunci: Hiperpigmentasi, Melasma, Penambatan molekuler, *Piper crocatum*, Tirosinase

1. Pendahuluan

Kulit merupakan bagian tubuh terluar yang berfungsi sebagai pelindung utama dari paparan sinar ultraviolet. Melasma atau *kloasma* dikenal juga dengan istilah topeng kehamilan karena angka kasusnya meningkat pada wanita hamil. Prevalensi melasma pada populasi Hispatik di Amerika mencapai 9% dan di Asia tenggara mencapai 40% dari populasi.¹ Melasmadisebabkankarenamelanin diproduksi secara berlebihan berlebihan atau dikenal sebagai hiperpigmentasi. Enzim yang berperan dalam biosintesis melanin adalah tirosinase, sehingga enzim tersebut memiliki peranan sangat penting dalam proses pigmentasi.² Tirosinase berperan penting dalam 2 rekasi, yaitu hidroksilasi L-Tirosin menjadi L-DOPA dan oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon, Senyawa dopakuinon berpolimerasi membentuk dopakrom yang kemudian membentuk pigmen melanin.³

Senyawa aktif yang berasal dari alam serta memiliki aktivitas inhibitor tirosinase adalah dari golongan flavanoid, seperti kuersetin, mirisetin, kaempferol, dari golongan isoflavon, flavonol, dan stilbenoid.⁴ Alternatif inhibitor tirosinase berbahan alam sangat dibutuhkan, terlebih tanaman di Indonesia sangat berlimpah keanekaragamannya. Tanaman di Indonesia yang berlimpah dan banyak dikenal masyarakat Indonesia diantaranya adalah sirih merah (*Piper crocatum*). Senyawa columbin dan schisandrin yang terdapat pada fraksi etil asetat daun sirih merah memiliki aktivitas inhibitor terhadap α -glukosidase secara *in silico*.⁵ Ekstrak dan fraksi daun sirih merah juga memiliki aktivitas sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase secara *in silico* dan dapat menghambat reaksi pembentukan MDA (malondialdehida) secara *in vitro*,⁶ dan memiliki aktivitas penghambatan asetilkolinesterase secara *in silico*.⁷

Inhibitor tirosinase sangat dibutuhkan untuk kepentingan industri kecantikan dan juga dunia medis dalam mencegah terbentuknya *Reaction Oxygen Species* (ROS) sebagai radikal bebas.⁸ Senyawa aktif yang sudah dimanfaatkan indutri kosmetik sebagai inhibitor tirosinase diantaranya adalah

hidrokuinon, tropolon, asam azelat, merkuri dan asam kojat, akan tetapi penggunaan senyawa tersebut memiliki efek yang berbahaya bagi tubuh dan asam kojat dalam konsentrasi tinggi bersifat hepatokarsinogen, menyebabkan eritemia dan dermatitis⁹ dan hidrokuinon dapat menyebabkan inflamasi disekitar kelenjar sebaceous dan folikel rambut.¹⁰ Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi senyawa aktif daun sirih merah sebagai inhibitor tirosinase secara *in silico* dan *in vitro*. Parameter yang dianalisis pada *in silico* adalah nilai energi bebas pengikatan (ΔG), nilai konstanta inhibisi (K_i), jenis ikatan dan jarak ikatan yang terjadi antara reseptor dengan ligan.

2. Metode

2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian *in silico* adalah *personal computer* dengan spesifikasi *processor* AMD E1, memori RAM 4GB, piranti lunak *MarvinView* 6.0.0, *BIOVIA Discovery Studio Visualizer* v16.1.0.15350, *AutoDockTools*-1.5.68, *Ligplot+* dan *PyMOL*^(TM) 1.7.4.5 Edu. Alat yang digunakan pada penelitian *in vitro* adalah vorteks, desikator, tabung Effendorf, *microplate* 96 well, *SPECTROstar nano* *BMG Labtech*, mikropipet *multichannel* dan *syringe injector* 5 mL.

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada *in silico* adalah reseptor tirosinase dengan kode PDB 5M8O, tropolon sebagai *native ligand*, dan asam kojat sebagai pembanding. Ligan uji yang digunakan adalah 34 struktur 3D senyawa aktif daun sirih merah (*Piper crocatum*) hasil analisis *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS)^{11,12,13} dan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS)^{14,15} pada penelitian sebelumnya. Bahan yang digunakan pada penelitian secara *in vitro* adalah ekstrak dan fraksi (n-heksana, etil asetat dan air) daun sirih merah, DMSO, asam kojat dan *tyrosinase activity assay* kit Ab252899.

