

Potensi Daun Kayu Bawang (*Protium javanicum*) sebagai Penghambat Kerja Enzim Tirosinase

Potency of Kayu Bawang Leaves (Protium javanicum) as Tyrosinase Inhibitor

Irmanida Batubara^{1,2*}, Morina Adfa³

¹ Departemen Kimia FMIPA Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga Bogor.

² Pusat Studi Biofarmaka LPPM IPB, Jl. Taman Kencana No 3 Bogor, Jawa Barat 16151. Website: <http://biofarmaka.ipb.ac.id>

³ Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Bengkulu. Jl Raya Kandang Limun, Bengkulu 38371.

ABSTRAK

Pemanfaatan tanaman Kayu Bawang (*Protium javanicum*) masih perlu dilakukan selain sebagai bahan bangunan, terutama pemanfaatan daunnya karena lebih mudah untuk didapat. Penelitian ini bertujuan mendeskripsikan potensi daun kayu bawang sebagai penghambat enzim tirosinase, yaitu enzim yang mensintesis melanin sebagai pewarna kulit. Daun kayu bawang diekstraksi dengan metanol. Ekstrak metanol kemudian dipartisi dengan n-heksana, etil asetat, n-butanol, dan air. Seluruh hasil partisi dipekatkan dan diuji aktivitasnya pada enzim tirosinase menggunakan 2 jenis substrat yaitu L-DOPA (reaksi difenolase) dan L-tirosin (reaksi monofenolase). Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi n-heksana mampu menghambat kerja reaksi difenolase pada enzim tirosinase dengan nilai IC_{50} sebesar 114,2 ppm, dan fraksi etil asetat mampu menghambat reaksi monofenolase enzim tirosinase (IC_{50} 834,0 ppm). Ekstrak metanol, fraksi n-butanol, dan fraksi air tidak dapat menghambat kerja enzim tirosinase. Simpulannya, senyawa nonpolar dan semipolar dari daun kayu bawang dapat dimanfaatkan sebagai pemutih kulit.

Kata kunci: Kayu Bawang, *Protium javanicum*, tirosinase, pemutih

ABSTRACT

Utilization of Kayu Bawang (*Protium javanicum*) plant is needed beside its utilization for building material, especially the utilization of the leaves which easily to get. The aim of this research was to describe the potency of Kayu Bawang leaves as tyrosinase inhibitor, an enzyme which responsible to synthesis melanin as natural color of the skin. The leaves of Kayu Bawang macerated with methanol. The methanol extract then partitioned with n-hexane, EtOAc, n-BuOH, and water. All fractions were concentrated and tested its ability to inhibit tyrosinase with two substrates namely L-DOPA (diphenolase reaction) and L-tyrosine (monophenolase reaction). The result showed that n-hexane fraction could inhibit diphenolase reaction with IC_{50} value of 114.2 ppm. EtOAc fraction could inhibit monophenolase reaction (IC_{50} 834.0 ppm). Methanol extract, n-BuOH fraction, and water fraction could not inhibit tyrosinase activities. The conclusion is nonpolar and semi polar compounds in Kayu Bawang leaves could be utilized as whitening agent.

Key words: Kayu Bawang, *Protium javanicum*, tyrosinase, whitening agent.

* Alamat Korespondensi:
e-mail: imebatubara@gmail.com

PENDAHULUAN

Kayu Bawang (*Protium javanicum*) merupakan tanaman yang banyak digunakan sebagai material bangunan. Pada saat kayu tanaman ini digunakan, maka daunnya, maka akan terbuang begitu saja. Untuk memanfaatkan daunnya perlu dicari potensi dari daun kayu bawang untuk kepentingan lain bagi manusia. Salah satu pemanfaatannya ialah dalam meningkatkan rasa kepercayaan diri. Dalam meningkatkan kepercayaan diri salah satu yang menjadi pusat perhatian adalah kondisi kulit, khususnya kaum wanita menginginkan kulit yang tampak lebih cerah.

