

**KAJIAN DOCKING MOLEKULER DAN UJI  
AKTIVITAS PENGHAMBATAN ENZIM TIROSINASE  
EKSTRAK ETANOL UBI JALAR (*Ipomoea batatas* L. Lam)**

**TESIS**



Diajukan Oleh:

**RYAN SYAHPUTRA**

1907047002

**PROGRAM STUDI PASCA SARJANA  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN  
YOGYAKARTA  
2023**

**PENGESAHAN TESIS**

Berjudul

**KAJIAN DOCKING MOLEKULER DAN UJI  
AKTIVITAS PENGHAMBATAN ENZIM TIROSINASE  
EKSTRAK ETANOL UBI JALAR (*Ipomoea batatas L. Lam*)**

Oleh :

**Ryan Syahputra**  
1907047002

Dipertahankan di hadapan Dewan Penguji Tesis  
Program Pascasarjana Farmasi Universitas Ahmad Dahlan  
Pada tanggal : 14 April 2023

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Farmasi



Dr. Apt. Iis Wahyuningsih, M.Si  
NIY. 60970157

Pembimbing Utama



Dr. apt. Dwi Utami., M.Si  
NIY. 60010299

Pembimbing Pendamping



Dr. apt. Wahyu Widyaningsih., M.Si  
NIY. 000201721

Penguji :

1. Dr. apt. Dwi Utami., M.Si
2. Dr. apt. Wahyu Widyaningsih., M.Si
3. Dr. apt. Laela Hayu Nurani., M.Si
4. apt. Ichwan Ridwan Rais, M.Sc., Ph.D



## PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ryan Syahputra  
NIM : 1907047002  
Email : ryan1907047002@webamail.uad.ac.id  
Fakultas : Farmasi  
Program Studi : Pascasarjana Farmasi  
Judul Tugas Akhir : Studi Docking Molekuler dan Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam).

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Hasil karya yang saya serahkan ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar kesarjanaan baik di Universitas Ahmad Dahlan maupun di institusi pendidikan lainnya.
2. Hasil karya saya bukan saduran/terjemahan melainkan merupakan gagasan, rumusan, dan hasil pelaksanaan penelitian/implementasi saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan pembimbing akademik dan nara sumber penelitian.
3. Hasil karya saya merupakan revisi terakhir setelah diujikan yang telah diketahui dan disetujui oleh pembimbing.
4. Dalam karya saya tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali digunakan sebagai acuan dalam naskah dengan menyebutkan pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya. Apabila dikemudian hari terbukti ada penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini maka saya menerima sanksi akademik yang sesuai dengan ketentuan yang berlaku di Universitas Ahmad Dahlan.

Yogyakarta, 14 April 2023



Ryan Syahputra

## PERNYATAAN PERSETUJUAN AKSES

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :


Nama : Ryan Syahputra  
NIM : 1907047002  
Email : ryan1907047002@webmail.uad.ac.id  
Fakultas : Farmasi  
Program Studi : Pascasarjana Farmasi  
Judul Tugas Akhir : Studi Docking Molekuler dan Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam).

Dengan ini saya menyerahkan hak sepenuhnya kepada Pusat Sumber Belajar Universitas Ahmad Dahlan untuk menyimpan, mengatur akses serta melakukan pengelolaan terhadap karya saya ini dengan mengacu pada ketentuan akses tugas akhir elektronik sebagai berikut :

Saya mengizinkan karya tersebut di unggah ke dalam aplikasi Repository Pusat Sumber Belajar Universitas Ahmad Dahlan.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Yogyakarta, 14 April 2023



Ryan Syahputra

Mengetahui,

Pembimbing



Dr. apt. Dwi Utami., M.Si.

## HALAMAN PERSEMBAHAN

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”  
(QS. Al Inshirah:6)

“Jangan pernah katakan padaku tidak mungkin, selama engkau masih hidup dan belum mencobanya”  
(Al Fatih)

“Cause i’m telling you you all i need, i promise you, you all i see. so you can’t drag me trough hell”  
(Oliver sykes)

Kupersembahkan buat :

Ibu dan bapakku tercinta,

Ungkapan rasa hormat dan baktiku

Adikku tersayang

Ungkapan rasa sayang dan kasihku

Almamaterku

## HALAMAN PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini saya:

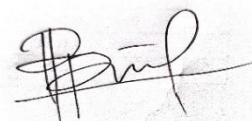
Nama : Ryan Syahputra  
NIM : 1907047002  
Program Studi : Farmasi – S2  
Judul Penelitian : KAJIAN DOCKING MOLEKULER DAN UJI  
AKTIVITAS PENGHAMBATAN ENZIM TIROSINASE  
EKSTRAK ETANOL UBI JALAR (*Ipomoea batatas* L.  
Lam)

Menyatakan bahwa penelitian ini adalah hasil karya sendiri sepanjang pengetahuan peneliti tidak berisi materi–materi yang dipublikasikan atau ditulis oleh orang lain, kecuali pada bagian – bagian tertentu yang saya ambil sebagai acuan.  
Apabila pernyataan ini tidak benar, sepenuhnya tanggung jawab saya.

Yogyakarta, April 2023

Yang membuat pernyataan

Ryan Syahputra



NIM : 1907047002

## KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warrahmatullahi Wabarakatu.

Segala puji bagi Allah SWT yang senantiasa melimpahkan segala rahmat serta hidayah-Nya kepada kita, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Kajian Docking Molekuler dan Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam)”** dengan baik. Sholawat serta salam tak lupa kita haturkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad S.A.W semoga kita senantiasa diberikan syafaat dan menjadi pengikut beliau hingga akhir zaman.

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan jenjang strata 2 (S2) Farmasi di Fakultas Pascasarjana Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Penulis menyadari bahwa dalam penyelesaian tesis ini banyak sekali bantuan baik berupa bimbingan, dukungan dan motivasi yang sangat berharga. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan dan ketulusan hati penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. apt. Dwi Utami., M.Si selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, motivasi dan semangat selama menyelesaikan tesis ini.
2. Dr. apt. Wahyu Widyaningsih., M.Si selaku dosen pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, motivasi dan semangat selama menyelesaikan tesis ini.
3. Dr. apt. Laela Hayu Nurani., M.Si selaku dosen penguji I yang telah berkenan memberikan arahan, masukan dan koreksi yang sangat berharga.
4. apt. Ichwan Ridwan Rais, M.Sc., Ph.D selaku dosen penguji II yang telah berkenan memberikan arahan, masukan dan koreksi yang sangat berharga.
5. Dr. Apt. Iis Wahyuningsih, M.Si selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan.
6. apt. Moch Saiful Bachri., M.Si., Ph.D selaku Ketua Program Pascasarjana Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan.

7. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan yang telah memberikan bekal ilmunya selama proses studi.
8. Seluruh staf, karyawan dan laboran Laboratorium farmasi Universitas Ahmad Dahlan atas bantuannya selama perkuliahan dan penelitian di Universitas Ahmad Dahlan.
9. Bapak Ahlan Dg. Pasau dan Ibu Ridayanti Pontoh selaku kedua orang tua yang tidak pernah lelah dalam memotivasi dengan bantuan moral serta biaya terkait perkuliahan.
10. Kedua wanita yang saya cintai Citra Safira dan Rizqi Faronika yang setiap saat memberikan dukungan moral dan semangat.
11. Teman-teman seperjuangan POKBA'19 yang saya banggakan, kalian luar biasa.

Semoga laporan penelitian tesis ini akan bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan masyarakat luas. Semua saran dan masukan demi perbaikan naskah ini sangat diharapkan.

Wassalamualaikum Warrahmatullahi Wabarakatu.

Yogyakarta, April 2023

Penulis



Ryan Syahputra



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>PENGESAHAN TESIS</b> .....	ii
<b>PERNYATAN TIDAK PALGIAT</b> .....	iii
<b>PERNYATAAN PERSETUJUAN AKSES</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>DAFTAR ISTILAH</b> .....	xviii
<b>INTISARI</b> .....	xx
<b>ABSTRACT</b> .....	xxi
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Manfaat Penelitian.....	4
E. Batasan Penelitian .....	5
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
A. Kajian Teori.....	6
1. Tumbuhan Ubi Jalar ( <i>Ipomoea batatas</i> L. Lam).....	6
2. Farmakologi Senyawa Aktif Ubi Jalar .....	9
3. Enzim Tirosinase .....	11
4. Metode Ekstraksi.....	11
5. Metode Docking Molekuler .....	14
6. Software Metode Docking Molekuler.....	18

a. Autodock .....	18
b. Biovia Discovery Studio Visualizer .....	20
c. Avogadro .....	21
d. Chem Office .....	21
e. Pymol.....	23
B. Kerangka Teori .....	24
C. Hipotesis .....	28
<b>BAB III. METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>30</b>
A. Pengujian Penghambatan Enzim Tirosinase Secara In silico Berdasarkan Docking Molekuler.....	30
1. Alat dan Bahan .....	30
2. Prosedur Pengujian.....	31
a. Preparasi Reseptor Enzim Tirosinase .....	31
b. Preparasi Native Ligan Tropolone (OTR) Enzim Tirosinase.....	31
c. Validasi Metode Docking Molekuler .....	31
d. Preparasi Ligan Uji/Senyawa Uji .....	32
e. Docking Molekuler Antara Ligan Uji dan Enzim Tirosinase.....	31
f. Prediksi ADMET dan Evaluasi Berdasarkan Aturan Lipinski .....	32
3. Ekstraksi dan Pengujian Parameter Spesifik Ekstrak.....	33
a. Penyiapan Sampel.....	33
b. Ekstraksi .....	33
c. Pengujian Parameter Spesifik Ekstrak.....	35
1). Pengamatan Organoleptik .....	35
2). Pengamatan Rendemen Ekstrak.....	35
3). Identifikasi Senyawa Aktif Ubi Jalar Secara Kualitatif .....	35
4. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Secara In vitro .....	35
a. Alat dan Bahan .....	36
b. Prosedur Pengujian.....	36
1). Pembuatan Larutan Pereaksi.....	37
a). Pembuatan Larutan $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,05 M.....	36

b).	Pembuatan Larutan NaOH 0,2 M .....	36
c).	Pembuatan Larutan Dapar Fosfat 0,05 M pH 6,5 .....	36
d).	Pembuatan Larutan L-DOPA 2,5 mM.....	37
e).	Pembuatan Larutan Tirosinase .....	37
f).	Pembuatan Larutan Asam Kojat (Kontrol Positif) .....	38
g).	Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol Ubi Jalar.....	38
2).	Uji Pendahuluan Enzim.....	38
a).	Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Dopakrom.....	39
b).	Pengukuran Absorbansi Ekstrak Ubi Jalar Pada Panjang Gelombang Enzim Tirosinase.....	40
c).	Optimasi Substrat L-DOPA.....	40
3).	Uji Penghambatan Enzim Tirosinase Asam kojat.....	41
4).	Uji Penghambatan Enzim Tirosinase Ekstrak Ubi jalar.....	41
B.	Variabel Penelitian.....	42
C.	Analisis Data.....	41
<b>BAB IV.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>43</b>
A.	Analisis Hasil Pengujian Secara In silico Berdasarkan Metode Docking Molekuler .....	44
1.	Pembuatan Struktur Tiga Dimensi dan Optimasi Senyawa Aktif Ubi jalar ( <i>Ipomoea batatas</i> L. Lam).....	44
2.	Pengunduhan Protein Target Penambatan Senyawa .....	47
3.	Preparasi Protein Tirosinase (2Y9X) sebagai Target Penambatan.....	49
4.	Pemisahan Native Ligan dan Validasi Metode Docking Molekuler (Redocking) .....	50
5.	Preparasi Struktur Senyawa Aktif Ubi jalar ( <i>Ipomoea batatas</i> L. Lam) Sebagai Ligan Uji .....	53
6.	Analisis dan Visulisasi Hasil Penambatan dengan Metode Docking Molekuler.....	54
7.	Analisis Hasil Parameter Prediksi ADMET Docking Molekuler .....	69

B. Analisis Hasil Penghambatan Enzim Tirosinase Berdasarkan Pengujian Secara In vitro.....	78
1. Persiapan dan Ekstraksi Sampel Ubi Jalar .....	78
2. Analisis Hasil Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Ubi Jalar.....	80
3. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase.....	87
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>101</b>
A. Kesimpulan .....	101
B. Saran .....	102
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>103</b>
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>113</b>
<b>LAMPIRAN PENELITIAN.....</b>	<b>116</b>

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel I	Metode uji penghambatan enzim tirosinase.....42
Tabel II	Struktur senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat (kontrol) dalam bentuk dua dimensi dan tiga dimensi.....45
Tabel III	Penentuan koordinat dan ukuran grid box pada proses redocking antara native ligan dan tirosinase (PDB ID: 2Y9X).....51
Tabel IV	Analisis afinitas binding energi ( $\Delta G$ ) dan konstanta knhibisi ( $K_i$ ) senyawa aktif ubi jalar, asam kojat (kontrol) dan tropolone (native ligan).....55
Tabel V	Prediksi parameter ADMET hasil docking molekuler senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat (kontrol).....70
Tabel VI	Pemeriksaan organoleptis ekstrak ubi jalar.....79
Tabel VII	Hasil identifikasi senyawa aktif ekstrak ubi jalar secara kualitatif dengan uji reaksi tabung.....80
Tabel VIII	Hasil pengujian kandungan senyawa aktif ekstrak ubi jalar secara kualitatif dengan metode KLT.....86
Tabel IX	Hasil uji persen inhibisi dan nilai $IC_{50}$ aktivitas penghambatan enzim tirosinase asam kojat.....93
Tabel X	Hasil uji persen inhibisi dan nilai $IC_{50}$ aktivitas penghambatan enzim tirosinase ekstrak ubi jalar.....96
Tabel XI	Hasil uji normalitas $IC_{50}$ antara asam kojat (kontrol) dan ekstrak ubi jalar.....97
Tabel XII	Hasil uji Independent sample t-test data nilai $IC_{50}$ asam kojat dan ekstrak ubi jalar .....98

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 1	Tumbuhan ubi jalar ( <i>Ipomoea batatas</i> L. Lam).....7
Gambar 2	Struktur senyawa aktif ubi jalar .....8
Gambar 3	Mekanisme kerja enzim tirosinase .....11
Gambar 4	Reaksi monofenolase dan difenolase yang terjadi pada enzim tirosinase.....12
Gambar 5	Kerangka skema pengujian secara in silico .....27
Gambar 6	Kerangka skema pengujian secara in vitro.....28
Gambar 7	Struktur kristal tirosinase <i>Agaricus bisporus</i> (PDB ID: 2Y9X) hasil kristalografi dengan kompleks tropolone.....47
Gambar 8	Struktur kristal tirosinase <i>Agaricus bisporus</i> setelah dilakukan pemisahan terhadap molekul air, native ligan dan senyawa lain yang melekat pada protein.....49
Gambar 9	Struktur tropolone (native ligan) hasil preparasi secara dua dimensi dan tiga dimensi.....50
Gambar 10	Visualisasi native ligan hasil validasi dan native ligan hasil kristalografi.....52
Gambar 11	Hasil penambahan atom hidrogen, optimasi geometri dan minimasi struktur senyawa beta-karoten, kuersetin, katekin, antosianin, asam klorogenat dan asam kojat.....53
Gambar 12	Interaksi ikatan yang terbentuk antara native ligan tropolone (OTR), beta-karoten, kuersetin, katekin, antosianin, asam klorogenat, asam kojat dan enzim tirosinase.....57
Gambar 13	Hasil analisis docking molekuler antara tropolone (native ligan), beta-karoten, asam klorogenat, kuersetin, katekin, antosianin, asam kojat (kontrol) dan enzim tirosinase.....64

Gambar 14	Visualisasi radar bioavailabilitas senyawa beta-karoten, asam klorogenat kuersetin, katekin, antosianin dan asam kojat (kontrol).....	76
Gambar 15	Hasil Identifikasi senyawa flavonoid ekstrak ubi jalar menggunakan KLT.....	82
Gambar 16	Hasil identifikasi senyawa karotenoid ekstrak ubi jalar menggunakan KLT.....	84
Gambar 17	Hasil identifikasi senyawa senyawa fenolik ekstrak ubi jalar menggunakan KLT .....	85
Gambar 18	Penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom pada rentang 200-800 nm menggunakan spektrofotometer Uv-vis.....	88

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1 Pengujian secara in silico berdasarkan docking molekuler .....	116
Lampiran 2 Software yang digunakan dalam metode docking molekuler .....	116
Lampiran 3 Website yang digunakan dalam metode docking molekuler .....	116
Lampiran 4 Optimasi geometri dan minimasi energi senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat.....	117
Lampiran 5 Validasi metode docking molekuler .....	118
Lampiran 6 Hasil penentuan koordinat sumbu X, Y, Z dan pembuatan grid box.....	118
Lampiran 7 Hasil validasi metode docking molekuler .....	118
Lampiran 8 Hasil docking molekuler native ligan, senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat.....	119
Lampiran 9 Jarak interaksi ikatan hidrogen native ligan tropolone (OTR), senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat.....	121
Lampiran 10 Hasil prediksi ADMET dengan menggunakan website pKCSM dan swissADME.....	122
Lampiran 11 Hasil prediksi ADMET beta-karoten.....	122
Lampiran 12 Hasil prediksi ADMET kuersetin.....	123
Lampiran 13 Hasil prediksi ADMET katekin.....	124
Lampiran 14 Hasil prediksi ADMET antosianin .....	125
Lampiran 15 Hasil prediksi ADMET asam klorogenat .....	126
Lampiran 16 Hasil prediksi ADMET asam kojat .....	127
Lampiran 17 Pengujian penghambatan enzim tirosinase secara in vitro .....	128
Lampiran 18 Alat yang digunakan dalam pengujian penghambatan enzim tirosinase secara in vitro .....	128
Lampiran 19 Bahan yang digunakan dalam uji reaksi tabung, KLT dan pengujian penghambatan secara in vitro .....	129
Lampiran 20 Simplisia ubi jalar.....	130
Lampiran 21 Metode ekstraksi dan ekstrak ubi jalar.....	130



