

MOMOPHENOL MONOOXYGENASE

SKRIPSI

SUHARSANTI RAHAYU

PERBANDINGAN DAYA HAMBAT ASAM-3,4-DIHIDROKSISINAMAT DAN ASAM PIPERONIL AKRILAT TERHADAP AKTIVITAS TIROSINASE



FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2003

Lembar Pengesahan

**PERBANDINGAN DAYA HAMBAT
ASAM-3,4-DIHIDROKSISINAMAT DAN ASAM
PIPERONIL AKRILAT TERHADAP AKTIVITAS
TIROSINASE**

SKRIPSI

**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat
Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2003**

Oleh :

**Suharsanti Rahayu
NIM : 059912131**



Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Tutuk Budiati".

Dr. Tutuk Budiati, Apt., M.S
NIP. 130 531 780

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Juni Ekowati".

Dra. Juni Ekowati, Apt., M.Si
NIP. 132 009 462

RINGKASAN

Mekanisme kerja bahan aktif pencerah kulit sangat beragam, salah satunya adalah dengan menghambat pembentukan melanin. Enzim utama yang berperan dalam pembentukan melanin adalah tirosinase. Pada proses tersebut, tirosinase berperan dalam mengkatalisis dua reaksi yang berbeda yaitu hidrosilasi tirosin menjadi dihidroksifenilalanin (DOPA) yang disebut dengan aktivitas kresolase dan oksidasi dopa menjadi dopakuinon atau aktivitas katekolase. Bila terjadi hambatan pada aktivitas tirosinase, maka pigmen melanin akan berkurang atau tidak terbentuk.

Asam sinamat dan turunannya memiliki struktur kimia yang mirip dengan L-tirosin, substrat dari tirosinase. Penelitian yang dilakukan oleh Lee dkk., 2000 menyatakan bahwa asam sinamat dapat menghambat aktivitas tirosinase dan penelitian yang dilakukan oleh Yamazaki dkk., 2002 menyatakan bahwa asam-2,4-dihidroksisinamat juga dapat menghambat aktivitas tirosinase. Oleh karena itu, senyawa turunan sinamat lainnya juga diharapkan dapat memberikan efek yang sama pada reaksi tersebut.

Untuk mengetahui hal tersebut dan dalam rangka pencarian bahan aktif pencerah kulit baru, dilakukan penelitian yang menguji hambatan turunan asam sinamat terhadap aktivitas tirosinase. Pada penelitian ini dipilih asam-3,4-dihidroksisinamat dan asam piperonil akrilat (asam-3,4-metilendioksisinamat). Pemilihan kedua senyawa tersebut selain karena mirip dengan L-DOPA juga karena dapat diketahui pengaruh substituen dari kedua senyawa tersebut terhadap hambatan aktivitas tirosinase.

Aktivitas kedua senyawa tersebut terhadap tirosinase ditentukan secara *in vitro* dengan melakukan pengamatan nilai absorbansi produk (dopakrom) yang dihasilkan dari reaksi tirosinase dengan substrat L-tirosin. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer.

Berbagai metode dapat digunakan untuk menentukan aktivitas hambatan tirosinase, namun pada penelitian ini digunakan metode yang merupakan modifikasi dari metode Boyer (1993) dan Calzyme (1998). Prosedur kerja untuk penghambatan aktivitas tirosinase adalah sebagai berikut larutan L-tirosin ditambah larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,0. Kemudian ditambah dengan larutan senyawa uji dalam tabung reaksi. Larutan ini dioksidasi selama 5 menit. Lalu ditambahkan larutan tirosinase dan diukur absorbansinya (A_0). Kemudian campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C. Setelah waktu inkubasi berakhir dilakukan pengukuran absorbansi (A_{30}) pada panjang gelombang maksimum dopakrom (480 nm).

Nilai absorbansi yang diperoleh diubah menjadi nilai absorbansi tiap menit ($\Delta A/\text{menit}$) yang kemudian diubah lagi menjadi aktivitas enzim ($\mu\text{mol}/\text{menit}$) secara perhitungan dengan menggunakan persamaan Lambert-Beer. Tipe hambatan asam-3,4-dihidroksisinamat dan asam piperonil akrilat diperoleh dengan menganalisis profil kurva Lineweaver-Burk. Daya hambat kedua senyawa terhadap aktivitas tirosinase ditunjukkan oleh nilai %inhibisi yang didapat dengan membandingkan nilai $\Delta A/\text{menit}$ yang diperoleh dari reaksi tanpa inhibitor dan dengan inhibitor secara perhitungan.

Dari profil kurva Lineweaver-Burk diperoleh hasil nilai V_{maks} dari reaksi yang tanpa inhibitor dan yang dengan asam-3,4-dihidroksisinat adalah tetap sedangkan harga K_m berubah, sehingga dapat disimpulkan bahwa asam-3,4-dihidroksisinat dapat menghambat aktivitas tirosinase dengan tipe hambatan kompetitif. Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh profil kurva Lineweaver-Burk tanpa dan dengan asam piperonil akrilat. Nilai V_{maks} maupun K_m nya berubah. Pada kurva, titik potong kedua reaksi terletak di sebelah kiri sumbu y dan di atas sumbu x, sehingga asam piperonil akrilat disimpulkan dapat menghambat aktivitas tirosinase dengan tipe hambatan campuran yaitu secara kompetitif-nonkompetitif.

Daya hambat yang ditunjukkan dengan nilai %inhibisi dari kedua senyawa tersebut berbeda. Asam-3,4-dihidroksisinat dengan konsentrasi substrat 0,5 mM memiliki daya hambat sebesar 40,1% dan asam piperonil akrilat dengan konsentrasi substrat yang sama memiliki daya hambat 25,4%. Dari penelitian ini dapat dilihat bahwa daya hambat asam-3,4-dihidroksisinat lebih besar dari asam piperonil akrilat. Dari uraian diatas dapat disimpulkan bahwa perubahan substitusi gugus dihidroksi menjadi metilendioksi mengakibatkan perubahan letak interaksi enzim-inhibitor dan mengakibatkan penurunan daya hambat.



ABSTRACT

Tyrosinase is known to be a key enzyme for melanin biosynthesis. Therefore, inhibition in tyrosinase activity will cause a decreasing in melanin production.

The inhibition of cinnamic acid and its substituted compound against tyrosinase has been studied as the effort to find a new effective skin-lightening agent. Two of the cinnamic acid substituted compound, 3,4-dihydroxycinnamic acid and piperonil acrylic acid, were tested to know its effect on inhibiting tyrosinase.

To asses the efficacy of tyrosinase inhibition, tyrosinase activity using L-Tyrosine as a substrate was assayed spectrofotometrically with the dopachrome method.

The inhibition kinetic of 3,4-dihydroxycinnamic acid and piperonil acrylic acid were analyzed using a Lineweaver-Burk plot. Lineweaver-Burk plots in the absence and presence of 3,4-dihydroxycinnamic acid showed that this compound inhibits tyrosinase competitively. Lineweaver-Burk plots in the absence and presence of piperonil acrylic acid showed that this compound is a mix inhibitor (competitive-noncompetitive).

Key words: tyrosinase, 3,4-dihydroxycinnamic acid, piperonil acrylic acid, and inhibitory activity

