

TESIS

KK  
TF 01/03  
Ava  
d

**DAYA HAMBAT EPIGALOKATEKIN GALAT (EGCG)  
DAN KOMBINASI EPIGALOKATEKIN GALAT - KOJIC ACID  
TERHADAP AKTIVITAS TIROSINASE**

**UPAYA MENDAPATKAN PENCERAH KULIT BARU**



**CHRISTINA AVANTI**



**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2002**

## **TESIS**

# **DAYA HAMBAT EPIGALOKATEKIN GALAT (EGCG) DAN KOMBINASI EPIGALOKATEKIN GALAT - *KOJIC ACID* TERHADAP AKTIVITAS TIROSINASE**

**UPAYA MENDAPATKAN PENCERAH KULIT BARU**



**CHRISTINA AVANTI**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2002**

**DAYA HAMBAT EPIGALOKATEKIN GALAT (EGCG)  
DAN KOMBINASI EPIGALOKATEKIN GALAT - *KOJIC ACID*  
TERHADAP AKTIVITAS TIROSINASE**

**UPAYA MENDAPATKAN PENCERAH KULIT BARU**

**TESIS**

Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Farmasi  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

**CHRISTINA AVANTI**

**NIM. 090014159 M**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**Tanggal 4 Juni 2002**

Lambar pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 4 JUNI 2002**

**OLEH**


Pembimbing Ketua



**DR. WIDJI SOERATRI, DEA., Apt**

**NIP. 130611501**

Pembimbing

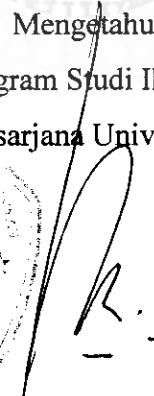
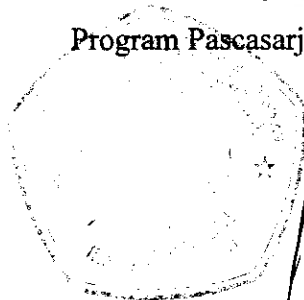


**Prof. DR. AMI SOEWANDI J.S., Apt**

**NIP. 130 531781**

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Farmasi  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



**DR. DJOKO AGUS PURWANTO MSi., Apt**

**NIP. 131653457**

**Telah diuji pada**

**Tanggal 4 Juni 2002**

**PANITIA PENGUJI TESIS**

Ketua : Prof. Dr. H. Fasich, Apt

Anggota : 1. Prof. Dr. Ami Soewandi J.S., Apt  
2. Dr. H. Purwanto, Apt  
3. Dr. Hj. Widji Soeratri, DEA., Apt.  
4. Dr. Djoko Agus Purwanto, MSi, Apt



## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah Subhanahu wata'ala atas limpahan rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Rektor Universitas Airlangga yang hingga pertengahan pendidikan dijabat Prof. Dr. H. Soedarto, DTM&H., Ph.D., selanjutnya dijabat Prof. DR. Med. H. Puruhito, dr., Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr., serta Ketua Program Studi Ilmu Farmasi yang hingga pertengahan pendidikan dijabat Dr. Hj. Widji Soeratri, DEA, Apt., kemudian dijabat Dr. Djoko Agus Purwanto, MSi., Apt atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister Ilmu Farmasi pada Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.

Penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Fasich, Apt. yang telah memberikan berbagai fasilitas serta turut pula memberikan berbagai petunjuk sejak rancangan awal hingga tersusunnya usulan penelitian, sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Terima kasih yang tak terhingga, saya sampaikan pula kepada Rektor Universitas Surabaya dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Surabaya yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh studi lanjut serta memberikan bantuan finansial sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan studi dan tesis ini.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Dr. Hj. Widji Soeratri, DEA., Apt, Pembimbing Ketua yang telah

membimbing dengan penuh perhatian dan kesabaran, memberikan dorongan, saran-saran dan kritik, sehingga memacu semangat saya untuk segera menyelesaikan tesis ini.

Kepada Prof. Dr. Ami Soewandi J.S., Apt, pembimbing yang dengan tulus dan sabar memberikan berbagai petunjuk dan saran sejak rancangan awal penelitian hingga selesainya tesis ini, saya ucapkan terima kasih yang tak terhingga

Selesainya tesis ini tak lepas dari bantuan berbagai pihak yang berperan dalam substansi penulisan, untuk itu penghargaan setinggi-tingginya saya sampaikan kepada :

- Prof. Dr. H. Azis Hubeiz, Apt., Ketua Minat Studi Farmasetika yang telah mendorong dan memberikan kesempatan kepada saya untuk memperdalam Ilmu di bidang Farmasetika dan memberikan masukan pada penyusunan tesis ini.
- Prof. Dr. H. Muhammad Zainuddin, Apt., Konsultan dalam Metodologi Penelitian dan Statistika yang telah memberikan arahan dalam penyusunan metode penelitian serta analisis statistik dalam tesis ini.
- Dr. Djoko Agus Purwanto, MSi., Apt., yang telah memicu timbulnya konsep penelitian dan dengan sabar mendiskusikan berbagai aspek yang terkait dengan substansi teh hijau, khususnya epigalokatekin galat.
- Dr. H. Purwanto, Apt. yang telah memberikan banyak sekali masukan dalam substansi tesis, terutama dalam prosedur pelaksanaan penelitian, sehingga penelitian dapat terlaksana dengan lancar

- Dra. Tutuk Budiati MS, Apt yang memberikan telah berbagai masukan terutama dalam hal prosedur pelaksanaan penelitian
- Dra Endang Sumarsih, SH., MLS, Staf Ahli Perpustakaan Universitas Airlangga yang telah meluangkan waktu untuk menelusuri keberadaan berbagai literatur yang saya butuhkan.
- Dra Sri Ariani, Kepala Perpustakaan Universitas Surabaya beserta Staf yang telah bahu membahu berusaha mendapatkan berbagai literatur yang saya butuhkan.
- Ibu Ani Winarni, Staf Pusat Dokumentasi dan Informasi LIPI, Jakarta yang telah membantu memberikan informasi dan mengirimkan berbagai literatur yang saya butuhkan.
- Dra. Esti Hendradi, MSi. di Tokyo yang dengan ikhlas membantu dalam penelusuran pustaka dan mengirimkannya kepada saya.
- DR. Isnaeni, Apt., Dra. Ekarina R.H., MKes., Gwang Ho Jeohn, Ph.D., Dra. Mariana Wahyudi MSi. dan Niken Ariestanti SSI., serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas bantuan moril dan materiil yang diberikan.

Semoga apa yang telah diberikan ini mendapatkan karunia yang berlimpah dari Allah Subhanahu wata'ala sebagai balasan.



## RINGKASAN

Tirosinase merupakan enzim utama dalam pembentukan melanin. Tirosinase berperan dalam mengkatalisis tiga reaksi yang berbeda dalam pembentukan melanin (melanogenesis), yaitu hidrosilasi tirosin menjadi dihidroksifenilalanin (DOPA), oksidasi DOPA menjadi dopakuinon dan oksidasi dihidroksiindol (DHI) menjadi indolkuinon. Hambatan pada pembentukan ataupun aktivitas enzim ini akan menyebabkan pigmen melanin berkurang atau tidak terbentuk.

Ekstrak daun teh hijau merupakan kandidat bahan pencerah kulit yang potensial. Dari penelitian Jae Kyung No, dkk. diketahui teh hijau mempunyai daya hambat tirosinase yang kuat dan beberapa studi juga telah membuktikan bahwa teh hijau mempunyai efek antiinflamasi dan anti karsinogenik yang dapat digunakan untuk mengatasi berbagai gangguan kulit. Senyawa aktif utama teh hijau yang bertanggung jawab terhadap aktivitas ini adalah (-) *-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG)*.<sup>7,8</sup>

Dalam upaya mendapatkan pencerah kulit yang efektif dengan efek samping minimal ingin diteliti lebih lanjut tentang komponen utama teh hijau EGCG sebagai bahan aktif utama pencerah kulit. Selain itu, untuk mengetahui aktivitas EGCG dalam bentuk kombinasi dengan pencerah kulit lain, dipilih *kojic acid* sebagai bahan aktif kedua, karena dengan mekanisme kerja yang sama yaitu hambatan aktivitas tirosinase, diharapkan terdapat aktivitas sinergistik dari kedua bahan aktif tersebut.

Untuk mengetahui aktivitas EGCG dalam menghambat tirosinase, perlu diketahui bagaimanakah kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase.

Kinetika dan jenis hambatan ditentukan secara invitro dengan mengamati nilai absorpsi produk (dopakrom) yang dihasilkan dari reaksi tirosinase dan substrat L-tirosin menggunakan spektrofotometer. Nilai absorpsi digunakan untuk mendapatkan parameter aktivitas tirosinase. Dari profil kurva Lineweaver-Burk aktivitas tirosinase terhadap berbagai konsentrasi L-tirosin pada berbagai konsentrasi EGCG, diketahui konstanta kinetik reaksi enzimatik tanpa inhibitor adalah  $K_M$  0,224 mM dan  $V_{maks}$  0,213  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ . Pada kurva dengan inhibitor EGCG didapat data kinetik  $V_{maks}$  yang tidak berubah dan  $K_M$  yang makin meningkat dengan makin meningkatnya konsentrasi EGCG, sehingga jenis hambatan EGCG adalah hambatan kompetitif.

Kemudian untuk mengetahui pengaruh EGCG bila dikombinasi dengan *kojic acid*, dilakukan pengujian guna mendapatkan parameter daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase. Daya hambat aktivitas tirosinase merupakan interpretasi dari nilai % inhibisi yang didapat dari nilai absorpsi produk secara spektrofotometri.<sup>7,10,11</sup> Untuk keperluan analisis statistik, nilai % inhibisi diwakili oleh harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang menunjukkan bahwa harga  $\Delta A/\text{menit}$  reaksi enzimatik yang menggunakan inhibitor EGCG konsentrasi 0,05 mM tidak berbeda bermakna dengan harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang dihasilkan dari reaksi enzimatik yang dihambat oleh *kojic acid* konsentrasi 0,005 mM, begitu pula EGCG dengan konsentrasi yang berbeda, mempunyai harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang tidak berbeda dengan

harga  $\Delta A$ /menit yang dihasilkan oleh *kojic acid* dengan konsentrasi 1/10 kali EGCG, sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa EGCG mempunyai daya hambat 10 kali lebih kecil dibandingkan *kojic acid* pada konsentrasi yang sama.

Dari hasil analisis statistik terhadap harga  $\Delta A$ /menit juga diketahui bahwa bila EGCG dan *kojic acid* tidak diberikan dalam bentuk kombinasi, perubahan harga  $\Delta A$ /menit pada setiap peningkatan konsentrasi EGCG atau *kojic acid* cenderung lebih besar bila dibandingkan dengan perubahan harga  $\Delta A$ /menit kombinasi EGCG - *kojic acid*, sehingga dapat dikatakan bahwa peningkatan konsentrasi inhibitor dalam bentuk kombinasi tidak meningkatkan daya hambat aktivitas tirosinase sebesar daya hambat yang ditimbulkan bila masing-masing inhibitor berada dalam bentuk tunggal. Kombinasi EGCG – *kojic acid* tidak menunjukkan daya hambat aktivitas tirosinase yang saling memperkuat, tetapi cenderung memperlemah.

## ABSTRACT

Tyrosinase is one of the most important key enzymes in the melanin biosynthesis. Inhibition of tyrosinase activity will cause a decreasing in melanin production.

Tyrosinase inhibitory activity of *(-)-epigallocatechin-3-O-gallate* (EGCG) has been studied as the effort to find an effective and safety skin lightening agent. EGCG is

the major and most preventive constituent in green tea, which commonly known to have anti inflammatory activity and skin cancer preventive effects.

To asses the efficacy of tyrosinase inhibition, *mushroom tyrosinase* activity using L-tyrosine as the substrate was assayed spectrophotometrically with the EGCG as an inhibitor. To asses the effect of EGCG in which combined by other inhibitor, kojic acid was used.

Michaelis-Menten constant ( $K_M$ ) and maximal velocity ( $V_{max}$ ) of the tyrosinase were determined by Lineweaver-Burk's plots. The  $K_M$  and  $V_{max}$  value obtained was 0,224 mM and 0,213  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . Lineweaver-Burk's plots of the concentration of L-tyrosine in the absence and presence of EGCG, showed that EGCG inhibits mushroom tyrosinase competitively.

The results of inhibition effects on tyrosinase activity of EGCG combined by kojic acid showed that EGCG and kojic acid has inhibition activity which weaken each other.

**Key words : *(-)-epigallocatechin-3-O-gallate* (EGCG), kojic acid, tyrosinase, inhibitory activity**

## DAFTAR ISI

Sampul depan .....	i
Sampul dalam .....	ii
Prasyarat gelar .....	iii
Persetujuan .....	iv
Panitia Penguji .....	v
Ucapan terima kasih .....	vi
Ringkasan .....	ix
Abstrak .....	xii
Daftar isi .....	xiii
Daftar tabel.....	xviii
Daftar gambar.....	xxi
Daftar lampiran.....	xxiii
Daftar arti lambang, singkatan dan istilah.....	xxv
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	4
1.3. Tujuan Penelitian .....	5
1.4. Manfaat Penelitian .....	5

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 Fisiologi pigmentasi kulit .....	6
2.1.1 Warna kulit .....	6
2.1.2 Melanosom dan melanin .....	6
2.1.3 Tirosinase .....	7
2.2. Bahan pencerah kulit atau penghambat pigmentasi .....	8
2.3. <i>Kojic acid</i> .....	9
2.4 <i>(-) - Epigallocatechin gallat (EGCG)</i> .....	11
2.5 Evaluasi bahan penghambat pigmentasi .....	13
2.6 Kinetika enzimatik .....	14
2.7 Kinetika reaksi hambatan aktivitas enzim .....	16
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.. .....	19
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian .....	19
3.2. Hipotesis penelitian .....	23
BAB 4. METODE PENELITIAN .....	24
4.1 Rancangan penelitian .....	24
4.2 Sampel, ukuran sampel dan tehnik pengambilan data .....	26
4.2.1 Sampel dan ukuran sampel.....	26
4.2.2. Teknik pengambilan data .....	26
4.3. Variabel penelitian .....	27

4.3.1. Penentuan kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase .....	27
4.3.2. Penentuan kinetika dan jenis hambatan <i>kojic acid</i> terhadap aktivitas tirosinase .....	27
4.3.3. Penentuan daya hambat kombinasi EGCG dan <i>kojic acid</i> terhadap aktivitas tirosinase .....	27
4.4 Definisi operasional variabel .....	28
4.5 Bahan Penelitian .....	29
4.6 Instrumen Penelitian .....	29
4.7 Lokasi dan waktu penelitian .....	29
4.8 Prosedur pengumpulan data .....	30
4.8.1 Skema kerangka penelitian .....	30
4.8.2 Penyiapan Larutan .....	31
4.8.2.1 Penyiapan Larutan Tirosinase .....	31
4.8.2.2. Penyiapan larutan baku L- Tirosin 5,52 mM .....	31
4.8.2.3. Penyiapan larutan baku EGCG .....	31
4.8.2.4. Penyiapan larutan baku <i>kojic acid</i> .....	32
4.8.3 Penentuan konsentrasi larutan tirosinase .....	33
4.8.4 Penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom .....	33
4.8.5 Penentuan konsentrasi tirosinase untuk penetapan kinetik .....	34
4.8.6. Penentuan konstanta kinetik menggunakan persamaan Lineweaver-Burk.....	34

4.8.7 Penentuan kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase .....	36
4.8.8 Penentuan kinetika dan jenis hambatan <i>kojic acid</i> terhadap aktivitas tirosinase .....	37
4.8.9 Penentuan daya hambat kombinasi EGCG dan <i>kojic acid</i> terhadap aktivitas tirosinase .....	38
4.9 Cara Analisis Data .....	38
4.9.1 Profil kinetika dan jenis hambatan EGCG dan <i>kojic acid</i> .....	38
4.9.2 Daya hambat kombinasi bahan penghambat pigmentasi EGCG dan <i>kojic acid</i> terhadap aktivitas tirosinase .....	39
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>41</b>
5.1 Hasil penentuan konsentrasi larutan tirosinase .....	42
5.2 Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom .....	43
5.3 Hasil penentuan konsentrasi tirosinase untuk penetapan kinetika .....	44
5.4 Hasil penentuan konstanta kinetik menggunakan persamaan Lineweaver-Burk .....	46
5.5 Hasil penentuan kinetika hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase .....	47
5.6 Hasil penentuan kinetika hambatan <i>kojic acid</i> terhadap aktivitas tirosinase .....	48



5.7 Hambatan aktivitas tirosinase oleh EGCG, <i>kojic acid</i> dan kombinasi EGCG – <i>kojic acid</i> .....	60
BAB 6. PEMBAHASAN.....	58
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN PENELITIAN .....	66
7.1 Kesimpulan penelitian .....	66
7.2 Saran Penelitian .....	67
DAFTAR PUSTAKA .....	69
LAMPIRAN.....	72

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Rancangan faktorial penentuan kinetika hambatan aktivitas tirosinase oleh EGCG .....	22
Tabel 4.2	Rancangan faktorial penentuan kinetika hambatan aktivitas tirosinase oleh <i>kojic acid</i> .....	22
Tabel 4.3	Rancangan faktorial penentuan daya hambat kombinasi EGCG dan <i>kojic acid</i> .....	23
Tabel 4.4	Komposisi larutan baku kerja EGCG .....	29
Tabel 4.5	Pembuatan larutan baku kerja <i>kojic acid</i> .....	29
Tabel 4.6	Komposisi pereaksi pada penentuan konsentrasi tirosinase untuk penetapan kinetik dengan konsentrasi L-tirosin 1,1040 mM	32
Tabel. 4.7	Volume pereaksi untuk penentuan kinetika reaksi enzimatik tanpa inhibitor ( $E_0$ ) .....	33
Tabel. 4.8	Komposisi pereaksi untuk penentuan kinetika reaksi enzimatik dengan inhibitor EGCG 0,05 mM ( $E_1$ ) .....	34
Tabel 4.9	Volume pereaksi untuk penentuan kinetika reaksi enzimatik dengan inhibitor EGCG 0,1 mM ( $E_2$ ) .....	34
Tabel 4.10	Volume pereaksi untuk penentuan daya hambat kombinasi EGCG dan <i>kojic acid</i> terhadap aktivitas tirosinase .....	35
Tabel 4.11	Rancangan faktorial penentuan kinetika hambatan aktivitas tirosinase oleh EGCG .....	21

Tabel 5.1	Hasil penentuan konsentrasi larutan tirosinase .....	38
Tabel 5.2	Nilai absorpsi dopakrom pada berbagai konsentrasi tirosinase .....	40
Tabel 5.3	Laju pembentukan dopakrom dalam berbagai konsentrasi L-tirosin dengan dan tanpa inhibitor EGCG .....	42
Tabel 5.4	Harga konstanta kinetik reaksi enzimatik dengan dan tanpa inhibitor EGCG .....	43
Tabel 5.5	Hasil analisis harga intersep garis pada kurva Lineweaver-Burk kinetika hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase .....	44
Tabel 5.6	Laju pembentukan dopakrom dalam berbagai konsentrasi L-tirosin dengan dan tanpa inhibitor <i>kojic acid</i> .....	44
Tabel 5.7	Harga konstanta kinetik reaksi enzimatik dengan dan tanpa inhibitor <i>kojic acid</i> .....	45
Tabel 5.8	Hasil analisis harga intersep garis pada kurva Lineweaver-Burk kinetika hambatan <i>kojic acid</i> terhadap aktivitas tirosinase .....	46
Tabel 5.9	Laju perubahan nilai absorpsi ( $\Delta A/\text{menit}$ ) reaksi enzimatik dengan inhibitor kombinasi EGCG - <i>kojic acid</i> .....	47
Tabel 5.10	Hasil perhitungan statistik ANAVA faktorial dari harga $\Delta A/\text{menit}$ reaksi enzimatik dengan kombinasi inhibitor EGCG dan <i>kojic acid</i> ..	48
Tabel 5.11	Hasil analisis statistik perbandingan berpasangan harga $\Delta A/\text{menit}$ dari perlakuan konsentrasi EGCG .....	51
Tabel 5.12	Hasil analisis statistik perbandingan berpasangan harga $\Delta A/\text{menit}$ dari perlakuan konsentrasi <i>kojic acid</i> .....	51

Tabel 5.13 Hasil analisis statistik perbandingan berpasangan harga  $\Delta A$ /menit  
dari kombinasi EGCG dan *kojic acid* ..... 52



## DAFTAR GAMBAR

Gambar.2.1 Jalur morfologik dan metabolik pigmentasi.....	7
Gambar.2.2 Skema biokimia pembentukan melanin.....	8
Gambar 2.3 Struktur molekul <i>kojic acid</i> .....	10
Gambar 2.4 Skema daya hambat <i>Kojic acid</i> terhadap formasi polimer melanin.....	11
Gambar 2.5. Struktur molekul ECG, GCG dan EGCG .....	12
Gambar 2.6 Kurva aktivitas terhadap konsentrasi substrat pada konsentrasi enzim konstan untuk reaksi katalisis enzim dengan substrat tunggal dari persamaan Michaelis – Menten .....	15
Gambar 2.7 Kurva resiprokal aktivitas terhadap resiprokal konsentrasi substrat pada konsentrasi enzim konstan untuk reaksi katalisis enzim dengan substrat tunggal dari persamaan Lineweaver – Burk .....	16
Gambar 2.8 Kurva Lineweaver-Burk kinetika hambatan kompetitif, ankompetitif dan nonkompetitif. ....	18
Gambar 2.6. Kurva Michaelis-Menten yang menunjukkan efek hambatan kompetitif .....	15
Gambar 2.7. Kurva Lineweaver-Burk kinetika hambatan kompetitif, ankompetitif dan nonkompetitif .....	15
Gambar 3.1 Struktur molekul GCG, EGCG dan <i>kojic acid</i> .....	18
Gambar 3.2 Skema kerangka konseptual dan hipotesis penelitian.....	19