Lampiran 22	Hasil skirining fitokimia berdasarkan uji tabung secara kualitatif terkait kandungan senyawa aktif ekstrak ubi jalar .....	131
Lampiran 23	Hasil perhitungan nilai Rf ekstrak ubi jalar dan senyawa pembanding.....	132
Lampiran 24	Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum enzim tirosinase dengan substrat L-DOPA 0,6 mM .....	133
Lampiran 25	Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum standar beta-karoten, kuersetin dan asam galat .....	134
Lampiran 26	Hasil optimasi substrat L-DOPA.....	135
Lampiran 27	Hasil uji penghambatan enzim tirosinase asam kojat .....	135
Lampiran 28	Hasil uji penghambatan enzim tirosinase ekstrak ubi jalar... ..	135
Lampiran 29	Hasil pengukuran absorbansi asam kojat.....	136
Lampiran 30	Hasil pengukuran absorbansi ekstrak ubi jalar sebagai validasi pada panjang gelombang enzim tirosinase.....	137
Lampiran 31	Hasil pengukuran absorbansi ekstrak ubi jalar.....	138
Lampiran 32	Hasil perhitungan persen inhibisi dan IC <sub>50</sub> asam kojat .....	139
Lampiran 33	Hasil perhitungan persen inhibisi dan IC <sub>50</sub> ekstrak ubi jalar.....	140
Lampiran 34	Uji normalitas data IC <sub>50</sub> asam kojat dan ekstrak ubi jalar dengan SPSS .....	141
Lampiran 35	Uji Independent Sample T-Test data IC <sub>50</sub> ekstrak ubi jalar dan asam kojat .....	142

## DAFTAR ISTILAH

	<b>Halaman</b>
ROS ( <i>Reactive Oxygen Species</i> ) .....	1
Å (Armstrong).....	2
RMSD ( <i>Root Means Standard Deviation</i> ) .....	2
OTR ( <i>Tropolone</i> ) .....	3
Native Ligand (Ligan Alami) .....	3
PDB ( <i>Protein Data Bank</i> ) .....	3
DNA ( <i>Deoxyribo Nucleic acid</i> ) .....	10
Software (Perangkat Lunak) .....	15
$\Delta G$ ( <i>Afinitas Binding Energy</i> ).....	16
Ki (Konstanta Inhibisi).....	16
Redocking (Penambatan Kembali) .....	16
ADMET (Absorpsi Distribusi Metabolisme Eksresi dan Toksisitas) .....	17
H, O, N, F (Hidrogen, Oksigen, Nitrogen, Fluor) .....	18
Non-Polar (Senyawa dengan Afinitas Rendah Terhadap Air) .....	18
Dipol-dipol (Gaya yang Bekerja Antara Molekul-Molekul Polar) .....	18
LGA ( <i>Lamarckian Genetic Algoritma</i> ).....	20
MM2 ( <i>Mecanic Molecule</i> ) .....	23
MMF49 ( <i>Merck Molecular Force Field</i> ).....	24
AbTYR ( <i>Agaricus bisporus Tyrosinase</i> ) .....	26
TPSA ( <i>Topological Polar Surface Area</i> ).....	27
Log P ( <i>Lipofilitas</i> ).....	27
Log S (Kelarutan).....	27
Log Kp ( <i>Skin Permeability Coefficient</i> ).....	27
KLT (Kromatografi Lapis Tipis) .....	35
Rf ( <i>Retention Factor</i> ) .....	36
$\mu\text{M}$ ( <i>Micromolar</i> ).....	36
Uv-vis (Spektrofotometer Uv-visible) .....	36
KU ( <i>Kilo Unit</i> ) .....	37
M (Molaritas) .....	38

mM (Milimolar) .....	38
ppm ( <i>Part Per-million</i> ).....	38
$\mu$ L ( <i>Micro liter</i> ) .....	38
IC <sub>50</sub> ( <i>Inhibisi Concentration</i> ) .....	42
Sig (Signifikansi) .....	43
CID ( <i>Identification Number Compound</i> ) .....	44
GA (Genetik Algoritma) .....	56
Lowest Energy (Energi Terendah).....	56
PO <sub>2</sub> (Parsial Oksigen).....	57
Binding Pocket (Kantong Pengikatan).....	60
HOMO ( <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> ).....	66
LUMO ( <i>Lowest Occupied Molecular Orbital</i> ) .....	69
Drug Likeness (Sifat Kemiripan Obat) .....	69
Skin Permeability (Permeabilitas Kulit) .....	70
Rotatable Bond (Ikatan Tunggal Non-cincin).....	70
SIZE (Ukuran Molekul) .....	77
LIPO (Lipofilitas) .....	77
POLAR (Polaritas).....	77
INSOLU (Solubilitas) .....	77
INSATU (Saturasi).....	77
FLEX (Fleksibilitas) .....	77
Insoluble (Tidak Larut) .....	77
Poorly (Kurang Baik).....	77
Moderately (Sedang).....	77
Soluble (Larut) .....	77
Very (Sangat) .....	77
Highly (Sangat Tinggi) .....	77

## INTISARI

Tumbuhan ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) merupakan sumber karbohidrat dengan kandungan kimia seperti beta-karoten, kuersetin, katekin, asam klorogenat, dan antosianin. Senyawa kimia tersebut telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang berhubungan erat dengan enzim tirosinase melalui jalur stress oksidatif dengan inhibisi aktivitas monofenolase dan difenolase dari tirosinase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak ubi jalar memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim tirosinase secara *in silico* dan *in vitro*.

Penelitian ini dilakukan dengan dua tahapan. Tahapan yang pertama dengan metode komputasi secara *in silico* melalui docking molekuler zat aktif ubi jalar terhadap protein tirosinase (PDB ID: 2Y9X) dengan kontrol asam kojat, kemudian dilakukan studi parameter ADMET terhadap hasil docking molekuler senyawa aktif ubi jalar. Tahapan yang kedua secara *in vitro* dengan pengujian aktivitas penghambatan ekstrak etanol ubi jalar 60% yang diperoleh dengan metode sokletasi terhadap enzim tirosinase dengan asam kojat sebagai kontrol menggunakan spektrofotometer Uv-vis. Data yang diperoleh kemudian dianalisis statistik parametrik menggunakan metode Independent sample t-test untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna antara nilai IC<sub>50</sub> ekstrak ubi jalar dan asam kojat.

Hasil pengujian secara *in silico* melalui metode docking molekuler senyawa aktif ubi jalar terhadap enzim tirosinase diperoleh energi ikatan ( $\Delta G$ ) beta-karoten -6,05 kcal/mol, asam klorogenat -6,05 kcal/mol, kuersetin -5,87 kcal/mol, katekin -5,77 kcal/mol, dan antosianin -5,70 kcal/mol dengan konstanta inhibisi (Ki) masing-masing 36,72  $\mu$ M, 36,90  $\mu$ M, 45,30  $\mu$ M, 59,38  $\mu$ M dan 66,55  $\mu$ M. Analisis parameter ADMET yang dilakukan terhadap senyawa aktif ubi jalar menunjukkan sifat farmakokinetik seperti lipofilitas (Log P), polaritas (Log S), fleksibilitas, permeabilitas kulit, sensitivitas kulit dan bioavailabilitas yang cukup baik. Berdasarkan pendekatan yang dilakukan secara *in vitro* terhadap ekstrak ubi jalar dan asam kojat dengan IC<sub>50</sub> masing-masing  $63,32 \pm 0,15$  dan  $6,06 \pm 0,02$   $\mu$ g/ml.

Terlihat perbedaan bermakna ( $P < 0,05$ ) IC<sub>50</sub> aktivitas penghambatan enzim tirosinase ekstrak ubi jalar dan asam kojat setelah dilakukan analisis statistik dengan Independent sample t-test. Walaupun demikian, penggunaan ubi jalar masih dapat diterima sebagai inhibitor alami pengganti inhibitor sintetik mengingat potensi penghambatan senyawa aktif yang dimilikinya cukup baik terhadap enzim tirosinase.

**Kata Kunci:** Tirosinase (PDB ID: 2Y9X), *Ipomoea batatas* L. Lam, Docking Molekuler, Autodock-4.

## **ABSTRACT**

Sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) is a source of carbohydrates with chemical compounds such as beta-carotene, quercetin, catechins, chlorogenic acid, and anthocyanin. These chemical compounds have been shown to have antioxidant activity which is closely related to the tyrosinase enzyme through the oxidative stress pathway by inhibiting the activity of monophenolase and diphenolase of tyrosinase. This study aims to determine whether sweet potato extract activity as an inhibitor of the tyrosinase enzyme in silico and in vitro.

This research was conducted in two steps. The first step was by in silico computational method through molecular docking of sweet potato active substance to protein tyrosinase (PDB ID: 2Y9X) with kojic acid control, then ADMET parameter study was carried out on the results of molecular docking of sweet potato active compound. The second step was in vitro by analyzing the inhibitory activity of 60% sweet potato ethanol extract obtained using the soxhlet method for the tyrosinase enzyme with kojic acid as a control using a Uv-vis spectrophotometer. The data obtained were then analyzed by parametric statistics using the Independent sample t-test method to see whether or not there was a significant difference between the IC<sub>50</sub> values of sweet potato extract and kojic acid.

The results of in silico analysis using the molecular docking method of the active compound of sweet potato to the tyrosinase enzyme obtained the binding energy ( $\Delta G$ ) of beta-carotene -6,05 kcal/mol, chlorogenic acid -6,05 kcal/mol, quercetin -5,87 kcal/mol, catechins -5,77 kcal/mol, and anthocyanins -5,70 kcal/mol with inhibition constants (Ki) of 36,72  $\mu$ M, 36,90  $\mu$ M, 45,30  $\mu$ M, 59,38  $\mu$ M and 66,55 $\mu$ M. ADMET parameter analysis performed on the active compounds of sweet potato showed good pharmacokinetic properties such as lipophilicity (Log P), polarity (Log S), flexibility, skin permeability, skin sensitivity, and bioavailability. Based on the in vitro approach to sweet potato extract and kojic acid with IC<sub>50</sub> respectively  $63.32 \pm 0.15$  and  $6.06 \pm 0.02$   $\mu$ g/ml.

There was a significant difference ( $P < 0.05$ ) of IC<sub>50</sub> in the activity of inhibiting the tyrosinase enzyme of sweet potato extract and kojic acid after statistical analysis was performed using an independent sample t-test. Even so, the use of sweet potato is still acceptable as a natural inhibitor to replace synthetic inhibitors considering the potential inhibition of the active compound that has quite good against the tyrosinase enzyme.

**Keywords:** Tyrosinase (PDB ID: 2Y9X), *Ipomoea batatas* L. Lam, Molecular Docking, Autodock-4.

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Ekstrak tumbuhan berpotensi menunda proses penuaan dan pigmentasi kulit dengan melawan ROS (Reaktif Oksigen Spesies) dan melindungi kulit dari sinar ultraviolet (Mukherjee *et al.*, 2011). Ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) merupakan salah satu tumbuhan sumber karoten yang dianggap sebagai komponen pro-vitamin A terpenting dalam makanan dan kaya akan karotenoid (Eluagu *et al.*, 2010). Tumbuhan ini banyak digunakan sebagai pangan fungsional di berbagai negara (Clifford *et al.*, 2014) yang diketahui memiliki kandungan senyawa seperti beta-karoten (Islam, 2016), kuersetin, katekin, antosianin (Mohanraj & Sivasankar, 2014) dan asam klorogenat (Zengin, *et al.*, 2017). Dalam pengembangan kosmetika komponen kimia seperti beta-karoten, kuersetin, katekin, antosianin dan asam klorogenat memiliki banyak khasiat, salah satunya adalah sebagai pencerah kulit berdasarkan inhibisinya terhadap enzim tirosinase sebagai target aktivitasnya.

Saat ini ditemukan banyak senyawa berbasis bahan alam ataupun sintesis yang memiliki aktivitas dalam penghambatan enzim tirosinase. Beberapa bahan kimia seperti hidrokuinon, asam kojat dan arbutin merupakan bahan sintesis yang biasa digunakan dalam bidang kosmetik sebagai agen pencerah kulit. Akan tetapi, beberapa dari bahan sintesis tersebut seringkali menimbulkan efek karsinogenik pada kulit manusia (Rianda, 2017). Hal tersebut kemudian dijadikan sebagai acuan dari beberapa peneliti untuk menjadikan bahan alam sebagai inhibitor alami

pengganti bahan sintetis dengan tujuan untuk mengurangi terjadinya efek karsinogenik.

Dalam analisisnya, *in silico* merupakan salah satu pendekatan yang sering digunakan untuk mengetahui aktivitas suatu senyawa terhadap target aksinya (Jourdan, 2020). Pendekatan *in silico* dilakukan secara komputasi dengan metode docking molekuler atau skrining virtual dengan teknik representatif dalam menyaring komponen senyawa yang digunakan sebagai validasi dalam pengujian eksperimental (Lee *et al.*, 2021). Parameter yang biasanya digunakan dalam analisis metode docking molekuler adalah nilai RMSD (*Root Means Square Deviation*), afinitas dan interaksi ikatan yang terbentuk (Dhanik *et al.*, 2013).

Parameter pertama dalam analisis docking molekuler adalah nilai RMSD yang menjadi standar validasi dari metode docking molekuler dengan nilai kurang dari 2 Å yang menunjukkan bahwa hasil dari redocking mendekati hasil kristalografi (Girija *et al.*, 2010). Parameter kedua adalah afinitas ligan yang menunjukkan aktivitasnya terhadap reseptor protein. Semakin negatif nilai afinitas ligan maka semakin sedikit juga energi yang diperlukan ligan dalam menembus membran reseptor protein (Dhanik *et al.*, 2013). Sedangkan untuk parameter ketiga adalah interaksi ikatan yang terbentuk antara ligan dan reseptor protein melalui ikatan hidrogen, hidrofobik dan ikatan Van der Waals yang mempengaruhi aktivitas dari ligan terhadap reseptor protein (Mauliana *et al.*, 2022).

Dalam penelitian ini, skrining virtual dilakukan dengan menggunakan metode docking molekuler terhadap lima senyawa aktif ubi jalar seperti beta-karoten, kuersetin, katekin, antosianin dan asam klorogenat dengan enzim

tirosinase *Agaricus bisphorus* (PDB ID: 2Y9X) yang diketahui memiliki native ligan tropolone (OTR). Pada situs aktif tirosinase, tropolone memiliki peranan spesifik dalam membentuk kompleks model kinetika (Pra-michaelis) sangat baik yang dapat berikatan langsung dengan ion tembaga pada situs aktif enzim tirosinase (Ismaya *et al.*, 2011).

Tirosinase merupakan enzim multi-tembaga yang bertanggung jawab pada proses pembentukan melanin pada kulit. Enzim ini terdistribusi secara luas pada organisme hidup dan memiliki peranan penting dalam proses melanogenesis serta penggelapan pada kulit (Zolghadri *et al.*, 2019). Tirosinase mengkatalis dua reaksi berbeda dalam sintesis melanin yaitu hidroksilasi L-tirosin menjadi 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), kemudian teroksidasi menjadi dopakuinon yang dapat mengalami polarisasi secara spontan membentuk melanin (Nguyen *et al.*, 2016). Melanin merupakan senyawa yang bertanggung jawab terhadap pigmentasi kulit, mata dan rambut (Lai *et al.*, 2017). Gangguan yang terjadi pada pigmentasi kulit disebabkan oleh proses melanogenesis yang menyebabkan terjadinya penggelapan warna pada kulit (Jiang *et al.*, 2017).

Salah satu cara untuk mencegah pembentukan melanin adalah dengan melakukan penghambatan terhadap aktivitas enzim tirosinase (Woolery & Kammer, 2011). Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian terkait aktivitas senyawa aktif ubi jalar terhadap enzim tirosinase berdasarkan pendekatan secara *in silico* dan dilanjutkan dengan pendekatan eksperimental secara *in vitro*.



## **B. Rumusan Masalah**

1. Bagaimana aktivitas senyawa aktif ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) terhadap enzim tirosinase berdasarkan kajian docking molekuler secara in silico ?
2. Bagaimana aktivitas ekstrak etanol ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) terhadap enzim tirosinase berdasarkan uji penghambatan enzim tirosinase secara in vitro?

## **C. Tujuan Penelitian**

1. Untuk mengetahui apakah senyawa aktif ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) memiliki aktivitas terhadap enzim tirosinase berdasarkan kajian docking molekuler enzim tirosinase secara in silico.
2. Untuk mengetahui apakah ekstrak etanol ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) memiliki aktivitas terhadap enzim tirosinase berdasarkan uji penghambatan enzim tirosinase secara in vitro.