2.3. Metode

2.3.1. Preparasi Ligan dan Analisa Stabilitas Reseptor

Struktur 3D ligan uji diunduh dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dan disimpan dalam format sdf, kemudian dikonversi menjadi format pdb menggunakan *MarvinView* 6.0.0. Struktur 3D Reseptor enzim tirosinase diunduh dari laman PDB <https://www.rcsb.org/> dengan kode PDB 5M8O dalam format PDB. Reseptor memiliki 4 rantai yang sama. Preparasi ligan dilakukan dengan menambahkan atom hidrogen polar menggunakan *Discovery Studio Visualizer* v16.1.0.15350 dan rotasi ikatan menggunakan piranti *AutoDock Tools* v.1.5.6. Preparasi reseptor menggunakan piranti *BIOVIA DSV* v16.1.0.15350 dengan menghilangkan molekul air, hetero atom dan ligan alami. File pdbqt reseptor ditambahkan atom hidrogen polar, dan *Gasteiger partial charges* menggunakan piranti *AutoDock Tools* v.1.5.616. Analisis plot Ramachandran dilakukan dengan cara mengunggah struktur 3D reseptor dalam format PDB pada laman <http://services.mbi.ucla.edu/> kemudian dipilih “*runprocheck*” dan plot Ramachandran hasil analisis disimpan dalam format PDF.¹⁷

2.3.2. Validasi Gridbox dan Penapisan Virtual

Validasi *gridbox* dilakukan dengan cara menentukan area penambatan menggunakan *AutoDock Tools* v.1.5.6. Zona *gridbox* diperoleh size x, y dan z secara berurutan 14×14×14 dengan center_x -13.194, center_y 2.661 dan center_z -24.972 serta jarak antaratom 1 Å. Validasi penambatan dilakukan 20 kali ulangan hingga mendapatkan RMSD $\leq 2\text{\AA}$. Sebanyak 34 ligan uji, tropolon dan asam kojat ditambatkan pada reseptor secara bersamaan menggunakan *PyRx* 0.8. Ligan ditambatkan pada area *gridbox* hasil validasi. Nilai energi bebas pengikatan (ΔG) yang lebih rendah dari tropolon akan ditambatkan secara molekuler menggunakan *AutodockTools*.¹⁸

2.3.3. Penambatan Ligan Uji dan Analisis Hasil

Ligan yang lolos penapisan virtual dan reseptor yang sudah dipreparasi disimpan dalam format *.pdbqt, kemudian disalin

ke folder Vina. Program *AutoDock Vina* dijalankan melalui *Command Prompt* (CMD). Perintah pemograman yang dijalankan yaitu “vina --config conf.txt --log log.txt”. Hasil penambatan molekuler berupa file output dalam format *.pdbqt dan file log yang berisi informasi energi afinitas dan RMSD dalam format txt.¹⁹ Analisis hasil penambatan berupa nilai ΔG dan menghitung konstanta inhibisi (K_i) yang diperoleh dari persamaan $\Delta G = -R \times T \times \ln K_i$, dengan keterangan ΔG = energi bebas Gibbs (kkal/mol), R = konstanta gas universal (1.986 kkal/molK) dan T = suhu (Kelvin). Ligan yang tertambat pada reseptor divisualisasikan 2D menggunakan *Ligplot+* dan 3D menggunakan *PyMOL*.²⁰

2.3.4. Prediksi Toksisitas Ligan

Prediksi toksisitas dilakukan dengan cara diunggah struktur SMILES ligan pada <http://biosig.unimel.edu.au/pkcsml/prediction>, kemudian klik ‘ADMET’. Parameter yang prediksi adalah permeabilitas dan sensitifitas pada kulit,²¹ sedangkan prediksi inhibisi herG, toksisitas oral akut dan karsinogenitas dengan cara diunggah di <http://lmmd.ecust.edu.cn/admestar1>.²²

2.3.5. Uji Inhibisi Tirosinase

Uji inhibisi tirosinase dilakukan menggunakan kit uji aktivitas tirosinase Ab252899 (kolorimetri). Sampel terdiri atas ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi n-heksana, dan fraksi air daun sirih merah. Sampel dibuatkan 10.000 ppm dalam 2 mL, sedangkan asam kojat (kontrol positif) dibuatkan pada 1000 ppm. Pemilihan konsentrasi asam kojat dikarenakan memiliki aktivitas sangat kuat sebagai inhibitor tirosinase,²³ sedangkan pemilihan konsentrasi 10000 ppm pada ekstrak/fraksi bertujuan untuk mendeteksi potensi awal sampel sirih merah yang memiliki aktivitas inhibisi tirosinase. Sebanyak 5 μL *enhancer* dan 50 μL ddH₂O dimasukkan ke dalam mikropate 1, kemudian sebanyak 43 μL buffer dan 2 μL enzim dimasukkan kedalam mikropate 2, kedua campuran tersebut digabungkan. Larutan tersebut sebagai *sample background control* (SBC). Sebanyak 5 μL *enhancer*,

10 μL substrat tirosinase dan 50 μL sampel dimasukkan kedalam mikropate 1 dan sebanyak 33 μL *buffer* dan 2 μL enzim dimasukkan kedalam mikropate 2, kedua campuran tersebut digabungkan secara bersamaan dengan menggunakan mikropipet *multichannel*. Sampel diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit di ruangan gelap dan diukur absorbansinya pada λ 509 nm menggunakan *SPECTROstar nano BMG Labtech*. Sampel dilakukan pengujian sebanyak tiga kali ulangan.²⁴