Gambar 4.1	Skema kerangka penelitian .....	27
Gambar 4.3	<i>Dummy curve</i> $1/v$ terhadap $1/[S]$ menurut Persamaan Lineweaver-Burk untuk hambatan kompetitif, ankompetitif dan nonkompetitif .....	36
Gambar 5.1	Hasil penentuan panjang gelombang maksimum tirosinase .....	38
Gambar 5.2	Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom .....	39
Gambar 5.3	Kurva nilai absorpsi berbagai konsentrasi tirosinase terhadap waktu inkubasi .....	40
Gambar 5.4	Kurva aktivitas reaksi enzimatik pada berbagai konsentrasi tirosinase .....	41
Gambar 5.5	Kurva Lineweaver-Burk kinetika hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase .....	42
Gambar 5.6	Kurva Lineweaver-Burk kinetika hambatan <i>kojic acid</i> terhadap aktivitas tirosinase .....	45
Gambar 5.7	Pengaruh berbagai konsentrasi EGCG terhadap harga $\Delta A$ /menit reaksi enzimatik yang dihambat oleh <i>kojic acid</i> pada berbagai konsentrasi .....	49
Gambar 5.8	Pengaruh kombinasi EGCG dan <i>kojic acid</i> pada berbagai konsentrasi terhadap daya hambat aktivitas tirosinase .....	50

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	: Sertifikat analisis L-tirosin .....	72
Lampiran 2	: Sertifikat analisis <i>Mushroom tyrosinase</i> .....	74
Lampiran 3	: Sertifikat analisis Epigalokatekin galat (EGCG) .....	77
Lampiran 4	: Sertifikat analisis <i>Kojic acid</i> .....	78
Lampiran 5	: Hasil penentuan panjang gelombang maksimum tirosinase dengan pelarut dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 .....	79
Lampiran 6	: Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom yang terbentuk dari hasil reaksi L-tirosin dan tirosinase dalam dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 .....	80
Lampiran 7	: Suhu ruang, suhu spektrofotometer, pH larutan dapar dan pH reaksi selama periode penelitian .....	81
Lampiran 8	: Laju reaksi kontrol .....	82
Lampiran 9	: Nilai absorpsi dopakrom pada berbagai konsentrasi tirosinase yang diamati setiap 30 detik selama 3 menit pada panjang gelombang 475 nm .....	83
Lampiran 10	: Data laju reaksi pembentukan dopakrom dari L-tirosin 1,104 mM pada berbagai konsentrasi tirosinase .....	85
Lampiran 11	: Laju pembentukan dopakrom dalam berbagai konsentrasi L-tirosin dengan inhibitor EGCG .....	86

Lampiran 12 : Laju pembentukan dopakrom dalam berbagai konsentrasi L-tirosin dengan inhibitor <i>kojic acid</i> .....	87
Lampiran 13 : Data hasil perhitungan daya hambat aktivitas tirosinase rata-rata oleh kombinasi EGCG dan <i>kojic acid</i> .....	88





## DAFTAR ARTI LAMBANG, SINGKATAN DAN ISTILAH

$v$	:	aktivitas
$\lambda$	:	panjang gelombang
$\alpha$	:	tingkat kemaknaan
$\Delta A$	:	perubahan nilai absorpsi
$\mu\text{mol}$	:	mikromolar
AHA	:	Asam alfa hidroksi
APTA	:	n~2,4-Asetoksifenil tioetil asetamid
BHT	:	Butil hidroksi toluene
DHI	:	Dihidroksiindol
DHICA	:	<i>Dihydroxyindolecarboxylic acid</i>
DOPA	:	Dihidroksifenilalanin
EGC	:	Epigalokatekin
EGCG	:	Epigalokatekin galat
GCG	:	Galokatekin galat
K / KA	:	<i>Kojic acid</i>
$K_M$	:	Konstanta Michaelis – Menten
MHW	:	<i>Ministry of Health and Welfare</i>
mM	:	millimolar
T	:	L-Tirosin
Tase	:	Tirosinase
U	:	unit
$V_{\text{maks}}$	:	kecepatan maksimum



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Sinar matahari tidak dapat dilepaskan dari kelangsungan hidup di bumi karena kegunaannya yang begitu besar terutama sebagai sumber energi, sumber cahaya, fotosintesis dan sintesis vitamin D. Di sisi lain, paparan sinar matahari dapat pula menimbulkan akibat yang merugikan terutama bagi kulit seperti terjadinya penuaan dini, kanker kulit dan hiperpigmentasi.<sup>1</sup>

Hiperpigmentasi adalah kelainan pigmentasi dimana terjadi peningkatan produksi melanin kulit dengan gambaran warna kulit yang lebih gelap dari keadaan normal yang dapat terjadi secara merata ataupun terlokalisir. Hal ini sering menjadi problema psikologis dan sosial yang cukup serius karena bagi kebanyakan orang di daerah tropis, kulit yang berwarna gelap terlebih yang tidak homogen dianggap tidak estetik.<sup>2,3</sup>

Berbagai cara telah dilakukan untuk mengatasi hiperpigmentasi, yaitu dengan menghindari faktor penyebab termasuk menghindari paparan sinar matahari atau menggunakan sediaan tabir surya atau menanggulangnya dengan menggunakan produk pencerah kulit.<sup>2,4,5</sup>

Produk pencerah kulit kini telah banyak ditemui di pasaran dalam berbagai bentuk sediaan dengan berbagai bahan aktif yang bekerja dengan mekanisme yang beragam. Prinsip utama kerja bahan aktif pencerah kulit adalah menghambat pembentukan melanin. Melanin dapat dihambat dengan berbagai cara, yaitu dengan penurunan sintesis tirosinase, penurunan transfer tirosinase dan hambatan aktivitas tirosinase.<sup>5</sup>

Tirosinase merupakan enzim utama dalam pembentukan melanin. Tirosinase berperan dalam mengkatalisa tiga reaksi yang berbeda dalam pembentukan melanin (melanogenesis), yaitu hidroksilasi tirosin menjadi dihidroksifenilalanin (dopa), oksidasi dopa menjadi dopakuinon dan oksidasi dihidroksiindol (DHI) menjadi indolkuinon. Hambatan pada pembentukan ataupun aktivitas enzim ini akan menyebabkan pigmen melanin berkurang atau tidak terbentuk. Beberapa senyawa yang terbukti menghambat tirosinase, diantaranya adalah hidrokuinon, arbutin dan *kojic acid*.<sup>5,6</sup>

Sampai saat ini hidrokuinon masih merupakan pencerah kulit yang paling efektif mengatasi melasma, namun dalam sejarah penggunaannya sering ditemui adanya efek samping berupa dermatitis kontak alergi dan iritan, perubahan warna kuku, hiperpigmentasi pasca radang serta terjadinya hipopigmentasi dan depigmentasi pada kulit yang diobati maupun kulit normal di sekitarnya. Arbutin merupakan turunan hidrokuinon yang mempunyai efek samping lebih ringan dari hidrokuinon, namun daya hambatnya terhadap aktivitas tirosinase lebih kecil dibandingkan dengan *kojic acid*. Pada penderita dermatitis kontak, hidrokuinon dapat digantikan dengan *kojic acid*.<sup>7,8</sup>

*Kojic acid* digunakan sebagai bahan pencerah kulit, karena dapat menghambat pigmentasi dan disetujui oleh *Ministry of Health & Welfare (MHW) of Japan* karena sejarah keamanan yang panjang.<sup>5</sup> Efek pencerahan kulit pada *kojic acid* cukup baik, namun perlu waktu yang relatif panjang, oleh karena itu *Kojic Acid* sering dikombinasi dengan beberapa senyawa pencerah kulit lainnya baik yang bekerja bersama-sama dengan menghambat aktivitas tirosinase atau dengan mekanisme lain yang bertujuan menghambat pigmentasi atau

menghilangkan melanin yang telah terbentuk. Senyawa-senyawa tersebut diantaranya asam alfa hidroksi (AHA), asam retinoat, ekstrak *liquorice* (*Glycyrrhiza glabra*) dan ekstrak daun teh hijau.<sup>8</sup>

Ekstrak daun teh hijau merupakan kandidat bahan pencerah kulit yang potensial. Dari penelitian Jae Kyung No, dkk. diketahui teh hijau mempunyai daya hambat tirosinase yang kuat dan beberapa studi juga telah membuktikan bahwa teh hijau mempunyai efek antiinflamasi dan anti karsinogenik yang dapat digunakan untuk mengatasi berbagai gangguan kulit. Senyawa aktif utama teh hijau yang bertanggung jawab terhadap aktivitas ini adalah (-) - *epigallocatechin 3-O-gallate* (EGCG).<sup>9,10,11</sup> Penelitian Stratton, dkk membuktikan bahwa penggunaan EGCG topikal sehari-hari tidak menunjukkan adanya toksisitas.<sup>12</sup>

Pada penggunaan klinis, ekstrak teh hijau digunakan sebagai bahan aktif kedua setelah *kojic acid*,<sup>8</sup> namun mengingat aktivitas komponen-komponennya yang selain menghambat tirosinase juga mempunyai aktivitas antiinflamasi,<sup>10</sup> maka dalam upaya mendapatkan pencerah kulit yang efektif dengan efek samping minimal ingin diteliti lebih lanjut tentang komponen utama teh hijau EGCG sebagai bahan aktif utama pencerah kulit.

EGCG telah diketahui menghambat aktivitas tirosinase,<sup>9</sup> namun belum diketahui mekanisme aksinya. Untuk mengungkapkan informasi tentang mekanisme aksi EGCG dalam menghambat aktivitas tirosinase, perlu ditentukan kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase. Dari penelitian terdahulu, (-) - *gallocatechin 3-O-gallate* (GCG), epimer dari EGCG, terbukti menghambat tirosinase secara kompetitif dengan substrat L-tirosin,<sup>9</sup> sehingga bila ditinjau dari kemiripan struktur EGCG dan GCG diduga EGCG mempunyai jenis

hambatan yang sama dengan GCG, yaitu hambatan kompetitif, namun dugaan ini masih perlu pembuktian secara empiris.

Kinetika dan jenis hambatan ditentukan secara invitro dengan mengamati nilai absorpsi produk (dopakrom) yang dihasilkan dari reaksi tirosinase dan substrat L-tirosin menggunakan spektrofotometer.<sup>9,13,14</sup> Nilai absorpsi digunakan untuk mendapatkan parameter aktivitas tirosinase. Dari profil kurva aktivitas tirosinase yang dihasilkan dari reaksinya dengan berbagai konsentrasi L-tirosin pada berbagai konsentrasi EGCG, dapat diketahui kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap tirosinase.<sup>15,16</sup>

Untuk mengetahui aktivitas EGCG bila digunakan dalam bentuk tunggal maupun kombinasi dengan pencerah kulit lain, perlu ditentukan daya hambat EGCG dan kombinasi EGCG – *kojic acid*. *Kojic acid* bekerja menghambat tirosinase pada aktivitas katekolase atau reaksi oksidasi dari dopa menjadi dopaquinon sedangkan EGCG diduga bekerja pada aktivitas kresolase atau hidroksilasi tirosin menjadi dopa. *Kojic acid* dipilih sebagai bahan aktif kedua karena mempunyai mekanisme kerja yang sama dengan EGCG yaitu hambatan aktivitas tirosinase, namun bekerja dalam tahapan yang berbeda, sehingga diharapkan terdapat aktivitas sinergistik dari kedua bahan aktif tersebut. Untuk membuktikannya perlu dilakukan pengujian guna mendapatkan parameter daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase. Daya hambat aktivitas tirosinase merupakan interpretasi dari nilai % inhibisi yang didapat dari nilai absorpsi produk secara spektrofotometri.<sup>9,17,18,19,20,21</sup>

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase ?
2. Bagaimanakah daya hambat EGCG bila dibandingkan dengan *kojic acid* ?
3. Sejauh manakah kombinasi EGCG dan *kojic acid* dalam menghambat aktivitas tirosinase?
4. Bagaimanakah pengaruh EGCG terhadap daya hambat aktivitas tirosinase yang ditimbulkan oleh *kojic acid* ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase
2. Menentukan daya hambat EGCG bila dibandingkan dengan *kojic acid*
3. Menentukan daya hambat kombinasi EGCG dan *Kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase
- b. Menentukan pengaruh EGCG terhadap daya hambat aktivitas tirosinase yang ditimbulkan oleh *kojic acid*.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini bermanfaat untuk mendapatkan pencerah kulit yang efektif untuk kemudian diformulasi dalam berbagai bentuk sediaan. Keberhasilan penelitian ini akan juga berarti peningkatan budidaya tanaman teh, sehingga dapat meningkatkan perekonomian daerah penghasil teh di Indonesia sekaligus sebagai sumbangan ilmiah bagi ilmu pengetahuan.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Fisiologi pigmentasi kulit

#### 2.1.1 Warna kulit<sup>2,6</sup>

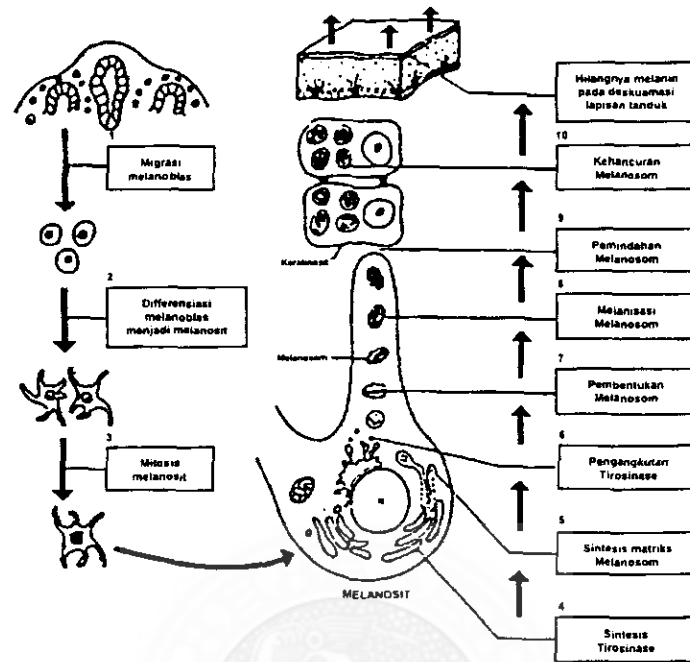
Warna kulit manusia normal merupakan campuran dari warna merah, kuning, coklat dan biru. Warna kuning dihasilkan oleh karotenoid, warna coklat berasal dari melanin di epidermis, warna merah oleh hemoglobin teroksigenasi dan warna biru oleh hemoglobin tereduksi didalam venule dermis. Dari keempat pigmen tersebut melanin merupakan pembeda utama adanya perbedaan warna kulit setiap individu.

Berdasarkan penyebab, warna kulit dapat dibedakan atas warna kulit konstitutif dan warna kulit fakultatif. Warna kulit konstitutif yaitu perubahan warna kulit yang normal sesuai dengan program genetika tanpa dipengaruhi faktor lain, sedangkan warna kulit konstitutif adalah perubahan warna kulit sebagai akibat dari pengaruh cahaya, hormon dan genetik.

#### 2.1.2 Melanosom dan melanin<sup>2,3,6,22</sup>

Warna kulit manusia berhubungan dengan jumlah, ukuran, macam dan distribusi partikel pigmen sitoplasma yang disebut melanosom. Melanosom mengandung *biochrome* coklat yaitu melanin, Melanosom merupakan hasil dari kelenjar *exocrine uniceluler* atau melanosit yang berada dibasal lamina dan menyebarkan dendritnya kedalam epidermis. Melanosit mentransfer melanosom kedalam sel malpighi (keratinosit) dan melanosom kemudian terdistribusi ke dalam dermis dengan pergerakan keluar keratinosit.





Gambar.2.1 Jalur morfologik dan metabolik pigmentasi <sup>6</sup>

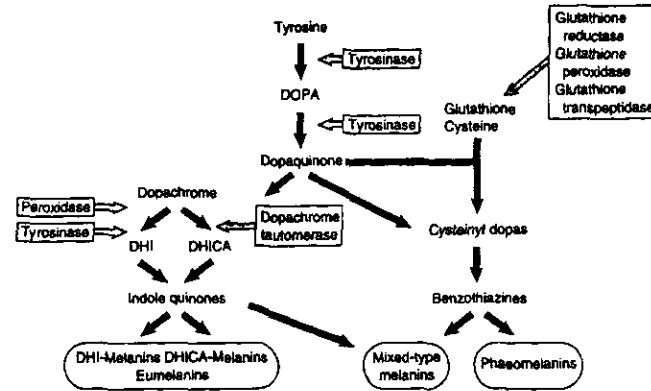
### 2.1.3 Tirosinase <sup>3,5,9,22,23</sup>

Melanin dibentuk dari tirosin dengan bantuan tirosinase, enzim ini termasuk oksidase aerobik yang membutuhkan molekul oksigen dan tembaga agar fungsi oksidasinya dapat berlangsung. Tirosinase merupakan enzim penentu kecepatan biosintesa melanin yang berperan dalam mengkatalisa tiga reaksi yang berbeda dalam pembentukan melanin (melanogenesis), yaitu :

- 1 Hidroksilasi tirosin menjadi dihidroksi fenil alanin ( DOPA)
- 2 Oksidasi DOPA menjadi dopaquinon
- 3 Oksidasi 5,6-dihidroksiindol ( DHI ) menjadi indolquinon

Dopaquinon diubah menjadi eumelanin dan pheomelanin melalui proses

polimerisasi. Aktivitas tirosinase pada pembentukan melanin ditunjukkan dalam Gambar 2.2 .



Gambar.2.2 Skema biokimia pembentukan melanin <sup>6</sup>

Tirosinase atau polifenoloksidase, adalah kompleks protein tembaga berfungsi ganda yang bertanggung jawab dalam proses melanisasi pada manusia, hewan dan pencoklatan tumbuhan. Tirosinase mengkatalisa reaksi dengan 2 mekanisme yang berbeda, yaitu :

- aktivitas kresolase atau hidroksilasi monofenol menjadi o- difenol
- aktivitas katekolase atau oksidasi o- difenol menjadi o-quinon

## 2.2. Bahan pencerah kulit atau penghambat pigmentasi <sup>3,5,9,22,23</sup>

Meskipun pigmen melanin dalam kulit manusia merupakan mekanisme pertahanan utama terhadap radiasi lembayung ultra (UV) matahari, terutama UVA dan UVB yang dapat mencapai permukaan bumi, produksi pigmentasi yang abnormal seperti *melasma*, *freckles*, *senile lentigenes* dan beberapa bentuk hiperpigmentasi melanin dapat menimbulkan problema estetika yang serius.

Modulasi sintesis melanin untuk mencegah pigmentasi ini menjadi sangat penting. Beberapa senyawa yang dapat menghambat melanogenesis telah diteliti untuk pencegahan dan pengobatan gangguan hiperpigmentasi diantaranya hidroquinon, turunan asam askorbat, *kojic acid*, *azelaic acid*, kortikosteroid, arbutin dan lain-lain

Pembentukan melanin dapat dihambat melalui beberapa mekanisme, yaitu

#### 1. Supresi tirosinase

contoh : *Kojic acid*, hidroquinon, *Ascorbic acid*, arbutin, *ellagic acid*, (-) - *epigallocatechin gallate* (komponen dari teh hijau).

#### 2. Penurunan sintesis tirosinase

Contoh: Biomein<sup>®</sup>

#### 3. Penurunan transfer tirosinase.

Contoh: Glukosamin, tunikamisin

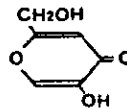
#### 4. Sitotoksik terhadap melanosit

Contoh : Hidroquinon mono benzil eter, n~2, 4-Asetoksifenil tioetil asetamid  
( APTA)

### 2.3. *Kojic acid*<sup>2,6,8,13,14</sup>

*Kojic acid* ( 5 - hydroxy-2 hydroxymetil - 4 H - pyran - 4 on) dihasilkan oleh beberapa spesies dari *Aspergillus* dan *Penicillium* dalam proses aerobik dari berbagai sumber karbon. *Kojic acid* telah seringkali digunakan sebagai bahan kosmetik dengan efek pencerahan kulit yang baik. *Kojic acid* menghambat pembentukan melanin dengan menghambat aktivitas katekolase dari tirosinase.<sup>13</sup> *Kojic acid* diklasifikasikan sebagai senyawa penghambat pigmentasi yang

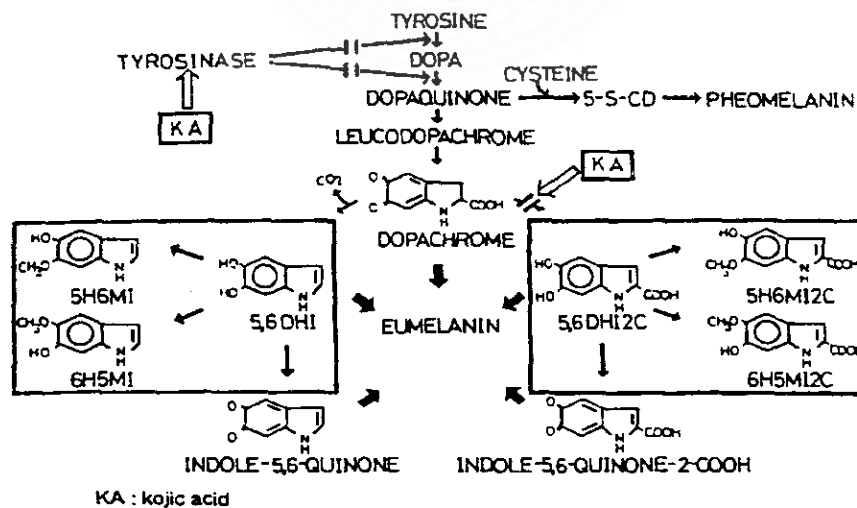
mempunyai struktur analog dengan substrat fenolik, yang secara umum menunjukkan adanya hambatan kompetitif.<sup>15</sup> Struktur molekul *kojic acid* dapat dilihat pada Gambar 2.3 berikut ini :



Gambar 2.3 Struktur molekul *kojic acid*<sup>5</sup>

Di Jepang *kojic* berarti ragi (*ferment*), dan biasa digunakan untuk bahan tambahan minuman Jepang (Sake) yang dibuat dari beras. *Kojic acid* murni dapat diproduksi dari glukosa dengan cara fermentasi tertentu<sup>5</sup>

Berbagai pemeriksaan untuk mengetahui mekanisme depigmetasi serta uji keamanan *kojic acid* telah banyak dilakukan. Mekanisme kerja *kojic acid* ditunjukkan dalam skema pada Gambar 2.4 berikut ini,



Gambar 2.4 Skema daya hambat *Kojic acid* terhadap formasi polimer melanin.<sup>5</sup>

#### 2.4 (-) - Epigalokatekin galat (EGCG) <sup>8,9,10,11,12,16,24,25</sup>

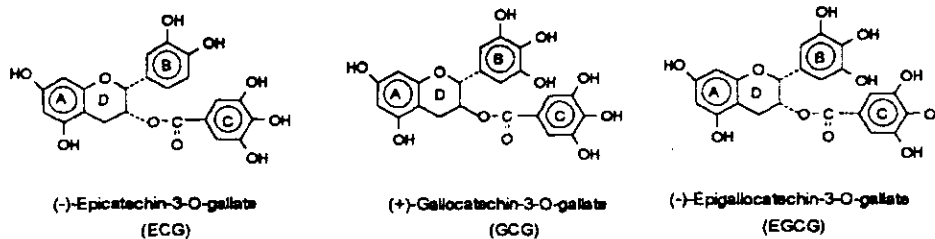
Teh merupakan minuman yang sangat dikenal di seluruh dunia. Teh dibuat dari daun dan pucuk tanaman *Camellia sinensis* dan beredar di pasaran terutama dalam tiga bentuk : teh hijau, teh hitam, dan *oolong tea* . Sekitar 78 % dikonsumsi sebagai teh hitam terutama di negara-negara barat dan beberapa negara di Asia, sementara 20 % dikonsumsi sebagai teh hijau terutama di negara-negara Asia termasuk Jepang, Cina, Korea dan India, sedangkan 2% dibuat dalam bentuk *oolong tea* yang terutama dibuat dan dikonsumsi di Cina Tenggara.