## **D. Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi terkait farmakokinetik kandungan senyawa aktif ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) melalui docking molekuler berdasarkan prediksi ADMET secara in silico.
2. Memberikan informasi mengenai aktivitas kandungan senyawa ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) terhadap enzim tirosinase secara in vitro.

## **E. Batasan Penelitian**

1. Docking molekuler hanya dilakukan terhadap senyawa aktif ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam), native ligan dan kontrol senyawa dengan protein tirosinase (PDB ID: 2Y9X) sebagai target aksinya untuk melihat perbandingan aktivitas

masing-masing berdasarkan afinitas *binding energy* ( $\Delta G$ ), konstanta inhibisi ( $K_i$ ), residu asam amino yang berperan dan interaksi ikatan yang terbentuk.

2. Pada penelitian ini, pengujian aktivitas penghambatan enzim tirosinase hanya menggunakan ekstrak kasar ubi jalar hasil ekstraksi dan asam kojat sebagai kontrol.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Kajian Teori

##### 1. Tumbuhan Ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam)

Dalam beberapa tahun terakhir, produk nabati dianggap sebagai salah satu sumber utama untuk pengembangan obat baru dan pangan fungsional dikarenakan efek negatif yang ditimbulkan bahan berbasis sintetik. Saat ini, banyak penelitian terkait dengan produk alami memiliki dampak besar di bidang farmasi dan makanan (Bauer *et al.*, 2014). Ubi jalar diketahui memiliki banyak khasiat sebagai tanaman dikotil dari famili *convolvulaceae* dengan bagian yang dapat dimakan adalah umbinya (Islam, 2016).

Klasifikasi tumbuhan ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) berdasarkan (River *et al.*, 2013) adalah sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*  
Sub kingdom : *Tracheobionta*  
Super divisi : *Spermatophyta*  
Divisi : *Magnoliophyta*  
Kelas : *Magnoliopsida*  
Sub kelas : *Asteridae*  
Ordo : *Solanales*  
Famili : *Convolvulaceae*  
Genus : *Ipomoea*  
Spesies : *Ipomoea batatas* L. Lam

Selain kaya akan vitamin, umbinya mengandung karbohidrat kompleks, serat dan zat gizi mikro lainnya termasuk beberapa mineral penting seperti kalium, mangan, zat besi dan kalsium (Truong *et al.*, 2007). Secara alami, tumbuhan ini bebas dari lemak dan kolesterol, rendah sodium dan rendah kalori jika dibandingkan dengan kentang (Mohanraj & Sivasankar, 2014). Terlihat pada Gambar 1 deskripsi tumbuhan ubi jalar.

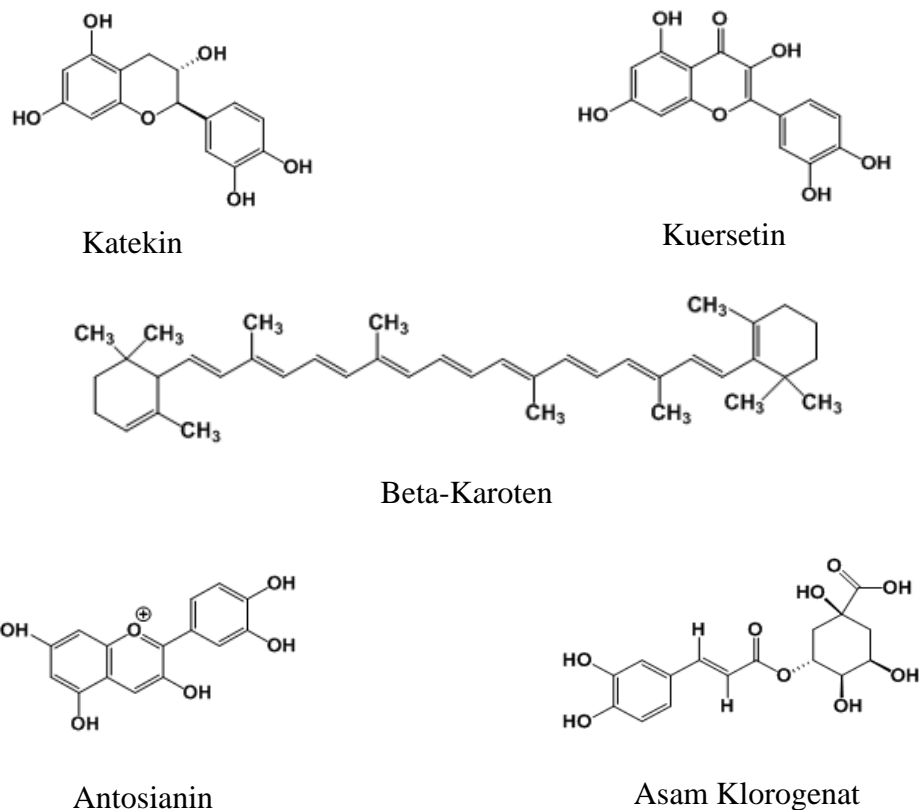


**Gambar 1.** Tumbuhan ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam)  
(Mohanraj & Sivasankar, 2014)

Tumbuhan ubi jalar termasuk tumbuhan semusim yang memiliki susunan tubuh utama terdiri dari batang, umbi, daun dan biji. Batang tumbuhan berbentuk bulat, tidak berkayu, berbuku-buku dengan tipe pertumbuhan tegak atau merambat. Pada daun tumbuhan ubi jalar berbentuk bulat sampai lonjong dengan tepi rata sedangkan bagian ujungnya runcing, helaian daun berukuran lebar dan menyatu seperti jantung serta ada juga yang menjari. Ubi jalar memiliki bunga berbentuk seperti terompet, tersusun dari lima helai daun mahkota, lima helai daun bunga dan satu tangkai putik serta mahkota bunga berwarna putih keunguan. Adapun untuk bentuk umbi dari tumbuhan ini adalah berbentuk lonjong agak panjang dengan berat

antara 200-250 gram/umbi. Sedangkan untuk warna umbinya sendiri bervariasi antara lain berwarna putih, kuning atau jingga, ungu dan memiliki rasa yang manis.

Tumbuhan ubi jalar banyak digunakan sebagai pangan fungsional di banyak negara dan diketahui memiliki kandungan senyawa aktif seperti karotenoid, antosianin, fenolat, serat, asam askorbat, asam folat dan mineral (Clifford *et al.*, 2014). Selain itu, ubi jalar juga memiliki kandungan senyawa yang diduga mempunyai aktivitas terhadap enzim tirosinase seperti beta-karoten, kuersetin, katekin, (Mohanraj & Sivasankar, 2014), antosianin (Islam, 2016) dan asam klorogenat (Zengin *et al.*, 2017). Terlihat pada Gambar 2 struktur senyawa aktif ubi jalar yang diunduh dari situs Pubchem Compound sebagai berikut.



**Gambar 2.** Struktur senyawa aktif ubi jalar

(Kim *et al.*, 2023)

## 2. Farmakologi Senyawa Aktif Ubi jalar

Sejumlah besar inhibitor tirosinase dengan kategori sedang hingga kuat telah dilaporkan selama dekade terakhir. Beberapa penelitian melaporkan bahwa inhibitor dengan kategori kuat diperoleh dari bahan sintetik, semi-sintetik dan alami. Senyawa tersebut berasal dari beberapa kelas kimia seperti fenolat, terpen, steroid, kalkon, flavonoid, alkaloid, asam lemak, kumarin, analog sildenafil, bipiperidin, biskumarin, oksadiazol dan tetraketon (Khan, 2012). Pengembangan terkait aktivitas farmakologi berbasis bahan alam dalam bidang kosmetik gencar dilakukan mengingat efek yang ditimbulkan relatif aman jika dibandingkan dengan bahan sintesis (Sari *et al.*, 2015).

Senyawa aktif bahan alam seperti polifenol dan flavonoid diketahui berpotensi sebagai inhibitor tirosinase karena dapat berikatan dengan bagian situs aktif enzim sehingga mampu menjadi inhibitor kompetitif enzim tirosinase (Zuo *et al.*, 2018). Tumbuhan ubi jalar diketahui memiliki kandungan senyawa aktif seperti beta-karoten yang berkhasiat sebagai antioksidan. Selain itu, golongan senyawa flavonoid seperti kuersetin, antosianin, katekin dan golongan polifenol seperti asam klorogenat yang dapat menghambat enzim tirosinase (Isemura, 2019).

Aktivitas senyawa beta-karoten dalam ubi jalar diketahui memiliki sifat antioksidan selain fungsi biologisnya sebagai pro-vitamin A. Kontribusi beta-karoten terhadap total kapasitas penangkapan radikal bebas diperkirakan sekitar 79,6% (Oki *et al.*, 2006). Ubi jalar diketahui memiliki senyawa katekin yang dikenal sebagai inhibitor secara selektif dalam melawan melanoma yang diaktifkan oleh enzim tirosinase (Broto, 2011). Peranan lain senyawa katekin melalui

penghambatannya terhadap enzim tirosinase dalam penurunan produksi melanin yang berlebih di dalam tubuh (Khan *et al.*, 2013). Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa katekin dapat digunakan sebagai inhibitor alami enzim tirosinase (Tang *et al.*, 2018). Kandungan senyawa kuersetin dalam ubi jalar diketahui dapat menghambat aktivitas monofenolase dan difenolase enzim tirosinase dengan penghambatan secara reversibel dan kompetitif terhadap aktivitas difenolase (Fan *et al.*, 2017).

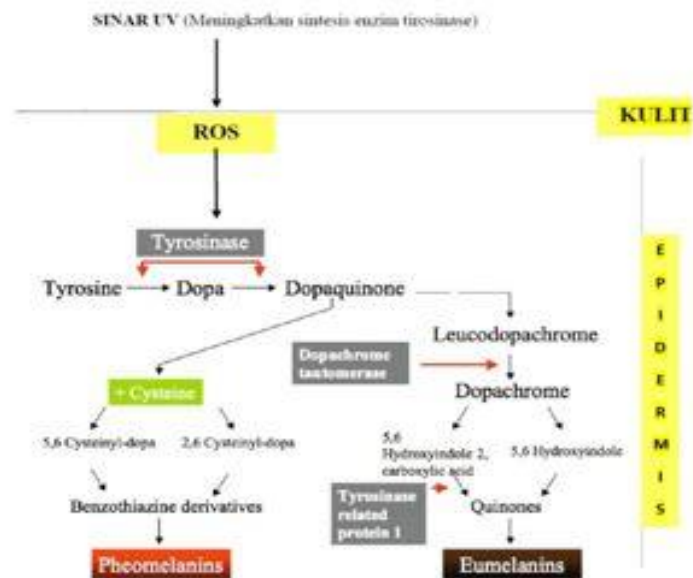
Senyawa antosianin yang merupakan kelompok utama senyawa polifenol yang memiliki beberapa sifat terapeutik dan fisiologis sebagai agen antineoplastik penangkal radiasi (Islam *et al.*, 2005). Aktivitas antosianin melalui penghilangan ROS yang berperan dalam produksi dan kerusakan DNA yang dihasilkan untuk mengaktifasi P53 pada fibroblas dermal manusia yang disinari Uv-B (Bae *et al.*, 2009). Sedangkan senyawa asam klorogenat merupakan senyawa fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan. Pada penelitian sebelumnya, menyatakan bahwa asam klorogenat dan katekin dalam ubi jalar memiliki aktivitas antioksidan dan dapat menghambat enzim tirosinase dalam membentuk melanin (Kho *et al.*, 2019).

Berdasarkan aktivitas senyawa aktif ubi jalar yang telah dijelaskan pada paragraf sebelumnya diketahui berkhasiat sebagai antioksidan dan juga sebagai inhibitor enzim tirosinase. Antioksidan diketahui berperan penting dalam penangkapan terhadap ROS, sehingga dapat menghambat sintesis enzim tirosinase (Kho *et al.*, 2019). Aktivitas senyawa aktif ubi jalar dalam menghambat enzim tirosinase bersifat reversibel dan kompetitif dikarenakan adanya korelasi yang terbentuk antara senyawa beta-karoten, kuersetin, katekin, antosianin, asam

klorogenat dalam dua reaksi berbeda yaitu monofenolase dan difenolase (Marliana *et al.*, 2016).

### 3. Enzim Tirosinase

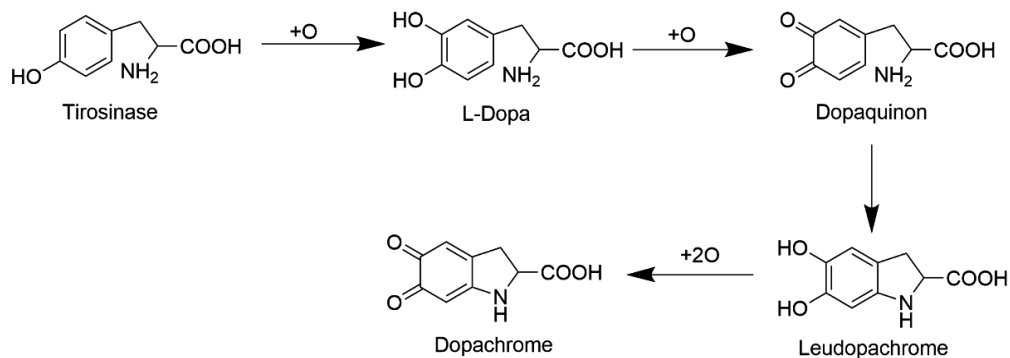
Enzim tirosinase merupakan monooksigenase yang mengandung dua ion tembaga Cu dan mengkatalisis dua reaksi berbeda pada biosintesis melanin dalam jalur melanogenesis (Ochiai *et al.*, 2016). Tirosinase termasuk salah satu dari tiga jenis enzim spesifik pigmen dalam melanosom dan secara luas berada pada mamalia, tumbuhan, bakteri, dan jamur (Hu *et al.*, 2016). Enzim ini mengkatalisis hidroksilasi monofenol menjadi O-difenol (aktivitas monofenolase) dan kemudian menjadi O-kuinon (aktivitas difenolase) yang kemudian menjadi melanin pada kulit (Oyama *et al.*, 2017). Terlihat Gambar 3 merupakan mekanisme molekuler enzim tirosinase sebagai berikut.



**Gambar 3.** Mekanisme kerja enzim tirosinase (Achsanul, 2019)



Melanin merupakan senyawa yang bertanggung jawab untuk pigmentasi kulit, mata dan rambut (Lai *et al.*, 2017). Berbagai inhibitor enzim tirosinase banyak ditemukan dalam bahan kosmetik seperti arbutin, sistein, hidrokuinon, l-glutation, asam kojat, asam glikolat, *polyhidroxymethyl* (PHM), dan asam retinoat yang selama penggunaannya dalam jangka panjang mengakibatkan efek samping yang menyebabkan karsinogenesis (Nur *et al.*, 2020). Akumulasi melanin yang berlebihan dapat menyebabkan beberapa gangguan pigmentasi, seperti bintik penuaan, melasma, melanoma, menghambat *over* ekspresi tirosinase dapat menurunkan pembentukan melanin (Sari *et al.*, 2015).



**Gambar 4.** Reaksi pembentukan dopakrom antara substrat L-DOPA dan enzim tirosinase (Correia *et al.*, 2021)

Pada Gambar 4 menunjukkan reaksi pembentukan dopakrom antara substrat L-DOPA dan enzim tirosinase sehingga menghasilkan melanin yang merupakan pigmen atau zat warna alami pada organel khusus termasuk makhluk hidup yang mempunyai dua bentuk yaitu eumelanin dan feomelanin. Pigmen eumelanin memiliki sifat tidak larut air dan berwarna coklat gelap kehitaman sedangkan feomelanin memiliki sifat yang larut dalam basa dan berwarna kemerahan yang disintesis berdasarkan reaksi dari oksidasi tirosin oleh enzim tirosinase dengan

mengkatalis orto-hidroksilasi menjadi 3,4-dihidroksifenilalanin atau DOPA (monofenolase) dan oksidasi DOPA menjadi dopakuinon (difenolase). O-kuinon yang dihasilkan dari reaksi ini dapat bertransformasi menjadi pigmen dengan reaksi enzimatik maupun reaksi non-enzimatik (Meiliana, 2016). Analisis skrining virtual pada penelitian ini dilakukan terhadap enzim tirosinase *Agaricus bisporus* dengan kode protein (PDB ID: 2Y9X) yang merupakan hasil dari kristalografi (Ismaya *et al.*, 2011).

Enzim tirosinase dengan kode tersebut telah diterbitkan dalam bentuk struktur kristal kompleks tirosinase jamur dengan inhibitor tropolone yang sangat potensial. Namun ada kekurangan mengenai informasi tentang interaksi antarmolekul inhibitor tirosinase. Sehingga untuk mengatasi masalah tersebut, beberapa peneliti mulai memanfaatkan pendekatan secara *in silico* berdasarkan metode docking molekuler (Khan, 2012).

#### **4. Metode Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan suatu teknik pemisahan kimia untuk memisahkan atau menarik beberapa komponen atau analit senyawa dari suatu sampel dengan menggunakan pelarut-pelarut tertentu yang sesuai dengan karakteristik senyawa aktif (Mukhrani, 2014). Ekstraksi sampel padatan dapat dilakukan jika analit yang diinginkan dapat larut dalam pelarut pengestraksi (Sholikha & Puspitasari, 2023). Sifat komponen yang diekstrak bergantung pada polaritas, termostabil dan pH (Lee, 2019). Prinsip pemisahan pada metode ekstraksi didasarkan atas kemampuan atau daya larut analit dalam pelarut tertentu. Metode pemisahan senyawa dengan

metode ekstraksi yang sering digunakan adalah maserasi, perkolasi dan sokletasi (Sholikha & Puspitasari, 2023).