3. Hasil

3.1. Preparasi Ligan dan Reseptor

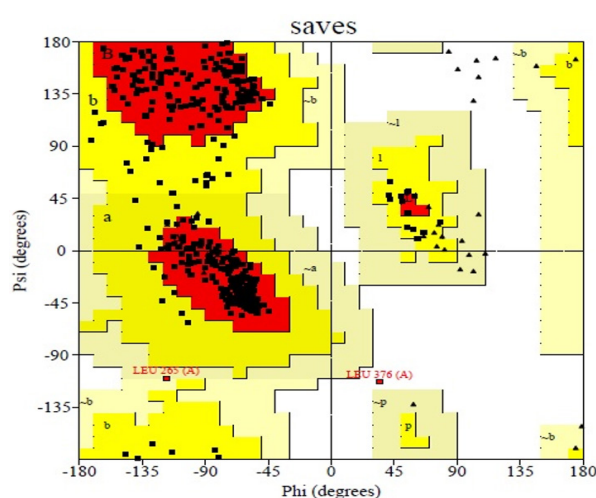
Sebanyak 34 struktur 3D ligan uji hasil analisis LC-MS dan GC-MS dipreparasi dengan cara menambahkan ion hidrogen. Reseptor yang digunakan pada penelitian ini adalah enzim tirosinase dengan kode PDB 5M8O. Reseptor diperoleh dari basis data RCSB PDB. Residu asam amino pada reseptor 5M8O berjumlah 446 dan ikut tertambat senyawa tropolon (*native ligand*). Stabilitas reseptor ditentukan berdasarkan

plot Ramachandran dan resolusi kristalografi. Hasil plot Ramachandran menunjukkan bahwa 85.5% residu asam amino berada pada kuadran I, 14% berada pada kuadran II, 0.3% berada pada kuadran III dan 0.3% berada pada kuadran IV (Gambar 1).

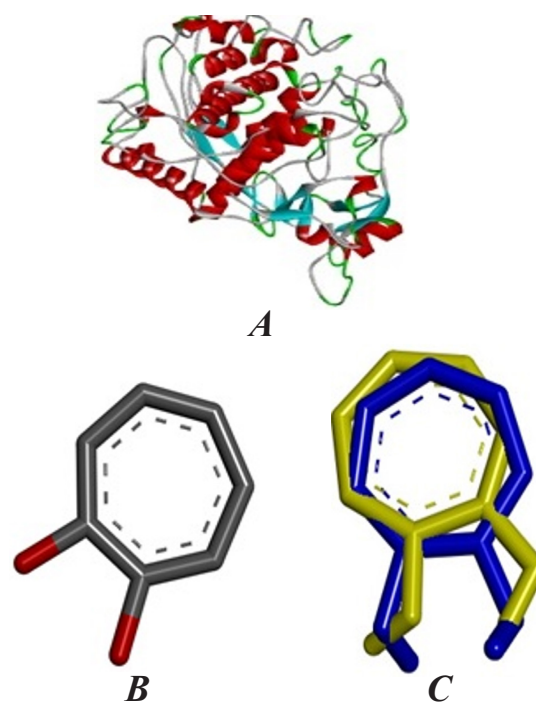
Plot Ramachandran merupakan diagram dua dimensi yang berisi plot asam amino berdasarkan torsi putaran phi (Φ) dan psi (Ψ). Rantai utama ikatan N-C α dan C α -C pada polipeptida relatif berputar secara bebas, dan rotasi tersebut disebut dengan torsi phi dan psi.²⁵

3.2. Validasi area *gridbox* dan penapisan virtual

Validasi area *gridbox* adalah penambatan kembali (*redocking*) tropolon pada reseptor untuk mengetahui ukuran *gridbox*, nilai RMSD dan sisi aktif reseptor. Validasi area penambatan didapatkan zona *gridbox* size x, y, dan z adalah 14 $\times$ 14 $\times$ 14 dan center_x = -13.194, center_y = 2.661 dan center_z = -24.972 dengan jarak 1 Å dengan nilai RMSD rata-rata 0.9962 Å dan ΔG rata-



Gambar 1. Plot Ramachandran tirosinase (kode PDB: 5M8O) (sumber: <https://saves.mbi.ucla.edu/results?job=1062217&p=procheck>)



Gambar 2. Visualisasi (a) reseptor tirosinase; (b) tropolon; (c) tropolon redocking (biru) dengan tropolon native ligand (kuning)

rata sebesar -5.4 kkal/mol. Sebanyak 34 ligan uji ditambahkan pada reseptor dan didapatkan hasil ΔG yang bervariasi. Terdapat 9 ligan uji yang lolos penapisan virtual dengan kriteria memiliki ΔG lebih rendah dari tropolon, yaitu sebesar -5.4 kkal/mol. Kesebelas ligan tersebut adalah katekin, 3-(3,4 dimetilfenil) asam propionat, asam protokatekuat, L-(+) arginin hidroklorida, 1-amino-1,3,5 triazin-2-yl) glisinat dihidroklorida, metoksiindol, N1-(5-metilisoxazol-3-yl) etana diamida, limonen, terpinen-4-ol, metil eugenol, dan sineol.