Sebutan teh hijau berasal dari proses manufaktur teh tersebut yang dibuat dari daun segar tanaman teh dengan penguapan dan pengeringan pada temperatur dipercepat, yang dijaga agar tidak terjadi oksidasi dan polimerisasi komponen fenoliknya.

Teh hijau mengandung banyak senyawa polifenol yang mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Teh hijau kini banyak digunakan dalam industri kosmetik. Beberapa industri kosmetik seperti Avon Product Inc. (New York), Estée Lauder Inc. (New York) , L'oreal (Paris) dan lain-lain telah menggunakan teh hijau sebagai bahan tambahan dalam produk-produk kosmetiknya. Sediaan tersebut beredar dalam bentuk shampo, krim pelembab, losio pelembab, losio pembersih wajah, krim penghilang bulu, *body lotion* dan *bath & shower gel*.<sup>24</sup>

Dari penelitian terdahulu, Jae Kyung No dkk., telah melakukan skrining terhadap 10 macam teh tradisional Korea dalam aktivitasnya menghambat *mushroom tirosinase*. Dari penelitian tersebut teh hijau mempunyai daya hambat tirosinase terkuat dan senyawa aktif utama dalam teh hijau tersebut adalah (-) -

*epicatechin 3-O-gallate (ECG), (+)-gallocatechin 3-O-gallate (GCG) dan (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG).* Pada Gambar 2.5 ditunjukkan struktur molekul ketiga katekin tersebut.



Gambar 2.5. Struktur molekul ECG, GCG dan EGCG<sup>9,24</sup>

Komponen teh hijau ECG, GCG dan EGCG menunjukkan daya hambat yang potensial, yang mengindikasikan bahwa semua katekin dengan gugus asam galat merupakan *active site*.<sup>24</sup> Kerangka flavan-3-ol dengan galoil pada posisi tiga memainkan peranan penting untuk daya hambat optimum pada aktivitas tirosinase.<sup>9</sup> Dari data sebelumnya diketahui EGCG dan GCG dari komponen teh hijau menangkap radikal bebas termasuk peroksinitrit. Hal tersebut menunjukkan bahwa gugus orto-hidroksi pada cincin B dan gugus galoil pada posisi tiga dari kerangka flavan-3-ol EGCG dan GCG merupakan struktur terpenting yang dibutuhkan untuk menangkap radikal bebas.<sup>9,11,24</sup>

Dari uji stabilitas yang dilakukan oleh Dvorakova dkk, diketahui bahwa stabilitas EGCG dalam salep hidrofilik USP tergantung pada waktu, temperatur dan derajat oksidasi. EGCG terurai sebesar 10 % setelah 2 hari penyimpanan pada suhu 37°C, tetapi bila formula yang sama ditambah dengan 0,1 % butilhidroksitoluen (BHT) akan mempunyai stabilitas yang lebih panjang, yaitu lebih besar atau sama dengan 90% EGCG masih didapatkan setelah 130 hari

penyimpanan pada 37<sup>0</sup> C.<sup>25</sup>

Dari hasil penelitian Stratton dkk, menunjukkan bahwa penggunaan EGCG topikal sehari-hari tidak menunjukkan adanya toksisitas pada kulit normal tikus, namun penggunaan depilatori (penghilang bulu) topikal dapat meningkatkan potensi toksik EGCG.<sup>12</sup>

## 2.5 Evaluasi bahan penghambat pigmentasi<sup>5,9,13,14</sup>

Beberapa metode telah dikembangkan untuk mengevaluasi senyawa-senyawa yang dapat menghambat proses pigmentasi, diantaranya secara in vitro dengan mengamati hambatan terhadap aktivitas tirosinase secara spektrofotometrik, mengamati hambatan pembentukan melanin pada mikroba *Streptomyces bikiniensis* ataupun dengan kultur sel melanoma B16. Metode evaluasi secara in vivo yang sering dilakukan adalah analisis kromametrik warna kulit individu dengan kolorimeter ataupun evaluasi perbedaan warna kulit secara visual.

Penentuan daya hambat terhadap tirosinase merupakan salah satu cara evaluasi untuk mengetahui hambatan suatu senyawa terhadap proses pembentukan melanin (pigmentasi) secara invitro instrumental

Tirosinase yang digunakan adalah *mushroom tirosinase* , sedangkan sebagai substrat digunakan L-Tirosin. Produk yang terjadi dari reaksi enzimatik ini adalah Dopakrom yang dapat ditentukan nilai absorpsinya secara spektrofotometrik pada panjang gelombang 475 nm. Daya hambat terhadap tirosinase dievaluasi menggunakan parameter % inhibisi .

## 2.6 Kinetika reaksi enzimatik<sup>15,26,27,28</sup>

Enzim adalah katalis biologis yang tanpa keberadaannya dalam sel kebanyakan reaksi biokimia tidak akan mencapai laju yang diperlukan. Leonor Michaelis dan Maude Menten (1913) menyatakan bahwa dalam reaksi enzim terjadi lebih dahulu kompleks enzim-substrat (ES) yang kemudian menghasilkan produk (P) dan enzim kembali. Reaksi katalisis enzim ini ditunjukkan oleh persamaan 2.1.



Keterangan :

E = enzim  
 S = substrat  
 ES = kompleks enzim-substrat  
 P = produk

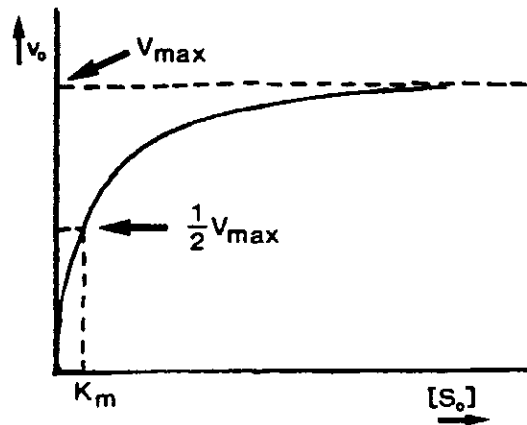
Bila konsentrasi substrat sangat besar, maka semua enzim akan membentuk kompleks ES. Keadaan ini dinyatakan dengan laju reaksi maksimal ( $V_{maks}$ ). Harga  $V_{maks}$  dapat ditentukan dari asimtot garis pada kurva laju reaksi atau aktivitas ( $v$ ) terhadap konsentrasi substrat (Gambar 2.6) berdasarkan persamaan Michaelis – Menten (persamaan 2.2).

$$v = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]} \quad \text{persamaan 2.2}$$

Keterangan :

$v$  = laju reaksi katalisis enzim (aktivitas)  
 $V_{maks}$  = laju reaksi maksimal  
 $[S]$  = konsentrasi substrat  
 $K_M$  = konstanta Michaelis - Menten

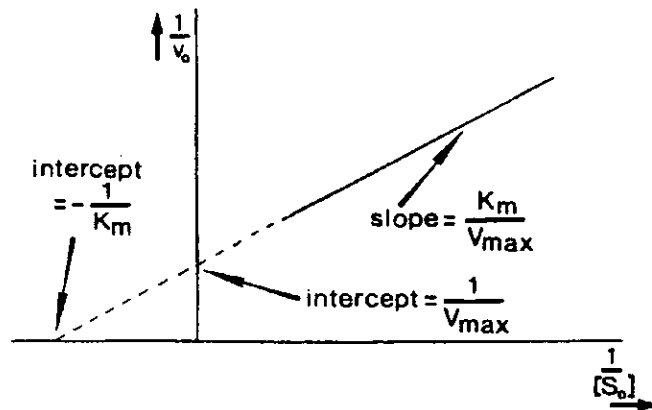




Gambar 2.6 Kurva aktivitas terhadap konsentrasi substrat pada konsentrasi enzim konstan untuk reaksi katalisis enzim dengan substrat tunggal dari persamaan Michaelis – Menten<sup>27</sup>

Konstanta Michaelis – Menten ( $K_M$ ) adalah konsentrasi substrat yang memberikan laju reaksi setengah dari laju reaksi maksimum, sehingga harga  $K_M$  juga dapat ditentukan dari Gambar 2.6, namun hal ini dapat menimbulkan kesalahan akibat analisis kinetik non linier. Lineweaver-Burk memodifikasi persamaan Michaelis – Menten dengan menggunakan resipokal semua sisi persamaan Michaelis - Menten seperti ditunjukkan pada persamaan 2.3 dan Gambar 2.7.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad \text{persamaan 2.3}$$



Gambar 2.7 Kurva resiprokal aktivitas terhadap resiprokal konsentrasi substrat pada konsentrasi enzim konstan untuk reaksi katalisis enzim dengan substrat tunggal dari persamaan Lineweaver – Burk<sup>26,27</sup>

Kurva Lineweaver-Burk pada gambar 2.7 akan menghasilkan garis lurus membentuk persamaan  $y = mx + b$ , dimana intersep pada sumbu  $1/v$  adalah  $1/V_{maks}$  dan intersep pada sumbu  $1/[S]$  adalah  $-1/K_M$ .

## 2.7 Kinetika reaksi hambatan aktivitas enzim<sup>15,26,27,28</sup>

Tirosinase merupakan enzim yang secara umum dapat dihambat oleh senyawa-senyawa tertentu yang dikenal dengan enzim inhibitor. Hambatan pada suatu reaksi yang dikatalisa oleh enzim dapat terjadi bila penggabungan substrat pada bagian aktif enzim mengalami hambatan. Hambatan yang dilakukan oleh inhibitor dapat berupa hambatan tidak dapat balik (ireversibel) atau hambatan dapat balik (reversibel). Hambatan tidak dapat balik umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih yang terdapat pada molekul enzim, sedangkan hambatan dapat balik dapat berupa hambatan kompetitif, hambatan ankompetitif atau hambatan nonkompetitif.

Hambatan kompetitif disebabkan karena ada molekul yang mirip dengan substrat yang dapat pula membentuk kompleks dengan enzim, sehingga terjadi persaingan antara inhibitor dengan substrat terhadap sisi aktif enzim. Pada hambatan kompetitif, adanya inhibitor akan mempengaruhi harga  $K_M$ , namun tidak mempengaruhi  $V_{maks}$ . Semakin meningkat konsentrasi inhibitor akan menurunkan laju reaksi awal pembentukan produk, sehingga harga  $K_M$  makin meningkat, namun laju reaksi maksimal akan tetap tercapai bila konsentrasi substrat ditingkatkan.

Hambatan ankompetitif terjadi karena inhibitor terikat hanya pada kompleks enzim-substrat tidak pada enzim bebas. Hambatan pembentukan produk dapat disebabkan oleh pengikatan substrat pada sisi aktif enzim yang menyebabkan perubahan konformasi enzim dan menghasilkan sisi ikatan inhibitor atau adanya pengikatan langsung pada enzim yang telah terikat substrat. Inhibitor ankompetitif tidak bersaing dengan substrat pada sisi ikatan yang sama sehingga penghambatan tidak dapat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Harga  $V_{maks}$  dan  $K_M$  berubah, namun profil kinetiknya menunjukkan keadaan *steady state*. Dengan kata lain *slope* kurva Lineweaver – Burk tidak terpengaruh oleh adanya inhibitor walaupun terjadi perubahan pada masing-masing intersep.

Pada hambatan nonkompetitif, inhibitor berikatan pada sisi enzim selain tempat yang berikatan dengan substrat, sehingga mengubah konformasi molekul enzim, namun tidak mempengaruhi pengikatan substrat. Hal ini menyebabkan konsentrasi enzim total menurun, harga  $V_{maks}$  menurun, namun harga  $K_M$  tidak berubah.

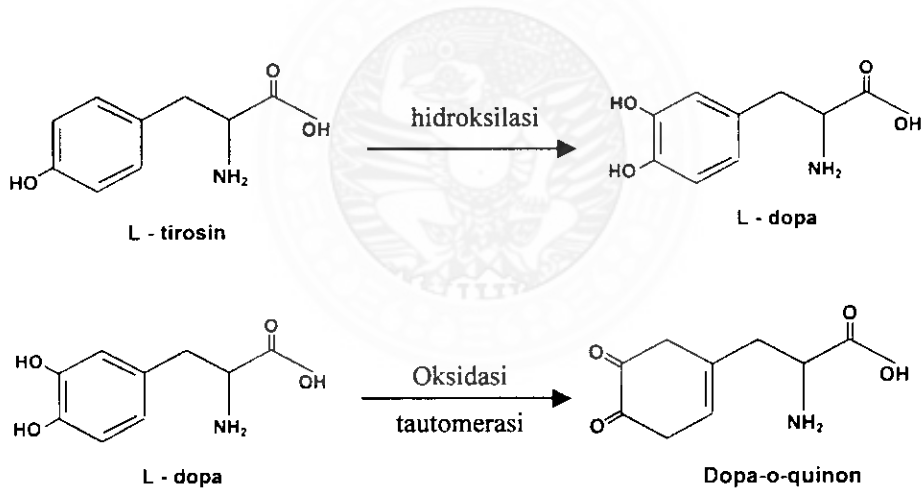
Uji kinetika untuk membedakan hambatan kompetitif, ankompetitif dan non

### BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Mekanisme kerja bahan aktif pencerah kulit terutama dengan menghambat pembentukan melanin. Melanin dapat dihambat dengan berbagai cara, diantaranya adalah dengan menghambat aktivitas tirosinase, enzim yang berperan dalam mengkatalisa pembentukan melanin.

Tirosinase mengkatalisis dua reaksi yang berbeda dalam pembentukan melanin, yaitu aktivitas kresolase yang mengkatalisis hidroksilasi monofenol (L-tirosin) menjadi o-difenol (L-DOPA) dan aktivitas katekolase yang mengkatalisis oksidasi o-difenol (L-DOPA) menjadi o-quinon (Dopa-o-quinon).<sup>13,29</sup>



Kemudian reaksi berlanjut dengan terjadinya siklisasi melalui adisi 1,4 intramolekul gugus amino membentuk senyawa yang lebih stabil, dopakrom.



Hambatan aktivitas tirosinase dapat menghambat reaksi pembentukan dopakrom. Hambatan ini dapat terjadi bila penggabungan substrat pada bagian aktif enzim mengalami hambatan.<sup>15,26,27</sup>

Ekstrak daun teh hijau merupakan kandidat bahan pencerah kulit yang potensial. Senyawa aktif utama yang bertanggung jawab terhadap aktivitas hambatan terhadap tirosinase adalah (-)-epigalokatekin galat (EGCG). EGCG terbukti menghambat aktivitas tirosinase,<sup>9,10,24</sup> namun belum diketahui mekanisme kerjanya. Untuk itu perlu ditentukan kinetika dan jenis hambatan enzimnya.

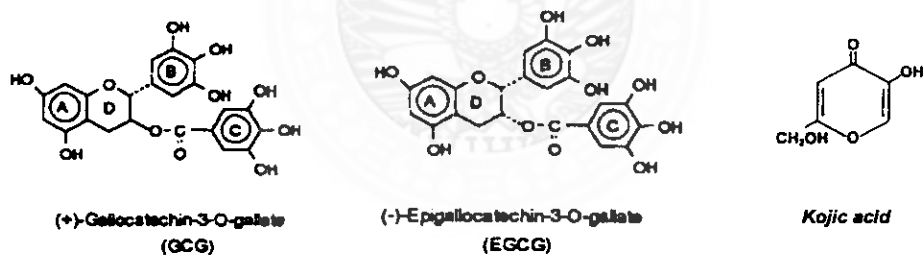
Dari penelitian terdahulu (+)-galokatekin galat (GCG), epimer dari EGCG, terbukti menghambat tirosinase secara kompetitif dan diduga gugus yang berperan dalam aktivitas hambatan tirosinase adalah gugus galoil karena mempunyai kemiripan struktur dengan substrat L-tirosin maupun L-DOPA. GCG dan EGCG mempunyai perbedaan konformasi pada satu C kiral dimana gugus orto trihidroksi benzena dan gugus galoil pada GCG berada pada posisi *trans*, sedangkan pada EGCG berada pada posisi *cis*.<sup>9,24</sup> Dari kemiripan struktur EGCG dengan GCG, diduga EGCG mempunyai kinetika dan jenis hambatan yang sama dengan GCG, yaitu hambatan kompetitif, namun karena reaksi enzimatik bersifat stereospesifik, hal tersebut masih perlu pembuktian secara empiris.

Setelah kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap tirosinase diketahui, kemudian dilakukan pengamatan tentang pengaruh EGCG terhadap daya hambat aktivitas tirosinase pencerah kulit lain, yaitu *kojic acid*.

*Kojic acid* adalah salah satu bahan aktif kosmetik yang diketahui menghambat aktivitas tirosinase. Dari profil kinetika hambatannya, *kojic acid*

termasuk kategori inhibitor kompetitif yang diduga disebabkan oleh kemiripan struktur *kojic acid* dengan L-dopa.<sup>5,8,13</sup>

Dari hasil penelitian telah diketahui bahwa GCG berkompetisi dengan L-tirosin pada sisi aktif tirosinase<sup>9</sup>, sehingga diduga bahwa GCG menghambat tirosinase pada aktivitas kresolase. Begitu pula EGCG yang merupakan epimer ECG, kemungkinan menghambat tirosinase pada proses pembentukan L-tirosin menjadi L-dopa (aktivitas resolase), *kojic acid* diduga menghambat tirosinase pada proses pembentukan L-dopa menjadi dopaquinon (aktivitas katekolase).<sup>13</sup> Bila EGCG dan *kojic acid* digabung kemungkinan akan terjadi aktivitas yang saling memperkuat, sehingga daya hambat terhadap aktivitas tirosinase meningkat. Untuk membuktikan kebenaran teori ini, perlu dilakukan pembuktian secara empiris.



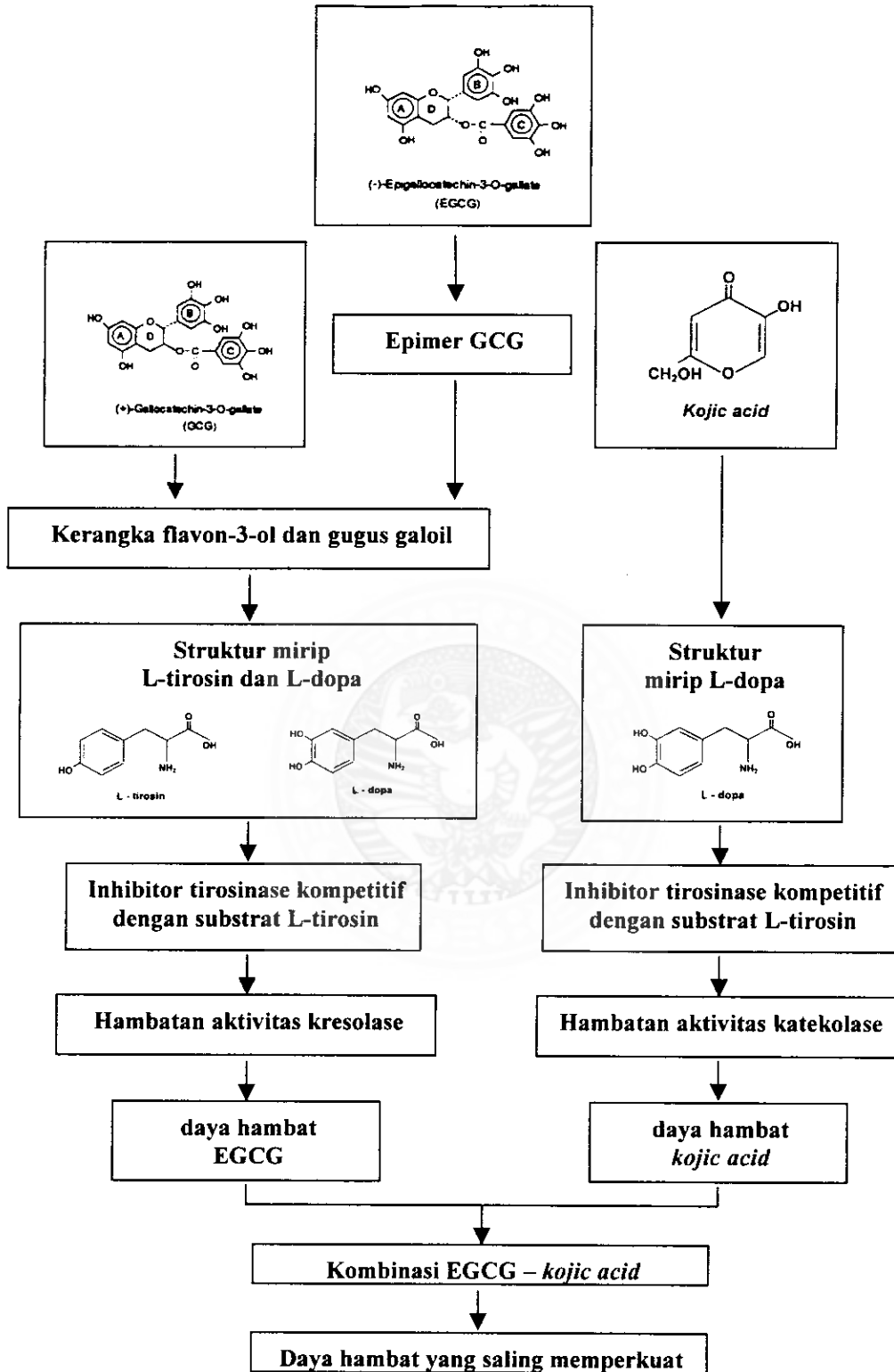
Gambar 3.1 Struktur molekul GCG, EGCG<sup>9,24</sup> dan *kojic acid*<sup>13</sup>

Kinetika hambatan EGCG terhadap tirosinase ditentukan dengan membuat kurva resiprokal aktivitas tirosinase terhadap resiprokal konsentrasi substrat L-tirosin (Lineweaver-Burk Plots). Dari profil kurva yang terbentuk didapat jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase.<sup>15,26,27,28</sup>

Aktivitas tirosinase diamati secara *in vitro* menggunakan substrat L-tirosin dan enzim *mushroom tyrosinase*. Dopakrom yang terbentuk dari reaksi enzimatik ini diamati menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 475 nm.<sup>15</sup>

Hambatan aktivitas tirosinase ditandai dengan adanya penurunan aktivitas enzimatik dari reaksi tirosinase dan  $\alpha$  tirosin. Penurunan aktivitas ini diuji kebermaknaannya menggunakan analisis statistik ANAVA faktorial dengan tingkat kemaknaan 0,05.