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan paparan sinar matahari. Paparan sinar matahari (sinar UV) dapat mengaktifkan hormon yang akan menstimulasi sintesis pigmen melanin dan menyebabkan warna kulit tampak lebih gelap. Oleh sebab itu, tersedia banyak produk kosmetik dengan fungsi sebagai pemutih atau pencerah kulit. Namun, beberapa produk kosmetik pemutih tidak aman dipakai karena mengandung senyawa berbahaya, seperti hidrokuinon dan juga merkuri. Hal tersebut melandasi banyaknya penelitian untuk mencari potensi tanaman atau bahan alam sebagai pemutih. Diharapkan senyawa aktif pemutih dari bahan alam tidak memberikan efek samping kepada konsumen.

Pemanfaatan yang diharapkan dari daun kayu bawang ialah sebagai agen pencerah kulit. Pendekatan yang dilakukan dengan menggunakan enzim tirosinase. Enzim tirosinase merupakan enzim yang paling penting dalam biosintesis melanin. Tirosinase terdapat pada berbagai jenis makhluk hidup, termasuk manusia (Chang, 2009). Enzim ini mengubah L-tirosin menjadi L-DOPA (monofenolase) dan selanjutnya mengubah L-DOPA menjadi Dopakuinone. Selanjutnya dopakuinon akan membentuk melanin yang merupakan penyebab kulit berwarna gelap (Lithiwitayawuid, 2008).

Mengurangi warna pada kulit dapat dilakukan dengan cara menghambat kerja enzim tirosinase. Telah banyak dilaporkan tanaman Indonesia yang mampu menghambat kerja enzim tirosinase seperti pada *Artocarpus heterophyllus*, *Allamanda cathartica*, *Xylocarpus granatum*, *Rhizophora* sp., *Caesalpinia sappan*, *Curcuma longa*, *Curcuma xanthorrhiza*, *Durio zibethinus*, *Goniothalamus macrophyllus*, *Guazoma ulmifolia*, *Gynura pseudochina*, *Helminthostachys zeylanica*, *Intsia palembanica*, *Koompassia mallaccensis*, *Talinum* sp., *Terminalia catappa*, dan *Tinospora tuberculata* (Batubara *et al.*, 2010; 2011; Arung, 2006). Telah banyak pula peneliti yang menemukan senyawa aktif dalam bahan alam yang berfungsi sebagai inhibitor tirosinase, di antaranya adalah arbutin, asam elagat, oksiresveratrol, kloroforin, noratokarpanon, artokarpanon, dan glabridin (Arung *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2011).

Kayu bawang selain digunakan sebagai material bangunan juga dikenal sebagai sumber senyawa aromatik. Dalam pengobatan tradisional, gum dan oleoresin dari spesies *Protium* digunakan sebagai stimulan, tonik, anti-inflamasi (Rüdiger *et al.*, 2007), mengatasi sakit kepala dan rematik (Deharo *et al.*, 2001). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan potensi daun kayu bawang sebagai

pencerah kulit melalui mekanisme penghambatan kerja enzim tirosinase pada reaksi monofenolase dan difenolase.

METODE PENELITIAN

Daun kayu bawang diambil dari Bengkulu Utara, identifikasi tanaman dilakukan di Herbarium Universitas Andalas, Padang, Sumatra Barat.

Ekstraksi dan Partisi. Daun kayu bawang segar dimaserasi pada suhu ruang dengan metanol dengan perbandingan (1:3) sebanyak 3 kali. Campuran hasil maserasi disaring dan filtratnya dipekatkan menggunakan rotavapor. Ekstrak metanol kemudian dipartisi dengan n-heksana, etilasetat, dan n-butanol serta air. Seluruh hasil partisi dipekatkan dan ditentukan rendemennya.