3.3. Penambatan Ligan Uji dan Analisis hasil

Penambatan molekul dilakukan untuk mengidentifikasi potensi penghambatan senyawa aktif pada daun sirih merah. Hasil penambatan molekul diperoleh nilai ΔG , konstanta inhibisi (K_i) dan divisualisasikan secara 2D dan 3D. Nilai ΔG dan K_i merupakan parameter daya inhibisi ligan terhadap reseptor. Visualisasi 2D menunjukkan residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan membentuk ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Nilai ΔG terendah didapatkan pada katekin, sebesar -6,7 kkal/mol dan nilai K_i sebesar 12,12 μM . Nilai ΔG dan K_i terkecil diperoleh dari ligan sineol secara berurutan sebesar -5.4 kkal/mol dan 108,99 μM . Nilai ΔG dan K_i berbanding lurus, semakin kecil energi afinitas (ΔG) maka ligan semakin mudah untuk menghambat kinerja enzim.

3.4. Toksisitas Ligan Uji

Analisis bioavailabilitas ligan uji berdasarkan aturan Lipinski untuk mengetahui kriteria senyawa kandidat obat yang ideal. Ligan uji yang lolos penapisan virtual dianalisis bioavailabilitas-nya. Semua ligan uji memenuhi kriteria sesuai aturan Lipinski. Ligan yang memiliki bioavailabilitas yang baik tidak lebih dari dua kriteria yang dilanggar.²² Prediksi toksisitas ligan berdasarkan ADMET (*absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity*), permeabilitas dan sensitivitas terhadap kulit. Semua ligan uji, tropolon dan asam kojat bersifat inhibitor lemah, non karsinogen dan non toksik. Ligan yang menyebabkan sensitif terhadap kulit adalah terpinen-4-ol, sineol dan tropolon (ligan alami).

4. Pembahasan

4.1. Ligan dan Stabilitas Reseptor

Ligan uji merupakan senyawa bioaktif yang terdapat pada daun sirih merah. Senyawa tropolon berperan sebagai ligan alami yang sudah tertambat pada reseptor, dan asam kojat sebagai ligan pembanding. Preparasi ligan uji, ligan alami dan ligan pembanding dilakukan dengan tujuan untuk menghitung energi interaksi antara ligan dan reseptor sehingga dapat menghasilkan fleksibilitas ligan dengan menambah jumlah ikatan yang dapat diputar oleh ligan.²⁶ Reseptor enzim tirosinase merupakan enzim

Tabel 1. Energi bebas pengikatan ligan dengan reseptor

Ligan	Energi Bebas Pengikatan (kkal/mol)	K_i (μM)
Tropolon	-5,4	108,99
Asam Kojat	-5,7	65,65
Katekin	-6,7	12,12
3-(3,4 dimetilfenil) asam propionat	-5,9	46,82
Asam protokatekuat	-6,2	28,20
L-(+) Arginin hidroklorida	-5,8	55,44
1-amino-3-(aminooxy)-2-propanyl N-(4,6-diamino-1,3,5 triazin-2-yl) glisinat dihidroklorida	-6,3	23,82
Metoksi indol	-5,6	77,73
N1-(5-methylisoxazol-3-yl)ethanediamide	-6,6	14,34
Terpinen-4-ol	-5,6	77,73
Sineol	-5,4	108,99

Tabel 2. Bioavaibilitas Ligan Berdasarkan Aturan Lipinski

No	Ligan	Inhibisi herG		Karsinogenitas		Toksisitas oral akut Sensitisasi kulit	Permeabilitas kulit	Sensitisasi kulit
		Kategori	Skor	Kategori	Skor			
1	Tropolon	Inhibitor Lemah	0,9	Non karsinogen	0,8	III	-3,078	Ya
2	Asam Kojat	Inhibitor Lemah	0,9	Non karsinogen	0,9	III	-3,157	Tidak
3	Katekin	Inhibitor Lemah	0,9	Non karsinogen	0,9	IV	-2,735	Tidak
4	Terpinen-4-ol	Inhibitor Lemah	0,8	Non karsinogen	0,8	III	-2,182	Ya
5	3-(3, 4 dimetilfenil) asam propionat	Inhibitor Lemah	0,9	Non karsinogen	0,9	III	-2,712	Tidak
6	N1-(5-methylisoxazol-3-yl)ethanediamide	Inhibitor Lemah	0,9	Non karsinogen	0,7	III	-3,313	Tidak
7	Asam protokatekuat	Inhibitor Lemah	0,9	Non karsinogen	0,9	III	-2,727	Tidak
8	L-(+)-Arginin Hidroklorida	Inhibitor Lemah	0,9	Non karsinogen	0,8	IV	-2,735	Tidak
9	Metoksi indol	Inhibitor lemah	0,9	Non karsinogen	0,9	III	-2,397	Tidak
10	Sineol	Inhibitor Lemah	0,86	Non arsinogen	0,9	III	-2,437	Ya