Gambar 3.2 Skema kerangka konseptual dan hipotesis penelitian



### 3.2 Hipotesis penelitian

Dari kerangka konseptual dirumuskan hipotesis penelitian sebagai berikut :

1. Jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase adalah hambatan kompetitif
2. EGCG dan kojic acid bila dikombinasi akan memiliki daya hambat yang saling memperkuat, sehingga terjadi peningkatan aktivitas hambatan terhadap tirosinase.





## BAB 4. METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan faktorial yang bertujuan untuk menentukan kinetika dan jenis hambatan epigalokatekin galat (EGCG) terhadap aktivitas tirosinase dan menentukan daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase.

Penelitian ini dilakukan dengan tiga tahap, yaitu :

1. Penentuan kinetika hambatan EGCG
2. Penentuan kinetika hambatan *kojic acid*
3. Penentuan daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid*

Kinetika hambatan EGCG ditentukan dengan mengukur aktivitas reaksi enzimatik ( $v$ ) pada berbagai konsentrasi substrat L-tirosin [S]. Aktivitas reaksi enzimatik didapatkan dengan pengamatan nilai absorpsi produk dopakrom pada panjang gelombang 475 nm setiap 30 detik selama 3 menit sehingga didapatkan harga perubahan nilai absorpsi per menit ( $\Delta A/\text{menit}$ ) yang kemudian dengan perhitungan diubah menjadi aktivitas reaksi enzimatik  $v$  ( $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ).

Kinetika hambatan ditentukan dari kurva Lineweaver-Burk dengan menggambarkan hubungan antara resiprokal Aktivitas ( $\frac{1}{v}$ ) terhadap resiprokal konsentrasi L-tirosin ( $\frac{1}{[S]}$ ) dengan rancangan seperti tertera pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rancangan faktorial penentuan kinetika hambatan aktivitas tirosinase oleh EGCG

Konsentrasi EGCG	Konsentrasi L-tirosin				
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
E <sub>0</sub>	T <sub>1</sub> E <sub>0</sub>	T <sub>2</sub> E <sub>0</sub>	T <sub>3</sub> E <sub>0</sub>	T <sub>4</sub> E <sub>0</sub>	T <sub>5</sub> E <sub>0</sub>
E <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> E <sub>1</sub>	T <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> E <sub>1</sub>	T <sub>4</sub> E <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> E <sub>1</sub>
E <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> E <sub>2</sub>	T <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> E <sub>2</sub>	T <sub>4</sub> E <sub>2</sub>	T <sub>5</sub> E <sub>2</sub>

Sampel adalah tirosinase dan bahan pencerah kulit EGCG, pada dua konsentrasi yang berbeda yaitu E<sub>1</sub> dan E<sub>2</sub> serta tirosinase tanpa EGCG (E<sub>0</sub>). Pada sampel diberikan penambahan substrat L-tirosin dalam 5 macam konsentrasi (T<sub>1</sub>-T<sub>5</sub>).

Kinetika hambatan *kojic acid* ditentukan dengan melakukan hal yang sama seperti pada EGCG, namun pencerah kulit yang diberikan adalah *kojic acid* dengan 2 konsentrasi yang berbeda yaitu K<sub>1</sub> dan K<sub>2</sub> serta tanpa *kojic acid* (K<sub>0</sub>). Rancangan faktorial penentuan kinetika hambatan aktivitas tirosinase oleh *kojic acid* tertera pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Rancangan faktorial penentuan kinetika hambatan aktivitas tirosinase oleh *kojic acid*

Konsentrasi <i>kojic acid</i>	Konsentrasi L-tirosin				
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
K <sub>0</sub>	T <sub>1</sub> K <sub>0</sub>	T <sub>2</sub> K <sub>0</sub>	T <sub>3</sub> K <sub>0</sub>	T <sub>4</sub> K <sub>0</sub>	T <sub>5</sub> K <sub>0</sub>
K <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> K <sub>1</sub>	T <sub>2</sub> K <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> K <sub>1</sub>	T <sub>4</sub> K <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> K <sub>1</sub>
K <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> K <sub>2</sub>	T <sub>2</sub> K <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> K <sub>2</sub>	T <sub>4</sub> K <sub>2</sub>	T <sub>5</sub> K <sub>2</sub>

Daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid* ditentukan dengan membandingkan laju perubahan nilai absorpsi ( $\Delta A/\text{menit}$ ) reaksi enzimatik dengan inhibitor EGCG, *kojic acid* dan EGCG - *kojic acid* pada konsentrasi enzim dan konsentrasi substrat tertentu. Rancangan faktorial untuk menentukan daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid* tertera pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Rancangan faktorial penentuan daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid*

Konsentrasi <i>kojic acid</i>	Konsentrasi EGCG			
	E <sub>0</sub>	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>
K <sub>0</sub>	E <sub>0</sub> K <sub>0</sub>	E <sub>1</sub> K <sub>0</sub>	E <sub>2</sub> K <sub>0</sub>	E <sub>3</sub> K <sub>0</sub>
K <sub>1</sub>	E <sub>0</sub> K <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> K <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> K <sub>1</sub>	E <sub>3</sub> K <sub>1</sub>
K <sub>2</sub>	E <sub>0</sub> K <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> K <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> K <sub>2</sub>	E <sub>3</sub> K <sub>2</sub>
K <sub>3</sub>	E <sub>0</sub> K <sub>3</sub>	E <sub>1</sub> K <sub>3</sub>	E <sub>2</sub> K <sub>3</sub>	E <sub>3</sub> K <sub>3</sub>

## 4.2 Sampel, ukuran sampel dan tehnik pengambilan data

### 4.2.1 Sampel dan ukuran sampel

Sampel untuk menentukan kinetika hambatan EGCG adalah tirosinase yang dicampur dengan EGCG dalam dua konsentrasi yang masing-masing mendapatkan lima perlakuan yaitu penambahan lima macam konsentrasi L-tirosin. Masing-masing perlakuan dilakukan tiga kali (tiga replikasi)

Sampel untuk menentukan kinetika hambatan *kojic acid* adalah tirosinase yang dicampur dengan *kojic acid* dalam dua konsentrasi yang masing-masing mendapatkan lima perlakuan yaitu penambahan lima macam konsentrasi L-tirosin. Masing-masing perlakuan dilakukan tiga kali (tiga replikasi).

Sampel untuk menentukan pengaruh inhibitor EGCG dan *kojic acid* adalah kombinasi tiga macam konsentrasi EGCG dan tiga macam konsentrasi *kojic acid* yang diberikan substrat pada konsentrasi tertentu. Masing-masing dilakukan tiga replikasi.

### 4.2.2. Teknik pengambilan data

Sampel setelah diberi perlakuan, diamati nilai absorpsinya pada panjang gelombang 475 nm setiap 30 detik selama 3 menit menggunakan alat Spektrofotometer UV-VIS Hitachi U-2000.

### 4.3. Variabel penelitian

Variabel bebas dan variabel tergantung dalam penelitian ini disusun berdasarkan tahap penelitian yang dilakukan.

#### 4.3.1. Penentuan kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase

Sebagai variabel bebas untuk penentuan kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase adalah konsentrasi EGCG dalam notasi  $E_0$ ,  $E_1$  dan  $E_2$  dan konsentrasi substrat  $[S]$  dalam notasi  $T_1 - T_5$ , sedangkan variabel tergantung adalah aktivitas tirosinase ( $v$ ).

#### 4.3.2. Penentuan kinetika dan jenis hambatan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase

Variabel bebas untuk penentuan kinetika dan jenis hambatan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase adalah konsentrasi *kojic acid* dalam notasi  $K_0$ ,  $K_1$  dan  $K_2$  dan konsentrasi substrat  $[S]$ , dalam notasi  $T_1 - T_5$ , sedangkan variabel tergantung adalah aktivitas tirosinase ( $v$ ).

#### 4.3.3. Penentuan daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase

Variabel bebas untuk menentukan daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase adalah berbagai konsentrasi EGCG, *kojic acid* dan kombinasi EGCG - *kojic acid* dalam berbagai konsentrasi, sedangkan variabel tergantung adalah laju perubahan nilai absorpsi ( $\Delta A/\text{menit}$ )

#### 4.4 Definisi operasional variabel

Konsentrasi substrat [S] dalam penelitian ini adalah konsentrasi L-tirosin dalam pelarut dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 yang dibuat bervariasi yaitu 0,11; 0,22; 0,33; 0,44 dan 0,55 mM (T<sub>1</sub>-T<sub>5</sub>).

Konsentrasi EGCG adalah konsentrasi EGCG yang dibuat bervariasi, yaitu 0 mM (E<sub>0</sub>), 0,05 mM (E<sub>1</sub>), 0,1 mM (E<sub>2</sub>) dan 0,12 mM (E<sub>3</sub>)

Konsentrasi *kojic acid* adalah konsentrasi *kojic acid* yang dibuat bervariasi, yaitu 0 mM (K<sub>0</sub>), 0,005 mM (K<sub>1</sub>), 0,01 mM (K<sub>2</sub>) dan 0,012 mM (K<sub>3</sub>)

Laju perubahan nilai absorpsi ( $\Delta A/\text{menit}$ ) adalah *slope* nilai perubahan absorpsi terhadap waktu yang diamati menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 475 nm setiap 30 detik selama 3 menit.

Aktivitas tirosinase ( $v$ ) didapat dari hasil perhitungan  $\Delta A/\text{menit}$ . Satuan yang digunakan untuk aktivitas adalah  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ .

Perlakuan adalah penambahan bahan EGCG, *kojic acid* dan kombinasi EGCG - *kojic acid* dalam berbagai konsentrasi dan penambahan L-tirosin pada berbagai konsentrasi.

Daya hambat aktivitas tirosinase adalah nilai % inhibisi yang didapatkan dari  $\Delta A/\text{menit}$  yang kemudian dilakukan perhitungan menggunakan rumus seperti yang tertera pada persamaan 4.1.

$$\% \text{ inhibisi} = 100 - \frac{(A \cdot 100)}{B} \quad (\text{persamaan 4.1})$$

Keterangan :

A = laju perubahan nilai absorpsi ( $\Delta A/\text{menit}$ ) pada panjang gelombang 475 nm dengan inhibitor

B = laju perubahan nilai absorpsi ( $\Delta A/\text{menit}$ ) pada panjang gelombang 475 nm tanpa inhibitor

#### 4.5 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah (-)-*Epigallocatechin gallate*, *Kojic Acid*, *L-tyrosine* dan *Mushroom tyrosinase*, yang kesemuanya berasal dari Sigma Chemical Co. Semua bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai tingkat kemurnian pro analisis. Larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 yang digunakan berasal dari E-Merck.

#### 4.6 Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Spektrofotometer UV-VIS Hitachi U-2000.
2. Mikropipet berbagai volume
3. Termometer
4. pH meter
5. penangas es
6. timbangan analitik
7. Labu ukur berbagai volume ( 100,0 ; 50,0 ; 25,0 ; 10,0 ml )
8. Berbagai alat gelas , seperti tabung reaksi, pengaduk, gelas piala dan lain-lain

#### 4.7 Lokasi dan waktu penelitian

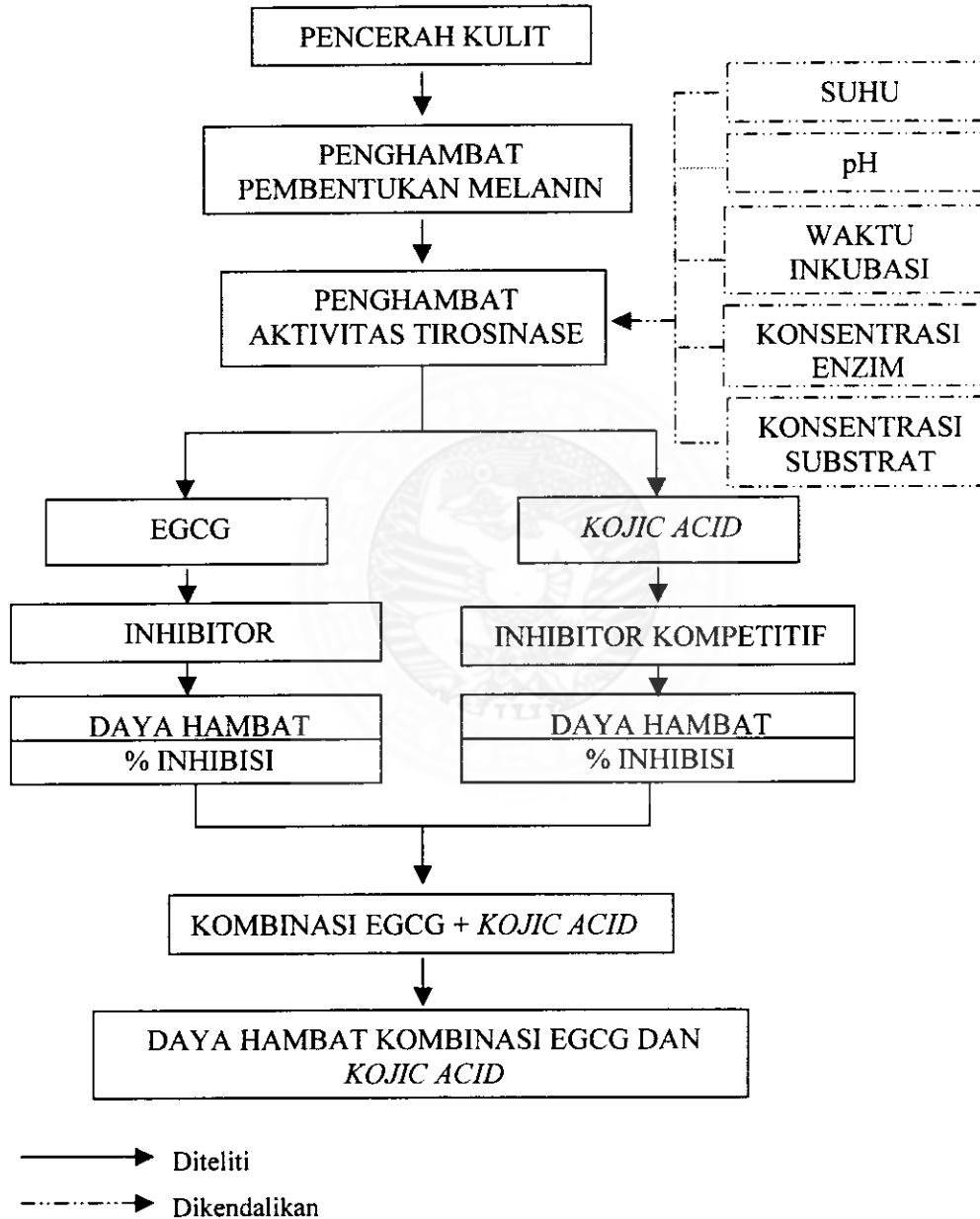
Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Surabaya, baik untuk penyiapan maupun pengamatan sampel menggunakan Spektrofotometer UV-VIS Hitachi U-2000 dan dilaksanakan mulai tanggal 18 Desember 2001 hingga 22 Maret 2002 (tiga bulan).



#### 4.8 Prosedur pengumpulan data

##### 4.8.1 Skema kerangka penelitian

Penelitian dilakukan menurut rancangan penelitian seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Skema kerangka penelitian

## 4.8.2 Penyiapan Larutan

Berbagai larutan pereaksi yang perlu disiapkan dalam penelitian ini adalah larutan tirosinase, L-tirosin, EGCG dan *kojic acid*.

### 4.8.2.1 Penyiapan Larutan Tirosinase

*Mushroom tyrosinase* ditimbang 15,0 mg, kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 sampai volume 100,0 ml disimpan dalam penangas es. Nilai absorpsi larutan ini harus berada disekitar 0,300 pada panjang gelombang 280 nm.

### 4.8.2.2. Penyiapan larutan baku L- Tirosin 5,52 mM

L-tirosin ditimbang 100,0 mg, kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 sampai volume 100,0 ml.

### 4.8.2.3. Penyiapan larutan baku EGCG

Larutan baku EGCG yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari larutan baku induk EGCG 10 mM yang kemudian diencerkan menjadi berbagai konsentrasi.

#### *a. Baku Induk EGCG 10 mM*

EGCG ditimbang 4,58 mg, kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 sampai volume 10,0 ml.

#### *b. Baku kerja EGCG 0,5 mM, 1 mM dan 1,2 mM*

Berbagai konsentrasi larutan baku kerja EGCG dibuat dengan mengencerkan larutan baku induk EGCG 10 mM dengan volume seperti pada komposisi yang tertera pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Komposisi larutan baku kerja EGCG

Notasi	Konsentrasi EGCG (mM)	Volume EGCG 10 mM (ml)	Diencerkan sampai volume (ml)
E <sub>1</sub>	0,5	0,5	10,0
E <sub>2</sub>	1,0	1,0	10,0
E <sub>3</sub>	1,2	3,0	25,0

#### 4.8.2.4. Penyiapan larutan baku *kojic acid*

Larutan baku *kojic acid* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari larutan baku induk *kojic acid* 1 mM yang kemudian diencerkan menjadi berbagai konsentrasi.

##### a. Baku Induk *kojic acid* 1,0 mM

*Kojic acid* ditimbang 3,55 mg, kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 sampai volume 25,0 ml.

##### b. Baku kerja *kojic acid* 0,05 mM, 0,1 mM dan 0,12 mM

Berbagai konsentrasi larutan baku kerja *kojic acid* dibuat dengan mengencerkan larutan baku induk *kojic acid* 1 mM dengan volume seperti pada komposisi yang tertera pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Pembuatan larutan baku kerja *kojic acid*

Notasi	Konsentrasi KA (mM)	Volume KA 1,0 mM (ml)	Diencerkan sampai volume (ml)
K <sub>1</sub>	0,05	0,5	10,0
K <sub>2</sub>	0,10	1,0	10,0
K <sub>3</sub>	0,12	3,0	25,0

### **4.8.3 Penentuan konsentrasi larutan tirosinase**

Konsentrasi larutan tirosinase diukur dengan cara menentukan terlebih dahulu panjang gelombang maksimum tirosinase, kemudian dilakukan pengamatan nilai absorpsi pada panjang gelombang maksimum.

#### ***a. Penentuan panjang gelombang maksimum tirosinase***

Panjang gelombang maksimum tirosinase ditentukan dengan memilih panjang gelombang 270 - 290 nm pada spektrofotometer. Larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 dimasukkan kedalam kuvet kemudian diletakkan pada posisi sampel dalam spektrofotometer. Sebagai blanko digunakan larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0. Pembacaan nilai absorpsi disesuaikan pada posisi 0,000. Tahap selanjutnya larutan dapar pada posisi sampel diganti dengan larutan tirosinase, kemudian dilakukan pembacaan nilai absorpsi mulai panjang gelombang 270 nm hingga 290 nm (panjang gelombang maksimum tirosinase menurut pustaka adalah 280 nm).

#### ***b. Penentuan konsentrasi larutan tirosinase***

Nilai absorpsi pada panjang gelombang maksimum digunakan untuk menghitung konsentrasi tirosinase sebenarnya. Percobaan dilakukan sebanyak 3 replikasi.

### **4.8.4 Penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom**

Panjang gelombang maksimum dopakrom ditentukan dengan dengan memilih panjang gelombang 465 - 485 nm pada spektrofotometer, kemudian larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 dimasukkan kedalam kuvet dan diletakkan pada posisi sampel dalam spektrofotometer. Sebagai blanko digunakan larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0. Pembacaan nilai absorpsi disesuaikan pada posisi 0,000.

Larutan dapar pada posisi sampel diganti dengan larutan pereaksi yang terdiri atas 2,0 ml larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0, 1,0 ml larutan L-Tirosin 5,52 M dan 2,0 ml larutan tirosinase yang telah ditentukan konsentrasinya. Kemudian dilakukan pembacaan nilai absorpsi mulai panjang gelombang 465 nm hingga 485 nm. (panjang gelombang maksimum dopakrom menurut pustaka adalah 475 nm)

#### 4.8.5 Penentuan konsentrasi tirosinase untuk penetapan kinetik

Sebelum dilakukan penentuan kinetika reaksi enzimatik, perlu ditentukan terlebih dahulu konsentrasi tirosinase yang nantinya akan digunakan dengan mengukur laju perubahan nilai absorpsi dopakrom pada berbagai konsentrasi tirosinase. Laju perubahan nilai absorpsi dopakrom diamati dengan mengukur nilai absorpsi dopakrom pada panjang gelombang maksimum dopakrom setiap 30 detik selama 3 menit. Nilai absorpsi yang didapat kemudian dibuat kurva terhadap waktu. *Slope* yang dihasilkan dari kurva nilai absorpsi terhadap waktu adalah laju perubahan nilai absorpsi ( $\Delta A/\text{menit}$ ). Berbagai konsentrasi tirosinase yang akan ditentukan lajunya dibuat dengan mencampur larutan pereaksi seperti komposisi yang tertera pada Tabel 4.6. Sebagai kontrol, diamati laju reaksi campuran larutan dapar fosfat dan L-tirosin seperti komposisi Tabel 4.6 namun larutan tirosinase digantikan dengan larutan dapar fosfat (tanpa tirosinase). Bila teramati adanya laju kontrol yang bermakna (lebih dari 5% laju enzim) dilakukan perhitungan dengan mengurangi laju reaksi enzim dengan laju kontrol. Konsentrasi tirosinase yang dipilih untuk penetapan kinetik adalah yang mempunyai harga  $\Delta A/\text{menit}$  dalam rentang 0,100 – 0,150 dan mempunyai perubahan nilai absorpsi linier selama tiga menit. Untuk mengetahui aktivitas spesifik dari tiap konsentrasi enzim, harga

$\Delta A/\text{menit}$  yang didapat kemudian diubah menjadi jumlah produk yang terbentuk tiap satuan waktu ( $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ), kemudian dibuat kurva laju produk yang terbentuk terhadap konsentrasi tirosinase. Jumlah produk yang terbentuk tiap satuan waktu selanjutnya dinyatakan sebagai aktivitas tirosinase ( $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ).

