

## INHIBITORY POTENTIAL OF SOME SYNTHETIC CINNAMIC ACID DERIVATIVES TOWARDS TYROSINASE ENZYME

### Daya Hambat Beberapa Turunan Asam Sinamat Sintetik Terhadap Enzim Tirosinase

Lanny Hartanti\* and Henry Kurnia Setiawan

Faculty of Pharmacy, Widya Mandala Catholic University, Jl. Dinoyo 42-44 Surabaya 60265

Received October 17, 2008; Accepted March 4, 2009

#### ABSTRACT

Cinnamic acid is one of known tyrosinase inhibitors. This study investigated the inhibition of tyrosinase activity of some cinnamic acid derivatives, i.e. 4-butoxy-cinnamic acid, 4-n-butylcinnamic acid and 4-phenylcinnamic acid. Each inhibitor used in this research had the same type of inhibition towards enzymatic activity, i.e. mixed type inhibition of competitive and non competitive type. The potential sequence of tyrosinase inhibition based on the ratio of its  $IC_{50}$  compared to cinnamic acid, from the lowest to the highest were 4-butoxycinnamic acid, 4-phenylcinnamic acid and 4-n-butylcinnamic acid. Based on the obtained results of this research, it was disclosed that *n*-butyl substituent on para position did not increase the inhibition effect of cinnamic acid towards tyrosinase enzymatic reaction. But in the other hand, butoxy and phenyl substituent on para position could increase the inhibition effect of cinnamic acid towards tyrosinase enzymatic reaction because butoxy substituent increased the similarity of its structure with the substrate of enzymatic reaction while phenyl substituent blocked the substrate-enzyme reaction.

**Keywords:** tyrosinase; L-DOPA; inhibition kinetics;  $IC_{50}$ , cinnamic acid

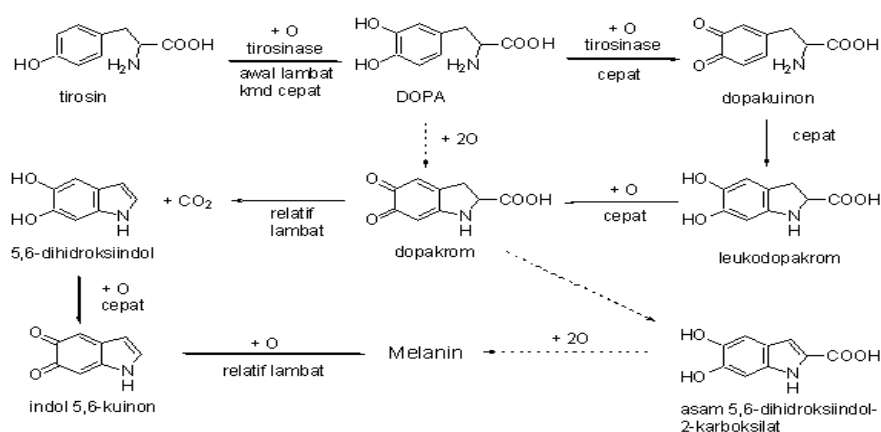
#### PENDAHULUAN

Warna kulit manusia tergantung pada jumlah, ukuran, jenis dan distribusi partikel sitoplasma yang disebut melanosom. Melanosom mengandung *biochrome* coklat yaitu melanin. Dengan demikian keberadaan melanin pada kulit sangat mempengaruhi warna kulit [1]. Proses pembentukan melanin dijelaskan oleh skema pada gambar 1 [2].

Kulit yang berwarna cerah merupakan dambaan banyak orang, khususnya wanita. Berbagai produk pencerah kulit saat ini menjadi trend dalam bidang kosmetika. Prinsip utama dari produk pencerah kulit ialah menghambat pembentukan melanin. Tirosinase

merupakan enzim yang berfungsi mengatur biosintesis melanin. Pembentukan melanin dapat dihambat dengan cara menurunkan sintesis tirosinase, menurunkan transfer tirosinase, dan menghambat aktivitas tirosinase [3].

Salah satu senyawa yang dikenal sebagai penghambat tirosinase ialah asam sinamat [4]. Asam sinamat adalah senyawa bahan alam yang terdapat dalam berbagai tanaman, misalnya mesoyi (*Messويا aromatica Becc*) dan kemenyan (*Styrax sp.*). Senyawa ini memiliki berbagai aktivitas biologis, antara lain antibakteri, anestetik, antiinflamasi, antispasmodik, antimutagenik, fungisida, herbisida [5] serta penghambat enzim tirosinase [4].



**Gambar 1.** Skema pembentukan melanin (Balsam and Sagarin [2])

\* Corresponding author. Tel : +62-31-5678478 ext. 177  
Email address : lanny\_hart@yahoo.co.id

Salah satu turunan asam sinamat yang terdapat di alam ialah etil *p*-metoksisinamat yang terdapat dalam rimpang kencur (*Kaempferia galanga*). Contoh lain ialah asam 3-etoksi-4-hidroksisinamat yang terdapat dalam daun sicerek (*Clausena excavata*, *Burm.f.*).

Beberapa contoh turunan asam sinamat sintetik yang memiliki aktivitas farmakologi adalah asam 4-hidroksisinamat, asam 3,4-dihidroksisinamat, asam 4-hidroksi-3-metoksisinamat dan asam 3,4-dihidroksisinamat yang memiliki aktivitas antioksidan [6]. Amida tersier dari asam 3,4-dimetoksisinamat dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi dan analgesik [7].

Asam *p*-metoksisinamat, yang dapat diperoleh dari hidrolisis etil *p*-metoksisinamat, dilaporkan memiliki aktivitas analgesik [8]. Asam *p*-metoksisinamat merupakan turunan asam sinamat yang digunakan sebagai bahan awal sintesis bahan-bahan aktif untuk sediaan tabir surya seperti 2-etilheksil-*p*-metoksisinamat, 2-etoksietil-*p*-metoksisinamat dan dietanolamina-*p*-metoksisinamat [9]. Telah pula dilaporkan sintesis asam 3-alkoksi-4-metoksi-6-nitrosinamat [10].

Asam sinamat dan turunannya memiliki struktur yang mirip dengan L-tirosin, sehingga dapat menghambat aktivitasnya secara kompetitif dan dapat digunakan sebagai pemutih kulit [3], serta insektisida [11, 12]. Struktur asam sinamat juga memenuhi syarat untuk dikembangkan sebagai senyawa analgesik-antiinflamasi [13, 14].