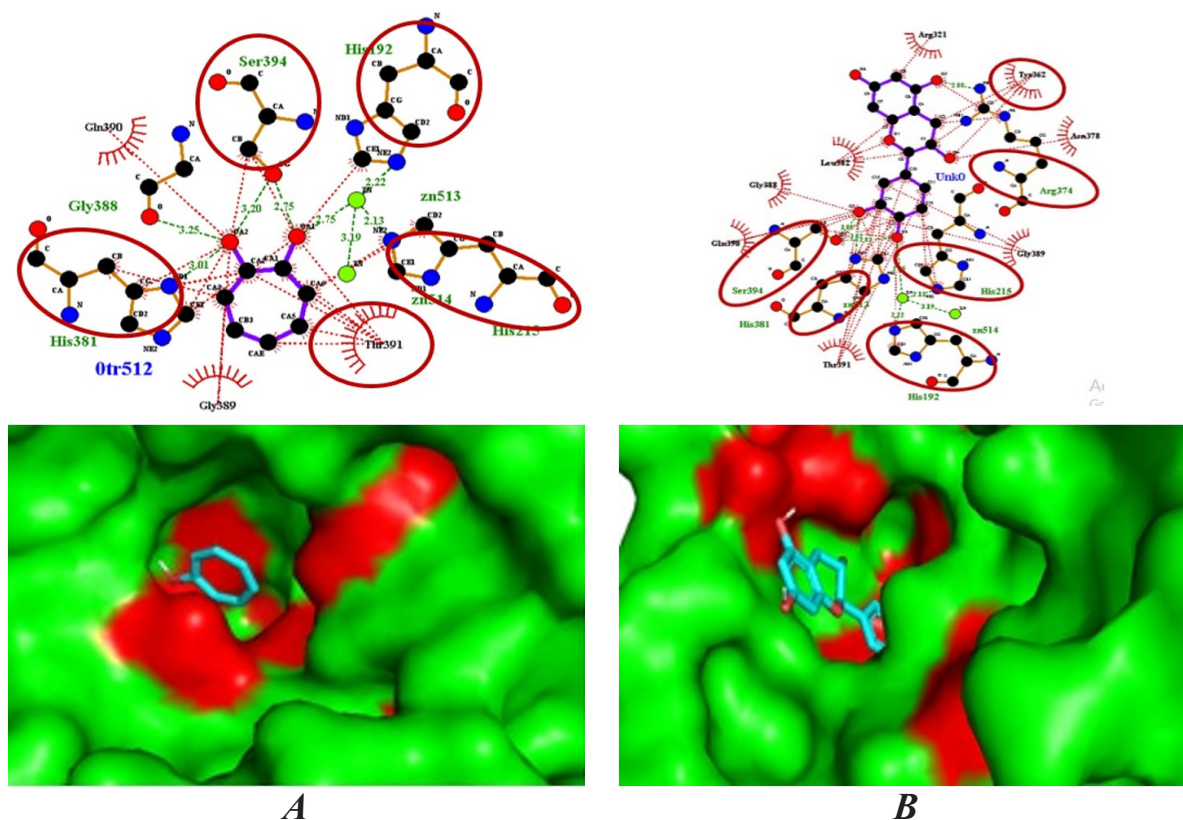
yang memiliki empat subunit yang sama (A, B, C dan D), sehingga pada penelitian ini hanya menggunakan subunit A saja (gambar 1a dan 1b). Reseptor tidak terdapat mutasi, dikristalisasi berasal dari manusia, memiliki 446 residu asam amino dan nilai resolusinya 2.5 Å. Reseptor memiliki kualitas yang baik dan dapat digunakan untuk docking adalah reseptor yang memiliki nilai resolusi kurang atau sama dengan 2,5.²⁷ Analisis stabilitas reseptor berdasarkan plot Ramachandran menunjukkan bahwa reseptor 5M8O residu asam amino sebagian besar berada pada kuadran I dan II, yang merupakan daerah disukai, sedangkan pada kuadran IV banyak tersebar glisin dan terdapat asam amino Leu376. Suatu protein dinyatakan baik apabila jumlah residu asam amino non glisin pada kuadran IV kurang dari 20%.²⁸

berfungsi mendapatkan ukuran *gridbox* yang tepat meliputi sisi aktif tirosinase. Nilai energi bebas pengikatan rata-rata yang dihasilkan sebesar -5,5 kkal/mol dengan nilai RMSD 0,9962 (Gambar 1c dan 1d), maka dapat dinyatakan bahwa nilai RMSD hasil validasi dapat diterima karena lebih kecil dari 3,0 Å.¹⁸

Sebanyak 9 ligan uji yang lolos penapisan virtual dari 34 ligan atau senyawa aktif daun sirih merah. Pemilihan ligan uji yang lolos adalah ligan yang memiliki nilai ΔG lebih rendah dari ΔG tropolon, yaitu sebesar -5,4 kkal/mol. Sembilan ligan uji tersebut, dianalisis bioavaibilitas dan toksisitasnya. Kelebihan penapisan virtual dapat menambatkan banyak ligan secara bersamaan, namun kekurangannya adalah spesifitas lebih rendah dibandingkan dengan penambatan molekuler.²⁹

4.2. Ukuran Gridbox dan Penapisan virtual
Validasi area penambatan molekuler (*gridbox*) dilakukan dengan cara meredocking ligan alami dengan reseptor. Validasi *gridbox*