Tabel 4.6 Komposisi pereaksi pada penentuan konsentrasi tirosinase untuk penetapan kinetik dengan konsentrasi L-tirosin 1,1040 mM

Pereaksi	Konsentrasi Tirosinase (mg/penetapan)					
	1,1044 (Tase <sub>1</sub> )	1,3253 (Tase <sub>2</sub> )	1,6566 (Tase <sub>3</sub> )	1,8775 (Tase <sub>4</sub> )	2,2088 (Tase <sub>5</sub> )	2,4297 (Tase <sub>6</sub> )
	volume (ml)					
Dapar	3,0	2,8	2,5	2,3	2,0	1,8
L-tirosin	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tirosinase	1,0	1,2	1,5	1,7	2,0	2,2

#### 4.8.6. Penentuan konstanta kinetik menggunakan persamaan Lineweaver-Burk

Setelah didapatkan konsentrasi tirosinase yang sesuai, konsentrasi tirosinase digunakan untuk penentuan konstanta kinetik  $K_M$  dan  $V_{maks}$ . Konstanta kinetik ditentukan dengan melakukan percobaan yang sama seperti pada penentuan konsentrasi tirosinase, namun faktor yang dibuat bervariasi adalah konsentrasi L-tirosin [S]. Nilai absorpsi dopakrom yang terbentuk dari campuran pereaksi dengan komposisi seperti yang tertera pada Table 4.7 dibaca pada panjang gelombang maksimum dopakrom setiap 30 detik selama tiga menit. Harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang didapat dari *slope* kurva nilai absorpsi dopakrom terhadap waktu dari berbagai konsentrasi L-tirosin diubah menjadi aktivitas ( $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ), kemudian dengan mengikuti persamaan Lineweaver-Burk (persamaan 4.2) dibuat kurva resiprokal aktivitas ( $1/v$ ) terhadap resiprokal konsentrasi L-tirosin ( $1/[S]$ ).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (\text{persamaan 4.2})$$

Pada kurva Lineweaver- Burk, intersep pada ordinat (sumbu y) adalah  $1/V_{maks}$  dan intersep pada absis (sumbu x) adalah  $-1/K_M$

Tabel. 4.7 Volume pereaksi untuk penentuan kinetika reaksi enzimatik tanpa inhibitor ( $E_0$ )

Pereaksi	Konsentrasi L-Tirosin				
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
Dapar fosfat 0,1 M	2,9	2,8	2,7	2,6	2,5
L-tirosin 5,52 mM	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Lar. Tirosinase	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

#### 4.8.7 Penentuan kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase

Kinetika hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase ditentukan dengan mengamati pengaruh berbagai konsentrasi inhibitor pada kurva  $1/v$  terhadap  $1/[S]$  yang dihasilkan dari reaksi enzimatik tanpa inhibitor ( $E_0$ ) seperti yang telah dijabarkan dalam penentuan konstanta kinetik 4.8.6. Campuran peraksi yang digunakan untuk menghasilkan kurva pengaruh konsentrasi epigalokatekin galat 0,05 dan 0,10 mM mengikuti komposisi seperti tertera pada Tabel 4.8 dan 4.9. Dari kurva Lineweaver-Burk yang diperoleh, akan dihasilkan tiga garis regresi untuk  $E_0$ ,  $E_1$  dan  $E_2$  yang akan menunjukkan jenis hambatan EGCG.

Tabel. 4.8 Komposisi pereaksi untuk penentuan kinetika reaksi enzimatik dengan inhibitor EGCG 0,05 mM ( $E_1$ )

Pereaksi	Konsentrasi L-Tirosin				
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
Dapar fosfat 0,1 M	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0
L-tirosin 5,52 mM	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
EGCG 0,5 mM	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lar. Tirosinase	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Tabel 4.9 Volume pereaksi untuk penentuan kinetika reaksi enzimatik dengan inhibitor EGCG 0,1 mM ( $E_2$ )

Pereaksi	Konsentrasi L-Tirosin				
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
Dapar fosfat 0,1 M	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0
L-tirosin 5,52 mM	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
EGCG 1 mM	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tirosinase	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

#### 4.8.8 Penentuan kinetika dan jenis hambatan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase

Kinetika dan jenis hambatan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase ditentukan dengan tahapan seperti penentuan kinetika hambatan EGCG, namun inhibitor yang digunakan adalah *kojic acid* dengan konsentrasi 0,005 dan 0,01 mM. Konstanta kinetik  $K_M$  dan  $V_{maks}$  ditentukan terlebih dahulu dengan membuat kurva  $1/v$  terhadap  $1/[S]$  dari reaksi enzimatik tanpa inhibitor ( $K_0$ ), kemudian diamati pengaruh inhibitor *kojic acid* pada konsentrasi 0,005 mM ( $K_1$ ) dan 0,01 mM ( $K_2$ ) terhadap kurva  $K_0$ . Dari kurva Lineweaver-Burk yang diperoleh, akan dihasilkan tiga garis regresi untuk  $K_0$ ,  $K_1$  dan  $K_2$  yang akan menunjukkan jenis hambatan *kojic acid*.



#### 4.8.9 Penentuan daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase

Daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase ditentukan dengan mengamati penurunan laju perubahan nilai absorpsi ( $\Delta A/\text{menit}$ ) dari campuran larutan dengan komposisi seperti tertera pada Tabel 4.10.

Tabel 4.10 Volume pereaksi untuk penentuan daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase

Pereaksi	E <sub>0</sub> K <sub>0</sub>	E <sub>1</sub> K <sub>0</sub>	E <sub>2</sub> K <sub>0</sub>	E <sub>3</sub> K <sub>0</sub>	E <sub>0</sub> K <sub>1</sub>	E <sub>0</sub> K <sub>2</sub>	E <sub>0</sub> K <sub>3</sub>	E <sub>1</sub> K <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> K <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> K <sub>3</sub>	E <sub>2</sub> K <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> K <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> K <sub>3</sub>	E <sub>3</sub> K <sub>1</sub>	E <sub>0</sub> K <sub>2</sub>	E <sub>0</sub> K <sub>3</sub>
Dapar fosfat 0,1M	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
L-tirosin 5,52mM	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
EGCG 0,5mM	-	0,5	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-
EGCG 1,0mM	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5	-	-	-
EGCG 1,2 mM	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5
KA 0,05mM	-	-	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-
KA 0,1 mM	-	-	-	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-	0,5	-
KA 0,12mM	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-	0,5
Tirosinase	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

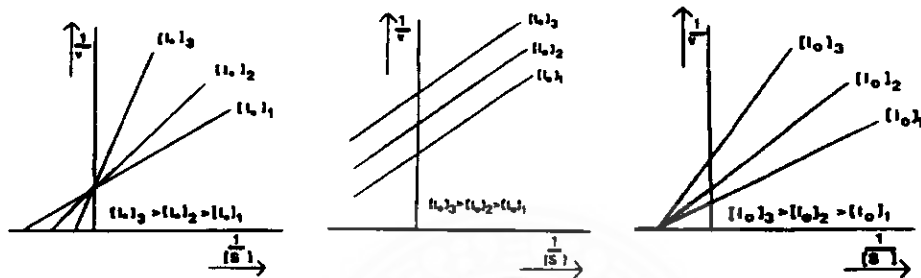
#### 4.9 Cara Analisis Data

Analisis data dilakukan sesuai dengan tahapan penelitian yaitu analisis kinetika dan jenis hambatan EGCG, analisis kinetika dan jenis hambatan *kojic acid* dan analisis daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase.

##### 4.9.1 Profil kinetika dan jenis hambatan EGCG dan *kojic acid*

Kinetika dan jenis hambatan EGCG dan *kojic acid* diperoleh dengan menganalisis profil kurva Lineweaver-Burk yang dihasilkan dari pengamatan aktivitas reaksi enzimatik pada tiap konsentrasi L-tirosin dan membandingkan

harga konstanta kinetik  $K_M$  dan  $V_{maks}$  yang dihasilkan dari reaksi enzimatik tanpa inhibitor dengan reaksi enzimatik menggunakan inhibitor epigalokatekin galat maupun *kojic acid* pada berbagai konsentrasi. Dari profil kurva  $1/v$  terhadap  $1/[S]$  didapatkan gambaran jenis hambatan aktivitas enzim yang diakibatkan oleh EGCG. *Dummy curve* yang muncul seperti yang tertera pada Gambar 4.3. :



Gambar 4.3 *Dummy curve*  $1/v$  terhadap  $1/[S]$  menurut persamaan Lineweaver-Burk untuk hambatan kompetitif, ankompetitif dan nonkompetitif

#### 4.9.2 Daya hambat kombinasi bahan penghambat pigmentasi EGCG dan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase

Harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang didapat dari setiap penetapan dianalisis menggunakan analisis variansi faktorial dengan  $\alpha$  (tingkat kemaknaan) = 0,05.

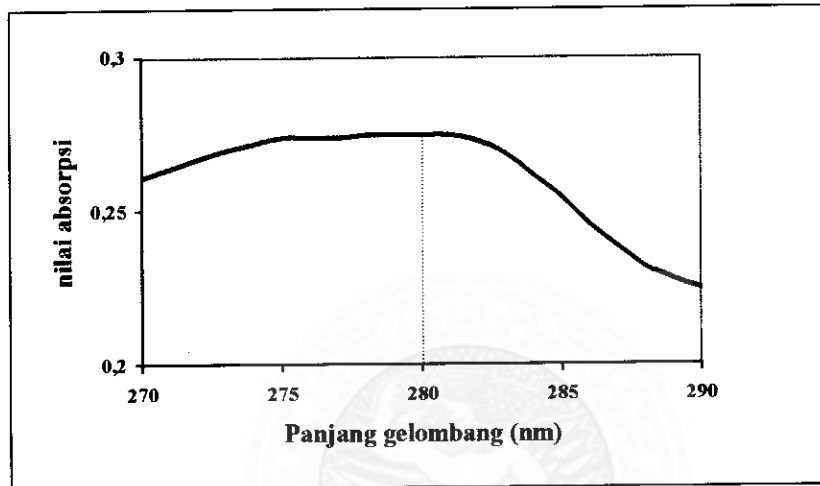
## BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

Pada percobaan pendahuluan, telah dilakukan pengamatan terhadap beberapa metode yang dikembangkan oleh peneliti terdahulu.<sup>9,13,15,16,17</sup> Beberapa metode menggunakan panjang gelombang maksimum yang tidak sesuai dengan hasil penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom dalam penelitian ini. Beberapa penelitian dilakukan dengan waktu inkubasi yang relatif panjang, sampai 30 menit<sup>9</sup> atau bahkan terlalu pendek (dua menit).<sup>19</sup> Peneliti lain menggunakan tirosinase dalam jumlah yang terlalu besar untuk tiap penetapan dan dilakukan pada suhu yang cukup tinggi (37° C).<sup>17</sup> Metode yang sesuai digunakan dalam penelitian ini adalah modifikasi dari metode Boyer yang merupakan pengembangan dari metode yang telah dilakukan oleh Pomerantz.<sup>15,16</sup> Metode ini menggunakan panjang gelombang maksimum dopakrom yang sesuai dengan yang didapatkan dari penelitian (475 nm) , waktu inkubasi relatif pendek (tiga menit) namun masih dapat terdeteksi linieritas perubahan nilai absorpsinya, jumlah tirosinase yang digunakan relatif kecil dan suhu inkubasi sesuai dengan suhu ruang dimana penelitian ini dilakukan.

Selama periode penelitian, suhu ruang dan suhu di dalam spektrofotometer senantiasa diukur, begitu pula pH larutan dapar dan pH campuran reaksi. Hasil pengamatan suhu dan pH tertera pada Lampiran 7. Suhu inkubasi reaksi katalisis tirosinase menurut pustaka dikendalikan pada 25 – 30 °C, sedangkan pH optimum reaksi katalisis tirosinase adalah 6,0 - 7,0.<sup>15,16,19</sup>

### 5.1 Hasil penentuan konsentrasi larutan tirosinase

Panjang gelombang maksimum tirosinase menurut kurva hasil pengamatan nilai absorpsi pada panjang gelombang 270 – 290 adalah 280 nm (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Hasil penentuan panjang gelombang maksimum tirosinase dalam larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 menggunakan spektrofotometer

Nilai absorpsi pada panjang gelombang maksimum ini digunakan untuk menentukan konsentrasi larutan tirosinase. Konsentrasi larutan tirosinase ditentukan dengan perhitungan perbandingan sederhana yang menunjukkan hasil tertera pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil penentuan konsentrasi larutan tirosinase yang diamati pada panjang gelombang 280 nm dengan spektrofotometer

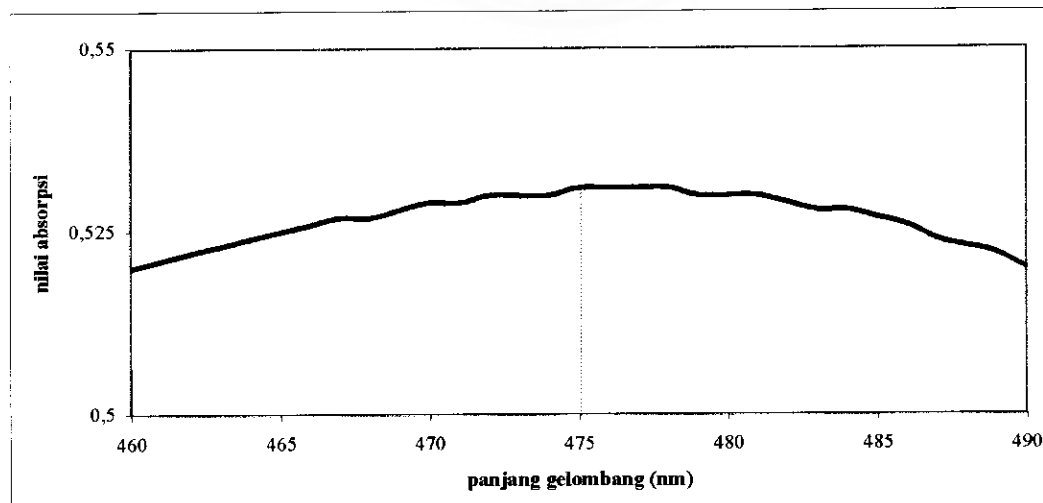
Replikasi	Nilai absorpsi pada 280 nm	Konsentrasi (mg/ml)
1	0,275	0,110
2	0,274	0,110
3	0,276	0,110
Rata-rata	0,275	0,110

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa konsentrasi larutan tirosinase yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,110 mg tirosinase/ml. Larutan ini kemudian dipipet dalam berbagai volume dan digunakan dalam penentuan konsentrasi tirosinase untuk penetapan kinetik

## 5.2 Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom

Aktivitas katalitik tirosinase ditentukan dengan mengamati laju pembentukan produk hasil reaksi enzimatik. Produk yang diamati adalah dopakrom yang menurut pustaka mempunyai panjang gelombang maksimum 475 nm.<sup>7,12,17,18,19</sup>

Panjang gelombang maksimum dopakrom ditentukan dengan mengamati nilai absorpsi terhadap panjang gelombang dalam rentang 465-485 nm. Hasil yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 5.2 yang menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum dopakrom adalah 475 nm (sesuai dengan pustaka).



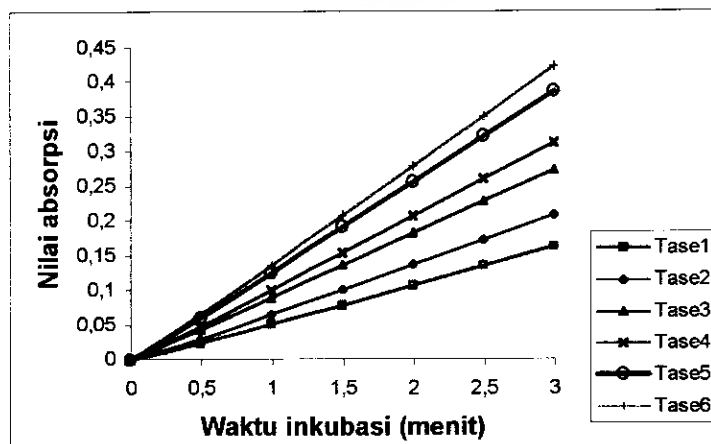
Gambar 5.2 Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom yang terbentuk dari hasil reaksi L-tirosin dan tirosinase dalam dapar fosfat 0,1 M pH 7,0

### 5.3 Hasil penentuan konsentrasi tirosinase untuk penetapan kinetika

Nilai absorpsi dopakrom yang terbentuk dari reaksi L-tirosin dengan berbagai konsentrasi tirosinase (Tabel 4.6) yang diamati pada panjang gelombang 475 nm setiap 30 detik selama 3 menit menunjukkan hasil seperti tertera pada Tabel 5.2 dan dari Tabel 5.2 diperoleh kurva seperti tampak pada Gambar 5.3.

Tabel 5.2 Nilai absorpsi dopakrom pada berbagai konsentrasi tirosinase

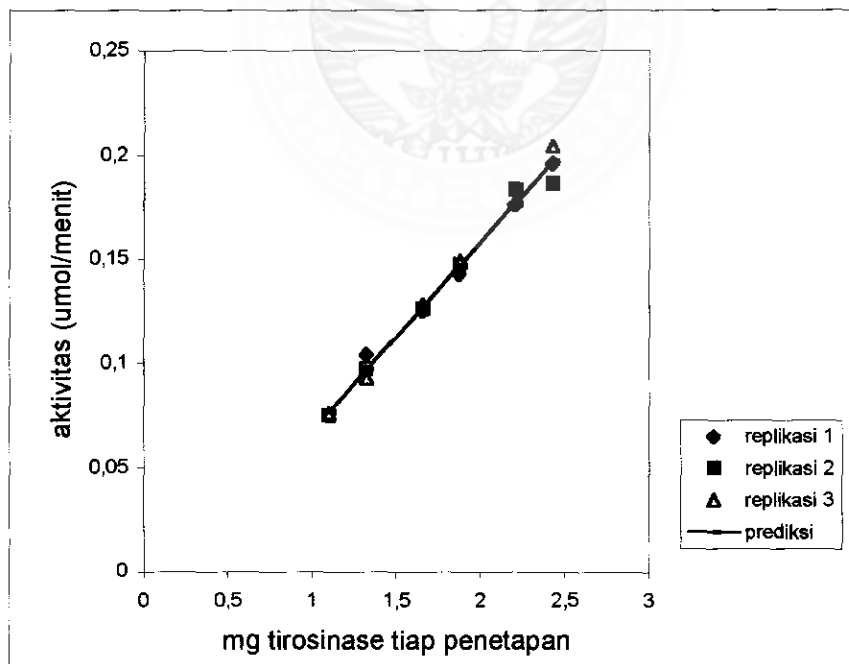
Waktu (menit)	Konsentrasi tirosinase (mg/penetapan)					
	1,1044 (Tase <sub>1</sub> )	1,3253 (Tase <sub>2</sub> )	1,6566 (Tase <sub>3</sub> )	1,8775 (Tase <sub>4</sub> )	2,2088 (Tase <sub>5</sub> )	2,4297 (Tase <sub>6</sub> )
	Nilai absorpsi					
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	0,024	0,030	0,044	0,049	0,061	0,066
1,0	0,052	0,066	0,090	0,102	0,126	0,137
1,5	0,079	0,102	0,137	0,155	0,192	0,209
2,0	0,108	0,138	0,183	0,208	0,257	0,280
2,5	0,136	0,174	0,229	0,261	0,322	0,351
3,0	0,164	0,210	0,275	0,314	0,387	0,423
$\Delta A/\text{menit}$	0,055	0,070	0,092	0,105	0,129	0,141
$v \mu\text{mol/mnt}$	0,076	0,097	0,128	0,146	0,179	0,196



Gambar 5.3 Kurva nilai absorpsi dopakrom yang terbentuk dari reaksi L-tirosin dengan berbagai konsentrasi tirosinase terhadap waktu inkubasi

Dari Gambar 5.3 teramati profil kurva yang linier selama tiga menit untuk seluruh konsentrasi tirosinase, namun pada tirosinase konsentrasi 2,4296 mg/penetapan ( $Tase_6$ ), perubahan nilai absorpsi telah menurun sebelum tiga menit, sehingga konsentrasi tirosinase yang dipilih untuk penetapan kinetik adalah 2,2088 mg/penetapan ( $Tase_5$ )

Laju reaksi pembentukan dopakrom atau aktivitas ( $v$ ) yang didapat dari hasil perhitungan harga  $\Delta A/\text{menit}$  kemudian dihubungkan terhadap konsentrasi tirosinase tiap penetapan, sehingga dihasilkan Gambar 5.4. Data hasil pengamatan tertera pada Lampiran 9 dan 10.