Uji Aktivitas Inhibitor Tirosinase (Batubara *et al.*, 2010). Setiap fraksi yang diperoleh dilarutkan di dalam DMSO hingga konsentrasi 20 mg/ml. Larutan stok disiapkan dengan cara melarutkan ekstrak pekat ke dalam bufer fosfat 50 mM (pH 6.5) hingga diperoleh konsentrasi 600 µg/ml. Ekstrak yang didapat diuji dengan konsentrasi 31–2000 µg/ml. Asam kojat sebagai kontrol positif juga diuji pada variasi konsentrasi yang sama dalam pelat tetes 96 sumur. Ekstrak sampel masing-masing ditambahkan sebanyak 70 µL ke dalam pelat tetes 96 sumur. Kemudian ke dalam tiap sumur ditambahkan 30 µL enzim tirosinase (Sigma, 333 unit/ml dalam bufer fosfat) dan campuran diinkubasi selama 5 menit. Setelah itu, sebanyak 110 µL substrat (L-tirosin 2 mM atau L-DOPA 12 mM) ditambahkan dan campuran diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit. Larutan pada setiap sumur diukur absorbansinya dengan menggunakan *micro-plate reader* pada panjang gelombang 492 nm untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambat 50% (IC₅₀). Persen inhibisi dihitung dengan cara membandingkan absorbans sampel tanpa penambahan ekstrak dengan penambahan ekstrak pada panjang gelombang 492 nm.

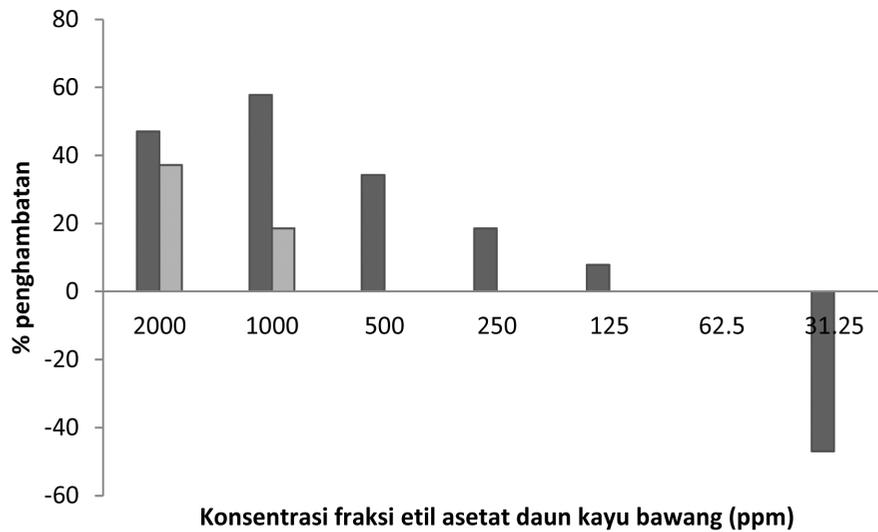
HASIL DAN PEMBAHASAN

Maserasi daun kayu bawang menggunakan pelarut metanol menghasilkan ekstrak dengan rendemen sebesar 6,14% berdasarkan bobot basah. Sementara rendemen untuk fraksi n-heksana, etilasetat, n-butanol, dan air berturut-turut 0,69%; 1,18%; 0,56%; dan 2,90% berdasarkan bobot basah daun kayu bawang. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun kayu bawang mengandung senyawa yang bersifat polar lebih tinggi kadarnya dibandingkan senyawa yang bersifat nonpolar ataupun semipolar. Senyawa nonpolar yang dilaporkan terdapat pada spesies *Protium* ialah kelompok senyawa steroid seperti sitosterol dan triterpenoid pada *P. opacum* (Zoghbi *et al.*, 1981). Senyawa semipolar yang dilaporkan terdapat pada spesies ini ialah cleomiscosin, p-coumaric ethyl ester, fraxetin, scopoletin, dan lupeol yang telah diisolasi dari batang dan kulit batang *P. heptaphyllum*