Dalam penelitian ini, pemilihan metode ekstraksi terhadap sampel ubi jalar dilakukan dengan metode sokletasi dikarenakan merupakan salah satu metode pemisahan senyawa kimia dengan pemanasan dan pelarut mengalami kontak dengan sampe secara terus-menerus (Irianty & Yenti, 2014). Apabila dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya, sokletasi memberikan hasil ekstrak yang lebih banyak dengan pelarut yang digunakan lebih sedikit, waktu lebih cepat dan sampel diekstraksi secara sempurna. Aktivitas biologis saat pemanasan tidak hilang dikarenakan adanya pendingin pada kondensor sehingga teknik ini dapat digunakan untuk senyawa aktif yang tidak tahan pemanasan (Puspitasari & Proyogo, 2017).

## **5. Metode Docking Molekuler**

Pendekatan secara *in silico* sekarang memungkinkan penyaringan virtual jutaan senyawa dalam waktu yang terjangkau, sehingga mengurangi biaya awal identifikasi dan meningkatkan peluang menemukan kandidat obat yang diinginkan (Girija *et al.*, 2010). Analisis dengan skrining virtual memiliki peranan cukup penting dalam pengembangan suatu obat, karena dapat memberikan prediksi hasil aktivitas dari banyaknya senyawa yang dianalisis. Dengan demikian, peneliti dapat dengan mudah menyaring senyawa-senyawa berdasarkan hasil skrining virtual untuk pengembangan dalam uji laboratorium (Pinzi & Rastelli, 2019).

Teknik pemodelan molekul tersedia untuk memfasilitasi tugas penemuan obat, salah satunya menggunakan metode docking molekuler yang diklasifikasikan sebagai pendekatan berbasis struktur dan berbasis ligan secara komputasi (Pinzi &

Rastelli, 2019). Metode docking molekuler merupakan penambatan antara ligan dan reseptor protein dengan tujuan untuk memprediksi posisi atau konformasi dan orientasi dari ligan ketika terikat pada reseptor protein. Interaksi dikatakan baik apabila memiliki energi yang minimum (Girija *et al.*, 2010). Dalam penelitian ini, metode docking molekuler dilakukan secara komputasi dengan menggunakan beberapa *software* seperti Autodock-4, Biovia DS, Avogadro, Chem Office 2019 dan Pymol (Goodsell *et al.*, 2021).

Pendekatan secara *in silico* dengan metode docking molekuler digunakan dalam penemuan obat baru yang lebih baik secara terapeutik, memprediksi interaksi antara ligan dan reseptor protein pada tingkat molekuler atau menggambarkan HKSA (Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas) suatu obat (Pinzi & Rastelli, 2019). Tujuan dari metode docking molekuler adalah untuk memberikan prediksi struktur kompleks antara ligan dan reseptor dengan komputasi yang dapat dicapai melalui dua langkah yang saling terkait (Meng *et al.*, 2011). Analisis dengan metode docking molekuler diketahui banyak *software* yang dapat digunakan salah satunya Autodock-4 yang merupakan pengembangan dari *The Script Research Institute* (Morris & Lim, 2017).

Tahapan pertama yang dilakukan dalam metode docking molekuler adalah preparasi reseptor protein dan native ligan dengan *software* Biovia DS yang bertujuan untuk memudahkan dalam pemisahan molekul air dari senyawa yang akan digunakan. Tahapan kedua adalah redocking atau penambatan kembali antara native ligan dan reseptor protein yang dikenal dengan tahapan validasi yang

bertujuan untuk membuktikan apakah valid atau tidaknya metode yang digunakan dengan parameter nilai RMSD  $< 2 \text{ \AA}$  (Meng, 2011).

Tahapan ketiga merupakan optimasi geometri terhadap senyawa atau ligan uji menggunakan Avogadro yang bertujuan untuk mendapatkan konformasi senyawa yang lebih baik dan stabil (Govindarasu *et al.*, 2021). Tahapan keempat adalah meminimisasi energi dengan Chem Office yang bertujuan untuk mendapatkan senyawa dengan energi yang paling rendah (minimum) dikarenakan pada kondisi tersebut senyawa mempunyai konformasi paling stabil (Govindarasu *et al.*, 2021). Energi ikatan terurai menjadi beberapa komponen energi, seperti ikatan hidrogen, interaksi ionik, efek hidrofobik dan entropi ikatan (Meng *et al.*, 2011). Semakin negatif nilai afinitas energi ikatan ( $\Delta G$ ) dan semakin kecil nilai konstanta inhibisi ( $K_i$ ) menunjukkan afinitas ligan yang semakin tinggi (Allouche, 2012).

Tahapan kelima dalam metode docking molekuler adalah analisis dan visualisasi hasil menggunakan Biovia DS dan Pymol yang bertujuan untuk mengetahui nilai afinitas energi dan interaksi yang terjadi antara ligan dan reseptor protein seperti ikatan hidrogen, hidrofobik dan Van der Waals. Metode berbasis struktur mengandalkan informasi yang diperoleh dari pengetahuan tentang struktur tiga dimensi dari target yang diinginkan dan memungkinkan database molekul sesuai dengan komplementaritas struktural dan elektronik ligan terhadap target tertentu. Pada konsepnya, simulasi docking molekuler adalah salah satu pendekatan secara *in silico* berbasis struktur yang paling populer, yang membantu memprediksi interaksi yang terjadi antara molekul dan target biologis (Kitchen *et al.*, 2004).

Parameter metode docking molekuler yang dianalisis berdasarkan penilaian empiris berupa nilai RMSD, afinitas, konstanta inhibisi dan interaksi ikatan yang terbentuk seperti interaksi elektrostatik, hidrogen dan hidrofobik dari hasil penambatan antara ligan dan reseptor protein serta analisis prediksi ADMET. Parameter RMSD dalam metode docking molekuler juga sebagai standar untuk mengetahui valid atau tidaknya suatu metode yang digunakan (Asadzadeh *et al.*, 2015). Metode dikatakan valid apabila hasil validasi menunjukkan nilai RMSD yang sesuai literatur, sehingga konformasi hasil penambatan senyawa mendekati hasil eksperimental.

Analisis prediksi ADMET digunakan untuk melihat parameter berdasarkan absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitas dari ligan atau senyawa uji untuk meningkatkan peluang dalam proses penemuan obat dengan memprediksi berbagai sifat farmakokinetik senyawa bioaktif (Huang *et al.*, 2019). Analisis farmakokinetika ADMET umumnya dimulai dengan identifikasi kemudian berlanjut melalui tahap pengoptimalan prospek, pemilihan dan pengembangan. Sebagian besar hasil dari program pengembangan obat telah ditentukan sebelumnya pada titik pemilihan kandidat. Adapun rentang fenomena yang dipelajari harus sangat komprehensif dan bahkan satu parameter saja mungkin bertanggung jawab atas kegagalan obat (Singh, 2006).

Pendekatan secara *in silico* melalui docking molekuler memungkinkan peneliti dapat mengetahui interaksi yang terbentuk antara ligan dan reseptor protein. Interaksi yang terbentuk melalui ikatan hidrogen dan hidrofobik pada situs aktif protein. Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang terbentuk antara molekul-molekul

yang sangat polar dan mengandung atom hidrogen. Ikatan ini terjadi antara atom hidrogen dengan atom lain yang memiliki sifat elektronegatif yang tinggi seperti O, F dan N. Selain itu, ikatan hidrogen juga merupakan jenis khusus interaksi dipol-dipol antara atom hidrogen dalam ikatan polar seperti (N-H, O-H atau F-H) dengan atom elektronegatif O, F dan N. Suatu senyawa dapat membentuk ikatan hidrogen apabila memiliki atom H, memiliki atom dengan keelektronegatifan yang tinggi (O, F, N) dan terdapat pasangan elektron bebas.

Senyawa yang memiliki ikatan hidrogen mempunyai titik didih yang tinggi (Mansour *et al.*, 2022). Sedangkan ikatan hidrofobik merupakan ikatan lemah tetapi sangat penting terhadap interaksi obat yang larut pada lemak dalam membran sel. Interaksi hidrofobik sebagian besar merupakan efek entropik yang berasal dari terganggunya ikatan hidrogen yang sangat dinamis antara molekul air oleh zat terlarut non-polar yang membentuk struktur di sekitar molekul non-polar. Struktur ini terbentuk lebih tinggi daripada molekul bebas air, karena molekul air dapat mengatur dirinya sendiri secara maksimal dalam berinteraksi. Hal tersebut menghasilkan keadaan entropi yang lebih tinggi dan menyebabkan molekul non-polar berkumpul bersama untuk mengurangi luas permukaan yang terkena air serta mengurangi sistem entropi (Lee, 2019).

## **6. Software Metode Docking Molekuler**

### **a. Autodock**

Autodock merupakan metode yang digunakan untuk mengikat ligan fleksibel kedalam protein. Metode ini digunakan dalam memprediksi struktur biomolekuler seringkali sangat dibatasi oleh kondisi infrastruktur komputasi yang

cukup terbatas. Metode dinamika molekul yang kuat seperti *software* AMBER yang dapat memberikan representasi berbasis fisika, tetapi terbatas pada skala waktu singkat dan biasanya menjelajahi ruang konformasi lokal disekitar model awal. Metode ini sangat inovatif menggunakan representasi sederhana dari interaksi antara ligan dan reseptor dengan metode berbasis skor interaksi. Dengan demikian, ligan tersebut dapat mencari ruang konformasi lebih besar yang diperlukan dalam penelitian komputasi dengan metode docking molekuler dalam penemuan obat baru (Goodsell *et al.*, 2021).

Autodock mengambil pendekatan perantara, menggunakan medan gaya berbasis fisika yang mirip dengan AMBER, tetapi penggunaannya berdasarkan pendekatan evaluasi energi volumetrik yang memungkinkan docking untuk mengeksplorasi ruang konformasi besar dari fleksibilitas ligan. Autodock telah digunakan dalam berbagai penelitian di seluruh dunia (Eger *et al.*, 2022).

Autodock tools (ADT) adalah simulasi grafis untuk menyiapkan dan menjalankan Autodock, perangkat lunak penambatan otomatis yang dirancang untuk memprediksi bagaimana molekul kecil, seperti substrat atau kandidat obat dalam mengikat reseptor dari struktur tiga dimensi protein yang diketahui. Vasquez *et al.*, (2020) menjelaskan bahwa metode untuk melakukan pencarian konformasi berdasarkan Lamarckian Genetic Algoritma (LGA) yang menjelaskan tentang konformasi populasi dalam percobaan terhadap satu senyawa yang bermutasi secara berturut-turut. Selain itu, konformasi juga bersaing secara analog dengan evolusi biologis yang kemudian akhirnya memilih satu senyawa dengan energi terendah (Goodsell *et al.*, 2021).



*The Script Research Institute* mengembangkan *software* Autodock-4 yang digunakan dalam metode docking molekuler berdasarkan medan gaya energi bebas semi-empiris untuk memprediksi energi pengikatan molekul kecil (ligan) terhadap target makromolekul (reseptor). Pengembangan dan pengujian terhadap medan gaya telah dijelaskan sebelumnya, dimana medan gaya didasarkan pada model termodinamika komprehensif yang memungkinkan penggabungan energi intramolekul kedalam prediksi energi bebas ikatan. Hal ini dilakukan dengan mengevaluasi energi dalam keadaan terikat dan tidak terikat dengan menggabungkan metode desolvasi berbasis muatan baru yang menggunakan satu set tipikal jenis muatan atom (Allouche, 2012).

Metode ini telah dikalibrasi pada satu set 188 kompleks protein-ligan yang beragam dengan struktur dan energi ikat yang diketahui, menunjukkan kesalahan standar sekitar 2-3 kcal/mol dalam prediksi energi bebas pengikatan dalam studi validasi silang. Aspek LGA adalah fitur tambahan yang memungkinkan konformasi individu untuk mencari ruang konformasi, menemukan area dengan dengan energi minimum, kemudian meneruskan informasi ini ke generasi berikutnya. Simulasi metode berdasarkan pencarian genetik algoritma juga tersedia pada Autodock-4 berdasarkan besarnya medan gaya energi bebas semi-empiris untuk memprediksi energi bebas pengikatan ligan terhadap reseptor protein (Allouche, 2012).

#### **b. Biovia Discovery Studio Visualizer**

Biovia DS adalah rangkaian perangkat lunak untuk mensimulasikan interaksi antara ligan dan reseptor protein. Software ini dikembangkan dan didistribusikan oleh Dassault Systemes Biovia yang bertujuan untuk

mengeksplorasi interaksi intramolekul antar atom dan juga memungkinkan untuk mengetahui, merubah, urutan dan keselarasan urutan serta struktur molekul (Dassault systemes, 2016). Interaksi antara ligan dan reseptor protein baik secara inter-molekul atau intra-molekul masih dipelajari secara eksperimental dan teoritis dengan kombinasi fase yang berbeda seperti padat-padat, padat-cair, cair-as, dan lain sebagainya. Pada metode simulasi docking molekuler, interaksi yang terjadi antara obat dan reseptor atau situs obat sangat penting dalam proses biologis dan farmakologis. Hubungan antara struktur elektronik dan aktivitas biologis menghasilkan sejumlah besar linier dan persamaan non-linier yang menghubungkan sifat interaksi (Saeed *et al.*, 2021).

### **c. Avogadro**

Avogadro merupakan *software* editor dan visualisator molekul canggih yang dirancang untuk penggunaan lintas platform dalam kimia komputasi, pemodelan molekul, bioinformatika, ilmu material dan bidang terkait. Software Avogadro sering digunakan dalam pemodelan struktur molekul. Avogadro dapat meningkatkan aksesibilitas tipe dari data kimia dengan *framework* paradigma model, *view* dan *controller* (López, 2014). Pemodelan struktur dengan avogadro terdiri dari molekul, atom dan ikatan. Avogadro dirancang untuk penggunaan dalam lintas platform dalam kimia komputasi, pemodelan molekul dan bioinformatika berkualitas tinggi yang lebih fleksibel (López, 2014).

### **d. Chem Office**

Chem Office merupakan salah satu *software* yang dapat digunakan dalam bidang kimia komputasi. Beberapa fungsi dari perangkat lunak tersebut adalah

untuk membuat struktur kimia, membuat nama kimia dari struktur kimia, membuat struktur streokimia dari nama kimia, menghitung rumus molekul dan berat molekul serta perkiraan spektrum NMR dari struktur kimia (Agustina *et ai.*, 2018). Chem office memiliki banyak kelebihan dan mempermudah peneliti dalam menggambar rumus kimia. Untuk menggambar rumus molekul kimia, Chem office menyertakan Chem Draw dan Chem 3D. Chem Draw merupakan salah satu *software* yang digunakan untuk menggambar struktur dua dimensi yang digunakan dalam bidang ilmu kimia seperti kimia organik, biokimia, dan polimer.

*Software* Chem office dapat membantu kita dalam penggambaran struktur kimia dengan berbagai sarana yang tersedia di dalamnya. Chem Draw merupakan *software* kimia dari Cambridge yang memiliki banyak fungsi, diantaranya membuat nama dan struktur senyawa, membuat struktur streokimia dengan benar dari nama kimia, menghitung rumus molekul dan berat molekul serta mendapatkan nama IUPAC dengan akurat dari struktur senyawa. Perkiraan spektra-NMR dari struktur suatu senyawa dengan atom langsung dengan korelasi spektral.

Chem Draw dilengkapi dengan peringatan jika terjadi kesalahan dalam pembuatan struktur kimia berupa garis berwarna merah yang mengelilingi bagian struktur yang salah. Chem Draw sangat bermanfaat, khususnya bagi seseorang yang keseharian berkecimpung dibidang kimia. Program ini dapat digunakan untuk menggambar berbagi bentuk atau rumus molekul senyawa dengan lebih mudah jika dibandingkan menggambar melalui microsoft word yang sangat rumit seperti pemodelan struktur senyawa kimia khususnya hidrokarbon (Agustina *et al.*, 2018).

Sementara itu, untuk pemodelan tiga dimensi struktur senyawa kimia dapat dibuat melalui Chem 3D. Selain itu, *software* ini banyak digunakan dalam metode simulasi docking molekuler terutama untuk meminimisasi struktur senyawa yang bertujuan untuk mendapatkan konformasi struktur dengan energi minimum. Ada beberapa metode minimisasi energi yang dapat digunakan dalam Chem 3D, seperti MM2 dan MMF94 berdasarkan mekanika molekul menggunakan medan gaya untuk membandingkan konformasi dari molekul yang sama dan mencari ruang konformasi dengan variasi sudut dihedral tunggal (Agustina *et al.*, 2018).