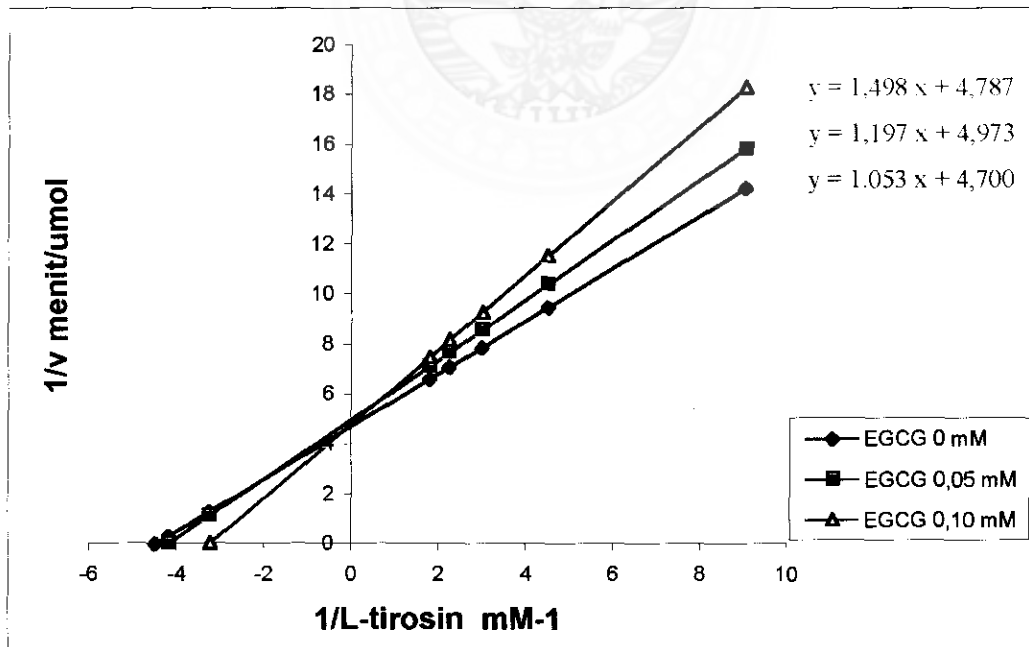
Gambar 5.4 Kurva aktivitas reaksi enzimatik pada berbagai konsentrasi tirosinase dengan konsentrasi L-tirosin konstan yang ditentukan secara spektrofotometri

#### 5.4 Hasil penentuan konstanta kinetik menggunakan persamaan Lineweaver-Burk

Hasil uji aktivitas reaksi enzimatik pada berbagai konsentrasi L-tirosin dapat dilihat pada Tabel 5.3 dan Gambar 5.5.

Tabel 5.3 Resiprokal aktivitas reaksi enzimatik dalam berbagai resiprokal konsentrasi L-tirosin dengan dan tanpa inhibitor EGCG

$1/[L\text{-tirosin}]$ $\text{mM}^{-1}$	$1/v$ (tanpa inhibitor) menit/ $\mu\text{mol}$	$1/v$ (dengan EGCG 0,05 mM) menit/ $\mu\text{mol}$	$1/v$ (dengan EGCG 0,10 mM) menit/ $\mu\text{mol}$
9,06	14,24	15,82	18,28
4,53	9,47	10,40	11,53
3,02	7,88	8,59	9,28
2,26	7,08	7,68	8,16
1,81	6,61	7,14	7,48



Gambar 5.5 Kurva Lineweaver-Burk kinetika hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase



Garis dengan notasi EGCG 0 mM menunjukkan aktivitas reaksi enzimatik tanpa adanya inhibitor. Dari aktivitas reaksi enzimatik tanpa adanya inhibitor didapatkan harga konstanta kinetik reaksi enzimatik  $K_M$  0,224 mM dan  $V_{maks}$  0,213  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ .

### 5.5 Hasil penentuan kinetika hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase

Hasil uji aktivitas reaksi enzimatik terhadap berbagai konsentrasi L-tirosin dengan dan tanpa inhibitor EGCG dapat dilihat pada Tabel 5.3 dan Gambar 5.5. Kurva Lineweaver-Burk pada Gambar 5.5 menunjukkan profil kinetika hambatan aktivitas tirosinase oleh inhibitor epigalokatekin galat dengan konsentrasi 0,05 mM dan 0,1 mM yang menunjukkan adanya perpotongan pada sumbu y dengan garis EGCG 0 mM. Harga konstanta kinetik masing-masing tampak pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Harga konstanta kinetik reaksi enzimatik dengan dan tanpa inhibitor EGCG

Reaksi enzimatik	$V_{maks}$ ( $\mu$ mol/menit)	$K_M$ (mM)
tanpa inhibitor (EGCG 0 mM)	0,213	0,224
dengan EGCG 0,05 mM	0,201	0,241
dengan EGCG 0,10 mM	0,209	0,311

Dari kurva Lineweaver-Burk Gambar 5.5 ketiga garis regresi mempunyai intersep yang berimpit. Untuk memutuskan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase, perlu diuji apakah ada perbedaan yang bermakna dari ketiga intersep tersebut. Tabel 5.5 dapat digunakan untuk menganalisis kebermaknaannya.

Tabel 5.5 Hasil analisis harga intersep garis pada kurva Lineweaver-Burk kinetika hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase

Garis	Harga intersep	<i>Confidence interval</i> 95%	
		Batas bawah	Batas atas
EGCG 0 mM	4,700	4,397	5,002
EGCG 0,05 mM	4,973	4,679	5,266
EGCG 0,10 mM	4,787	4,454	5,121

Dari Tabel 5.5 dapat diketahui bahwa harga ketiga intersep berada di dalam rentang batas bawah dan batas atas, sehingga dapat dikatakan ketiga intersep tersebut tidak berbeda bermakna. Hal ini menunjukkan jenis hambatan EGCG adalah hambatan kompetitif.

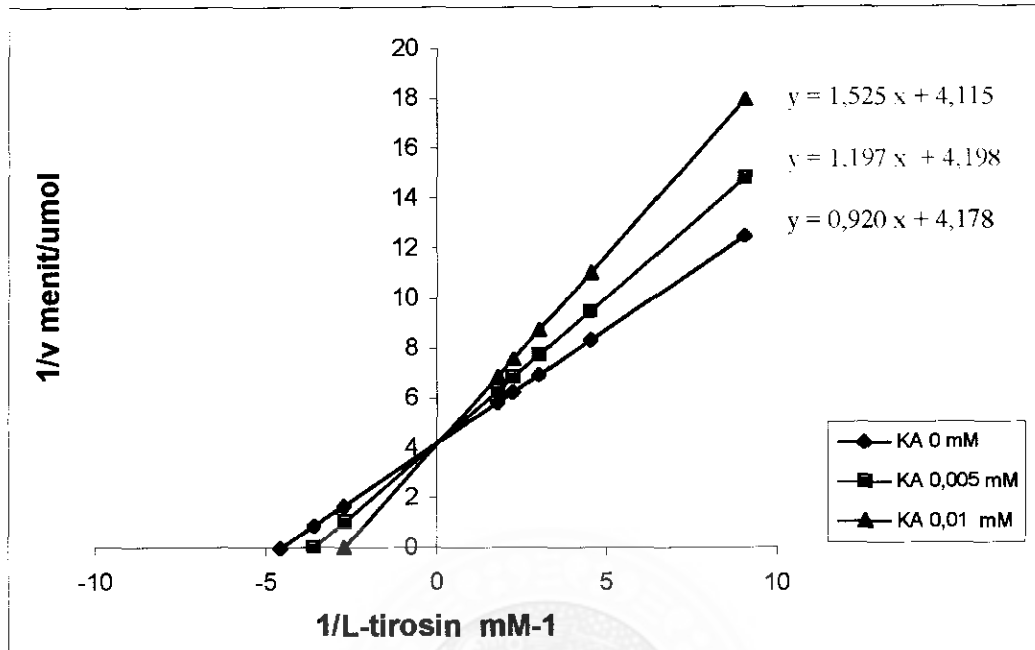
### 5.6 Hasil penentuan kinetika hambatan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase

Hasil uji aktivitas reaksi enzimatis pada berbagai konsentrasi L-tirosin dengan maupun tanpa inhibitor *kojic acid* dapat dilihat pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6 Resiprokal aktivitas reaksi enzimatis dalam berbagai resiprokal konsentrasi L-tirosin dengan dan tanpa inhibitor *kojic acid*

1/[L-tirosin] mM <sup>-1</sup>	1/v (tanpa inhibitor) menit/μmol	1/v (dengan KA 0,005 mM) menit/μmol	1/v (dengan KA 0,010 mM) menit/μmol
9,06	12,51	14,81	17,93
4,53	8,34	9,50	11,02
3,02	6,95	7,73	8,72
2,26	6,26	6,85	7,57
1,81	5,84	6,32	6,88

Dari Tabel 5.6 dihasilkan kurva Lineweaver-Burk seperti tampak pada Gambar 5.6.



Gambar 5.6 Kurva Lineweaver-Burk kinetika hambatan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase

Kurva Lineweaver-Burk pada Gambar 5.6 menunjukkan profil kinetika hambatan aktivitas enzim oleh inhibitor *kojic acid* dengan konsentrasi 0,005 mM dan 0,01 mM yang menunjukkan adanya perpotongan pada sumbu y dengan garis KA 0 mM (tanpa *kojic acid*). Harga konstanta kinetik masing-masing tampak pada Tabel 5.7.

Tabel 5.7 Harga konstanta kinetik reaksi enzimatik dengan dan tanpa inhibitor *kojic acid*

Reaksi enzimatik	$V_{maks}$ ( $\mu$ mol/menit)	$K_M$ (mM)
tanpa inhibitor (KA 0 mM)	0,239	0,220
dengan KA 0,005 mM	0,238	0,279
dengan KA 0,010 mM	0,224	0,371

Kurva Lineweaver-Burk untuk kinetika hambatan *kojic acid* menunjukkan hal yang mirip dengan EGCG. Ketiga garis regresi mempunyai intersep yang berimpit dan dari Tabel 5.8 terbukti bahwa ketiga harga intersep pada kurva Lineweaver-Burk untuk kinetika hambatan *kojic acid* tidak berbeda bermakna, sehingga jenis hambatan *kojic acid* adalah hambatan kompetitif.

Tabel 5.8 Hasil analisis harga intersep garis pada kurva Lineweaver-Burk kinetika hambatan *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase

Garis	Harga intersep	<i>Confidence interval</i> 95%	
		Batas bawah	Batas atas
KA 0 mM	4,178	3,852	4,503
KA 0,005 mM	4,198	3,972	4,423
KA 0,010 mM	4,115	3,900	4,330

### 5.7 Hambatan aktivitas tirosinase oleh EGCG, *kojic acid* dan kombinasi EGCG – *kojic acid*

Hambatan aktivitas tirosinase oleh kombinasi inhibitor ditentukan dengan mengamati laju perubahan nilai absorpsi ( $\Delta A/\text{menit}$ ) yang didapat dari *slope* nilai absorpsi pada panjang gelombang 475 nm terhadap waktu dari reaksi L-tirosin 0,552 mM dengan tirosinase 2,2088 mg/penetapan dan 0,5 ml inhibitor pada berbagai konsentrasi yang hasilnya tertera pada Tabel 5.9.

Tabel 5.9 Laju perubahan nilai absorpsi ( $\Delta A/\text{menit}$ ) reaksi enzimatik dengan inhibitor kombinasi EGCG - *kojic acid*

EGCG		Re- pli- ka- si	Kojic acid			
Konsentrasi			K <sub>0</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>
			0 mM	0.005 mM	0.01 mM	0.012 mM
Harga $\Delta A/\text{menit}$						
E <sub>0</sub>	0 mM	1	0,130	0,105	0,090	0,075
		2	0,129	0,103	0,081	0,075
		3	0,124	0,091	0,078	0,074
E <sub>1</sub>	0,05 mM	1	0,109	0,095	0,071	0,075
		2	0,106	0,093	0,071	0,066
		3	0,106	0,083	0,066	0,060
E <sub>2</sub>	0,10 mM	1	0,086	0,078	0,073	0,062
		2	0,079	0,069	0,067	0,061
		3	0,078	0,061	0,056	0,060
E <sub>3</sub>	0,12mM	1	0,074	0,068	0,066	0,059
		2	0,066	0,065	0,059	0,056
		3	0,066	0,053	0,053	0,050

Dari Tabel 5.9 diketahui bahwa makin tinggi konsentrasi EGCG, harga  $\Delta A/\text{menit}$  makin kecil. Penurunan harga  $\Delta A/\text{menit}$  menunjukkan adanya daya hambat aktivitas tirosinase yang makin meningkat, sehingga dapat dikatakan bahwa makin tinggi konsentrasi EGCG, daya hambat terhadap aktivitas tirosinase makin besar. Bila ditinjau dari *kojic acid*, juga terjadi peningkatan daya hambat aktivitas tirosinase oleh peningkatan konsentrasi *kojic acid*.

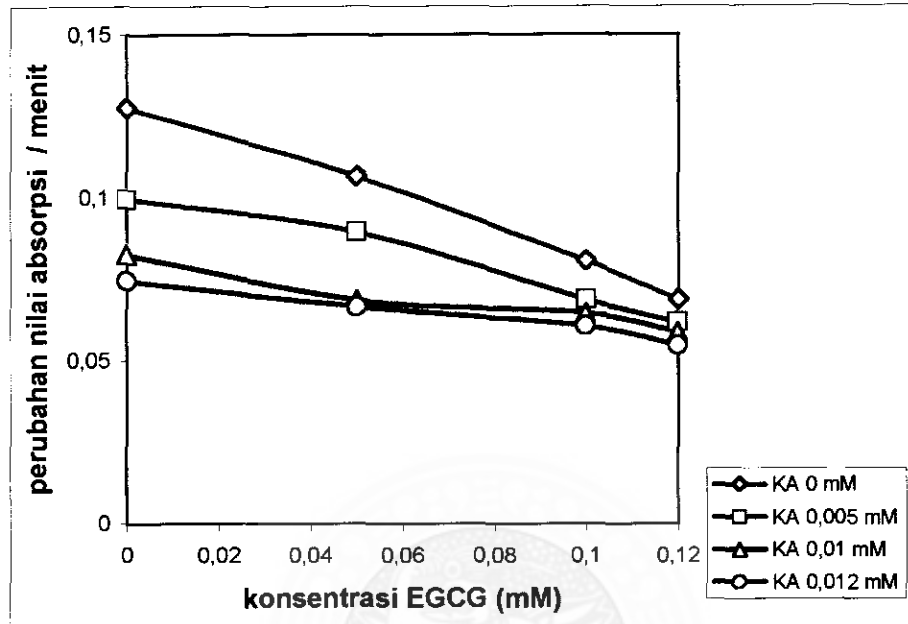
Dari Tabel 5.9 dilakukan analisis statistik ANAVA faktorial untuk melihat adanya perbedaan pada masing-masing perlakuan serta interaksi keduanya. Hasil perhitungan statistik tertera pada Tabel 5.10.

Tabel 5.10 Hasil perhitungan statistik ANAVA faktorial dari harga  $\Delta A$ /menit reaksi enzimatis dengan kombinasi inhibitor EGCG dan *kojic acid*

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1,774E-02	15	1,182E-03	35,628	,000
Intercept	,288	1	,288	8691,677	,000
EG	8,641E-03	3	2,880E-03	86,789	,000
KA	7,111E-03	3	2,370E-03	71,425	,000
EG * KA	1,984E-03	9	2,204E-04	6,642	,000
Error	1,062E-03	32	3,319E-05		
Total	,307	48			
Corrected Total	1,880E-02	47			

Hasil analisis statistik harga  $\Delta A$ /menit yang dapat dilihat pada Tabel 5.10 menunjukkan bahwa harga  $\Delta A$ /menit pada setiap perubahan konsentrasi EGCG, berbeda-beda untuk setiap kombinasinya dengan *kojic acid* dalam konsentrasi yang berbeda. Hal ini dibuktikan oleh tingkat kemaknaan yang lebih kecil dari 0,05 (0,00). Untuk mengetahui apakah perbedaan tersebut terjadi di setiap perlakuan, perlu dibuktikan lagi dengan analisis perbandingan berpasangan.

Untuk melihat adanya interaksi antara konsentrasi EGCG dan konsentrasi *kojic acid* digunakan Tabel 5.10 yang menyatakan bahwa harga F untuk interaksi antara konsentrasi EGCG dan konsentrasi *kojic acid* adalah 6,642 dengan tingkat kemaknaan 0,00. Dengan tingkat kemaknaan ini, maka hipotesis nol ditolak dan dapat dinyatakan bahwa terdapat interaksi antara konsentrasi EGCG dan konsentrasi *kojic acid*. Bukti interaksi ini dapat dilihat pada Gambar 5.7 yang menunjukkan perbedaan profil kurva  $\Delta A$ /menit terhadap konsentrasi EGCG untuk tiap konsentrasi *kojic acid*.

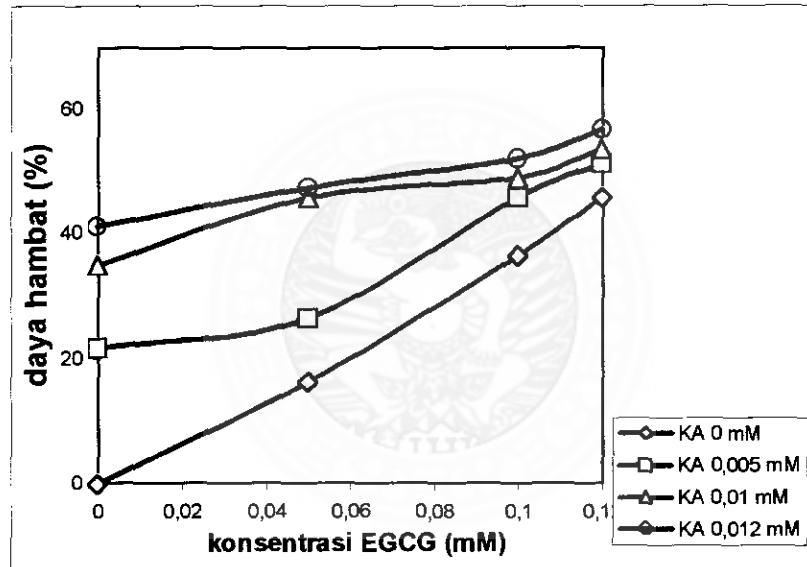


Gambar 5.7 Pengaruh berbagai konsentrasi EGCG terhadap harga  $\Delta A$ /menit reaksi enzimatik yang dihambat oleh *kojic acid* pada berbagai konsentrasi

Pada Gambar 5.7, kurva KA 0 mM, menggambarkan pengaruh perubahan konsentrasi EGCG terhadap harga  $\Delta A$ /menit reaksi enzimatik tanpa *kojic acid* yang menunjukkan bahwa setiap peningkatan konsentrasi EGCG menyebabkan penurunan harga  $\Delta A$ /menit yang cukup tajam. Penurunan harga  $\Delta A$ /menit reaksi enzimatik ini mencerminkan terjadinya penurunan laju reaksi enzimatik akibat inhibitor EGCG. Dari kurva KA 0,005 mM dapat diketahui bahwa peningkatan konsentrasi EGCG juga menyebabkan penurunan laju pada reaksi enzimatik dengan inhibitor *kojic acid* 0,005 mM, namun penurunannya tidak setajam penurunan laju reaksi tanpa *kojic acid*. Semakin besar konsentrasi campuran inhibitor akan semakin menurunkan laju reaksi,

namun penurunan laju reaksi tersebut cenderung makin kecil dengan makin meningkatnya konsentrasi kombinasi inhibitor.

Penurunan laju reaksi enzimatik mencerminkan daya hambat aktivitas tirosinase yang dinyatakan dengan parameter % inhibisi. Pengaruh berbagai konsentrasi EGCG dan *kojic acid* terhadap daya hambat aktivitas reaksi enzimatik dapat dilihat pada Gambar 5.8



Gambar 5.8 Pengaruh kombinasi EGCG dan *kojic acid* pada berbagai konsentrasi terhadap daya hambat aktivitas tirosinase

Gambar 5.8 menunjukkan adanya peningkatan daya hambat dalam setiap peningkatan konsentrasi inhibitor, namun peningkatan daya hambat oleh peningkatan konsentrasi inhibitor dalam bentuk kombinasi cenderung makin kecil bila dibandingkan dengan inhibitor tanpa kombinasi.



Pada Tabel 5.11 dan 5.12 dapat dilihat hasil analisis perbandingan berpasangan harga  $\Delta A$ /menit dari masing-masing perlakuan.

Tabel 5.11 Hasil analisis statistik perbandingan berpasangan harga  $\Delta A$ /menit dari perlakuan konsentrasi EGCG

(I) EGCG mM	(J) EGCG mM	Mean Diff. (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval for Difference	
					Lower Bound	Upper Bound
0	0.05	1,283E-02*	,002	,000	8,043E-03	1,762E-02
	0.10	2,708E-02*	,002	,000	2,229E-02	3,187E-02
	0.12	3,500E-02*	,002	,000	3,021E-02	3,979E-02
0.05	0	-1,283E-02*	,002	,000	-1,762E-02	-8,043E-03
	0.10	1,425E-02*	,002	,000	9,459E-03	1,904E-02
	0.12	2,217E-02*	,002	,000	1,738E-02	2,696E-02
0.10	0	-2,708E-02*	,002	,000	-3,187E-02	-2,229E-02
	0.05	-1,425E-02*	,002	,000	-1,904E-02	-9,459E-03
	0.12	7,917E-03*	,002	,002	3,126E-03	1,271E-02
0.12	0	-3,500E-02*	,002	,000	-3,979E-02	-3,021E-02
	0.05	-2,217E-02*	,002	,000	-2,696E-02	-1,738E-02
	0.10	-7,917E-03*	,002	,002	-1,271E-02	-3,126E-03

\* The mean difference is significant at the ,05 level.

Tabel 5.11 menunjukkan bahwa pada setiap perbedaan konsentrasi EGCG memberikan harga  $\Delta A$ /menit yang berbeda pada tingkat kemaknaan 0,05.

Tabel 5.12 Hasil analisis statistik perbandingan berpasangan harga  $\Delta A$ /menit dari perlakuan konsentrasi kojic acid

(I) kojic acid mM	(J) kojic acid mM	Mean Diff. (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval for Difference	
					Lower Bound	Upper Bound
0	0.005	1,575E-02*	,002	,000	1,096E-02	2,054E-02
	0.010	2,683E-02*	,002	,000	2,204E-02	3,162E-02
	0.012	3,167E-02*	,002	,000	2,688E-02	3,646E-02
0.005	0	-1,575E-02*	,002	,000	-2,054E-02	-1,096E-02
	0.010	1,108E-02*	,002	,000	6,293E-03	1,587E-02
	0.012	1,592E-02*	,002	,000	1,113E-02	2,071E-02
0.010	0	-2,683E-02*	,002	,000	-3,162E-02	-2,204E-02
	0.005	-1,108E-02*	,002	,000	-1,587E-02	-6,293E-03
	0.012	4,833E-03*	,002	,048	4,275E-05	9,624E-03
0.012	0	-3,167E-02*	,002	,000	-3,646E-02	-2,688E-02
	0.005	-1,592E-02*	,002	,000	-2,071E-02	-1,113E-02
	0.010	-4,833E-03*	,002	,048	-9,624E-03	-4,275E-05

\* The mean difference is significant at the ,05 level.