Salah satu strategi penting dalam pengembangan obat baru adalah dengan cara membuat turunan-turunan dari senyawa yang sudah diketahui aktivitasnya, kemudian menguji aktivitas turunan-turunan tersebut [15]. Pada penelitian terdahulu [16], untuk tujuan lain telah disintesis asam sinamat dan beberapa turunannya, yakni asam 4-butoksisinamat, asam 4-*n*-butilsinamat, dan asam 4-fenilsinamat melalui reaksi Knoevenagel dengan bahan awal benzaldehida, 4-butoksibenzaldehida, 4-*n*-butilbenzaldehida dan 4-fenilbenzaldehida.

Adanya gugus *n*-butil dan fenil pada turunan asam sinamat secara teoritis akan meningkatkan lipofilitas senyawa [17] sehingga lebih mudah menembus membran sel dan akan meningkatkan ketersediaan senyawa untuk berinteraksi dengan enzim tirosinase. Konsekuensi lain penambahan gugus alkil atau aril ialah meningkatkan halangan sterik [17] sehingga kemungkinan dapat menghalangi interaksinya dengan enzim. Adanya atom oksigen pada gugus butoksi dari asam 4-butoksisinamat meningkatkan kemiripan strukturnya dengan L-tirosin yang merupakan substrat dari tirosinase, sehingga secara teoritis akan meningkatkan daya hambatnya. Semua hal tersebut memerlukan pengungkapan dan pembuktian melalui penelitian.

Dari penelitian ini diharapkan dapat diketahui besarnya daya hambat senyawa-senyawa turunan asam

sinamat tersebut dengan cara menentukan persentase hambatannya. Senyawa yang memiliki daya hambat paling besar akan menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat dikembangkan sebagai pencerah kulit yang efektif.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah *mushroom tyrosinase* 50.000 unit (Sigma), L-DOPA (Fluka), natrium dihidrogen fosfat (RDH), dinatrium hidrogen fosfat (RDH), asam sinamat hasil sintesis, asam 4-butoksisinamat hasil sintesis, asam 4-*n*-butilsinamat hasil sintesis, asam 4-fenilsinamat hasil sintesis, dimetilsulfoksida (Sigma), lempeng KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), heksana (Brataco), etil asetat (Malin Crodth), asam asetat (Malin Crodth), kloroform (Brataco), aseton (Brataco), etanol (Merck), dan akuades.

### Alat

Peralatan yang digunakan ialah spektrofotometer Shimadzu UV-160, spektrofotometer Hitachi U-1800, mikropipet Socorex berbagai volume, pH-meter Fisher Accumet Model 230A pH/ion meter, neraca analitik Sartorius Bp 110S, termometer, labu takar berbagai volume, chamber Camag, dan *melting point apparatus* Gallenkamp.

### Prosedur Kerja

#### Pemurnian senyawa uji

Terhadap asam sinamat, asam 4-butoksisinamat, asam 4-*n*-butilsinamat, dan asam 4-fenilsinamat yang merupakan hasil sintesis dari penelitian sebelumnya dilakukan uji kemurnian, meliputi uji titik leleh dan uji kromatografi lapis tipis (KLT) dengan tiga macam fase gerak. Bila terdapat pengotor maka dilakukan pemurnian dengan kromatografi kolom menggunakan fasa diam silika gel dan fase gerak heksana - etil asetat (2:1).

#### Penyiapan larutan 0,1 M bufer fosfat pH 7,0

Larutan bufer fosfat dibuat dari dua bahan, yaitu larutan *monobasic sodium phosphat* 0,2 M (larutan A) dan larutan *dibasic sodium phosphat* 0,2 M (larutan B). Larutan A dibuat dengan menimbang 31,2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O dan dilarutkan dalam air suling sampai 1000 mL. Larutan B dibuat dengan menimbang 28,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dan dilarutkan dalam air suling sampai 1000 mL.

Larutan 0,1 M bufer fosfat pH 7,0 dibuat dengan mencampur 39 mL larutan A dan 61 mL larutan B, kemudian pH *diadjust* sampai pH 7,0 dan diencerkan sampai volume 200 mL.

#### **Penyiapan larutan tirosinase**

*Mushroom tyrosinase* 12,5 mg ~ 50 kU dilarutkan dalam 0,1 M bufer fosfat pH 7,0 sampai volume 50 mL. Kemudian dilakukan pengenceran sampai diperoleh serapan 0,173 – 0,177 pada  $\lambda$  280 nm. Larutan ini digunakan sebagai larutan baku.

#### **Penyiapan larutan L-DOPA**

Larutan baku L-DOPA 10,0 M dibuat dengan melarutkan 50,0 mg L-DOPA dalam larutan bufer fosfat 0,1 M pH 7,0 sampai volume 25,0 mL. Larutan ini kemudian diencerkan menjadi 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 mM.

#### **Penyiapan larutan asam sinamat 80,0 mM**

Larutan asam sinamat 80,0 mM dibuat dengan cara menimbang 59,28 mg asam sinamat dan dilarutkan dalam DMSO sampai volume 5,0 mL. Larutan ini digunakan sebagai larutan induk. Larutan asam sinamat dengan konsentrasi berbeda disiapkan dari larutan ini dengan pengenceran yang sesuai.

#### **Penyiapan larutan asam 4-butoksisinamat**

Larutan asam 4-butoksisinamat 20,0 mM sebagai larutan induk dibuat dengan cara menimbang 22,12 mg asam 4-butoksisinamat dan dilarutkan dalam DMSO sampai volume 5,0 mL. Larutan asam 4-butoksisinamat dengan konsentrasi berbeda disiapkan dari larutan ini dengan pengenceran yang sesuai.

#### **Penyiapan larutan asam 4-n-butilsinamat**

Larutan asam 4-*n*-butilsinamat 108 mM sebagai larutan induk dibuat dengan cara ditimbang 110,7 mg asam 4-*n*-butilsinamat dan dilarutkan dengan DMSO hingga 5,0 mL. Larutan asam 4-*n*-butilsinamat dengan

konsentrasi berbeda disiapkan dari larutan ini dengan pengenceran yang sesuai.

#### **Penyiapan larutan asam 4-fenilsinamat**

Larutan induk asam 4-fenilsinamat 21,4 mM dibuat dengan melarutkan 23,99 mg asam 4-fenilsinamat dalam 5,0 mL DMSO. Larutan asam 4-fenilsinamat dengan konsentrasi berbeda disiapkan dari larutan ini dengan pengenceran yang sesuai.