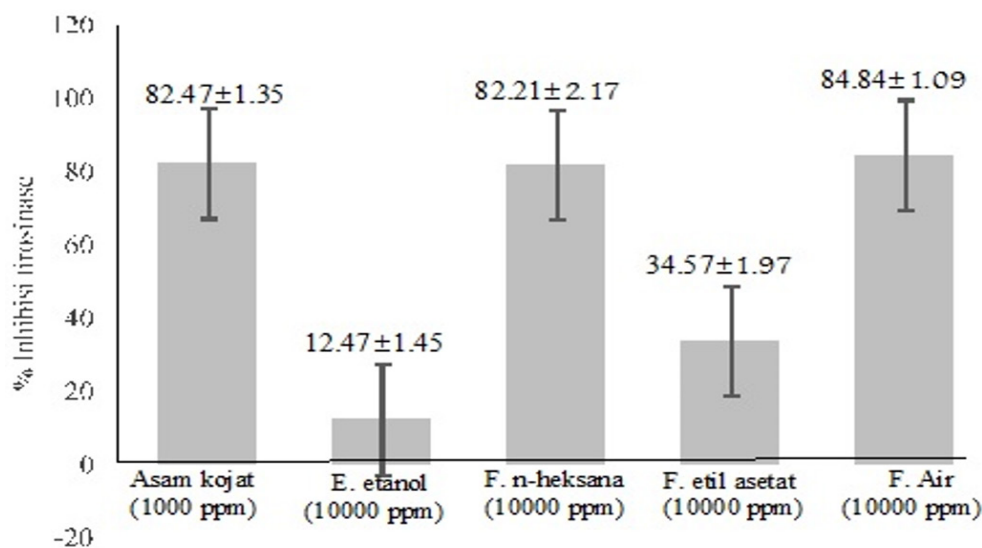
4.3. Penambatan Molekuler dan Analisis Hasil
Penambatan molekuler terhadap reseptor bertujuan untuk mengetahui



Gambar 3. Visualisasi interaksi reseptor dengan ligan (a) tropolon (2D dan 3D); (b) katekin (2D dan 3D)

kemampuan ligan dalam menghambat enzim dengan parameter nilai ΔG dan nilai K_i . Pada penelitian ini, didapatkan senyawa katekin yang memiliki nilai energi bebas pengikatan terendah, yaitu sebesar -6,7 kkal/mol dengan nilai konstanta inhibisinya (K_i) sebesar 12,12 μM . Nilai ΔG dan K_i terendah dihasilkan oleh sineol dengan nilai ΔG sebesar -5,4 kkal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 108,99 μM , nilai tersebut sama dengan tropolon sebagai ligan alami.

Residu asam amino reseptor berinteraksi dengan ligan membentuk ikatan hidrogen atau interaksi hidrofobik. Residu asam amino yang konsisten berinteraksi dengan ligan tropolon, asam kojat adalah His192, His215, His381, Thr391 dan Ser394. Sisi aktif tirosinase terletak pada residu asam amino His192 His215, His224, Arg374, His377, His381, Thr391 dan Ser394.³⁰ Katekin memiliki interaksi hidrofobik lebih banyak



Gambar 4. Daya inhibisi terhadap tirosinase (ket: E = ekstrak; F = fraksi)

dibandingkan dengan tropon dan asam kojat, sehingga memiliki nilai ΔG lebih rendah. Ligan uji sineol, metoksiindol dan terpinen-4-ol tidak terbentuk ikatan hidrogen sehingga memiliki nilai ΔG dan K_i yang besar. Nilai konstanta inhibisi yang kecil menunjukkan ligan semakin mudah menginhibisi enzim. Ikatan hidrogen mampu menstabilkan ikatan dan interaksi hidrofobik menurunkan nilai ΔG .³¹

4.4. Toksisitas Ligan

Prediksi toksisitas yang dilakukan berdasarkan ADMET (*Adsorption, distribution, metabolism, excretion dan toxicity*) dengan parameter herG, karsinogen, toksisitas oral akut, skin permeability dan sensitisation. Semua ligan uji, tropon dan asam kojat bersifat inhibitor lemah terhadap herG dan bersifat nonkarsinogen. herG merupakan gen pengkode kanal protein kalium yang berkontribusi untuk aktivitas detak jantung.³² Ligan uji katekin dan L-(+) arginin hidroklorida yang kategori IV dan ligan uji yang lainnya termasuk kategori III. Kategori toksisitas III dan IV merupakan nontoksik. Terdapat 5 ligan yang menyebabkan sensitif terhadap kulit, yaitu tropon, terpinen-4-ol, metil eugenol dan sineol. Zat yang menyebabkan sensitif terhadap kulit membuat tidak nyaman bagi sebagian orang.²²

4.5. Inhibisi Tirosinase Secara *In vitro*

Inhibisi tirosinase oleh ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun sirih merah secara *in vitro*. Analisis inhibisi tirosinase ekstrak etanol dan fraksi daun sirih merah dilakukan hanya pada satu konsentrasi yaitu 10000 ppm, karena hanya untuk melihat potensi awal ekstrak etanol dan fraksi nya sebagai inhibitor tirosinase. Hasil menunjukkan bahwa semua sampel memiliki aktivitas sebagai inhibitor tirosinase. Asam kojat (kontrol positif) memiliki aktivitas inhibisi tirosinase sebesar 82,47% pada konsentrasi 1000 ppm. Asam kojat merupakan inhibitor tirosinase yang kuat.²⁴ Pada fraksi air terdapat senyawa katekin yang termasuk golongan flavonoid, dan golongan flavonoid dapat menghambat tirosinase karena memiliki kemiripan struktur dengan substrat sehingga

dopakrom tidak terbentuk.³³

Ekstrak etanol memiliki aktivitas penghambatan terendah dibandingkan dengan fraksi-fraksinya. Ekstrak etanol mengandung senyawa eliminin, neoptadien, germakron dan asam propionat. Senyawa eliminin diduga memiliki aktivitas inhibitor tirosinase karena senyawa tersebut memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan antivirus. Eliminisin memiliki cincin benzena dan rantai karbon (pada C3–C6), sehingga terdapat kemiripan struktur dengan substrat tirosinase.³⁴