Adapun hasil yang ditunjukkan pada Tabel 5.12 juga menyatakan bahwa pada setiap perbedaan konsentrasi *kojic acid* memberikan harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang berbeda bermakna.

Pada Tabel 5.13 dapat dilihat hasil analisis perbandingan berpasangan dari harga  $\Delta A/\text{menit}$  pada kombinasi EGCG dan *kojic acid*.

Tabel 5.13 Hasil analisis statistik perbandingan berpasangan harga  $\Delta A/\text{menit}$  dari kombinasi EGCG dan *kojic acid*

EGCG mM	<i>Kojic acid</i> mM	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
0	0	0,128	,003	0,121	0,134
	0,005	9,967E-02	,003	9,289E-02	0,106
	0,010	8,300E-02	,003	7,623E-02	8,977E-02
	0,012	7,467E-02	,003	6,789E-02	8,144E-02
0,05	0	0,107	,003	,100	,114
	0,005	9,033E-02	,003	8,356E-02	9,711E-02
	0,010	6,933E-02	,003	6,256E-02	7,611E-02
	0,012	6,700E-02	,003	6,023E-02	7,377E-02
0,10	0	8,100E-02	,003	7,423E-02	8,777E-02
	0,005	6,933E-02	,003	6,256E-02	7,611E-02
	0,010	6,533E-02	,003	5,856E-02	7,211E-02
	0,012	6,100E-02	,003	5,423E-02	6,777E-02
0,12	0	6,867E-02	,003	6,189E-02	7,544E-02
	0,005	6,200E-02	,003	5,523E-02	6,877E-02
	0,010	5,933E-02	,003	5,256E-02	6,611E-02
	0,012	5,500E-02	,003	4,823E-02	6,177E-02

Dari hasil analisis statistik harga  $\Delta A/\text{menit}$  pada tabel 5.13 menunjukkan bahwa harga  $\Delta A/\text{menit}$  reaksi enzimatik yang menggunakan inhibitor EGCG konsentrasi 0,05 mM tidak berbeda bermakna dengan harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang dihasilkan dari reaksi enzimatik yang dihambat oleh *kojic acid* konsentrasi 0,005 mM, begitu pula EGCG

dengan konsentrasi yang berbeda, mempunyai harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang tidak berbeda dengan harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang dihasilkan oleh *kojic acid* dengan konsentrasi 1/10 (sepersepuluh) kali EGCG

Harga  $\Delta A/\text{menit}$  kombinasi EGCG – *kojic acid* hampir seluruhnya tidak berbeda bermakna, kecuali kombinasi EGCG – *kojic acid* 0,05 : 0,005 mM yang menunjukkan perbedaan dengan harga  $\Delta A/\text{menit}$  kombinasi yang lain dan harga  $\Delta A/\text{menit}$  kombinasi EGCG – *kojic acid* 0,05 : 0,01 mM menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan harga  $\Delta A/\text{menit}$  kombinasi EGCG – *kojic acid* 0,12 : 0,012 mM. Hal ini menunjukkan bahwa makin besar konsentrasi inhibitor dalam kombinasi, selisih harga  $\Delta A/\text{menit}$  makin kecil. Hal ini juga dibuktikan oleh kurva pada Gambar 5.8 yang menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi inhibitor dalam bentuk kombinasi tidak meningkatkan daya hambat aktivitas tirosinase sebesar daya hambat yang ditimbulkan bila masing-masing inhibitor berada dalam bentuk tunggal. Kombinasi EGCG – *kojic acid* tidak menunjukkan daya hambat aktivitas tirosinase yang saling memperkuat, tetapi cenderung memperlemah .

## BAB 6. PEMBAHASAN

Tirosinase merupakan salah satu enzim terpenting dalam proses biosintesis melanin. Hambatan aktivitas enzim ini dapat mengakibatkan terhambatnya pembentukan melanin, zat warna yang bertanggungjawab dalam penggelapan warna kulit. Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh epigalokatekin galat (EGCG) terhadap aktivitas tirosinase serta pengaruhnya terhadap efek hambatan senyawa inhibitor lain yang telah banyak digunakan sebagai bahan aktif pencerah kulit, *kojic acid*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase serta menentukan mekanisme pengaruh EGCG terhadap daya hambat aktivitas tirosinase yang ditimbulkan oleh *kojic acid*. Diharapkan penelitian ini bermanfaat untuk mendapatkan pencerah kulit yang efektif untuk kemudian diformulasi dalam berbagai bentuk sediaan.

Untuk mencapai tujuan, penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu

1. Penentuan kinetika hambatan EGCG
2. Penentuan kinetika hambatan *kojic acid*
3. Penentuan daya hambat kombinasi EGCG dan *kojic acid*

Sebelum tahapan tersebut dilakukan, terlebih dahulu dilakukan berbagai percobaan pendahuluan untuk menentukan kondisi reaksi. Percobaan yang dilakukan meliputi pemilihan metode ataupun modifikasi metode yang disesuaikan dengan kondisi laboratorium, penentuan suhu ruangan dan suhu di dalam spektrofotometer,

penentuan pH larutan dapar dan campuran pereaksi, penentuan cara inaktivasi enzim, penentuan panjang gelombang maksimum tirosinase dan panjang gelombang maksimum produk (dopakrom).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah modifikasi dari metode Boyer (1993) yang merupakan pengembangan dari Pomerantz (1966). Suhu ruangan selama penelitian dikendalikan pada  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Suhu di dalam spektrofotometer yang dimonitor selama periode penelitian berada sekitar  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Suhu yang dianjurkan menurut pustaka adalah  $25-30^\circ\text{C}$ , sehingga suhu ruang dan suhu di dalam spektrofotometer dapat digunakan untuk inkubasi dalam penelitian ini.

Larutan dapar yang digunakan adalah larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0, namun pada kondisi penelitian, pH larutan dapar tersebut berkisar antara  $6,8 \pm 0,05$ . pH larutan campuran pereaksi berkisar antara  $6,7 \pm 0,05$ . pH optimum reaksi katalisis tirosinase menurut pustaka berada di kisaran 6,0-7,0, sehingga pada penelitian ini reaksi berlangsung dalam kondisi pH yang telah sesuai dengan pH optimum tirosinase.

Sebagai kontrol aktivitas enzim, dilakukan pula pengamatan laju reaksi dengan menggunakan enzim yang telah diinaktivasi dengan pemanasan  $100^\circ\text{C}$  selama 30 menit. Laju reaksi dengan enzim inaktif menghasilkan harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang lebih kecil dari 0,001. Laju reaksi dengan enzim inaktif ini selanjutnya dibandingkan dengan laju reaksi campuran pereaksi tanpa enzim yang menunjukkan hasil tidak berbeda, yaitu perubahan nilai absorpsi per menit ( $\Delta A/\text{menit}$ ) pada campuran reaksi tanpa enzim lebih kecil dari 0,001 (lampiran 6). Untuk laju kontrol kurang dari 5%

laju reaksi enzim, nilai absorpsi sampel tidak perlu dikurangi dengan nilai absorpsi kontrol, dengan kata lain laju kontrol dapat diabaikan.<sup>15</sup>

Sebelum konstanta kinetik dievaluasi, penting diketahui terlebih dahulu konsentrasi enzim yang tepat yang digunakan untuk penetapan kinetik karena jika konsentrasi enzim yang digunakan terlalu kecil, perubahan nilai absorpsi untuk periode waktu reaksi akan sangat kecil sehingga sulit untuk diketahui perbedaan aktivitas oleh perbedaan konsentrasi substrat ataupun oleh adanya inhibitor. Di sisi lain terlalu besar konsentrasi enzim, akan menyebabkan reaksi berlangsung terlalu cepat sehingga laju reaksi sulit ditentukan.<sup>15</sup> Konsentrasi tirosinase yang dipilih adalah konsentrasi tirosinase yang memberikan nilai absorpsi linier selama tiga menit pada panjang gelombang 475 nm. Dari setiap kurva nilai absorpsi dopakrom pada panjang gelombang 475 nm terhadap waktu, teramati hubungan yang linier antara nilai absorpsi dan waktu selama tiga menit. *Slope* masing-masing kurva untuk tiap konsentrasi tirosinase menunjukkan perubahan nilai absorpsi per menit ( $\Delta A/\text{menit}$ ). Harga  $\Delta A/\text{menit}$  kemudian diubah menjadi jumlah dipakrom yang terbentuk per menit ( $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ) yang hasilnya tampak pada Gambar 5.4. Gambar 5.4 menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang linier antara konsentrasi tirosinase dengan aktivitas dengan harga koefisien korelasi  $r = 0,995$ .

Konsentrasi tirosinase yang digunakan untuk penetapan kinetik adalah 2,2088 mg/penetapan, yaitu larutan tirosinase dengan volume 2,0 ml pada penetapan TASE<sub>5</sub>. Konsentrasi ini dipilih karena mempunyai  $\Delta A/\text{menit}$  di kisaran 0,10 - 0,15/menit seperti yang dipersyaratkan dalam pustaka dan mempunyai perubahan nilai absorpsi

linier selama tiga menit.<sup>15</sup> Waktu tiga menit dipilih berdasarkan hasil pengamatan yang tampak pada Gambar 5.3 yang menunjukkan adanya hubungan linier dari nilai absorpsi terhadap waktu selama tiga menit inkubasi untuk semua konsentrasi tirosinase yang digunakan. Setelah tiga menit, terjadi penurunan perubahan nilai absorpsi yang bervariasi. Adanya penurunan perubahan nilai absorpsi ini terjadi pada tirosinase dengan konsentrasi 2,4297 mg/penetapan yang menunjukkan perubahan nilai absorpsi yang cenderung terlalu cepat bahkan penurunan harga  $\Delta A$  terjadi sebelum mencapai tiga menit.

Pada penentuan konstanta kinetik menggunakan persamaan Lineweaver-Burk (Gambar 5.5), didapat harga  $K_M$  0,224 mM dan  $V_{maks}$  0,213  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ .

Dari Gambar 5.5 dapat ditentukan kinetika dan jenis hambatan EGCG terhadap aktivitas tirosinase dengan mengamati pengaruh berbagai konsentrasi EGCG pada kurva reaksi enzimatik tanpa inhibitor yang digambarkan sebagai garis regresi EGCG 0 mM. Inhibitor EGCG dengan konsentrasi 0,05 mM menimbulkan perubahan kemiringan pada profil kurva EGCG 0 mM menjadi profil EGCG 0,05 mM. Inhibitor EGCG dengan konsentrasi yang lebih besar (0,10 mM) menimbulkan perubahan pada profil EGCG 0 mM dan EGCG 0,05 mM menjadi profil EGCG 0,10 mM. Dari ketiga garis regresi terdapat perpotongan pada sumbu y yang saling berimpit. Nilai intersep menurut persamaan Lineweaver-Burk mewakili konstanta kinetik  $V_{maks}$  yang nilainya merupakan hasil resiprokalnya. Nilai perpotongan garis regresi terhadap sumbu x mewakili harga  $K_M$  yang merupakan minus resiprokalnya. Tabel 5.4 dapat digunakan untuk menganalisis apakah ada perbedaan bermakna dari

nilai intersep ketiga garis regresi. Data tersebut menunjukkan bahwa harga ketiga intersep berada di dalam rentang batas bawah dan batas atas pada derajat kepercayaan 95%, sehingga dapat dikatakan bahwa ketiga intersep tersebut berbeda tidak bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa jenis hambatan EGCG terhadap tirosinase adalah hambatan kompetitif. Kesimpulan tersebut ditunjang oleh bukti harga konstanta kinetik  $V_{maks}$  yang tetap dan  $K_M$  yang makin meningkat oleh peningkatan konsentrasi inhibitor.<sup>26,28</sup> Hambatan kompetitif EGCG terhadap tirosinase diduga disebabkan oleh kemiripan struktur gugus galat dengan substrat L-tirosin dan L-dopa,<sup>9,27</sup> namun bila dilihat dari gugus ortohidroksinya, kemiripan struktur EGCG lebih mendekati struktur L-dopa, sehingga diduga EGCG berperan dalam menghambat aktivitas katalisis oksidasi o-difenol menjadi o-quinon (aktivitas katekolase).<sup>29</sup> Hubungan antara struktur kimia dan aktivitas hambatan tirosinase yang dinyatakan oleh Sakuma dkk. mendukung asumsi adanya hambatan EGCG pada aktivitas katekolase. Dikatakan bahwa turunan fenol yang mengandung dua atau tiga gugus hidroksil yang merupakan gugus penarik electron menghambat tirosinase karena kemampuannya sebagai senyawa pereduksi, sehingga EGCG kemungkinan menghambat tirosinase pada tahapan oksidasi L-dopa menjadi dopaquinon.<sup>17</sup> Untuk membuktikan lebih lanjut tentang dugaan ini, perlu dilakukan penelitian menggunakan substrat L-dopa dan pengamatan hidroksilasi L-tirosin menjadi L-dopa secara spektrofotometri atau dengan *High Performance Liquid Chromatography*.<sup>30,31</sup>

Kurva Lineweaver-Burk pada penentuan jenis hambatan *kojic acid* terhadap tirosinase (Gambar 5.6) menunjukkan adanya perpotongan pada sumbu y untuk ketiga



garis regresi. Tabel 5.5 menunjukkan harga ketiga intersep untuk tiga garis regresi. Ketiga intersep berada pada rentang batas bawah dan batas atas dengan derajat kepercayaan 95% atau berbeda tidak bermakna, sehingga jenis hambatan *kojic acid* adalah hambatan kompetitif yang ditunjang oleh data kinetik  $V_{maks}$  yang tidak berubah dan  $K_M$  yang makin meningkat dengan makin meningkatnya konsentrasi *kojic acid*.

Daya hambat aktivitas tirosinase kombinasi EGCG - *kojic acid* dinyatakan dalam nilai % inhibisi dan untuk keperluan analisis statistik, nilai % inhibisi diwakili oleh harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang menunjukkan bahwa harga  $\Delta A/\text{menit}$  reaksi enzimatik yang menggunakan inhibitor EGCG konsentrasi 0,05 mM tidak berbeda bermakna dengan harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang dihasilkan dari reaksi enzimatik yang dihambat oleh *kojic acid* konsentrasi 0,005 mM, begitu pula EGCG dengan konsentrasi yang berbeda, mempunyai harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang tidak berbeda dengan harga  $\Delta A/\text{menit}$  yang dihasilkan oleh *kojic acid* dengan konsentrasi sepersepuluh kali EGCG. Dari data pada Tabel 5.9 dapat disimpulkan bahwa EGCG mempunyai daya hambat 10 kali lebih kecil dibandingkan *kojic acid* pada konsentrasi yang sama.

Dari hasil analisis statistik terhadap harga  $\Delta A/\text{menit}$  juga diketahui bahwa bila EGCG dan *kojic acid* tidak diberikan dalam bentuk kombinasi, perubahan harga  $\Delta A/\text{menit}$  pada setiap peningkatan konsentrasi EGCG atau *kojic acid* cenderung lebih besar bila dibandingkan dengan perubahan harga  $\Delta A/\text{menit}$  kombinasi EGCG - *kojic acid*. Hal ini juga dibuktikan oleh kurva pada Gambar 5.8 yang menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi inhibitor dalam bentuk kombinasi tidak meningkatkan daya

hambat aktivitas tirosinase sebesar daya hambat yang ditimbulkan bila masing-masing inhibitor berada dalam bentuk tunggal. Kombinasi EGCG – *kojic acid* tidak menunjukkan daya hambat aktivitas tirosinase yang saling memperkuat, tetapi cenderung memperlemah.

Kedua inhibitor telah terbukti menghambat aktivitas tirosinase secara kompetitif dengan substrat L-tirosin. Bila EGCG dan *kojic acid* yang mempunyai jenis hambatan yang sama dikombinasi, kemungkinan yang terjadi adalah daya hambat kombinasi merupakan penjumlahan matematis dari daya hambat masing-masing, namun yang terjadi adalah kombinasi EGCG dan *kojic acid* mempunyai daya hambat yang lebih kecil dari penjumlahan matematisnya. Diduga kedua inhibitor saling berkompetisi untuk berikatan dengan sisi aktif tirosinase dengan kekuatan ikatan yang berbeda. Perbedaan afinitas ini masih perlu dibuktikan lebih lanjut dengan mengukur kekuatan masing-masing inhibitor pada sisi aktif enzim menggunakan difraktometer sinar-X.<sup>27,28</sup>

Dari penelitian ini aktivitas hambatan ditentukan dari laju reaksi pembentukan dopakrom, sedangkan untuk membentuk dopakrom terdapat dua tahapan reaksi yang berbeda, yaitu hidroksilasi tirosin menjadi dihidroksi fenil alanin (L-dopa) atau aktivitas kresolase, oksidasi L-dopa menjadi dopaquinon atau aktivitas katekolase.<sup>13,27</sup> Dari hasil penelitian belum dapat diketahui apakah EGCG menghambat aktivitas pembentukan dopakrom pada kedua tahapan tersebut atau EGCG hanya bekerja pada satu tahapan saja. Ada kemungkinan EGCG bekerja hanya pada aktivitas katekolase karena struktur molekul yang mempunyai kemiripan lebih besar dengan L-dopa.

Untuk mengetahui secara pasti, masih perlu pembuktian lebih lanjut dengan penelitian terhadap aktivitas tirosinase menggunakan berbagai macam substrat.



## BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN PENELITIAN

### 7.1 Kesimpulan penelitian

Dari analisis hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Profil kurva Lineweaver - Burk dari aktivitas reaksi enzimatik dengan dan tanpa epigalokatekin galat menunjukkan :
  - a. Harga konstanta kinetik  $V_{maks}$  tidak berubah oleh berubahnya konsentrasi epigalokatekin galat
  - b. Harga  $K_M$  makin meningkat oleh peningkatan konsentrasi epigalokatekin galat
  - c. Jenis hambatan epigalokatekin galat terhadap aktivitas tirosinase adalah hambatan kompetitif
2. Epigalokatekin galat mempunyai daya hambat terhadap aktivitas tirosinase 10 kali lebih kecil bila dibandingkan dengan *kojic acid* dalam konsentrasi molar yang sama
3. Makin besar konsentrasi inhibitor EGCG dan *kojic acid* dalam kombinasi, peningkatan daya hambatnya terhadap aktivitas tirosinase tidak sebesar peningkatan daya hambat yang ditimbulkan bila masing-masing inhibitor diberikan dalam bentuk tunggal
4. EGCG memperlemah daya hambat *kojic acid* terhadap aktivitas tirosinase

## 7.2 Saran Penelitian

Dari hasil penelitian ini telah diketahui bahwa Epigalokatekin galat (EGCG) mempunyai aktivitas menghambat tirosinase dengan jenis hambatan kompetitif, oleh karena itu dapat digunakan sebagai pencerah kulit. Dalam penggunaannya sebagai bahan aktif pada sediaan pencerah kulit disarankan untuk tidak memberikan EGCG dalam bentuk kombinasi dengan *kojic acid* ataupun dengan inhibitor tirosinase kompetitif lainnya. Untuk meningkatkan efektivitas pencerahan kulit, EGCG dapat dikombinasi dengan penghambat pigmentasi dengan mekanisme kerja yang berbeda. Untuk mendapatkan aktivitas hambatan terhadap tirosinase yang setara dengan *kojic acid*, penggunaan EGCG hendaknya diberikan dalam konsentrasi sepuluh kali konsentrasi molar *kojic acid* yang lazim digunakan.

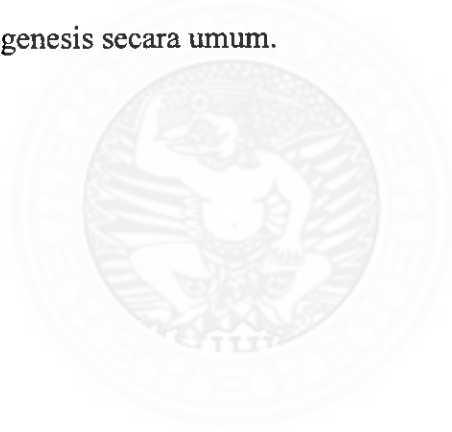
Untuk mengetahui lebih lanjut apakah EGCG berperan dalam setiap aktivitas katalisis tirosinase, masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang hambatan EGCG terhadap hidroksilasi L-tirosin menjadi L-dopa dan oksidasi L-dopa menjadi dopaquinon secara spektrofotometri ataupun *High Performance Liquid Chromatography* menggunakan berbagai macam substrat.<sup>30,31</sup>

Adanya penurunan daya hambat *kojic acid* akibat pengaruh EGCG memerlukan pemahaman lebih lanjut tentang kekuatan ikatan masing-masing inhibitor pada sisi aktif tirosinase, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menentukan kekuatan ikatan EGCG dan *kojic acid* menggunakan difraktometer sinar- X.<sup>26,28</sup>

Hambatan aktivitas tirosinase merupakan salah satu dari berbagai mekanisme hambatan pembentukan melanin epidermal. Untuk mengetahui kemungkinan EGCG

bekerja dengan mekanisme lain dalam pembentukan melanin, perlu diteliti lebih lanjut tentang aktivitas EGCG terhadap penurunan sintesis tirosinase, penurunan transfer tirosinase ataupun kemampuannya dalam menghambat proses pigmentasi kulit secara keseluruhan.<sup>5,13,14,30,31</sup>

Penelitian ini merupakan langkah awal upaya mendapatkan pencerah kulit yang efektif dan aman. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa epigalokatekin galat mempunyai efektivitas yang lebih kecil dibandingkan *kojic acid* dalam hal menghambat aktivitas tirosinase, sehingga masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang daya hambat senyawa-senyawa lain terhadap aktivitas tirosinase ataupun terhadap melanogenesis secara umum.