## 6.5 Pymol

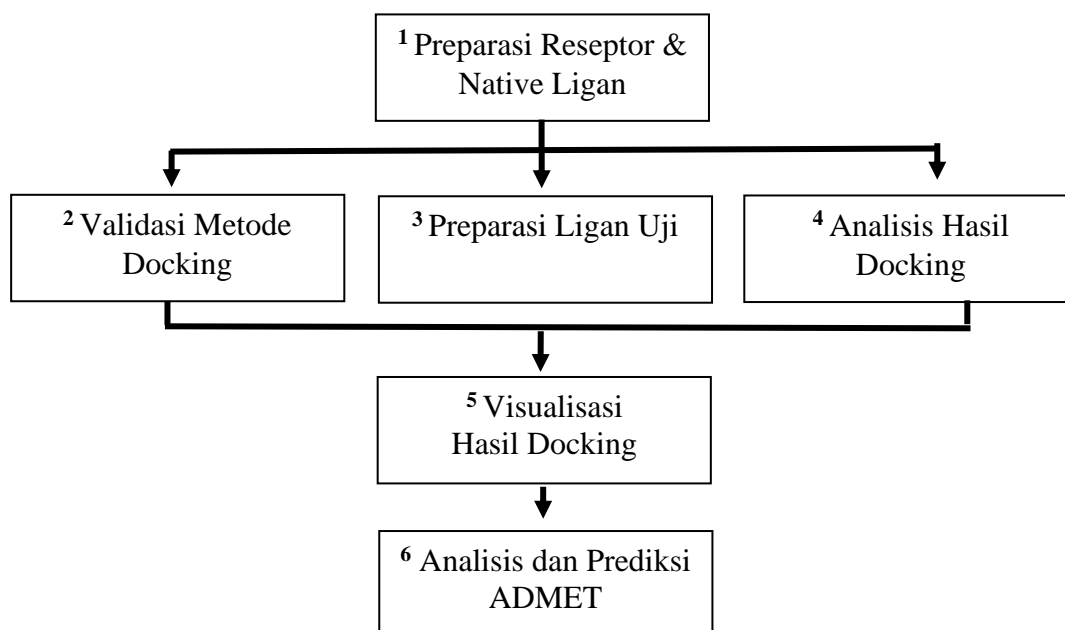
Pymol adalah visualisasi molekuler yang digunakan dalam menganalisis hasil docking molekuler. Software Pymol menggunakan lintas *Platform widget toolkit* (TK) yang menghasilkan visualisasi makromolekul berkualitas tinggi (Yuan *et al.*, 2017). Pymol merupakan salah satu alat visualisasi makromolekul yang banyak digunakan, karena *software* ini dijalankan dengan program Python yang merupakan salah satu bahasa pemrograman paling populer dalam bidang komputasi. Selain membahas visualisasi dan analisis yang disempurnakan dari fungsi Pymol, topiknya juga meluas kedalam pemodelan protein-ligan, simulasi molekuler dan penyaringan virtual. Fungsi penemuan obat secara komputasi oleh Pymol dapat diterapkan dalam proses penemuan kandidat obat yang baru untuk berbagai target aksinya termasuk penemuan inhibitor terhadap enzim tirosinase (Yuan *et al.*, 2017).

## B. Kerangka Teori

Pengembangan produk obat baru dan fungsional berbasis alami dalam beberapa waktu terakhir sering dilakukan mengingat banyaknya efek negatif dari penggunaan obat berbasis sintetik. Banyaknya penelitian terhadap produk berbasis alami memberikan dampak besar dibidang industri farmasi salah satunya ekstrak ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) yang mempunyai banyak manfaat dikarenakan memiliki banyak senyawa yang terkandung di dalamnya yang berkaitan dengan aktivitas penghambatan enzim tirosinase. Adapun kandungan senyawa ubi jalar yang diduga memiliki aktivitas penghambatan enzim tirosinase adalah senyawa katekin, kuersetin, asam klorogenat, (Zengin *et al.*, 2017), antosianin (Islam, 2016), beta-karoten (Mohanraj & Sivasankar, 2014).

Penelitian aktivitas ekstrak ubi jalar sebagai inhibitor enzim tirosinase berdasarkan dua tahap pengujian yaitu secara *in silico* melalui docking molekuler antara senyawa aktif ubi jalar dan reseptor protein tirosinase dan pengujian penghambatan enzim tirosinase secara *in vitro* untuk membuktikan apakah senyawa yang terkandung dalam ekstrak ubi jalar berpotensi untuk menggantikan inhibitor sintetik enzim tirosinase. Hal tersebut didasarkan atas beberapa senyawa inhibitor berbasis sintetik yang dapat menyebabkan efek karsinogenik pada manusia (Yuan *et al.*, 2017). Pada Gambar 5 menunjukkan pengujian tahap 1 penghambatan enzim tirosinase secara *in silico* dengan metode docking molekuler.

## 1. Pengujian Tahap I secara In silico



**Gambar 5.** Kerangka skema pengujian secara in silico (Godshell *et al.*, 2016)

Preparasi reseptor protein dilakukan terhadap struktur kristal tiga dimensi protein tirosinase *Agaricus bisphorus* yang sebelumnya di unduh pada situs RCSB Protein Data Bank. Kemudian dilakukan pemisahan terhadap molekul air dan native ligan dari protein menggunakan software Biovia DS. Preparasi native ligan protein tirosinase yaitu dengan cara menghilangkan reseptor protein dan beberapa molekul lain yang melekat pada struktur native ligan menggunakan *software* Biovia DS (Goodsell *et al.*, 2021).

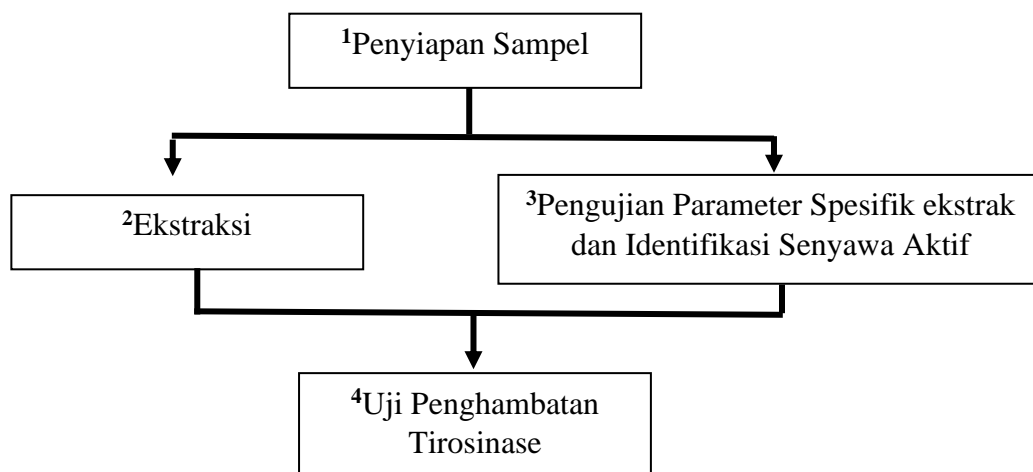
Struktur tiga dimensi native ligan hasil preparasi kemudian digunakan dalam proses validasi metode docking molekuler yang dilakukan dengan metode redocking menggunakan native ligan dari protein AbTYR (PDB ID: 2Y9X). Pada tahapan ini, pembuatan *grid box* perlu dilakukan yang bertujuan untuk mendapatkan koordinat dari native ligan yang akan digunakan sebagai koordinat

ligan atau senyawa uji. Validasi metode docking dilakukan dengan cara penambatan kembali (redocking) antara native ligan dan reseptor AbTYR dengan parameter nilai RMSD kurang dari 2 Å (Giantari *et al.*, 2019).

Preparasi struktur ligan uji dibangun dengan menggunakan *software* Chem Draw. Kemudian dilakukan tahap optimasi geometri menggunakan Avogadro dengan penambahan atom hidrogen pada struktur ligan uji dan kemudian dilakukan proses minimisasi energi menggunakan metode (MM2) pada Chem 3D dengan tujuan untuk meminimisasi energi untuk mendapatkan struktur yang lebih stabil. Hasil optimasi tersebut kemudian dikonversi menjadi file (PDB) untuk dapat digunakan dalam proses docking molekuler pada Autodock-4.

Analisis hasil docking molekuler dengan pose terbaik kemudian dianalisa menggunakan *software* Biovia DS. Parameter yang dianalisis meliputi besar afinitas binding energy ( $\Delta G$ ), konstanta inhibisi ( $K_i$ ), residu asam amino dan jumlah interaksi ikatan yang terbentuk. Kemudian dilakukan analisis parameter ADMET (Absorpsi Distribusi Metabolisme Eksresi dan Toksisitas) dengan parameter berdasarkan penelitian (Huang *et al.*, 2019) sebelumnya tentang analisis prediksi ADMET seperti lipofilitas (Log P), TPSA (*Topology Polar Surface Area*), permeabilitas kulit, sensitifitas kulit, (Log Kp), inhibitor CYP1A2, aturan Lipinski dan bioavailabilitas. Sedangkan untuk aturan Lipinski digunakan untuk mengetahui apakah senyawa-senyawa tersebut layak untuk digunakan sebagai kandidat inhibitor alami tirosinase (Huang *et al.*, 2019). Gambar 6 menunjukkan pengujian penghambatan enzim tirosinase secara *in vitro* dengan metode spektrofotometri uv-vis.

## 2. Pengujian Tahap II secara In vitro



**Gambar 6.** Kerangka skema pengujian secara in vitro (Mahardika, 2012)

Sampel ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) dikumpulkan dan disortasi basah kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Selanjutnya ditiriskan, dan ditimbang. selanjutnya dilakukan perajangan. Setelah itu, dilakukan pengeringan dengan menggunakan oven dengan suhu 60-70 °C dan kemudian ditimbang bobot keringnya. Sampel diekstraksi menggunakan alat sokletasi. Serbuk simplisia ubi jalar kering 500 mg dimasukkan ke dalam bejana, saring dan dimasukkan kedalam ekstraktor soklet. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan 50 ml etanol 60% dalam air. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian di water bath selama 24 jam hingga diperoleh ekstrak kental ditimbang dan dilakukan pengujian parameter spesifik ekstrak (Zengin *et al.*, 2017).

Pengujian parameter spesifik ekstrak dilakukan dengan uji organoleptik dengan cara pengamatan menggunakan panca indra terhadap ekstrak kental yang meliputi bentuk, warna, bau, rasa dan dihitung persen rendemen ekstrak (Syamsul



*et al.*, 2017). Kemudian dilakukan identifikasi secara kualitatif terhadap kandungan senyawa aktif ubi jalar dengan uji reaksi tabung menggunakan pereaksi tertentu dan dilanjutkan dengan uji KLT menggunakan sinar Uv-254 nm dan 366 nm untuk menentukan nilai Rf dari bercak noda yang terbentuk pada lempeng silica (Prasetyo, 2020). Pengujian penghambatan aktivitas enzim tirosinase menggunakan metode spektrofotometri Uv-vis berdasarkan perbandingan nilai absorbansi dan konsentrasi sampel sehingga diperoleh persamaan regresi linear yang kemudian digunakan untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub> (Mahardika, 2012).

### **C. Hipotesis**

Pengembangan obat berbasis bahan alam seperti ekstrak ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) yang diketahui memiliki kandungan senyawa kimia seperti beta-karoten, kuersetin, katekin, antosianin dan asam klorogenat yang diduga berpotensi sebagai inhibitor enzim tirosinase melalui jalur stress oksidatif terhadap ROS. Dengan demikian, perlu dilakukan pengujian secara *in silico* dan *in vitro* mengingat eksplorasi terkait kandungan senyawa aktif ubi jalar masih sangat minim dalam pengembangan obat berbasis bahan alam. Sehingga dengan informasi tersebut, ekstrak ubi jalar dapat dijadikan sebagai kandidat alami inhibitor enzim tirosinase yang relatif aman digunakan jika dibandingkan dengan inhibitor berbasis sintetik.

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Pengujian Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase Secara *In silico* Berdasarkan Docking Molekuler**

##### **1. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat komputer dengan spesifikasi ASUS X441B CPU : AMD dual core (A6-9225, up to 3.0 GHz) memori RAM : 4GB. *Software* Autodock 4.2.3 *Script Research Institute*, Chem Office 2019, Biovia Discovey Studio Visualizer (BDS), Avogadro, Pymol, *website* SwissADME dan pKCSM.

Bahan yang digunakan pada metode docking molekuler ini adalah struktur kristal PPO3, sebuah tirosinase dari *Agaricus bisporus* dalam bentuk deoksi yang mengandung sub-unit mirip seperti lektin dengan native ligan tropolone dengan kode (PDB: 2Y9X) yang diperoleh dari situs <http://rcsb.org/pdb/struktur>. Struktur senyawa aktif ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) seperti beta-karoten, kuersetin, katekin, antosianin dan asam klorogenat. Asam kojat digunakan sebagai kontrol positif dengan struktur bentuk tiga dimensi diperoleh dari situs Pubchem <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov//>.

## **2. Prosedur Pengujian**

### **a. Preparasi Reseptor Enzim Tirosinase**

Data struktur tiga dimensi kristal reseptor yang digunakan untuk analisis docking molekuler diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) pada situs <http://rcsb.org/pdb/struktur>. Reseptor yang digunakan adalah struktur kristal protein tirosinase (PDB ID: 2Y9X) dari *Agaricus bisporus* (AbTYR) dengan inhibitor tropolone pada situs aktif. Reseptor yang berupa makromolekul dipisahkan dari molekul lain seperti air dan ligan alaminya. Pemisahan dilakukan menggunakan *software* Biovia DS.

### **b. Preparasi Native Ligan Tropolone (OTR) Enzim Tirosinase**

Pada tahapan ini, preparasi native ligan tropolone (OTR) enzim tirosinase AbTYR dilakukan dengan cara ligan dipisahkan dari reseptor dan beberapa molekul lain yang melekat pada strukturnya. Pemisahan ligan dilakukan dengan menggunakan *software* Biovia DS. Kemudian struktur tiga dimensi ligan hasil preparasi tersebut yang akan digunakan dalam proses validasi metode docking molekuler.

### **c. Validasi Metode Docking Molekuler**

Validasi metode docking molekuler dilakukan dengan metode redocking menggunakan native ligan dari protein AbTYR (PDB: 2Y9X). Pada tahapan ini, pembuatan *grid box* perlu dilakukan yang bertujuan untuk mendapatkan koordinat dari native ligan yang akan digunakan sebagai koordinat ligan uji. Proses validasi akan memberikan hasil penambatan kembali (Redocking) antara native ligan dan reseptor AbTYR yang lebih mendekati hasil eksperimental dengan parameter nilai

RMSD kurang dari 3 Å (Giantari *et al.*, 2019). RMSD menunjukkan penyimpangan posisi yang terjadi antara ligan hasil validasi dan ligan hasil eksperimental. Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan posisi ligan hasil redocking akan mendekati posisi ligan hasil kristalografi (Kontoyianni *et al.*, 2004).

#### **d. Preparasi Ligan Uji/Senyawa Uji**

Struktur ligan uji dibangun dengan menggunakan *software* Chem Draw. Kemudian dilakukan tahap optimasi geometri menggunakan Avogadro dengan penambahan atom hidrogen pada struktur ligan uji dan kemudian dilakukan proses minimisasi energi menggunakan metode (MM2) pada Chem 3D dengan tujuan untuk meminimisasi energi untuk mendapatkan struktur yang lebih stabil. Hasil optimasi tersebut kemudian dikonversi menjadi file (PDB) untuk dapat digunakan dalam proses docking molekuler pada Autodock-4.

#### **e. Docking Molekuler Antara Ligan Uji dan Enzim Tirosinase**

Pengaturan parameter *grid box* dilakukan menggunakan *software* Autodock-4. Koordinat *grid box* ditentukan berdasarkan koordinat native ligan dari file reseptor yang digunakan pada saat validasi, kemudian dilakukan proses penambatan menggunakan Autodock-4. Analisis dan visualisasi hasil simulasi docking molekuler. Penentuan konformasi ligan hasil docking (pose terbaik) dilakukan dengan memilih konformasi ligan yang memiliki energi ikatan paling rendah. Hasil docking dengan pose terbaik kemudian dianalisa menggunakan *software* Biovia DS.

Parameter yang dianalisis dalam docking molekuler meliputi afinitas *binding energy* ( $\Delta G$ ), konstanta inhibisi ( $K_i$ ), residu asam amino dan jumlah interaksi ikatan yang terbentuk. *Software* Biovia DS kemudian digunakan untuk visualisasi hasil dari penambatan senyawa uji terhadap protein dengan melihat adanya ikatan yang terjadi antara ligan dan protein secara dua dimensi dan tiga dimensi *software* Pymol untuk melihat surface area ligan uji dalam protein.

#### **f. Prediksi ADMET dan Evaluasi Berdasarkan Aturan Lipinski**

Hasil penambatan senyawa uji terhadap reseptor kemudian dilanjutkan dengan studi seperti prediksi ADMET dan evaluasi berdasarkan aturan Lipinski. Analisis yang dilakukan dalam prediksi ADMET bertujuan untuk mengetahui apakah senyawa yang terkandung dalam tumbuhan ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) memiliki adsorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitas yang baik dengan menggunakan aplikasi pada situs pKCSM dan SwissADME. Hal tersebut meningkatkan peluang proses penemuan obat dengan memprediksi berbagai sifat farmakokinetik senyawa bioaktif. Analisis farmakokinetika ADMET umumnya dimulai dengan identifikasi kemudian berlanjut melalui tahap pengoptimalan prospek, pemilihan dan pengembangan.