Fraksi etil asetat mengandung metabolit sekunder diantaranya adalah 3-(3,4 dimetilfenil) asam propionat, schisandrin, dan columbin. Senyawa yang diduga memiliki aktivitas inhibitor tirosinase adalah (3,4 dimetilfenil) asam propionat. Senyawa (3,4 dimetilfenil) asam propionat memiliki aktivitas antioksidan, akseptor gugus hidroksil, dan mampu mengkelat ion logam Zn yang terdapat pada tirosinase.³⁵

Fraksi n-heksana melarutkan senyawa-senyawa non polar dari daun sirih merah. Senyawa-senyawa yang diduga sebagai inhibitor tirosinase adalah 4-metoksiindol, asam protokatekuat, N1-(5-metillisoxazol-3-yl) etana diamida, L-(+)-arginin hidroklorida dan 1-amino-3-(aminooxy)-2-propanil N-(4, 6 diamino-1, 3, 5 triazin-2-yl) glisinat dihidroklorida. Hal ini dikarenakan senyawa-senyawa tersebut termasuk kelompok fenolik dan memiliki cincin benzena yang menyerupai substrat tirosinase.³⁶

Ekstrak dan fraksi daun sirih merah memiliki aktivitas penghambatan terhadap tirosinase. Pada pengujian *in vitro* fraksi n-heksana dan fraksi air pada konsentrasi 10000 ppm memiliki aktivitas yang tinggi dalam menghambat tirosinase, hal tersebut diperkuat dengan hasil pengujian secara *in silico*. Terdapat 7 senyawa pada fraksi n-heksana dan katekin pada ekstrak air yang memiliki nilai ΔG lebih rendah dibandingkan dengan ligan alami, sehingga pada pengujian *in vitro* terbukti bahwa fraksi n-heksana dan fraksi air memiliki aktivitas sebagai inhibitor tirosinase yang tinggi dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi lainnya.

5. Kesimpulan

Senyawa bioaktif atau ligan uji dari daun sirih merah yang digunakan terbukti memiliki aktivitas penghambatan terhadap tirosinase. Senyawa katekin merupakan ligan uji terbaik dalam menghambat aktivitas tirosinase secara *in silico*. Secara *in vitro*, fraksi air dan fraksi n-heksana memiliki nilai tidak berbeda nyata dan memiliki daya hambat yang tinggi terhadap tirosinase.

Referensi

- Rinandari U, Putti FD, Arie K, Irawanto ME, Mochtar M. Terapi L-ascorbic acid dan glutathione 2% dibandingkan dengan hidrokuinon 4% pada pasien melasma. *J Health Sains*. 2021; 2(8): 1091-1108.
- Mawadah M, Yasmiwar. Potensi tumbuhan sebagai whitening agent. *Farmaka*. 2018; 16(2): 598-604.
- Aprilliani A, Asep GS, Rika H. Inhibition test of tyrosinase activity from Zingiberaceae. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 2018; 14(1):46-58.
- Sohretuglu D, Suat S, Burak B, Arzu O. Tyrosinase inhibition by some flavonoids: inhibitory activity, mechanism, by in vitro and in silico. *Bioorganic Chem*. 2018; 18: 168-174.
- Weni M, Mega S, Djarot SHS. Molecular docking of active compound Piper crocatum on the alpha-glucosidase enzyme as antidiabetic. *IJPST*. 2018; 7(2): 64-72.
- Bella Fatima ZD, Mega S, Dimas A. Molecular docking of red betel (Piper crocatum Ruiz & Pav) bioactive compounds as HMG-CoA reductase inhibitor. *JKSA*. 2021; 24(3): 101-107.
- Khalida S. Analisis potensi senyawa aktif daun sirih merah (Piper crocatum) sebagai inhibitor enzim asetilkolinesterase secara in silico (skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2021.
- Meiliana C, Joshita D, Berna E. Antioxidant activity assay, inhibition of tyrosinase and efficacy test of gel containing Taya cortex (Nauclea subdita) extract on human skin. *J Kefarm Ind*. 2016; 6(1): 98-107.
- Yaowares C, Rawiwan W, Anna K. Non-genotoxic mode of action and possible threshold for hepatocarcinogenicity of kojic acid in F344 rats. *Food and Chem Tox*. 2011; 49(2): 471-476.
- Joshua O, Oluseyi SF, Lola Adelo A, Miriammilicent CE. Effects of skin lightening cream agents – hydroquinone and kojic acid, on the skin of adult female experimental rats. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020; 13(2): 283-289.
- Safithri M, Kurniawati, Syaifudin. Formula of Piper crocatum, Cinnamomum burmanii, and Zingiber officinale extracts as functional beverage for diabetics. *IFRJ*. 2016; 23(3):1123-1130.
- Ramadani F. Aktivitas antioksidan, total tanin ekstrak dan fraksi daun sirih merah (Piper crocatum) dan identifikasi dengan LC-MS (skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2018.
- Wedaswari IAI. Aktivitas antioksidan etanol dan fraksi daun sirih merah (Piper crocatum) dengan metode Rancimat dan identifikasi dengan LC-MS (skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2018.
- Sundari H, Prabowo MH, Rachmawaty FJ, Tahmid HA. Standardization of leaf extract of red betel (Piper crocatum) leaves using ethanol. *Ind J Med Heal*. 2015;7(1):3-9.
- Anugrahwati M, Purwaningsih T, Rustiana, Manggalarini JA, Alnavs NB, Wulandari DN et al. Extraction of ethanolic extract of red betel leaves and cytotoxicity test HeLa cells. *Proc Engine*. 2016;148:1402-1407.
- Anitha K, Gopi G, Girish, Senthil KP. Molecular docking study on dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Int J Res Dev Pharm L Sci*. 2013;2(5):602-610.
- Zaelani Bella FD. Kajian in silico dan in vitro Piper crocatum Ruiz & Pav sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase serta aktivitas penghambatan terbentuknya malondialdehid (tesis). Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2021.
- Dallakyan S, Arthur JO. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Chem Biol*. 2015;1263:243-250.