**DAFTAR PUSTAKA**

1. Megaw J.M., Drake L.A., 1986, Photobiology an overview dalam Jackson E.M. (ed), *Photobiology of the Skin and Eye*, Marcel Dekker Inc., NY-Basel:1-31
2. Bose S.K., Ortonne J.P., 1994, Pigmentation : Dyschromia dalam Baran R., Maibach H.I., (eds), *Cosmetic Dermatology*, Martin Dunitz, London : 277-285
3. Mosher D.B., 1993, Disorder of Melanocytes dalam Fitzpatrick T.B., Eisen A.Z., et. Al. (eds), *Dermatology in General Medicine*, 4<sup>th</sup> ed., Mc Graw Hill, NY : 967-971
4. Castanet J., Orthonne J.P., 1995, Melasma : New Approached to Treatment, Martin Dunitz, London : 1-5
5. Nakayama H, Ebihara T, Satoh N, Jinnai T, 2000, Depigmentation Agents in Elsner, Mailbach H.I. (eds), *Cosmeticeuticals Drugs vs Cosmetics*, Marcel Dekker Inc, New York : 123-144
6. Quevedo W.C., Fitzpatrick T.B., Szabo G., Jombow K., 1993, Biology of Melanocytes dalam Fitzpatrick T.B., Eisen A.Z., et.al (eds), *Dermatology in General Medicine*, 4 th ed, New York, Mc Graw Hill : 261- 263
7. Grimes P.E., 1992, Melasma, Etiologic and Therapeutic Considerations, *Arc. Dermatol.* ; 131 : 1453-7
8. Piamphongsant T, 1988, Treatment of melasma, *Int.J. Dermatol* ;37 : 897-903
9. No J.K., Soung D.Y., Kim Y.J., Shim K.H., Rhee S.H., Yokozawa T., Chung H.Y., 1999, Inhibition of tyrosinase by Green Tea Components, *Life Sciences*, Vol.65 (21) : 241-246
10. Katiyar SK., Matsui MS., Elmets CA., Muchtar H, 2000, Polyphenolic Antioxidant (-) - epigallocatechin -3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leucocytes in human skin, *Photochem. Photobiol*; 69 (2):148-153



11. Sachinidis a., Seul C., Seewald S., Ahn H., Ko Y., Vetter H., 2000, Green tea compounds inhibit tyrosine phosphorylation of PDGF beta receptor and transformation of A<sub>172</sub> human glioblastoma, *FEBS Lett.*; 471(1): 51-5
12. Stratton SP, Bangert JL, Alberts DS, Dorr RT, 2000, Dermal Toxicity of Topical (-) epigallocatechin-3-gallate in BALB/C and SKH 1 mice, *Cancer Lett*; 158(1) : 47-52.
13. Cabanes J, Chazarra S., Carmona F.G.,1994, Kojic acid a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slow-binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase , *J.Pharm.Pharmacol.*;46 : 982-985
14. Tomita K, Oda N, Ohbayashi M., Kamei H, Miyaki T, Oki T, 1990, A New Screening Method for Melanin Biosynthesis Inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*, *The Journal of Antibiotics*; 43(12) :1601-5
15. Boyer R.F. , 1993, Modern Experimental Biochemistry, 2<sup>nd</sup> ed., The Benjamin/Cumming Publishing Co.,Inc, California : 299-321
16. Pomerantz, 1966, The Tyrosine Hydroxylase Activity of mammalian tyrosinase, *J. Biol. Chem*, 241 : 161-168
17. Sakuma K.,Ogawa M.,Sugibayashi K.,Yamada K., Yamamoto K., 1999, Relationship between Tyrosinase Inhibitory Action and Oxidation-Reduction Potential of Cosmetic Whitening Ingredients and Phenol Derivates, *Arc.Pharm.Res*;22(4):335-9
18. Iida K., Hase K., Shimomura K., Sudo S., Kadota S., Namba T, 1995, Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*, *Planta Medica*; 61: 425-428
19. Yagi A., Kanbara T., Morinobu N., 1987, Inhibition of Mushroom tyrosinase by Aloe extract, *Planta Medica* : 515-517
20. <http://www.worthington-biochem.com/manual/P/TY.html>. Polyfenol Oxidase (Tyrosinase)
21. Kubo I., Hori I.K., Yokokawa Y., 1994, Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits, *Journal of natural Products*; 57(4): 545-551

22. Orthono J.P., 1995, Melanin and melanocytes dalam Perspective in Hyperpigmentary Disorders : a role for azeleic acid, *Aids International*, Massashussets : 1-6
23. Sivayathorn A., 1995, Melasma in Orientals, *Clin. Drug. Invest* ; 10(suppl 2): 34-40
24. Katiyar SK., Ahmad N., Elmets CA., Mughtar H, 2000, Green Tea and Skin *Arch.Dermatol* ;136 : 989 –994
25. Dvorakova K, Dorr RT, Valcic S, Timmermann B, Albert DS, 1999, Pharmacokinetics of the Green Tea derivatives EGCG by the topical route of administration in mouse and human skin, *Cancer Chemother. Pharmacol*; 43(4) : 331-5
26. Lehninger A.L., 1977, *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., Worth Publishers Inc., NY : 183-213
27. Palmer T., 1995, *Understanding Enzymes*, 4<sup>th</sup> ed., Prentice Hall - Ellis Horwood : 128 – 151
28. Fersht A., 1985, *Enzyme Structure and Mechanism*, 2<sup>nd</sup> ed., W.H. Freeman and Co., NY : 5,107-115.221-222
29. Ho S., 1993, Biochemistry and Physiology of Melanin dalam Levine N. (ed) : *Pigmentation and Pigmentary Disorders*, CRC Press, I.n., Florida : 33-59
30. Lopez J.N.R., Escribano J., Canovas, 1994, A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, *Analytical Biochemistry* ; 216 : 205-212
31. Steiner U., Schliemann W., Strack D., 1996, Assay for Tyrosine Hydroxylation Activity of Tyrosinase from Betalain-Forming Plants and Cell Cultures, *Analytical Biochemistry*; 238 : 72-75



## Lampiran 1 : Sertifikat analisis L-tirosin



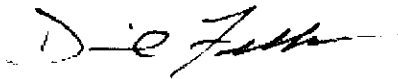
## Certificate of Analysis

TEST	LOT {050K0337} RESULTS
Product Name	L-Tyrosine
Product Number	T8566
CAS Number	60184
Formula	$C_9H_{11}NO_3$
Formula Weight	181.2
APPEARANCE	CONFORMS **
IDENTIFICATION BY IR	PASSES **
SOLUBILITY	CONFORMS
SPECIFIC ROTATION *	-11.9 DEG **
	-10.6 DEG **
CHLORIDE	PASS **
AMMONIUM	PASS **
SULFATE	PASS **
IRON	PASS **
HEAVY METALS	PASS **
ARSENIC	PASS **
LOSS ON DRYING	0.04% **
RESIDUE ON IGNITION	0.0% **
ORGANIC VOLATILES IMPURITIES	CONFORMS **
NINHYDRIN-POSITIVE SUBSTANCES (OTHER AMINO ACIDS)	CONFORMS **
PH TEST	5.6 **
ASSAY (DRY BASIS)	100.0% **
ENDOTOXIN ASSAY	<0.05 EU/MG
CELL CULTURE TEST	PASS
CELL LINE	CHO, L929, BHK-21

**NOTE**

**SHELF LIFE SOP QC-12-006  
QC ACCEPTANCE DATE**

**\*\* SUPPLIER'S  
INFORMATION  
JULY 2003  
JULY 2000**



---

**David Feldker, Manager  
Analytical Services**



Lampiran 2 : Sertifikat analisis *Mushroom tyrosinase*

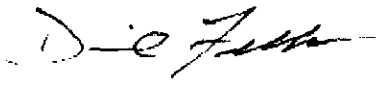
## Certificate of Analysis

TEST	SPECIFICATION	LOT {100K7041} RESULTS
Product Name	Tyrosinase	
Product Number	T7755	
CAS Number	9002102	
APPEARANCE	REPORT RESULT	TAN LYOPHILIZED POWDER
TYROSINASE ACTIVITY	NLT 2000 UNITS/MG SOLID	6,050 UNITS/MG SOLID
UNIT DEFINITION	ONE UNIT WILL CAUSE AN INCREASE IN A280 OF 0.001 PER MINUTE AT PH 6.5 AT 25 DEG C IN A 3 ML REACTION MIX CONTAINING L-TYROSINE.	
UNIT DEFINITION	ONE UNIT WILL CAUSE A DECREASE IN A265 OF 0.001 PER MINUTE AT PH 6.5 AT 25 DEG C. IN A 3 ML REACTION MIXTURE CONTAINING L-BETA-3,4- DIHYDROXYPHENYL- ALANINE (L-DOPA)	
UNIT DEFINITION	ONE UNIT WILL CAUSE A DECREASE IN A265 OF 0.001 PER MINUTE AT PH 6.5 AT 25 DEG C IN A 3 ML REACTION MIXTURE CONTAINING CATECHOL AND ASCORBIC ACID.	
POLYPHENOL OXIDASE	REPORT RESULT	174,00 UNITS/MG

<b>ACTIVITY</b>		<b>SOLID</b>
<b>UNIT DEFINITION</b>	ONE UNIT WILL CAUSE AN INCREASE IN A280 OF 0.001 PER MINUTE AT PH 6.5 AT 25 DEG C IN A 3 ML REACTION MIX CONTAINING L-TYROSINE.	
<b>UNIT DEFINITION</b>	ONE UNIT WILL CAUSE A DECREASE IN A265 OF 0.001 PER MINUTE AT PH 6.5 AT 25 DEG C. IN A 3 ML REACTION MIXTURE CONTAINING L-BETA-3,4-DIHYDROXYPHENYL- ALANINE (L-DOPA)	
<b>UNIT DEFINITION</b>	ONE UNIT WILL CAUSE A DECREASE IN A265 OF 0.001 PER MINUTE AT PH 6.5 AT 25 DEG C IN A 3 ML REACTION MIXTURE CONTAINING CATECHOL AND ASCORBIC ACID.	
<b>CATECHOL OXIDASE ACTIVITY</b>	<b>REPORT RESULT</b>	<b>990,000 UNITS/MG SOLID</b>
<b>UNIT DEFINITION</b>	ONE UNIT WILL CAUSE AN INCREASE IN A280 OF 0.001 PER MINUTE AT PH 6.5 AT 25 DEG C IN A 3 ML REACTION MIX CONTAINING L-TYROSINE.	
<b>UNIT DEFINITION</b>	ONE UNIT WILL CAUSE A DECREASE IN A265 OF 0.001 PER MINUTE AT PH 6.5 AT 25 DEG C. IN A 3 ML REACTION MIXTURE CONTAINING L-BETA-3,4-DIHYDROXYPHENYL- ALANINE (L-DOPA)	
<b>UNIT DEFINITION</b>	ONE UNIT WILL CAUSE A DECREASE IN A265 OF 0.001 PER MINUTE AT PH 6.5 AT 25 DEG C IN A 3 ML REACTION MIXTURE CONTAINING CATECHOL AND ASCORBIC ACID.	
<b>QC</b>		

**ACCEPTANCE  
DATE**

**NOVEMBER  
2000**



---

David Feldker, Manager  
Analytical Services





## Lampiran 3 : Sertifikat analisis Epigallocatekin galat (EGCG)


**Certificate of Analysis**

TEST	SPECIFICATION	LOT {061K1773} RESULTS
Product Name	(-)-Epigallocatechin gallate	
Product Number	E4143	
CAS Number	989515	
Formula	$C_{22}H_{18}O_{11}$	
Formula Weight	458.4	
APPEARANCE	FAINT PINK POWDER	CONFORMS
SOLUBILITY	CLEAR FAINT YELLOW OR FAINT PINK SOLUTION AT 5 MG/ML IN WATER	CLEAR FAINT YELLOW
PROTON NMR SPECTRUM	CONSISTENT WITH STRUCTURE	CONFORMS
PURITY BY HPLC	MINIMUM 95%	98%
SHELF LIFE SOP QC-12-006	2 YEARS	JULY 2003
QC ACCEPTANCE DATE		JULY 2001

---

David Feldker, Manager  
Analytical Services

Lampiran 4 : Sertifikat analisis *Kojic acid***Certificate of Analysis**

TEST	LOT {080K2528} RESULTS
Product Name	Kojic acid
Product Number	K3125
CAS Number	501304
Formula	$C_6H_6O_4$
Formula Weight	142.1
APPEARANCE	FAINT BEIGE POWDER
SOLUBILITY	CLEAR FAINT YELLOW SOLUTION AT 50 MG/ML WATER
IR SPECTRUM	CORRESPONDS
PURITY BY TITRATION	99.6%
PURITY BY HPLC	99.9%
QC ACCEPTANCE DATE	AUGUST 2000

A handwritten signature in black ink, appearing to read "David Feldker".

David Feldker, Manager  
Analytical Services

**Lampiran 5 : Hasil penentuan panjang gelombang maksimum tirosinase dengan pelarut dapar fosfat 0,1 M pH 7,0**

Panjang gelombang (nm)	Nilai Absorpsi			
	1	2	3	Mean
290.0	0.225	0.224	0.225	0,225
289.0	0.228	0.228	0.228	0,228
288.0	0.233	0.232	0.232	0,232
287.0	0.240	0.239	0.239	0,239
286.0	0.246	0.246	0.245	0,246
285.0	0.256	0.255	0.255	0,255
284.0	0.263	0.262	0.262	0,262
283.0	0.270	0.269	0.269	0,269
282.0	0.274	0.272	0.273	0,273
281.0	0.276	0.275	0.275	0,275
280.0	0.276	0.275	0.274	0,275
279.0	0.276	0.275	0.275	0,275
278.0	0.276	0.276	0.276	0,276
277.0	0.275	0.274	0.274	0,274
276.0	0.274	0.273	0.274	0,274
275.0	0.274	0.274	0.274	0,274
274.0	0.272	0.272	0.271	0,272
273.0	0.270	0.269	0.270	0,270
272.0	0.267	0.267	0.267	0,267
271.0	0.264	0.263	0.264	0,264
270.0	0.262	0.261	0.261	0,261

**Lampiran 6 :** Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom yang ditentukan dari hasil reaksi L-tirosin dan tirosinase dalam dapar fosfat 0,1 M pH 7,0 mM

Panjang gelombang (nm)	Nilai Absorpsi (A)			
	1	2	3	Mean
485,0	0,244	0,251	0,242	0,246
484,0	0,245	0,252	0,242	0,246
483,0	0,246	0,253	0,243	0,247
482,0	0,247	0,254	0,243	0,248
481,0	0,248	0,255	0,244	0,249
480,0	0,248	0,255	0,245	0,249
479,0	0,248	0,256	0,245	0,250
478,0	0,249	0,255	0,246	0,250
477,0	0,249	0,256	0,245	0,250
476,0	0,249	0,256	0,246	0,250
475,0	0,249	0,256	0,246	0,250
474,0	0,249	0,256	0,246	0,250
473,0	0,249	0,256	0,246	0,250
472,0	0,249	0,255	0,246	0,250
471,0	0,249	0,256	0,246	0,250
470,0	0,249	0,255	0,246	0,250
469,0	0,249	0,255	0,246	0,250
468,0	0,248	0,255	0,245	0,249
467,0	0,248	0,255	0,245	0,249
466,0	0,248	0,255	0,245	0,249
465,0	0,248	0,255	0,245	0,249

**Lampiran 7 :** Suhu ruang, suhu spektrofotometer, pH larutan dapar dan pH reaksi selama periode penelitian

hari	suhu ruang	Suhu spektro	pH dapar	pH reaksi
1	25,00	25,20	6,87	6,69
2	25,20	25,30	6,87	6,67
3	24,60	25,00	6,87	6,72
4	24,80	25,00	6,87	6,72
5	25,00	25,10	6,88	6,67
6	25,00	25,00	6,88	6,67
7	24,80	25,10	6,87	6,67
8	24,90	25,00	6,85	6,68
9	25,00	25,00	6,88	6,68
10	25,10	25,30	6,88	6,67
11	25,10	25,20	6,88	6,70
12	25,00	25,20	6,87	6,70
13	24,70	24,90	6,87	6,68
14	24,70	24,80	6,87	6,71
15	24,80	25,00	6,87	6,68
16	25,00	25,10	6,86	6,68
17	25,10	25,10	6,87	6,69
18	25,00	25,20	6,87	6,69
19	25,10	25,20	6,86	6,71
20	25,20	25,20	6,86	6,72
21	25,00	25,10	6,86	6,69
22	25,00	25,20	6,86	6,69
n	22	22	22	22
mean	24,96	25,10	6,87	6,69
sd	0,162	0,127	0,008	0,017

**Lampiran 8 : Laju reaksi kontrol**

Laju reaksi yang dikatalisis tirosinase inaktif  
(Inaktivasi tirosinase dengan pemanasan 100°C selama 30 menit)

Waktu (menit)	Nilai absorpsi pada $\lambda$ 475 nm		
	1	2	3
0.0	0.000	0.001	0.000
0.5	0.000	0.000	0.001
1.0	0.001	0.001	0.001
1.5	0.000	0.000	0.001
2.0	0.001	0.000	0.001
2.5	0.001	0.001	0.001
3.0	0.001	0.002	0.001
$\Delta A/mnt$	0.000	0.000	0.000

Laju reaksi tanpa tirosinase

Waktu (menit)	Nilai absorpsi pada $\lambda$ 475 nm		
	1	2	3
0.0	0.000	0.000	0.000
0.5	0.000	0.000	0.000
1.0	0.000	0.001	0.000
1.5	0.000	0.000	0.000
2.0	0.001	0.000	0.000
2.5	0.001	0.001	0.001
3.0	0.001	0.001	0.001
$\Delta A/mnt$	0.000	0.000	0.000

Nilai absorpsi dopakrom pada berbagai konsentrasi tirosinase, *lanjutan*

Tirosinase 1,8775 mg / penetapan (TASE 4)

Waktu (menit)	Nilai absorpsi pada $\lambda$ 475 nm		
	1	2	3
0.0	0.000	0.000	0.000
0.5	0.045	0.052	0.048
1.0	0.093	0.105	0.100
1.5	0.145	0.160	0.153
2.0	0.198	0.216	0.208
2.5	0.253	0.268	0.264
3.0	0.309	0.319	0.320
$\Delta A/mnt$	0.103	0.106	0.107

Tirosinase 2,2088 mg / penetapan (TASE 5)

Waktu (menit)	Nilai absorpsi pada $\lambda$ 475 nm		
	1	2	3
0.0	0.000	0.000	0.000
0.5	0.057	0.057	0.062
1.0	0.119	0.122	0.127
1.5	0.184	0.197	0.194
2.0	0.251	0.260	0.261
2.5	0.318	0.330	0.325
3.0	0.382	0.396	0.383
$\Delta A/mnt$	0.127	0.132	0.128

Tirosinase 2,4297 mg / penetapan (TASE 6)

Waktu (menit)	Nilai absorpsi pada $\lambda$ 475 nm		
	1	2	3
0.0	0.000	0.000	0.000
0.5	0.061	0.061	0.068
1.0	0.132	0.129	0.140
1.5	0.206	0.200	0.214
2.0	0.282	0.273	0.290
2.5	0.356	0.343	0.365
3.0	0.424	0.402	0.440
$\Delta A/mnt$	0.141	0.134	0.147

**Lampiran 10 :Data laju reaksi pembentukan dopakrom dari L-tirosin 1.104 mM pada berbagai konsentrasi tirosinase (TASE)**

Notasi	Konsentrasi Tirosinase		Laju pembentukan dopakrom	
	Replikasi	mg / penetapan	$\Delta A/mnt$	$v$ ( $\mu\text{mol}/mnt$ )
TASE <sub>1</sub>	1	1,1044	0.055	0.076
	2	1,1044	0.054	0.075
	3	1,1044	0.055	0.076
TASE <sub>2</sub>	1	1,3253	0.075	0.104
	2	1,3253	0.070	0.097
	3	1,3253	0.067	0.093
TASE <sub>3</sub>	1	1,6566	0.093	0.129
	2	1,6566	0.091	0.126
	3	1,6566	0.092	0.128
TASE <sub>4</sub>	1	1,8775	0.103	0.143
	2	1,8775	0.106	0.147
	3	1,8775	0.107	0.149
TASE <sub>5</sub>	1	2,2088	0.127	0.176
	2	2,2088	0.132	0.183
	3	2,2088	0.128	0.178
TASE <sub>6</sub>	1	2,4297	0.141	0.196
	2	2,4297	0.134	0.186
	3	2,4297	0.147	0.204



**Lampiran 11 : Laju pembentukan dopakrom dalam berbagai konsentrasi L-tirosin dengan inhibitor EGCG**

L-tirosin				Dopakrom								
	R	[S] mM	1/[S]	E0			E1			E2		
				$\Delta A/$ mnt	Umol/ mnt	1/v	$\Delta A/$ mnt	Umol/ mnt	1/v	$\Delta A/$ mnt	Umol/ mnt	1/v
T1	1	0.1104	9.06	0.050	0.069	14.40	0.046	0.064	15.65	0.041	0.057	17.56
	2	0.1104	9.06	0.050	0.069	14.40	0.045	0.062	16.00	0.039	0.054	18.46
	3	0.1104	9.06	0.051	0.071	14.12	0.045	0.062	16.00	0.038	0.053	18.95
T2	1	1.2208	4.53	0.077	0.107	9.35	0.070	0.097	10.29	0.063	0.087	11.43
	2	1.2208	4.53	0.078	0.108	9.23	0.069	0.096	10.43	0.063	0.087	11.43
	3	1.2208	4.53	0.078	0.108	9.23	0.073	0.101	9.86	0.062	0.086	11.61
T3	1	0.3312	3.02	0.091	0.126	7.94	0.080	0.111	9.00	0.079	0.110	9.11
	2	0.3312	3.02	0.089	0.124	8.09	0.083	0.115	8.67	0.080	0.111	9.00
	3	0.3312	3.02	0.091	0.126	7.94	0.086	0.119	8.37	0.078	0.108	9.23
T4	1	0.4416	2.26	0.107	0.149	6.73	0.094	0.130	7.66	0.091	0.126	7.91
	2	0.4416	2.26	0.105	0.146	6.86	0.091	0.126	7.91	0.088	0.122	8.18
	3	0.4416	2.26	0.097	0.135	7.42	0.099	0.137	7.27	0.087	0.121	8.28
T5	1	0.5520	1.81	0.115	0.160	6.26	0.095	0.132	7.58	0.093	0.129	7.74
	2	0.5520	1.81	0.108	0.150	6.67	0.102	0.142	7.06	0.094	0.130	7.66
	3	0.5520	1.81	0.099	0.137	7.27	0.101	0.140	7.13	0.094	0.130	7.66

**Lampiran 13** : Data hasil perhitungan daya hambat aktivitas tirosinase rata-rata oleh kombinasi EGCG dan *kojic acid*

EGCG		Kojic acid			
Konsentrasi		K <sub>0</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>
		0 mM	0.005 mM	0.01 mM	0.012 mM
		Nilai % inhibisi			
E <sub>0</sub>	0 mM	0	21,87	35,16	41,41
E <sub>1</sub>	0,05 mM	16,41	26,69	46,09	47,66
E <sub>2</sub>	0,10 mM	36,72	46,09	49,22	52,34
E <sub>3</sub>	0,12 mM	46,09	51,56	53,91	57,03