Sebagian besar hasil program pengembangan obat telah ditentukan sebelumnya pada titik pemilihan kandidat, rentang fenomena yang dipelajari harus sangat komprehensif dan bahkan satu parameter saja mungkin bertanggung jawab atas kegagalan obat (Singh, 2006). Adapun parameter yang dilihat pada tahapan ini berdasarkan penelitian Huang *et al.*, (2019) sebelumnya tentang analisis prediksi ADMET seperti lipofilitas ( $\log P$ ), TPSA (*Topology Polar Surface Area*),

permeabilitas kulit, sensitifitas kulit, (Log Kp), inhibitor CYP1A2, aturan Lipinski dan bioavailabilitas. Sedangkan untuk aturan Lipinski digunakan untuk mengetahui apakah senyawa-senyawa tersebut layak untuk digunakan sebagai kandidat inhibitor alami tirosinase.

### **3. Ekstraksi dan Pengujian Parameter Spesifik Ekstrak**

#### **a. Penyiapan Sampel**

Sampel ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) dikumpulkan dan disortasi basah kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Sampel ubi jalar dirajang dan dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 60-70 °C. Sampel kemudian ditimbang bobot keringnya.

#### **b. Ekstraksi**

Sampel diekstraksi menggunakan alat sokletasi. Serbuk simplisia ubi jalar kering 500 mg dimasukkan ke dalam bejana, saring dan dimasukkan kedalam ekstraktor soklet. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan etanol 60%. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh kemudian di water bath selama 24 jam hingga diperoleh ekstrak kental dan ditimbang (Zengin *et al.*, 2017). Ekstrak kemudian disimpan dalam kemasan plastik, lalu disimpan dalam kulkas sebelum digunakan sebagai bahan analisis.

### **c. Pengujian Parameter Spesifik Ekstrak**

#### **1). Pengamatan Organoleptik**

Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dilakukan uji organoleptik dengan cara pengamatan menggunakan panca indra terhadap ekstrak kental yang didapatkan yaitu meliputi bentuk, warna, bau dan rasa (Syamsul *et al.*, 2017).

#### **2). Pengamatan Rendemen Ekstrak**

Rendemen merupakan hasil perbandingan antara berat ekstrak kental yang didapatkan dengan berat awal simplisia. Ekstrak kental yang didapatkan ditimbang bobotnya untuk menghitung nilai rendamen. Adapun untuk menghitung rendemen ekstrak tersebut digunakan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{Bobot simplisia yang digunakan}} \times 100\%$$

#### **3). Identifikasi Senyawa Aktif Ubi jalar Secara Kualitatif**

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode pemisahan berdasarkan sifat fisis dimana campuran suatu senyawa didistribusikan antara fase diam dan fase gerak. Prinsipnya berdasarkan proses perpindahan atau pergeseran zat dengan kecepatan yang berbeda-beda untuk memisahkan berbagai senyawa seperti ion-ion organik dengan anorganik, dan senyawa-senyawa organik baik yang terdapat pada bahan alam dan senyawa-senyawa organik sintetik. Adapun kelebihan penggunaan KLT dibandingkan dengan Kromatografi Kertas (KK) adalah karena dapat dihasilkan pemisahan yang lebih sempurna, kepekaan yang lebih tinggi dan dapat dilaksanakan dengan cepat. KLT merupakan kromatografi adsorpsi dan adsorben bertindak sebagai fase stasioner. Empat macam adsorben yang sering digunakan

atau umum dipakai adalah silika gel (asam silikat), alumina (aluminium oxide), kieselgur (diatomaceous earth) dan selulosa. Dari keempat jenis adsorben yang paling banyak dipakai adalah silika gel dan masing-masing terdiri dari beberapa jenis yang mempunyai nama perdagangan bermacam-macam. Ada beberapa jenis silika gel yaitu silika gel G, silika gel H, silika gel PF (Prasetyo, 2020).

Sistem kromatografi mempunyai kemampuan memisahkan campuran bahan kimia dengan cara menghambat selektif perjalanan senyawa tertentu melalui fase stationer sedangkan senyawa lain dibiarkan terus berlalu, oleh karena itu kromatogram dapat dievaluasi secara kualitatif dengan cara menentukan R<sub>f</sub> (Retensi faktor) atau faktor penghambat untuk tiap bahan yang dielusi. Harga R<sub>f</sub> didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak senyawa dari titik awal dan jarak antarmuka pelarut dari titik awal. Harga R<sub>f</sub> adalah perbandingan jarak rambat suatu senyawa tertentu dengan jarak rambat baku pembanding. Jika zat uji yang diidentifikasi dan zat pembanding itu sama, maka terdapat kesesuaian dalam warna dan harga R<sub>f</sub> (Prasetyo, 2020).

#### **4. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Secara In vitro**

##### **a. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat sokletasi, cawan porselin, water bath, blender, oven, pH meter, pipet mikro 1000 µL, pipet tetes, rotary evaporator, spektrofotometer Uv-vis 1900 (Simadzu), magnetik stirer, gelas ukur, chamber, labu ukur, tabung reaksi, kaca arloji, lempeng KLT *silica gel* F<sub>254</sub>, pipa kapiler, neraca analitik, sinar Uv 254 dan 344 nm, tabung reaksi, batang pengaduk dan alat gelas lainnya.



Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk simplisia ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam), etanol 60%, asam kojat (Sigma), enzim liopilized tirosinase 1000 KU (Sigma), DMSO (Merck),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck), NaOH (Merck), L-DOPA (Levodopa 500 mg) (Sigma), kuersetin (Sigma), beta-karoten (Sigma), asam galat (Merck), pereaksi dragendroff, folin-ciocelteu (Merck), HCl (Merck), n-heksan (Merck),  $\text{FeCl}_3$  (Merck), amonia (Merck), etil asetat (Merck), aseton (Merck), asam format (Merck), serbuk magnesium (Mg) (Merck), n-butanol (Merck), kloroform (Merck), asam asetat (Merck),  $\text{AlCl}_3$  (Merck), KOH (Merck) dan aquadest.

## **b. Prosedur Pengujian**

### **1). Pembuatan Larutan Pereaksi**

#### **a). Pembuatan Larutan $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,05 M**

Larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 M dibuat dengan cara menimbang 3,402 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dilarutkan dalam aquadest 450 ml.

#### **b). Pembuatan Larutan NaOH 0,2 M**

Larutan NaOH 0,2 M dibuat dengan cara menimbang 0,4 g NaOH dilarutkan dalam aquadest 50 ml.

#### **c). Pembuatan Larutan Dapar Fosfat 0,05 M pH 6,5**

Pembuatan larutan dapar fosfat 0,05 M pH 6,5 dibuat dengan cara mencampurkan 50 ml NaOH 0,2 M ditambahkan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sampai 500 ml. Selanjutnya pH larutan diperiksa menggunakan pH meter.

**d). Pembuatan Larutan L-DOPA 2,5 mM**

L-DOPA ditimbang sebanyak 4,929 mg, dilarutkan dengan dapar fosfat 0,05 M pH 6,5 dalam labu ukur 25 ml dan volume larutan dicukupkan hingga batas. Kemudian diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mM. Pada saat preparasi hingga uji penghambatan tirosinase dilakukan larutan harus terhindar dari cahaya.

**e). Pembuatan Larutan Tirosinase**

Tirosinase ditimbang sebanyak 2,4 mg, kemudian dilarutkan dengan larutan dapar fosfat 0,05 M pH 6,5 dalam labu ukur 10 ml kemudian dicukupkan volumenya hingga 10 ml. Tirosinase yang terlarut memiliki aktivitas 240 unit/ml (Mahardika, 2012). Setelah preparasi hingga uji penghambatan tirosinase, larutan harus disimpan pada suhu rendah (2-8°C).

**f). Pembuatan Larutan Asam kojat (Kontrol Positif)**

Sebanyak 5 mg serbuk asam kojat ditimbang, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml, dilarutkan dalam 0,05 M larutan dapar fosfat pH 6,5, sehingga didapatkan larutan asam kojat dengan konsentrasi 500 µg/ml (Sagala & Telaumbanua, 2020). Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga didapatkan larutan asam kojat dengan konsentrasi 6; 7; 8; 9 dan 10 ppm. Pemilihan konsentrasi asam kojat tersebut berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Suhesti (2016) yang kemudian akan digunakan pada pengujian untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub>.

### **g). Pembuatan Larutan Ekstrak Ubi jalar**

Sebanyak 20 mg ekstrak kental ubi jalar ditimbang, ditambahkan DMSO sebanyak 1 ml dalam labu ukur. Kemudian ditambahkan dapar fosfat 0,05 M pH 6,5 hingga volume 10 ml (2.000 ppm) dalam labu ukur. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak 50; 60; 75; 85 dan 100 ppm. Pemilihan konsentrasi ekstrak ubi jalar tersebut berdasarkan penelitian Padda & Picha (2007). Kemudian konsentrasi tersebut akan digunakan pada pengujian untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub>.

### **2). Uji Pendahuluan Enzim**

#### **a). Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Enzim Tirosinase**

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan 500 µl larutan dapar fosfat (pH 6,5) dan 250 µl larutan L-DOPA dari masing-masing konsentrasi yaitu 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mM dipipet kedalam empat tabung reaksi yang berbeda. Larutan dinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 250 µl larutan tirosinase kedalam masing-masing tabung reaksi tabung reaksi dan inkubasi kembali pada suhu kamar selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 200-800 nm untuk mendapatkan serapan maksimum (Mahardika, 2012).

#### **b). Pengukuran Absorbansi Ekstrak Ubi Jalar Pada Panjang Gelombang Maksimum Enzim Tirosinase**

Pengukuran absorbansi ekstrak ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) menggunakan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang enzim tirosinase dilakukan dengan 500 µl larutan dapar fosfat (pH 6,5) dan 500 µl dari masing-

masing konsentrasi yaitu 50; 60; 75; 85 dan 100 ppm, pengukuran tersebut digunakan sebagai validasi apakah pada panjang gelombang 480,40 nm ekstrak ubi jalar memberikan serapan maksimum. Pengukuran dilakukan dengan tiga kali pengujian.

### **c). Optimasi Substrat L-DOPA**

Larutan dapar fosfat (pH 6,5) sebanyak 500 µl dimasukkan kedalam empat tabung reaksi, lalu ditambahkan masing-masing 250 µl larutan substrat L-DOPA dengan konsentrasi 0,4, : 0,6 : 0,8 dan 1 mM kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 250 µl larutan tirosinase, dihomogenkan menggunakan vortex mixer dan diinkubasi kembali pada suhu kamar selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 480,40 nm (Mahardika, 2012).

### **3). Uji Penghambatan Enzim Tirosinase Asam kojat (Kontrol)**

Sebanyak 500 µl buffer fosfat 0,05 M (pH 6,5), 250 µl L-DOPA 0,6 mM dan 250 µl asam kojat dari masing-masing konsentrasi dimasukkan kedalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit, setelah itu ditambahkan 250 µl larutan tirosinase (240U/ml) kemudian diinkubasi selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer Uv-vis pada panjang gelombang 480 nm, dengan dapar fosfat 0,05 M pH 6,5 sebagai blangko. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Mahardika, 2012).

### **4). Uji Penghambatan Enzim Tirosinase Ekstrak Ubi jalar**

Uji penghambatan tirosinase dilakukan berdasarkan metode yang digunakan Suhesti (2018), dengan L-DOPA sebagai substrat dan asam kojat sebagai kontrol

positif. Sebanyak 500 µl dapar fosfat 0,05 M (pH 6,8), 250 µl L-DOPA 0,6 mM, dan 250 µl sampel ekstrak ubi jalar dari masing-masing konsentrasi pengenceran dimasukkan kedalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit, setelah itu ditambahkan 250 µl larutan tirosinase (240 U/ml) dan diinkubasi lagi selama 30 menit. Aktivitas inhibisi tirosinase ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan uji dengan spektrofotometer Uv-vis pada panjang gelombang 480,40 nm. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Terlihat pada Tabel I pembagian konsentrasi dalam metode penghambatan tirosinase.

**Tabel I.** Metode uji penghambatan enzim tirosinase

<b>Bahan</b>	<b>Sampel (µl)</b>	<b>Kontrol negatif/substrat (µl)</b>	<b>Kontrol positif/asam kojat (µl)</b>
Dapar fosfat (pH 6,5)	500	750	500
L-DOPA (0,6 mM)	250	250	250
Asam kojat	-	-	250
Larutan sampel	250	-	-
Enzim tirosinase (240U/ml)	250	250	250

(Suhesti, 2018)

Persentase inhibisi tirosinase dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi tirosinase} = \frac{(B-S)}{B} \times 100 \%$$

Keterangan :

B = Absorbansi kontrol

S = Absorbansi sampel

Nilai IC<sub>50</sub> dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear, konsentrasi sampel dalam logaritma sebagai sumbu x dan persen penghambatan (%)

inhibisi) sebagai sumbu y dengan persamaan  $y = bx + a$  dapat dihitung nilai  $IC_{50}$  (Sagala & Telambuana, 2020).

## **B. Varibel Penelitian**

Variabel penelitian merupakan segala sesuatu yang berbentuk apa saja yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari sehingga diperoleh informasi tentang hal tersebut, kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2018). Variabel dalam penelitian ini yaitu variabel bebas (*Independent* variabel) yang merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahan atau timbulnya variabel terikat (Sugiyono, 2018). Sedangkan variabel terikat (*Dependent* variabel) variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat, karena adanya variabel bebas (Sugiyono, 2018). Pada pengujian secara *in silico* variabel bebas yang diamati adalah nilai afinitas ( $\Delta G$ ), Konstanta inhibisi ( $K_i$ ) dan variabel terikatnya adalah senyawa aktif ubi jalar. Sedangkan untuk pengujian secara *in vitro*, variabel bebas yang diamati adalah konsentrasi ekstrak ubi jalar dan variabel terikatnya berupa nilai  $IC_{50}$  inhibisi enzim tirosinase.

## **C. Analisis Data**

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan statistika untuk menentukan ada atau tidaknya perbedaan signifikan antara larutan uji dan larutan pembanding. Nilai hasil diuji dengan Shapiro-wilk dengan tujuan mengetahui distribusi data untuk tiap kelompoknya. Jika data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji Levene's test untuk mengetahui homogenitas data setiap kelompok. Hasil yang dianalisis dalam penelitian ini adalah nilai  $IC_{50}$  ekstrak ubi jalar dan asam kojat terhadap enzim tirosinase dengan uji Independent sample t-test menggunakan

*software* SPSS 20. Semua uji dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% untuk melihat perbedaan secara signifikan antara kelompok ( $P < 0,05$ ) atau tidak signifikan ( $P > 0,05$ ). Apabila data yang dihasilkan tidak terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan dengan uji non-parametrik menggunakan metode Kruskal wallis (Junaidi, 2010).

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Analisis Hasil Pengujian Secara In silico Berdasarkan Metode Docking Molekuler**

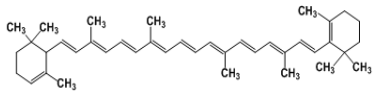
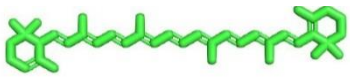
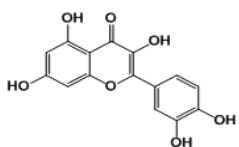
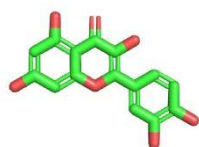
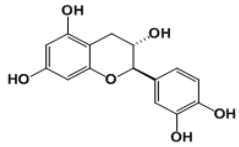
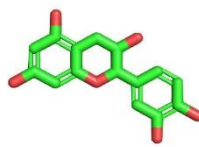
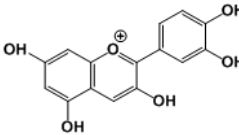
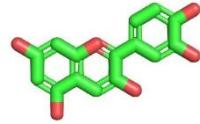
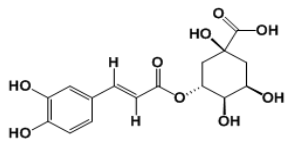
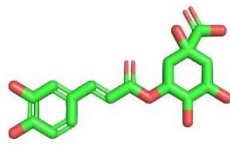
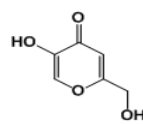
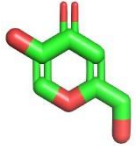
##### **1. Pembuatan Struktur Tiga Dimensi dan Optimasi Senyawa Aktif Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam)**

Analisis dengan menggunakan metode simulasi docking molekuler diperlukan struktur tiga dimensi senyawa aktif ubi jalar seperti beta-karoten, kuersetin, katekin, antosianin dan asam klorogenat serta struktur senyawa asam kojat sebagai kontrol yang diperoleh dengan cara mengunduh pada situs Pubchem Compound dalam bentuk dua dimensi dengan kode (CID) dari masing-masing senyawa. Pembuatan struktur tiga dimensi senyawa aktif ubi jalar yang diperoleh dari situs Pubchem dilakukan dengan menggunakan Biovia DS.

Optimasi geometri terhadap struktur senyawa aktif ubi jalar dilakukan menggunakan *software* Avogadro. Struktur tiga dimensi senyawa aktif ubi jalar hasil optimasi geometri kemudian dilakukan minimisasi energi menggunakan Chem 3D. Struktur hasil optimasi geometri dan minimisasi tersebut yang kemudian digunakan sebagai ligan uji dalam simulasi docking molekuler terhadap reseptor protein tirosinase (Gaba *et al.*, 2015). Tabel II menunjukkan struktur senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat (kontrol) dalam bentuk dua dimensi dan tiga dimensi yang diunduh dari situs Pubchem Compound.