#### **Optimasi Kondisi Penelitian**

Kondisi penelitian yang harus dioptimasi untuk memperoleh kondisi optimum kerja tirosinase adalah konsentrasi enzim, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi.

Prosedur kerja secara umum diadaptasi dari Boyer [18] yaitu sebagai berikut: larutan L-DOPA ditambah dengan larutan bufer fosfat 0,1 M pH 7,0 dalam kuvet, kemudian ditambahkan larutan tirosinase volume tertentu dan dihomogenkan. Campuran larutan diamati absorbansinya pada waktu 0 menit dan selanjutnya dilakukan pengamatan dan pengukuran serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dopakrom (475 nm) setiap 30 detik pada suhu optimum enzim yaitu 25-30 °C dan pH optimum 7,0. Untuk masing-masing optimasi prosedur dilakukan dua kali replikasi.

Pada penentuan konsentrasi enzim dan substrat optimum, digunakan larutan baku tirosinase yang memiliki serapan serapan 0,173 – 0,177 pada  $\lambda$  280 nm pada berbagai volume, serta variasi konsentrasi substrat (L-DOPA) 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 mM. Sedangkan penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan pengamatan serapan produk dopakrom dengan interval waktu setiap 30 detik selama 5 - 10 menit atau sampai diperoleh serapan yang maksimal, kemudian dibuat grafik antara *t* (menit) vs. absorbansi. Waktu inkubasi dipilih berdasarkan hasil korelasi yang masih menunjukkan hubungan linier (first order). Rancangan komposisi bahan sama dengan tabel 1, tanpa penambahan inhibitor.

**Tabel 1.** Rancangan komposisi pereaksi penentuan tipe hambatan inhibitor

Bahan	Komposisi volume (mL)				
	I	II	III	IV	V
L-DOPA	1,50 (1,0 mM)	1,50 (1,5 mM)	1,50 (2,0 mM)	1,50 (2,5 mM)	1,50 (3,0 mM)
Bufer fosfat*)	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
Inhibitor	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Tirosinase*)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

Catatan: \*) volume tirosinase dan bufer fosfat sesuai hasil optimasi,  
 Blanko: Bufer fosfat 3,00 ml

### Penentuan Parameter Karakteristik Aktivitas Tirosinase

Parameter karakteristik aktivitas tirosinase adalah  $K_M$  dan  $V_{maks}$ . Untuk menentukan parameter karakteristik ini dilakukan variasi konsentrasi L-DOPA. Pada tahap ini untuk volume pereaksi yang digunakan serta lama waktu inkubasi adalah sesuai dengan hasil optimasi konsentrasi tirosinase yang telah dilakukan. Rancangan komposisi bahan penelitian sesuai tabel 1, tanpa penambahan inhibitor.

### Penentuan Tipe Hambatan Inhibitor

Perlakuan kerja pada penentuan tipe hambatan ini sesuai prosedur kerja umum. Konsentrasi tirosinase dan lama waktu inkubasi disesuaikan dengan hasil optimasi. Pada penentuan tipe hambatan inhibitor (asam sinamat, asam 4-butok-sisinat, asam 4-*n*-butilsinat dan asam 4-fenilsinat) digunakan tiga macam variasi konsentrasi inhibitor dengan rancangan komposisi pereaksi sesuai tabel 1.

### Penentuan Pengaruh DMSO 100% terhadap Aktivitas Tirosinase

Perlakuan dari tahap ini sama dengan prosedur umum penentuan tipe hambatan inhibitor (tabel 1) tetapi inhibitor diganti dengan DMSO 100%. Tahap ini dilakukan untuk mengamati apakah DMSO 100% yang digunakan sebagai pelarut inhibitor (senyawa uji) mempunyai aktivitas penghambatan terhadap aktivitas tirosinase. Jika memang ada hasil dari tahap ini digunakan sebagai faktor koreksi terhadap aktivitas penghambatan dari masing-masing inhibitor yang digunakan.

### Teknik Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menganalisis profil kurva Lineweaver-Burk yang dihasilkan dari seluruh pengamatan aktivitas reaksi enzimatis pada berbagai konsentrasi substrat L-DOPA (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 mM). Kurva Lineweaver-Burk adalah hubungan antara resiprokal aktivitas enzim ( $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ) vs resiprokal konsentrasi substrat (1/mM).

Pengubahan  $\Delta A/\text{menit}$  menjadi  $M/\text{menit}$  dilakukan berdasarkan persamaan Lambert-Beer :

$$C = \frac{A}{(E \times l)} \quad (1)$$

dimana,  $C$  = konsentrasi dopakrom ( $M/\text{menit}$ );  $A$  = serapan tiap menit ( $/\text{menit}$ );  $E$  = serapan molar dopakrom ( $3600/M.cm$ );  $l$  = panjang kuvet yang dilalui cahaya (= 1 cm).

Perhitungan konsentrasi dopakrom ( $C$ ) dari  $M/\text{menit}$  menjadi bentuk  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ , digunakan rumus :

$$C = \frac{(A \times 3 \times 1000)}{(3600 \times l)} \quad (2)$$

dimana,  $C$  = konsentrasi dopakrom ( $\mu\text{mol}/\text{menit}$ );  $A$  = serapan tiap menit ( $/\text{menit}$ ); 3 = volume larutan uji (ml); 1000 = faktor konversi dari mmol ke  $\mu\text{mol}$ ;  $l$  = panjang kuvet yang dilalui cahaya (= 1 cm); 3600 = serapan molar dopakrom ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ).

Harga  $C$  yang didapat diolah menjadi  $V$  ( $1/C$ ) dan dimasukkan ke dalam persamaan Lineweaver-Burk, sebagai berikut :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{maks}} + \left( \frac{K_M}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]} \right) \quad (3)$$

Harga  $V_{maks}$  dapat dihitung dari  $1/\text{intersept}$  ( $a$ ), dan harga  $K_M$  adalah slope ( $b$ ) x  $V_{maks}$ .

Penentuan tipe hambatan inhibitor dengan membandingkan harga  $K_M$  dan  $V_{maks}$  dengan dan tanpa inhibitor. Tipe hambatan kompetitif didapat bila harga  $V_{maks}$  tetap, hambatan non kompetitif bila harga  $K_M$ -nya yang tetap, sedang hambatan *uncompetitive* bila harga  $V_{maks}$  dan  $K_M$  berbeda – tetapi memiliki harga slope yang sama.