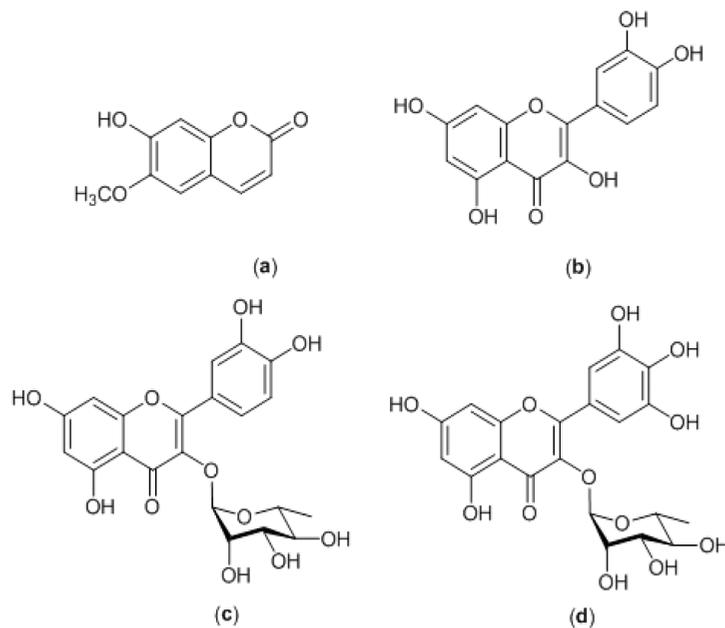
(Almeida *et al.* 2002). Senyawa polar yang terdapat pada spesies ini adalah kelompok tannin dan lignan.

Ekstrak metanol daun kayu bawang tidak memiliki aktivitas penghambatan terdapat enzim tirosinase baik pada reaksi monofenolase maupun pada reaksi difenolase. Seperti ekstrak metanol, fraksi yang dominan pada ekstrak metanol, yaitu fraksi air dan fraksi butanol juga tidak memiliki kemampuan untuk menghambat kerja enzim tirosinase. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa senyawa polar pada daun kayu bawang tidak menghambat kerja enzim tirosinase dan tidak berpotensi sebagai pemutih kulit melalui mekanisme enzim tirosinase.

Berbeda dengan fraksi yang mengandung senyawa polar, fraksi semipolar yaitu fraksi etil asetat pada konsentrasi rendah justru meningkatkan aktivitas enzim tirosinase pada reaksi monofenolase (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi rendah (31,25 ppm) fraksi etil asetat daun kayu bawang mampu meningkatkan aktivitas kerja enzim tirosinase. Hasil reaksi enzim tirosinase berupa DOPA dan DOPA kuinon selanjutnya akan disintesis oleh tubuh menjadi zat pewarna tubuh seperti pewarna kulit, rambut, dan retina mata. Dengan kata lain, fraksi semipolar daun kayu bawang berpotensi menjadi penghitam rambut.



Gambar 1. Persentase penghambatan aktivitas kerja enzim tirosinase terhadap fraksi etil asetat daun kayu bawang pada reaksi monofenolase (■) dan difenolase (□)



Gambar 2. Struktur scopoletin (a), kuersetin (b), kuersitrin (c), dan myrisitrin (d) yang telah diisolasi dari fraksi etil asetat daun kayu bawang.

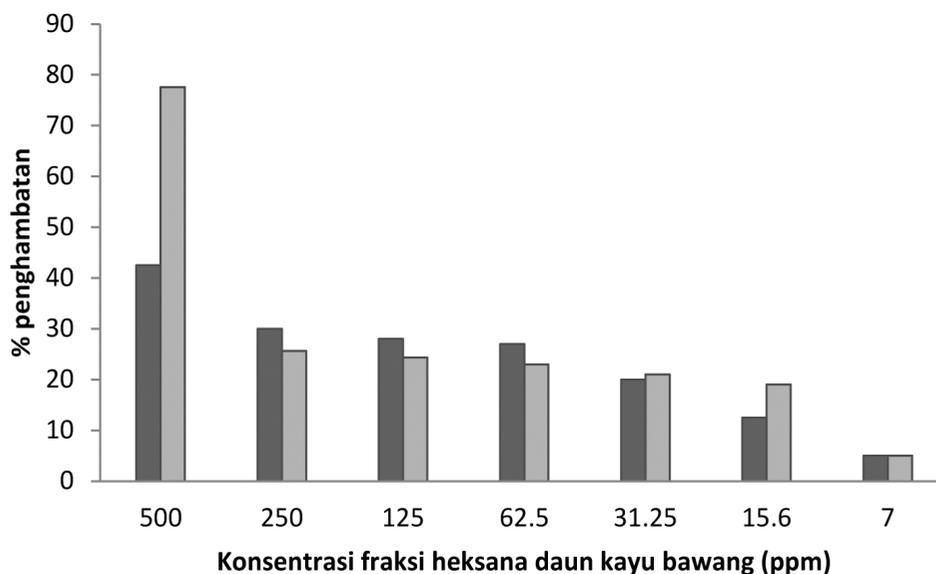
Pada konsentrasi tinggi, yaitu lebih dari 125 ppm, fraksi ini mampu menghambat kerja enzim tirosinase pada reaksi monofenolase. Untuk reaksi difenolase fraksi ini baru dapat menghambat setelah konsentrasi lebih besar dari 1000 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat kurang berpotensi sebagai pemutih kulit karena memerlukan jumlah yang banyak untuk dapat memutihkan kulit. Nilai IC_{50} fraksi etil asetat pada reaksi monofenolase sebesar 834,0 ppm. Nilai sangat besar bila dibandingkan dengan IC_{50} asam kojat sebagai kontrol positif yang hanya sebesar 11,3 ppm. Sementara untuk reaksi difenolase, fraksi etil asetat tidak mampu menghambat kerja enzim 50% sampai konsentrasi tertinggi sebesar 2000 ppm.