**Tabel II.** Struktur senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat (kontrol) dalam bentuk dua dimensi dan tiga dimensi

No.	Senyawa	Struktur 2D	Struktur 3D
1.	Beta-karoten	 <p>(CID : 5280489)</p>	
2.	Kuersetin	 <p>(CID : 5280343)</p>	
3.	Katekin	 <p>(CID : 9064)</p>	
4.	Antosianin	 <p>(CID : 145858)</p>	
5.	Asam Klorogenat	 <p>(CID : 1794427)</p>	
6.	Asam kojat (Kontrol)	 <p>(CID : 3840)</p>	

Keterangan : CID (Kode struktur senyawa)

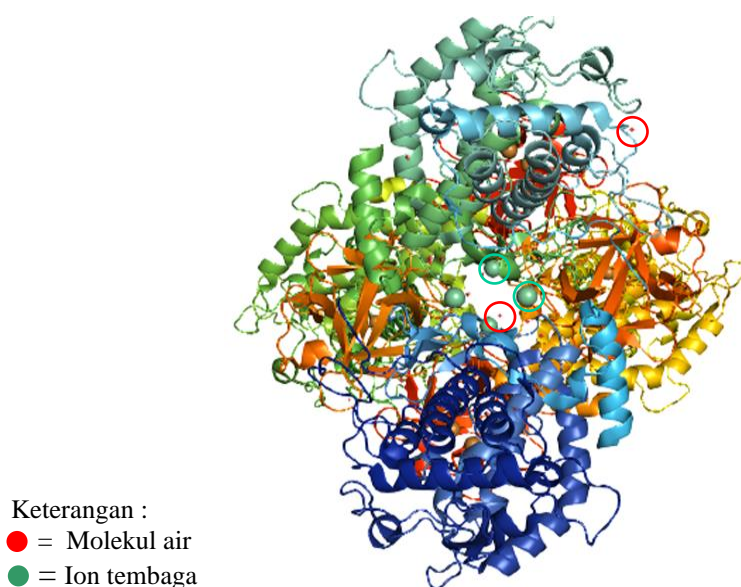
(Kim *et al.*, 2023)

Kemudian dilakukan penghitungan energi dari senyawa aktif ubi jalar tersebut. Setelah tahapan optimasi dilakukan, struktur senyawa aktif tersebut kemudian diminimasi energinya menggunakan Chem 3D dengan metode (MM2) yang bertujuan untuk mendapatkan konformasi struktur pada energi minimum, dikarenakan struktur dengan energi terendah merupakan struktur paling stabil sehingga diharapkan dapat terikat dengan residu asam amino dari reseptor protein tirosinase. Pemilihan metode (MM2) dikarenakan parameter yang digunakan dalam optimasi selain berdasarkan konformasi dari struktur ligan uji tetapi juga berdasarkan perhitungan energi titik tunggal untuk membandingkan konformasi dari molekul yang sama dan mencari ruang konformasi dengan variasi sudut dihedral tunggal (Cheng *et al.*, 2021).

Pembuatan struktur dua dimensi senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat dilakukan menggunakan Chem Draw yang bertujuan untuk memastikan apakah struktur-struktur tersebut dapat digunakan dalam metode simulasi docking molekuler. Struktur dua dimensi dibangun berdasarkan pola struktur senyawa-senyawa yang diperoleh dari situs Pubchem Compound yang kemudian disimpan dengan format dilanjutkan dengan pengubahan bentuk dua dimensi menjadi bentuk tiga dimensi dengan menggunakan Pymol, sehingga diperoleh struktur tiga dimensi dengan format seperti yang ditunjukkan pada Tabel II. Pengoptimalan susunan atom atau molekul dari struktur senyawa uji dan kontrol dengan cara optimasi geometri, mengingat struktur yang dihasilkan dari proses ini merupakan struktur dengan konformasi yang paling baik dan stabil (Goodsell *et al.*, 2021).

## 2. Pengunduhan Protein Target Penambatan Senyawa

Pada penelitian ini, proses virtual skrining dilakukan dengan menggunakan metode simulasi docking molekuler dengan tahapan preparasi dari protein enzim tirosinase dimulai dari pengunduhan struktur kristal enzim tirosinase pada situs RCSB dengan kode (PDB ID: 2Y9X) yang merupakan struktur kristal PPO3, suatu tirosinase dari *Agaricus bisporus* dalam bentuk deoksi yang mengandung sub-unit mirip lektin yang dikoordinasikan oleh dua ion tembaga yaitu CuA dan CuB dengan tropolone sebagai native ligan atau ligan alami (Ismaya *et al.*, 2011).



**Gambar 7.** Struktur kristal tirosinase (PDB ID: 2Y9X) *Agaricus bisporus* hasil kristalografi dengan kompleks tropolone (Ismaya *et al.*, 2011)

Gambar 7 menunjukkan visualisasi struktur kristal protein tirosinase yang dirancang dengan metode X-RAY diffraction 2.78 Å yang memiliki tiga jenis unik ligan yaitu tropolone (OTR), Cu dan Ho. Enzim ini mengkatalisis konversi senyawa fenolik menjadi turunan kuinonnya, yang merupakan prekursor untuk pembentukan melanin, pigmen yang banyak dimiliki dalam organisme hidup yang terdiri dari dua

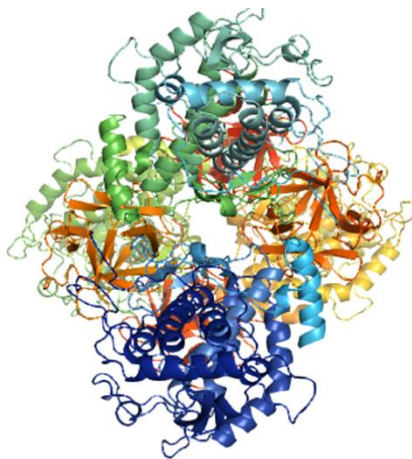
sub-unit H dari residu 392 dan dua sub-unit L dari residu 150. Sub-unit H berasal dari gen PPO3 dan memiliki lipatan yang mirip dengan tirosinase lain, tetapi 100 residu lebih besar. Sub-unit L merupakan produk dari orf239342 dan memiliki lipatan seperti lektin. Sub-unit H mengandung situs pengikatan tembaga binuklir dalam keadaan deoksi, dimana tiga residu histidin mengkoordinasikan setiap ion tembaga. Rantai samping histidin ini orientasinya ditetapkan oleh ikatan hidrogen atau, dalam kasus His85, oleh jembatan tioeter dengan rantai samping Cys83. Tropolone sebagai inhibitor alami tirosinase secara spesifik membentuk kompleks Pra-Michaelis dengan enzim kemudian mengikat dekat situs tembaga binuklir tanpa langsung mengkoordinasikan dengan ion tembaga (Ismaya *et al.*, 2011).

Analisis dengan metode simulasi docking molekuler menggunakan software Autodock-4 diperlukan beberapa struktur yang berperan sebagai reseptor, native ligan dan ligan uji. Reseptor merupakan molekul protein yang secara normal diaktivasi oleh transmittor atau hormon. Saat ini banyak reseptor yang telah direplikasi dan diketahui urutan asam aminonya. Selain itu, reseptor juga dapat berupa lipoprotein, asam nukleat yang jelas dan spesifik terdapat dalam jaringan sel makhluk hidup, mengandung gugus-gugus fungsional atau atom-atom terorganisasi (Cartika, 2016). Sedangkan ligan merupakan molekul sederhana dalam senyawa kompleks bertindak sebagai donor pasangan elektron (Basa Lewis) dimana ligan akan memberikan pasangan elektronnya bagi atom pusat yang menyediakan orbital kosong. Pada penelitian ini, tirosinase AbTYR berperan sebagai reseptor protein dan tropolone berperan sebagai native ligan.

### 3. Preparasi Enzim Tirosinase Sebagai Target Penambatan

Tahapan awal untuk memulai metode simulasi docking molekuler adalah proses preparasi struktur tiga dimensi reseptor protein. Pada tahapan ini dilakukan pemisahan terhadap molekul air, native ligan dan senyawa-senyawa lain seperti Cu, Ho yang melekat pada struktur protein yang bertujuan untuk mendapatkan struktur protein tirosinase dalam bentuk tiga dimensi bebas dari molekul air dan native ligan dengan menggunakan Biovia DS sehingga diperoleh struktur tiga dimensi protein tirosinase seperti yang ditunjukkan pada Gambar 8.

Adapun tujuan penghilangan molekul air, native ligan dan senyawa lain adalah untuk menghindari terganggunya proses docking antara ligan dan reseptor protein. Hasil preparasi struktur protein tersebut kemudian digunakan dalam proses penambatan untuk melihat interaksi yang terjadi dengan ligan.

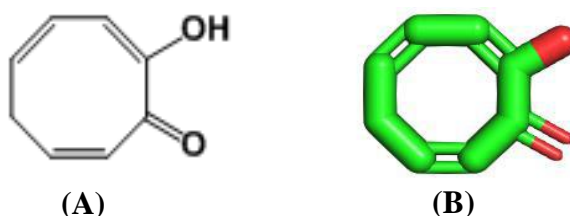


**Gambar 8.** Struktur kristal tirosinase (PDB ID: 2Y9X) *Agaricus bisporus* setelah dilakukan pemisahan terhadap molekul air, native ligan dan senyawa lain yang melekat pada protein

#### 4. Pemisahan Native Ligan dan Validasi Metode Docking Molekuler (Redocking)

Validasi merupakan pengujian terhadap suatu metode yang digunakan, bertujuan untuk membuktikan valid atau tidaknya metode tersebut. Pada penelitian ini, analisis simulasi docking molekuler dilakukan dengan menggunakan software Autodock-4 yaitu dengan tahapan yang dilakukan sebelum proses validasi adalah pemilihan native ligan pada protein tirosinase (PDB ID: 2Y9X) berdasarkan data yang tersedia pada situs RCSB sehingga diketahui bahwa protein tersebut memiliki tiga jenis ligan yaitu tropolone, Cu dan Ho.

Berdasarkan hasil penelusuran terkait native ligan yang berperan penting pada sisi aktif protein tirosinase diketahui bahwa senyawa tropolone diketahui sebagai ligan yang paling berperan aktif pada sisi aktif protein jika dibandingkan dengan ligan Cu dan Ho. Kemudian dilakukan preparasi terhadap native ligan yaitu dengan cara memisahkan ligan tersebut dari protein dan molekul-molekul yang melekat pada strukturnya menggunakan Biovia Discovery DS. Selanjutnya, digunakan Pymol untuk visualisasi struktur native ligan secara tiga dimensi dan disimpan dengan bentuk format.



**Gambar 9.** Struktur tropolone (native ligan) hasil preparasi secara (a) dua dimensi dan (b) tiga dimensi (Ismaya, 2011)

Penentuan koordinat dan pembuatan ukuran grid box atau tempat dimana ligan melakukan konformasi sangat berpengaruh terhadap afinitas ligan terhadap protein. Pada *software* Autodock-4 penentuan dan pembuatan ukuran *grid box* berdasarkan pada situs aktif protein. Hal tersebut memungkinkan ligan hanya melakukan konformasi pada area dengan energi terendah dimana ligan tersebut dapat berinteraksi baik dengan residu-residu asam amino pada protein dengan tujuan akhir untuk memperoleh koordinat berupa sumbu X, Y dan Z yang kemudian koordinat tersebut akan digunakan sebagai koordinat ligan uji.

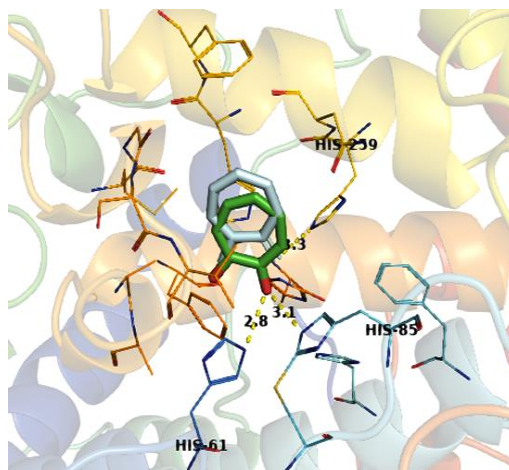
**Tabel III.** Penentuan koordinat dan ukuran grid box pada proses redocking antara native ligan dan enzim tirosinase (PDB ID: 2Y9X)

Native Ligand	Number Grid Point			Coordinat Grid Point			Spasing Grid Point	RMSD
	X	Y	Z	X	Y	Z		
OTR	40	40	40	22,548	2,483	-93,071	0,375	0,99 Å

Keterangan : nilai RMSD 0,99 0,99 Å dinyatakan sebagai standar validasi metode docking molekuler

Hasil penentuan koordinat native ligan dengan ukuran *grid box* berdasarkan pada sisi aktif protein dengan besaran sumbu X, Y, Z yang dibuat adalah (40, 40, 40) dengan koordinat (22,548, 2,483, -93,071) dan *grid point spacing* 0,375 Å seperti yang ditunjukkan pada Tabel III. Hasil validasi menunjukkan nilai RMSD (*Root Means Square Deviation*) 0,99 Å. Nilai RMSD digunakan sebagai parameter dalam membuktikan valid atau tidaknya metode docking molekuler tersebut dengan nilai RMSD yang dapat diterima adalah  $< 2 \text{ \AA}$  (Giantari *et al.*, 2019). Dengan demikian, metode simulasi tersebut sudah valid dan dapat digunakan untuk penambatan terhadap ligan uji.

Gambar 10 menunjukkan hasil validasi atau posisi native ligan hasil redocking tidak berbeda jauh dengan hasil kristalografi.



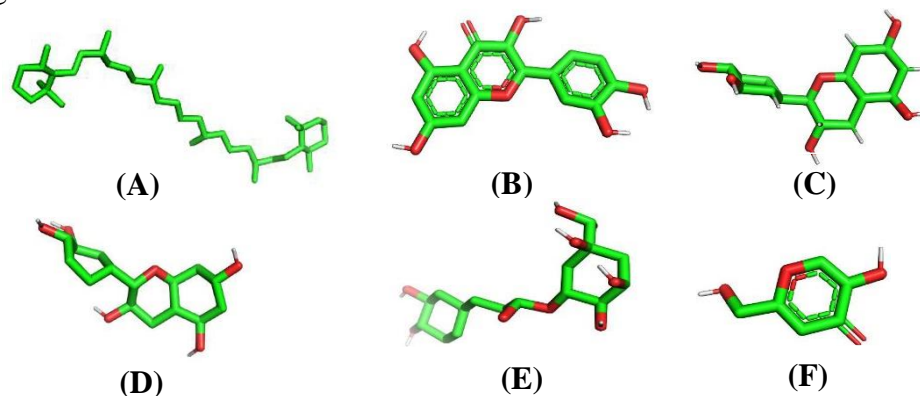
**Gambar 10.** Visualisasi hasil redocking konformasi antara native ligan hasil validasi dan native ligan hasil kristalografi

Hasil validasi yang dilakukan dengan metode redocking antara native ligan dan protein tirosinase dengan nilai RMSD 0,99 Å menunjukkan posisi atau konformasi dari ligan hasil validasi tidak berbeda jauh dengan posisi ligan hasil kristalografi. Hal tersebut dikarenakan nilai RMSD < 3 Å. Akan tetapi, apabila nilai hasil validasi > 3 Å tidak akan terlihat adanya tumpang tindih antara ligan hasil validasi dan ligan hasil kristalografi (Sarfraz *et al.*, 2020). Gambar 10 menunjukkan visualisasi native ligan hasil validasi dan hasil kristalografi menggunakan Pymol, untuk memudahkan peneliti dalam menganalisis hasil yang diperoleh dari tahapan validasi metode docking molekuler.



## 5. Preparasi Struktur Senyawa Aktif Ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) Sebagai Ligan Uji

Sebelum proses penambatan dengan protein tirosinase, terlebih dahulu perlu dilakukan preparasi terhadap struktur senyawa aktif ubi jalar yang berperan sebagai ligan uji melalui inhibisinya terhadap protein tirosinase seperti beta-karoten, kuersetin, katekin, antosianin, asam klorogenat serta struktur senyawa asam kojat yang berperan sebagai kontrol. Pada tahapan ini dilakukan dengan cara menambahkan atom hidrogen dan kemudian dilakukan optimasi geometri terhadap masing-masing struktur tiga dimensi senyawa uji serta senyawa kontrol menggunakan Avogadro. Tujuan dari penambahan atom hidrogen pada tahapan ini adalah agar suasana pH pada saat penambatan antara senyawa aktif dan protein mendekati pH dalam tubuh. Selain itu, penambahan atom hidrogen juga bertujuan untuk memunculkan kembali atom hidrogen pada makromolekul sehingga ikatan yang terbentuk dapat teramati (Gaba *et al.*, 2015). Gambar 11 menunjukkan hasil optimasi struktur senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat (kontrol) menggunakan Avogadro dan Chem 3D.



**Gambar 11.** Hasil optimasi geometri dan minimasi energi struktur senyawa (a) beta-karoten, (b) kuersetin, (c) katekin, (d) antosianin, (e) asam klorogenat dan (f) asam kojat (kontrol).