Untuk penentuan % daya hambat inhibitor dihitung dengan menggunakan persamaan :

$$\% \text{ Daya Hambat} = 100 - \frac{(A \times 100)}{B} \quad (4)$$

dimana,  $A$  = perubahan nilai serapan ( $\Delta A/\text{menit}$ ) dengan *inhibitor*; dan  $B$  = perubahan nilai serapan ( $\Delta A/\text{menit}$ ) tanpa *inhibitor*.

Penentuan konsentrasi substrat yang terpilih untuk perhitungan  $IC_{50}$  diperoleh dengan cara membuat grafik antara konsentrasi inhibitor yang digunakan (sumbu  $x$ ) dengan % daya hambat (sumbu  $y$ ) pada berbagai konsentrasi substrat L-DOPA (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 mM), kemudian dicari persamaan regresi ( $y=a+bx$ ). Kemudian dipilih pada konsentrasi substrat dimana grafik antara berbagai konsentrasi inhibitor vs % daya hambat yang paling linier.

Setelah terpilih konsentrasi substrat untuk perhitungan  $IC_{50}$ , maka dimasukkan persen hambatan 50% (sebagai nilai  $y$ ) ke dalam persamaan regresi antara konsentrasi inhibitor vs % daya hambat, sehingga diperoleh konsentrasi inhibitor yang memberikan hambatan sebesar 50%, atau menggunakan uji analisis Probit.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahap pertama yang dilakukan adalah penentuan kemurnian senyawa uji dengan dua metode, yaitu penentuan titik leleh serta uji KLT. Hasil penentuan titik leleh (tabel 2) menunjukkan bahwa rentang titik leleh sempit dan tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian

**Tabel 2.** Rentang titik leleh senyawa inhibitor hasil sintesis

Senyawa inhibitor	No. Replikasi	Titik leleh (°C)	Rentang titik leleh (°C)	Rentang titik leleh literatur (°C) <sup>*)</sup>
Asam sinamat	1	132,0-133,0	131,0-133,0	131,5-132,5
	2	132,5-133,0		
	3	131,0-132,0		
Asam 4-butoksisinamat	1	150,0-151,0	150,0-152,0	151,3-152,3
	2	150,5-151,5		
	3	151,0-152,0		
Asam 4- <i>n</i> -butilsinamat	1	142,0-143,0	141,5-143,0	139,0-140,0
	2	141,5-142,5		
	3	141,5-142,5		
Asam 4-fenilsinamat	1	219,0-220,0	219,0-221,0	219,5-220,5
	2	220,0-221,0		
	3	219,0-220,0		

Keterangan: Data diambil dari :<sup>\*)</sup> Rudyanto and Hartanti [16].

**Tabel 3.** Harga  $K_M$  dan  $V_{maks}$  enzim tirosinase pada berbagai pengujian senyawa inhibitor

Pengujian senyawa inhibitor	Harga $K_M$ (mM)	Harga $V_{maks}$ ( $\mu\text{mol}/\text{menit}$ )
Asam 4-fenilsinamat	2,1948	0,2523
Asam 4- <i>n</i> -butilsinamat	2,1948	0,2523
Asam 4-butoksisinamat	0,5715	0,1110
Asam sinamat	0,4680	0,1816

sebelumnya, sehingga keempat senyawa uji tersebut murni. Hasil pengujian KLT keempat senyawa uji memberikan satu noda tunggal pada tiga macam fase gerak yang berbeda kepolarannya, yaitu heksana - asam asetat - kloroform (5:1:4); kloroform - aseton - asam asetat (10:5:0,5) dan heksana - etil asetat (2:1). Berdasarkan hasil pengujian tersebut dapat disimpulkan bahwa keempat senyawa uji murni secara KLT.

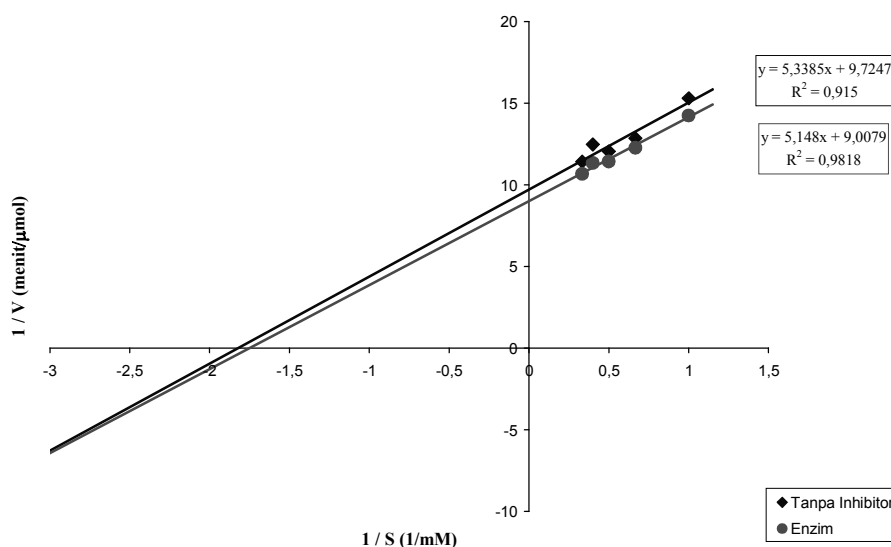
Aktivitas enzim bergantung pada beberapa faktor seperti konsentrasi substrat, konsentrasi kofaktor, pH dan temperatur. Pada penelitian ini suhu inkubasi reaksi katalisis tirosinase dikendalikan pada 25-30 °C, sedangkan pH dikendalikan pada pH optimum enzim yaitu 6,0-7,0. Substrat yang digunakan pada penelitian ini adalah L-DOPA untuk memotong jalur reaksi hidrosilasi tirosin menjadi L-DOPA (Gambar 1) yang biasanya dilakukan dengan proses oksigenasi tirosin selama 30 menit. Konsentrasi substrat L-DOPA merupakan variabel bebas, dipilih konsentrasi substrat yang mampu menjenuhkan enzim, yaitu 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 mM. Konsentrasi enzim tirosinase yang terpilih adalah 0,20 mL dalam larutan uji 3,00 mL (sesuai rancangan komposisi tabel 1) atau setara dengan 66,67

U/mL. Waktu inkubasi pengamatan reaksi enzimatik tirosinase adalah 3 menit karena kurva Lineweaver-Burk pada rentang waktu ini yang paling linier dan memenuhi syarat  $r_{hitung}$  ( $\alpha = 0,05$ ) 0,895 lebih besar dari  $r_{tabel}$  ( $\alpha = 0,05$ ) 0,878;  $\Delta A/\text{menit}$  rata-rata pada rentang waktu 3 menit memenuhi syarat 0,025 - 0,250  $\text{menit}^{-1}$  [18].