19. Trot O, Arthur JO. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comp Chem*. 2010; 31(2): 455-461.
20. Seeliger D, Groot BL. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and AutoDock Vina. *J Comp Mol Design*. 2010;24(5): 417-422.
21. Ochieng PJ, Sumaryada T, Okun D. Molecular docking and pharmacokinetic of herbal derivatives as maltase-glucoamylase inhibitor. *Asian J Pharm Clin Res*. 2017;10(9): 392-398.
22. Cahyani FN, Ardiana R, Khasanah DU. Pengembangan dan optimasi kapsul mikrosfer ekstrak Licorice sebagai bentuk sediaan oral extended release kanker payudara. *Pharm J Indon*. 2021;7(1): 63-70.
23. Kurniasari A, Effionora A, Joshita D. The potency of Cocoa Bean (*Theobroma cacao* Lim) extract as tyrosinase inhibitory for skin lightening product. *J Kim Farm*. 2018;8(1):34-43.
24. Batubara I, Darusman L, Mitsunaga T, Rahminiwati, Djauhari E. Potency of Indonesia medical plants as tyrosinase inhibitor and antioxydant agent. *J Biol Sci*. 2010;10(2): 138-144.
25. Vinsentricia A, Seno DSH, Bintang M. In silico analysis of *Curcuma longa* against PCAF histone acetyltransferase. *Curr Biochem*. 2015;2(2): 43-55.
26. Putri RG. Penambatan molekuler senyawa aktif sirih merah (*Piper crocatum*) pada butirilkolinterase sebagai kandidat antialzheimer (skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2021.
27. Susanti NMP, Laksmiani NPI, Dewi PPP, Dewi PYC. Molecular docking terpinen-4-ol pada protein IKK sebagai antiinflamasi pada aterosklerosis secara in silico. *J Farm Udayana*. 2019;8(1): 44-46.
28. Aziz A, Dimas A, Mega S. Molecular docking of bioactive wungu leaves (*Graptophyllum pictum* (L) Griff) as tyrosinase inhibitors. *IJPST*. 2022; 9(2):94-105.
29. Shafillah M. Penambatan molekuler xantin oksidase oleh senyawa aktif sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai pengobatan alternatif asam urat (skripsi). Bogor; Institut Pertanian Bogor.
30. Xuelei Lai, Wichers Harry J, Soler-Lopez M, Dijkstra Bauke W. Enzyme structure and function very important paper structure of human tyrosinase related protein 1 reveals a binuclear zinc active site important for melanogenesis. *Angew Chem Int*. 2017; 56: 648-660.
31. Pratama R. Penambatan Molekuler Senyawa Aktif Temulawak (*Curcuma xanthoriza*) dengan Enzim Cox-2 Sebagai Kandidat Obat Antikanker Payudara (tesis). Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2015.
32. Xiao Li, Lei Chen, Feixiong Cheng, Zengrui Wu, Hanping Bian, Congying Xu, et al. In silico prediction of chemical acute oral toxicity using multi-classification methods. *J Chemical Inform and Mod*. 2014;54(4):1061-1069.
33. Mustika R, Hindun S, Nurul A. Potensi tanaman sebagai pencerah wajah alami. *J Sai Kes*. 2020;2(4): 558-162.
34. Yang X, Wang Y, Zhu X, Dai M, Zhang T, Qu Y, Yang XW, Qin HB, Frank J, Li F. Metabolic activation of elimicin leads to the inhibition of stearyl-coA desaturase 1. *Res Tox*. 2019;32: 1965-1967.
35. Sugiyama Y, Shunro K, Toshihiko O. Involvement of the β -diketon moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem Pharm*. 2006; 52:519-525.
36. Batubara I, Adfa M. Potency of kayu bawang leaves (*Protium javanicum*) as tyrosinase inhibitor. *Sains dan Matematika*. 2013;1(2):52-56.