Senyawa yang dilaporkan terdapat pada fraksi etil asetat ialah scopoletin, kuersetin, kuersitrin dan myrsitrin (Adfa, 2010). Struktur senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 2. Di antara senyawa tersebut, kuersetin dilaporkan merupakan inhibitor tirosinase

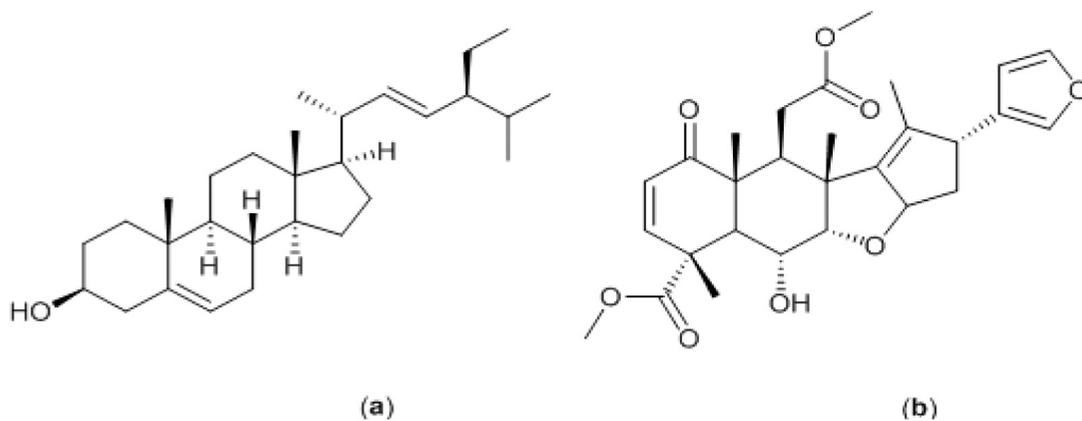
(Chang, 2009). Namun karena pada fraksi etil asetat tidak hanya terdapat kuersetin, maka aktivitas fraksi ini pun tidak terlalu baik sebagai penghambat kerja enzim tirosinase.

Fraksi *n*-heksana merupakan fraksi yang paling aktif sebagai penghambat kerja enzim tirosinase. Fraksi *n*-heksana lebih aktif menghambat kerja enzim tirosinase terutama pada reaksi difenolase. Aktivitas penghambatan kerja enzim tirosinase pada fraksi ini meningkat dengan meningkatnya jumlah fraksi yang diberikan (Gambar 3). Pada konsentrasi 500 ppm, fraksi ini telah menghambat kerja enzim tirosinase lebih dari 50%. Nilai IC_{50} fraksi *n*-heksana dalam menghambat kerja enzim tirosinase reaksi difenolase ialah sebesar 114,2 ppm. Nilai ini lebih besar 3 kali lipat dibandingkan nilai IC_{50} asam kojat sebagai kontrol positif, yaitu sebesar 40,2 ppm.