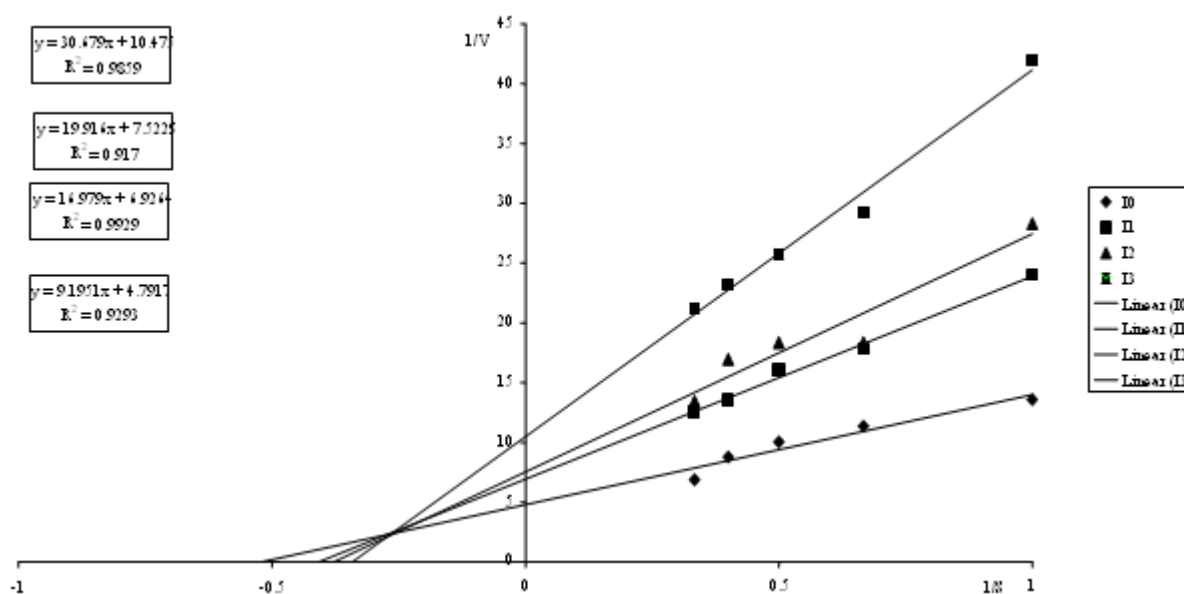
Penentuan parameter karakteristik enzim tirosinase ( $K_M$  dan  $V_{maks}$ ) dilakukan pada hari yang sama dengan pengujian tipe hambatan senyawa inhibitor yang digunakan untuk menghindari perbedaan hasil akibat aktivitas enzim yang sangat tidak stabil. Pada penelitian ini digunakan empat jenis senyawa inhibitor sehingga diperoleh lebih dari satu jenis harga  $K_M$  dan  $V_{maks}$  enzim tirosinase seperti yang disajikan pada tabel 3.

Pada pengujian tipe hambatan dan daya hambat dari keempat senyawa uji tersebut juga dilakukan pengujian terhadap pengaruh pelarut inhibitor yang digunakan, yaitu Dimetilsulfoksida (DMSO) 100%. DMSO yang digunakan sebagai pelarut inhibitor ternyata dapat memberikan pengaruh terhadap aktivitas tirosinase. Aktivitas tirosinase akan berkurang dengan penambahan DMSO. Oleh karena itu, pada percobaan selanjutnya besarnya hambatan yang disebabkan DMSO pada tahap ini akan digunakan sebagai kontrol pada penentuan daya dan tipe hambatan senyawa uji. Berdasarkan gambar 2, tampak bahwa DMSO memberikan hambatan terhadap aktivitas enzim tirosinase dengan tipe hambatan campuran antara non kompetitif dan unkompetitif.

Pengujian daya hambat maupun tipe hambatan enzim tirosinase dari masing-masing senyawa uji (asam 4-*n*-butilsinamat, asam 4-fenilsinamat dan asam



**Gambar 2.** Kurva Lineweaver-Burk dengan dan tanpa penambahan DMSO pada pengujian asam sinamat



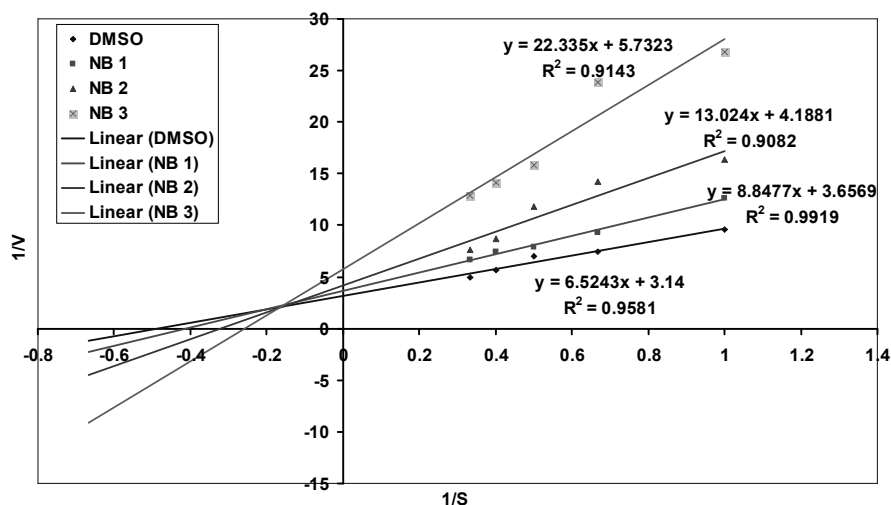
**Gambar 3.** Kurva Lineweaver-Burk tipe hambatan asam sinamat

4-butoksisinamat) dilakukan paralel dengan asam sinamat sebagai pembandingnya untuk menghindari perbedaan yang disebabkan oleh ketidakstabilan enzim yang digunakan. Hasil pengujian tipe hambatan asam sinamat yang ditampilkan hanya satu yaitu pada gambar 3. Profil kurva Lineweaver-Burk pada gambar 3 menunjukkan bahwa asam sinamat memiliki tipe hambatan campuran antara kompetitif dan non kompetitif, karena terdapat perpotongan satu titik pada daerah antara sumbu x (negatif) dan sumbu y (positif). Daya hambat asam sinamat ditunjukkan dalam tabel 4 dan 7.

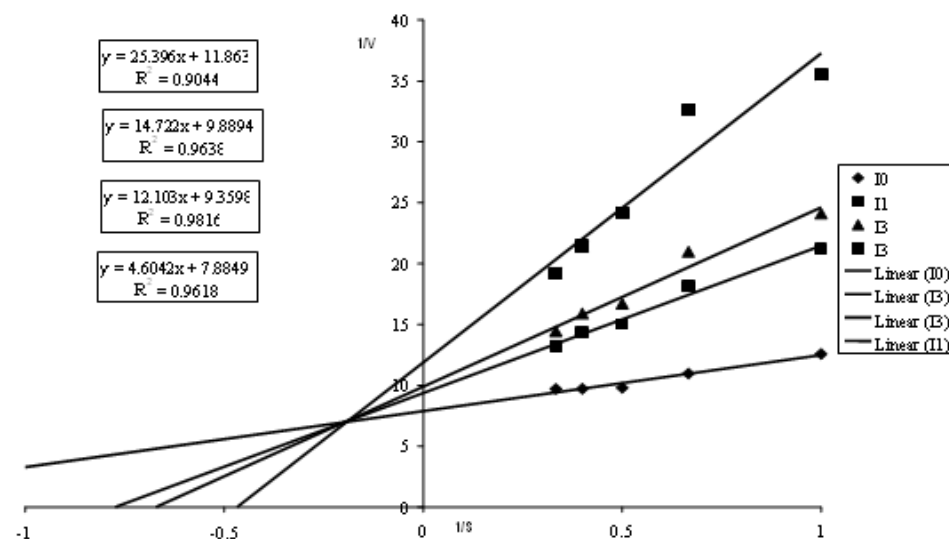
Hasil pengujian reaksi enzimatik terhadap berbagai konsentrasi substrat L-DOPA tanpa dan dengan inhibitor

asam 4-*n*-butilsinamat disajikan pada gambar 4. Profil kurva menunjukkan asam 4-*n*-butilsinamat memiliki tipe hambatan campuran antara kompetitif dan non kompetitif seperti asam sinamat. Daya hambat asam 4-*n*-butilsinamat ditunjukkan dalam tabel 5. IC<sub>50</sub> asam sinamat dan asam 4-*n*-butilsinamat berturut-turut adalah 0,4490 mM dan 1,3380 mM, yang menunjukkan bahwa potensi penghambatan asam 4-*n*-butilsinamat lebih kecil dibandingkan asam sinamat.

Profil kurva Lineweaver-Burk pada gambar 5 menunjukkan bahwa tipe hambatan asam 4-fenilsinamat terhadap reaksi enzimatik tirosinase adalah tipe hambatan campuran (kompetitif dan non kompetitif) yang cenderung hambatan kompetitif,



Gambar 4. Kurva Lineweaver-Burk tipe hambatan asam 4-*n*-butilsinamat dalam pelarut DMSO.



Gambar 5. Kurva Lineweaver-Burk tipe hambatan asam 4-fenilsinamat.

Tabel 4. Daya hambat asam sinamat dalam pelarut DMSO terhadap reaksi enzimatik tirosinase sebagai pembanding pada pengujian asam 4-*n*-butilsinamat dan asam 4-fenilsinamat

Konsentrasi substrat L-DOPA (mM)	Daya hambat inhibitor asam sinamat pada tiga konsentrasi (%)		
	Sin-1	Sin-2	Sin-3
	0,2440 mM	0,4880 mM	0,9760mM
1,0	43,44	52,04	67,65
1,5	36,17	38,07	61,17
2,0	37,29	45,32	61,04
2,5	35,09	48,25	62,13
3,0	45,18	48,74	67,55

Keterangan: Sin = Asam sinamat

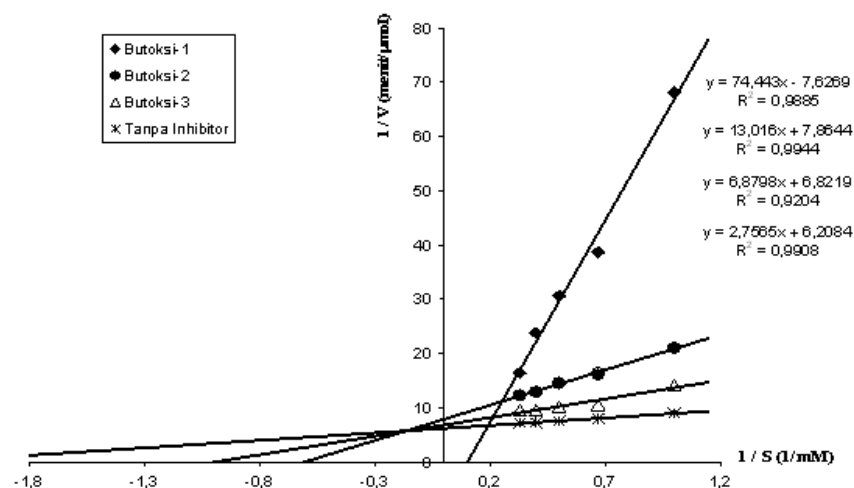
**Tabel 5.** Daya hambat asam 4-*n*-butilsinamat dalam pelarut DMSO terhadap reaksi enzimatik tirosinase

Konsentrasi substrat L-DOPA (mM)	Daya hambat inhibitor asam 4- <i>n</i> -butilsinamat pada tiga konsentrasi (%)		
	NB-1 0,3760 mM	NB-2 0,7510 mM	NB-3 1,8000 mM
1,0	24,52	41,56	64,33
1,5	20,27	47,71	68,85
2,0	11,10	40,54	55,84
2,5	23,17	34,85	59,64
3,0	26,03	35,34	61,53

Keterangan: NB = Asam 4-*n*-butilsinamat**Tabel 6.** Daya hambat asam 4-fenilsinamat dalam pelarut DMSO terhadap reaksi enzimatik tirosinase

Konsentrasi Substrat L-DOPA (mM)	Daya hambat inhibitor asam 4-fenilsinamat pada tiga konsentrasi (%)		
	F-1 0,0267 mM	F-2 0,0535 mM	F-3 0,1070 mM
1,0	40,67	47,80	64,57
1,5	39,49	47,71	66,36
2,0	34,64	41,34	59,48
2,5	32,31	38,87	54,66
3,0	26,54	32,85	49,51