Untuk reaksi monofenolase, fraksi *n*-heksana pada konsentrasi 500 ppm belum mampu menghambat



Gambar 3. Persentase penghambatan aktivitas kerja enzim tirosinase terhadap fraksi heksana daun kayu bawang pada reaksi monofenolase (■) dan difenolase (□)



Gambar 4. Struktur stigmasterol (a) dan 6-desacetylnimbin (b) yang telah diisolasi dari fraksi *n*-heksana daun kayu bawang.

kerja enzim tirosinase 50%. Diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi untuk menghambat reaksi difenolase pada enzim tirosinase jika digunakan fraksi *n*-heksana. Senyawa stigmasterol dan 6-desasetilnimbin. Senyawa stigmasterol dan 6-desasetilnimbin telah diisolasi dari fraksi *n*-heksana (Adfa *et al.* 2013), struktur stigmasterol dan 6-desasetilnimbin dapat dilihat pada Gambar 4. Untuk memastikan senyawa apa yang menghambat kerja enzim tirosinase pada fraksi *n*-heksana, maka pengujian senyawa isolat tunggal perlu dilakukan.

SIMPULAN

Daun kayu bawang berpotensi sebagai pemutih kulit. Bagian yang berpotensi ialah senyawa nonpolar dan semipolar yang terdapat pada fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat berpotensi sebagai penghambat kerja enzim tirosinase pada reaksi monofenolase dengan senyawa aktif diduga kuersetin. Fraksi *n*-heksana menghambat reaksi difenolase enzim tirosinase, sedangkan ekstrak metanol, fraksi *n*-butanol, dan fraksi air tidak berpotensi sebagai pemutih kulit.

DAFTAR PUSTAKA

- Adfa M, Hattori Y, Ninomiya M, Funahashi Y, Yoshimura T, Koketsu M, 2013. Chemical Constituents of Indonesian Plant *Protium javanicum* Burm. f. and Their Antifeedant Activities against *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Natural Product Research*; 27:270–273.
- Adfa M, Yoshimura T, Komura K, Koketsu M, 2010. Antitermite Activities of Coumarin Derivative and Scopoletin from *Protium javanicum* Burm. f. *Journal of Chemical Ecology*; 36:720–726.
- Almeida EX, Conserva LM, Lemos RPL, 2002. Coumarins, Coumarinolignoids and Terpenes from *Protium heptaphyllum*. *Biochemical Systematics and Ecology*; 30:685–687.
- Arung ET, Shimizu K, Kondo R, 2006. Inhibitory Effect of Artocarpanone from *Artocarpus heterophyllus* on Melanin Biosynthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*; 29:1966–1969.
- Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T, Aoki H, Rahminiwati M, Djauhari E, Yamauchi K, 2011. Flavonoid from *Intsia palembanica* as Skin Whitening Agent. *Journal of Biological Sciences*; 11(8):475–480.
- Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T, Rahminiwati M, Djauhari E, 2010. Potency of Indonesian Medicinal Plants as Tyrosinase Inhibitor and Antioxidant Agent. *Journal of Biological Sciences*; 10 (2):138–144.
- Chang T, 2009. An updated Review of Tyrosinase Inhibitor. *International Journal of Molecular Sciences*; 10:2440–2475.
- Deharo E, Bourdy G, Quenevo C, Muñoz V, Ruiz G, Sauvain MA, 2001. Search for Natural Bioactive Compounds in Bolivia through a Multidisciplinary Approach. Part V. Evaluation of the Antimalarial Activity of Plants Used by the Tacana Indians. *Journal of Ethnopharmacology*; 77:91–98.
- Lithiwitayawuid K, 2008. Stilbenes with Tyrosinase Inhibitory Activity. *Current Science*; 94: 44–52.
- Rüdiger AL, Siani AC, Veiga Junior VF, 2007. The Chemistry and Pharmacology of the South America Genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Pharmacognosy Reviews*; 1:93–104.
- Yamauchi K, Mitsunaga T, Batubara I, 2011. Isolation, Identification, and Tyrosinase Inhibitory Activities of Extractives from *Allamanda cathartica*. *Natural Resources*; 2:167–172.
- Zoghbi MGB, Roque NF, Gottlieb OR, 1981. Propacin, a Coumarinolignoid from *Protium opacum*. *Phytochemistry*; 20:180.