Keterangan: F = Asam 4-fenilsinamat

**Gambar 6.** Kurva Lineweaver-Burk tipe hambatan asam 4-butoksisinamat dengan pelarut DMSO.

sebab titik perpotongan mendekati sumbu y positif. Daya hambat asam 4-fenilsinamat ditunjukkan pada tabel 6. Berdasarkan tersebut dipilih data-data hambat pada konsentrasi substrat L-DOPA 1,0 mM untuk perhitungan  $IC_{50}$ , karena persamaan garis lurus yang dihasilkan paling linier serta kondisinya sama dengan pembanding (asam sinamat).  $IC_{50}$  asam sinamat pada tahap ini adalah 0,4366 mM, dan  $IC_{50}$  asam 4-fenilsinamat 0,0590 mM, sehingga dapat disimpulkan bahwa asam 4-

fenilsinamat berpotensi lebih besar sebagai inhibitor enzim tirosinase.

Hasil pengujian tipe hambatan asam 4-butoksisinamat terhadap reaksi enzimatik tirosinase disajikan pada gambar 6. Profil kurva menunjukkan bahwa tipe hambatan asam 4-butoksisinamat terhadap reaksi enzimatik tirosinase adalah tipe hambatan campuran (kompetitif dan non kompetitif). Daya hambat asam 4-butoksisinamat ditunjukkan pada tabel



**Tabel 7.** Daya hambat asam sinamat dalam pelarut DMSO terhadap reaksi enzimatik tirosinase sebagai pembandingan pada pengujian asam 4-butoksisinamat

Konsentrasi substrat L-DOPA (mM)	Daya hambat Inhibitor asam sinamat pada tiga Konsentrasi (%)		
	Sin-1 1,3540 mM	Sin-2 0,8929 mM	Sin-3 0,4465 mM
1,0	59,44	47,45	27,04
1,5	59,74	44,75	27,19
2,0	54,62	46,18	28,92
2,5	54,89	37,84	14,76
3,0	46,67	40,00	23,05

Keterangan: Sin = Asam sinamat

**Tabel 8.** Daya hambat asam 4-butoksisinamat dalam pelarut DMSO terhadap reaksi enzimatik tirosinase

Konsentrasi substrat L-DOPA (mM)	Daya hambat inhibitor asam 4-butoksisinamat pada tiga konsentrasi (%)		
	BuO-1 0,2896 mM	BuO-2 0,1448 mM	BuO-3 0,0579 mM
1,0	86,79	57,21	36,34
1,5	79,35	50,57	24,45
2,0	87,66	48,11	25,94
2,5	69,53	44,01	23,94
3,0	56,08	41,40	24,67

Keterangan: BuO = Asam 4-butoksisinamat

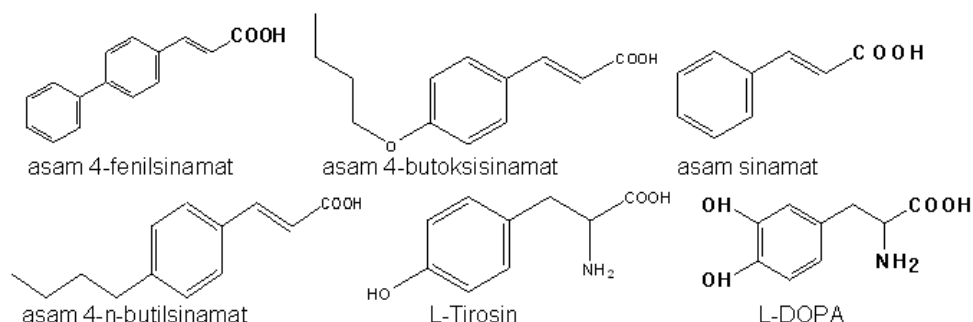
**Tabel 9.** Perbandingan  $IC_{50}$  terhadap reaksi enzimatik tirosinase dari masing-masing senyawa uji dengan asam sinamat sebagai pembandingan

Senyawa uji	$IC_{50}$ (mM)	$IC_{50}$ asam sinamat (mM)
Asam 4- <i>n</i> -butilsinamat	1,3380	0,4490
Asam 4-fenilsinamat	0,0590	0,4366
Asam 4-butoksisinamat	0,1174	1,0481

8. Perhitungan  $IC_{50}$  didasarkan pada data daya hambat dengan konsentrasi substrat L-DOPA 2,5 mM.  $IC_{50}$  asam sinamat pada tahap pengujian ini adalah 1,0481 mM, sedangkan  $IC_{50}$  asam 4-butoksisinamat 0,1174 mM. Dengan demikian potensi penghambatan asam 4-butoksisinamat terhadap enzim tirosinase lebih besar dibandingkan terhadap asam sinamat.

Berdasarkan hasil-hasil pengujian tersebut di atas dan ringkasan perbandingan  $IC_{50}$  (tabel 9) maka dapat diketahui bahwa ketiga senyawa inhibitor yang diuji memiliki daya penghambatan terhadap reaksi enzimatik tirosinase. Urutan potensi penghambatan ketiga senyawa tersebut dari besar ke kecil jika dibandingkan terhadap daya penghambatan oleh asam sinamat, berturut-turut adalah asam 4-butoksisinamat (8,9 kali), asam 4-fenilsinamat (7,4 kali) dan asam 4-*n*-butilsinamat (0,3 kali).

Tampak bahwa gugus *n*-butil yang terikat pada posisi para pada asam sinamat tidak memberikan efek peningkatan daya hambat terhadap reaksi enzimatik tirosinase. Namun dengan penambahan gugus butoksi atau fenil yang terikat pada posisi para asam sinamat ternyata mampu meningkatkan daya hambat terhadap reaksi enzimatik tirosinase. Hal ini disebabkan dengan adanya gugus butoksi kemiripan senyawa dengan substrat reaksi enzimatik tirosinase, yaitu L-DOPA atau L-tirosin semakin besar (gambar 7). Sedangkan pengaruh penambahan gugus fenil pada posisi para dari asam sinamat diperkirakan berasal dari sifat steriknyanya. Gugus fenil merupakan gugus yang memiliki jenis ikatan sp<sup>2</sup> sehingga memiliki struktur planar. Ada dua kemungkinan letak gugus fenil terhadap gugus benzena dari asam sinamat, yaitu sejajar atau tegak lurus terhadap bidang gugus benzena pada struktur



**Gambar 7.** Perbandingan struktur senyawa uji dengan substrat reaksi enzimatik tirosinase

asam sinamat. Diperkirakan struktur yang lebih mungkin terjadi adalah kemungkinan kedua yaitu gugus fenil terikat pada posisi tegak lurus terhadap gugus benzena dari asam sinamat induk. Dengan demikian maka kemungkinan penghambatan enzim tirosinase oleh senyawa asam 4-fenilsinamat menjadi lebih besar dibandingkan asam sinamat, karena begitu terikat pada sisi aktif enzim senyawa ini mampu memblokir substrat untuk bereaksi dengan enzim. Menurut Siswandono dan Purwanto [19] gugus fenil ini berperan sebagai gugus haptoforik, yaitu gugus yang membantu pengikatan inhibitor-enzim.

Jika ditinjau dari tipe penghambatannya, masing-masing senyawa uji memiliki tipe penghambatan yang sama dengan asam sinamat, sehingga dapat disimpulkan bahwa adanya substituen tambahan pada asam sinamat tidak mempengaruhi tipe penghambatan reaksi enzimatik tirosinase. Semua senyawa uji memiliki tipe penghambatan campuran antara kompetitif dan non kompetitif. Pada penelitian terdahulu tipe hambatan asam sinamat yang diperoleh sama dengan penelitian ini, yaitu campuran (kompetitif dan non kompetitif) dengan harga  $IC_{50}$  0,4273 mM [4]. Perbedaan  $IC_{50}$  yang didapat karena kondisi penelitian yang berbeda, seperti kondisi enzim, kondisi substrat, kondisi pH, kondisi alat spektrofotometer, dan lain sebagainya. Sedangkan tipe hambatan campuran mungkin disebabkan oleh pengaruh pelarut DMSO yang digunakan yang juga memberikan aktivitas penghambatan reaksi enzimatik tirosinase.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa asam sinamat, asam 4-n-butilsinamat, asam 4-butoksisinamat, dan asam 4-fenilsinamat memiliki sifat menghambat enzim tirosinase, dengan harga  $IC_{50}$  berturut-turut 0,6446; 1,3380; 0,0590 dan 0,1174 mM. Substituen *n*-butil pada posisi para tidak memberikan efek peningkatan daya hambat dari senyawa asam sinamat terhadap reaksi enzimatik tirosinase. Substituen fenil dan butoksi pada

posisi para mampu meningkatkan daya hambat dari senyawa asam sinamat terhadap reaksi enzimatik tirosinase. Tipe hambatan asam sinamat, asam 4-butoksisinamat, asam 4-*n*-butil-sinamat, dan asam 4-fenilsinamat terhadap enzim tirosinase adalah tipe hambatan campuran antara tipe hambatan kompetitif dan non kompetitif.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pemerintah Republik Indonesia c.q. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional, yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah Penelitian Dosen Muda 2007. Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada para mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, yaitu Kristin Catur Sugiyanto, Sinvanita Suhendro dan Yenny Octavia Pranoto, yang berperan sebagai eksekutor percobaan-percobaan pada penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Harry, R.G., 1973, *Harry's Cosmetology*, 6<sup>th</sup> ed., Vol. 1, Chemical Publishing, New York.
2. Balsam, M.S. and Sagarin, E., 1972, *Cosmetics Science and Technology*, 2<sup>nd</sup> ed, Vol. 3, John Wiley and Sons, New York.
3. Avanti, C., 2002, *Daya Hambat Epigalokatekin Galat (EGCG) dan Kombinasi Epigalokatekin Galat – Kojic Acid terhadap Aktivitas Tirosinase*, Tesis, Universitas Airlangga.
4. Tan, C., Zhu, W., and Lu, Y., 2002, *Chin. Med. J.*, **115**, 1859-1862.
5. Duke, J.A., 2004, *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases*, [Http://www.ars-grin.gov/duke](http://www.ars-grin.gov/duke), 12 Maret 2005.
6. Natella, F., Nardini, M., DiFelice, M., and Scaccini, C., 1999, *J. Agric. Food. Chem*, **47**, 1453-1459.
7. Yesilada, A., Zorlu, E., Aksu, F., and Yesilada, E., 1996, *Farmaco*, **51**, 595-599.

8. Sadono, S., 2001, *Bioavailabilitas Etil p-metoksisinamat dari Perasan Rimpang Kencur pada Hewan Coba Kelinci*, Tesis, Universitas Airlangga, Surabaya.
9. Parfitt, K., (ed), 1999, *Martindale The Complete Drug Reference*, 32<sup>nd</sup> ed., Pharmaceutical Press, London.
10. Knoerzer, T.A., 2003, *Multi-step Synthesis of 3-Alkoxy-4-methoxy-6-nitro-trans-cinnamic acid*, [Http://www.naz.edu](http://www.naz.edu), diakses pada tanggal 18 Januari 2005.
11. Sakuma, K., Ogawa, M., Sugibayashi, K., and Yamamoto, K., 1999, *Acc. Pharm. Res.*, **22**, 335-339.
12. Kubo, I., Kinst-Hori, I., and Yokohama, Y., 1994, *J. Nat. Prod.*, **57**, 545-551.
13. Glyglewski, R.J., "Structure-Activity Relationship of Some Prostaglandin Synthetase Inhibitors" in *Prostaglandin Synthetase Inhibitors*. Eds. Robinson, H.J. and Vane, J.R., Raven Press, New York, 1974.
14. Shen, T.Y., "Nonsteroidal Antiinflammatory Agent" in *Burger's Medicinal Chemistry*, Ed. Wolff, M.E., 4<sup>th</sup> ed, John Wiley and Sons, New York, 1981.
15. Siswandono, S. and Soekardjo, B., 2000, *Kimia Medisinal*, Airlangga University Press, Surabaya.
16. Rudyanto, M. and Hartanti, L., 2008, *Indonesian Journal of Chemistry*, **8**, 226-230.
17. Thomas, G., 2000, *Medicinal Chemistry: an introduction*, John Wiley and Sons, Chichester.
18. Boyer, R.F., 1993, *Modern Experimental Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed, Benjamin/Cumming Publishing, California.
19. Siswandono, S. and Purwanto, "Hubungan struktur aspek stereokimia dan aktivitas biologis obat" dalam *Kimia Medisinal*, Eds. Siswandono dan Soekardjo, B., Airlangga University Press, Surabaya, 2000.