Setelah penambahan atom hidrogen dan optimasi geometri kemudian dilakukan proses minimasi energi terhadap struktur senyawa ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) dan struktur senyawa kontrol asam kojat menggunakan Chem 3D dengan metode MM2 yaitu penambahan parsial berbasis medan gaya sebagai parameter *Molecular Mechanics*. Metode MM2 dapat digunakan untuk mengoptimalkan energi mencakup unsur-unsur yang biasa digunakan dalam senyawa organik seperti karbon, hidrogen, nitrogen, oksigen, belerang, dan halogen serta molekul yang mirip obat (Cheng *et al.*, 2021).

Gambar 11 menunjukkan visualisasi hasil penambahan atom hidrogen, optimasi geometri dan minimisasi energi terhadap struktur senyawa ubi serta asam kojat. Terlihat perbedaan yang sangat signifikan antara struktur sebelum dan sesudah dilakukan penambahan atom hidrogen, optimasi geometri dan minimisasi energi dikarenakan adanya konformasi atom atau molekul yang terjadi pada struktur senyawa-senyawa tersebut ketika berada pada energi terendah.

## **6. Analisis dan Visualisasi Hasil Penambatan dengan Metode Docking Molekuler**

Penentuan konformasi ligan hasil docking dengan pose terbaik dilakukan dengan cara memilih konformasi ligan yang memiliki energi ikatan paling rendah. Hasil docking molekuler dengan pose terbaik kemudian dianalisa menggunakan Biovia DS. Parameter yang dianalisis meliputi besar binding energi ( $\Delta G$ ), konstanta inhibisi ( $K_i$ ), residu asam amino dan jumlah interaksi ikatan yang terbentuk. Biovia DS kemudian digunakan untuk visualisasi hasil dari penambatan senyawa uji terhadap protein dengan melihat adanya ikatan yang terjadi antara ligan dan protein

secara dua dimensi dan tiga dimensi Pymol untuk melihat surface area ligan uji dalam protein. Hasil analisis yang diperoleh dengan menggunakan metode simulasi docking molekuler menunjukkan bahwa senyawa aktif ubi jalar memiliki afinitas energi yang cukup baik terhadap enzim tirosinase. Tabel IV menunjukkan hasil afinitas energi, konstanta inhibisi senyawa aktif ubi jalar, asam kojat (kontrol), dan tropolone (native ligan).

**Tabel IV.** Analisis afinitas binding energi ( $\Delta G$ ) dan konstanta knhibisi (Ki) senyawa aktif ubi jalar, asam kojat (kontrol) dan tropolone (native ligan)

No.	Senyawa /Ligan	Binding Energi ( $\Delta G$ )	Konstanta Inhibisi (Ki)	Residu Asam Amino	Ikatan Hidrogen
1.	Beta-karoten	-6,05 kcal/mol	36,72 $\mu$ M	HIS85, VAL283, HIS259, HIS244, HIS263, PHE90, PHE264, PRO277	-
2.	Asam klorogenat	-6,05 kcal/mol	36,90 $\mu$ M	CYS83, HIS85, HIS244, HIS263, ASN81, GLU256, MET280, PHE264, VAL283	9
3.	Kuersetin	-5,87 kcal/mol	45,30 $\mu$ M	SER282, HIS61, HIS85, HIS263, HIS94, MET280, GLY281, VAL283, ALA286	3
4.	Katekin	-5,77 kcal/mol	59,38 $\mu$ M	VAL248, VAL283, HIS61, HIS85, HIS244, HIS259, HIS263, ALA286, GLU256	2
5.	Antosianin	-5,70 kcal/mol	66,55 $\mu$ M	HIS85, HIS244, VAL283, ASN81, ASN260, CYS83	5
6.	Asam kojat	-5,27 kcal/mol	380,37 $\mu$ M	HIS263, HIS61, VAL283, ALA286, MET280	1
7.	Tropolone	-5,00 kcal/mol	214,89 $\mu$ M	HIS263, HIS61, HIS296, VAL283, ALA286	2

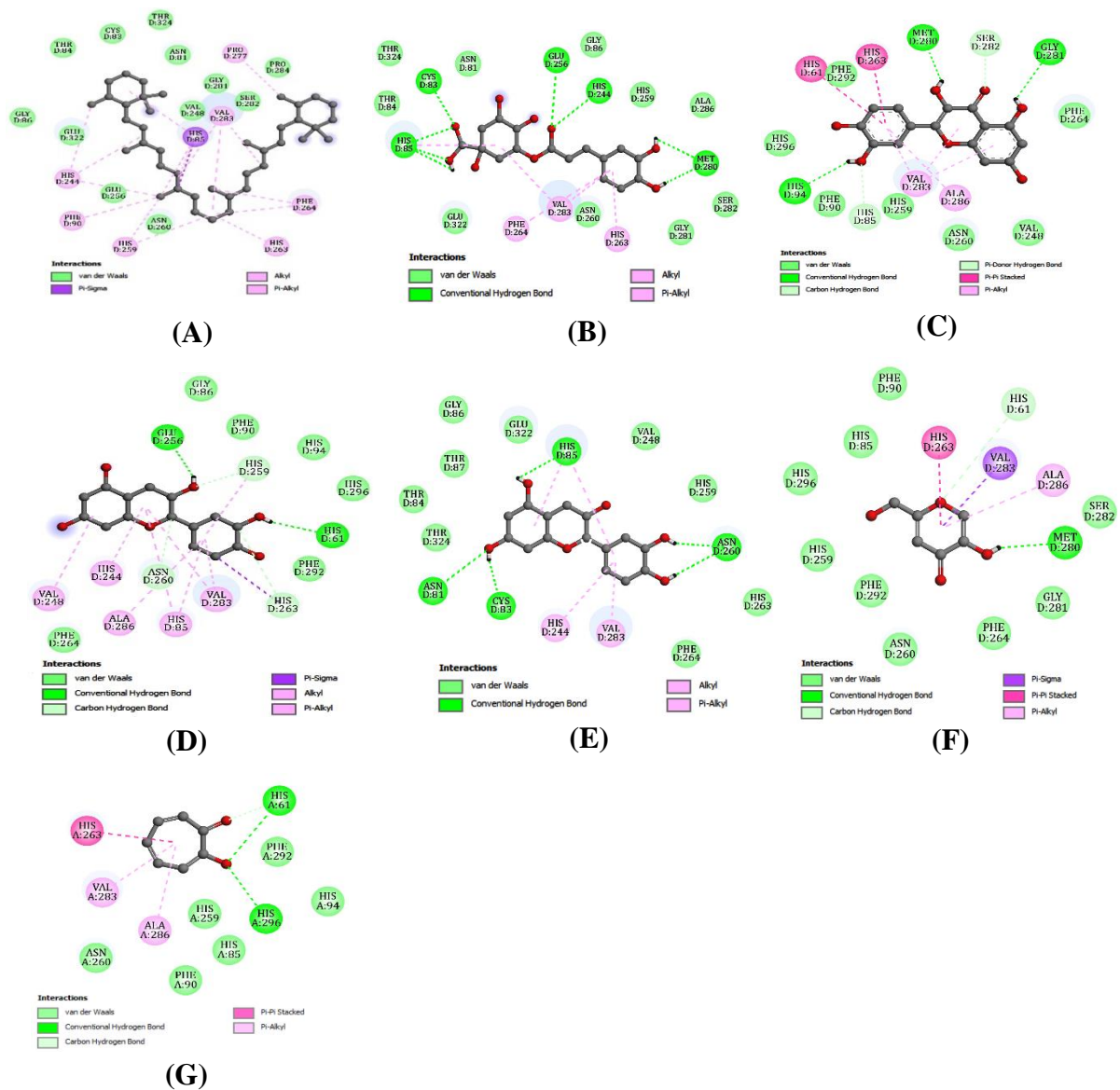
Keterangan : ■ Ikatan hidrogen  
■ Interaksi hidrofobik

Penambatan berdasarkan docking molekuler antara senyawa aktif ubi jalar dan enzim tirosinase dengan 100 jumlah konformasi berdasarkan Genetik Algoritma (GA) diperoleh struktur dengan konformasi terbaik pada energi minimum (*lowest energy*) yang menunjukkan afinitas binding energi ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi ( $K_i$ ) yang cukup baik terhadap enzim tirosinase *Agaricus bisporus* (AbTYR). Apabila dibandingkan dengan native ligan (OTR) 2-*hydroxycyclohepta-2,4,6-Trien-1-One* (tropolone) dan asam kojat (kontrol).

Senyawa aktif ubi jalar seperti beta-karoten, asam klorogenat, kuersetin, katekin dan antosianin terikat cukup baik dengan residu asam amino pada protein tirosinase seperti His61, His85, His263, Cys83, Val283, Met280, Ala286 dan Phe264 yang selalu ada dan membentuk interaksi diantara keduanya yang membentuk ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik seperti yang ditunjukkan pada Tabel IV, yang memungkinkan penggunaan ubi jalar sebagai inhibitor alami enzim tirosinase sudah cukup baik.

Hasil penambatan docking molekuler antara beta-karoten dan enzim tirosinase menunjukkan ( $\Delta G$ ) -6,05 kcal/mol dan ( $K_i$ ) 36,72  $\mu\text{M}$ . Beta-karoten memiliki afinitas yang kuat terhadap enzim tirosinase jika dibandingkan dengan afinitas yang dimiliki native ligan dan asam kojat (kontrol) seperti yang ditunjukkan pada Tabel IV. Penambatan antara beta-karoten dan enzim tirosinase tidak adanya ikatan hidrogen yang terbentuk dikarenakan beta-karoten merupakan salah satu senyawa karotenoid yang tidak larut dalam air KLT (Kusbandari & Susanti, 2017). Hal tersebut ditunjukkan dengan banyaknya interaksi hidrofobik yang terbentuk.

Beta-karoten membentuk interaksi hidrofobik dengan banyak residu asam amino melalui ikatan Pi-sigma pada residu His85 dan ikatan Pi-alkyl pada residu Phe90, Phe264, His244, His259, His263, Val283, Pro277 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 12a. Selain itu, beta-karoten juga aktif sebagai antioksidan terhadap parsial oksigen ( $PO_2$ ) dari jaringan perifer (Kasperczyk *et al.*, 2014).



**Gambar 12.** Interaksi ikatan yang terbentuk pada senyawa (a) beta-karoten, (b) asam klorogenat, (c) kuersetin, (d) katekin, (e) antosianin, (f) asam kojat (kontrol) dan (g) tropolone (native ligan)

Asam klorogenat merupakan senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan, dikarenakan senyawa ini tergolong dalam senyawa polifenol. Asam klorogenat diketahui dapat menghambat aktivitas enzim xantin oksidase dan juga dapat menghambat aktivitas enzim tirosinase dan dapat menangkap tiga jenis ROS yaitu  $O_2$ , OH dan  $H_2O_2$  (Miao & Xiang, 2020). Asam klorogenat berikatan dengan situs Cu dengan gugus kafeiknya dimana gugus fenol mengarah ke ion tembaga. Gugus fenol tersebut teroksidasi ke dalam situs Cu. Asam klorogenat dan isomernya menempati situs periferal dengan gugus kuinatnya, sehingga asam klorogenat memiliki pengikatan yang lebih erat daripada dua isomer lainnya. Berdasarkan hasil penambatannya dengan protein tirosinase, senyawa ini menunjukkan afinitas yang baik dengan afinitas ( $\Delta G$ ) -6,05 kcal/mol dan (Ki) 36,90  $\mu M$ .

Asam klorogenat memiliki pengikatan yang lebih erat pada lokasi periferal, yang memungkinkan untuk lebih dekat dengan ion tembaga. Komponen bioaktif alami seperti senyawa fenolik memungkinkan interaksi antara senyawa fenolik dan ion tembaga tirosinase dikarenakan tirosinase memainkan peran penting dalam sintesis melanin (Liu *et al.*, 2020). Berdasarkan hasil penambatan yang dilakukan, diketahui bahwa senyawa asam klorogenat mengikat banyak residu asam amino pada situs aktif protein tirosinase dengan adanya interaksi yang terbentuk melalui ikatan hidrogen pada residu Asn81, His85, Cys83, Glu256, His244, Met280 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 12b. Selain interaksi ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik juga terbentuk melalui ikatan  $\pi$ -alkyl pada residu His85, Val283, Phe264, His263. Interaksi polar pada asam klorogenat menghasilkan jarak ikatan 1,8 Å yang tergolong kuat.

Hasil penambatan antara senyawa kuersetin dan enzim tirosinase menunjukkan adanya pengikatan yang baik terhadap residu asam amino pada situs aktif protein dengan terbentuknya ikatan hidrogen pada residu His94, Met280, Gly281. Selain ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik juga terbentuk melalui ikatan Pi-stacked dan Pi-alkyl pada residu His61, His263, Val283, Ala286 dan ikatan carbon-hydrogen pada residu His85, Ser282 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 12c, dikarenakan kuersetin mempunyai afinitas ( $\Delta G$ ) -5,87 kcal/mol dan ( $K_i$ ) 45,30  $\mu M$ .

Senyawa kuersetin dapat menghambat aktivitas reaksi monofenolase dan penghambatannya terhadap aktivitas difenolase bersifat reversibel dan kompetitif. Hasil penambatan antara senyawa kuersetin dan protein tirosinase dengan nilai ( $K_i$ ) 45,30  $\mu M$  yang menunjukkan bahwa kuersetin terikat pada situs aktif protein tirosinase dan mengkelat tembaga dengan gugus 3,4-dihidroksi. Hal tersebut dikarenakan, senyawa kuersetin dapat terikat pada protein tirosinase berdasarkan interaksi hidrofobik, sehingga menghasilkan konformasi tirosinase dan pendinginan fluoresensi intrinsiknya sehingga khelasi tersebut dapat mencegah masuknya substrat dan kemudian menghambat aktivitas katalitik protein tirosinase (Fan *et al.*, 2017).

Penambatan antara senyawa kuersetin dan protein tirosinase membentuk interaksi ikatan hidrogen disitus aktif protein tirosinase pada residu asam amino His94, Met280, Gly281. Ikatan hidrogen merupakan salah satu ikatan yang relatif kuat jika dibandingkan dengan ikatan antar-molekul lainnya. Interaksi ikatan hidrogen dari penambatan tersebut terbentuk karena adanya gaya antar molekul

yang terjadi antara atom hidrogen dengan atom yang sangat elektronegatif seperti N, O dan F yang menghasilkan jarak interaksi ikatan hidrogen antar atom yang kuat (Fan *et al.*, 2017). Interaksi polar pada senyawa katekin menghasilkan jarak ikatan 2,2-3,1 Å yang tergolong kuat. Jarak interaksi polar diukur berdasarkan potensial ionisasinya yaitu energi yang dibutuhkan untuk melepaskan elektron dari orbital molekul yang terisi paling tinggi sehingga terjadi proses yang disebut donor-aseptor antara senyawa kuersetin dan protein tirosinase (Pratoko, 2012).

Ubi jalar juga diketahui memiliki senyawa katekin yang merupakan salah satu golongan senyawa flavonoid yang mempunyai aktivitas inhibisi terhadap reaksi monofenolase dari enzim tirosinase. Katekin memiliki dua gugus fenol yang berperan penting sebagai antioksidan (Liu *et al.*, 2022). Hasil penambatan antara senyawa katekin dengan protein tirosinase menunjukkan bahwa pengikatan senyawa ini cukup baik pada situs aktif protein dengan afinitas ( $\Delta G$ ) -5,77 kcal/mol dan ( $K_i$ ) 59,38  $\mu\text{M}$ . Katekin berinteraksi dengan protein tirosinase melalui ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik sehingga dapat menginduksi protein tirosinase pada *binding pocket* yang lebih luas. Nilai ( $K_i$ ) 59,38  $\mu\text{M}$  menunjukkan bahwa pengikatan katekin terhadap situs aktif protein tirosinase yang berinteraksi langsung dengan ion tembaga CuA dan CuB dengan residu utama asam amino protein tirosinase (Liu *et al.*, 2022). Interaksi yang terjadi melalui terbentuknya ikatan hidrogen pada residu His61 dan Glu256. Interaksi polar pada senyawa katekin menghasilkan jarak ikatan 2,0-2,7 Å yang tergolong kuat.

Interaksi hidrofobik yang terbentuk pada senyawa katekin melalui ikatan Pi-sigma pada residu His263, ikatan Pi-alkyl pada residu Val248, His85, His244,



Val283, Ala286 dan ikatan karbon-hidrogen pada residu His259, His263, Asn260 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 12d. Penelitian sebelumnya menyatakan formasi kontak bidang dan molekuler senyawa katekin dengan residu katalitik protein tirosinase terhadap aktivitas penghambatan protein tirosinase memiliki orientasi geometris yang menguntungkan dalam jalur kresolase untuk menunjukkan penghambatan terhadap enzim tirosinase.

Berdasarkan pengamatan tersebut, senyawa katekin diperkirakan menunjukkan aktivitas enzim tirosinase dengan bersaing atau menunda oksidasi dari substrat. Secara kolektif, berdasarkan analisis energi dan interaksi antar-molekul dari pose docking. Hasil tersebut menunjukkan bahwa katekin dapat berinteraksi dengan ion logam dan residu esensial dalam kantong katalitik protein tirosinase. Pada penelitian ini, nilai afinitas yang diperoleh melalui hasil penambatan antara katekin dan enzim tirosinase diperoleh interaksi ikatan hidrogen terhadap dua residu asam amino sesuai seperti penelitian sebelumnya yang menyatakan nilai afinitas ( $\Delta G$ ) interaksi ikatan yang terbentuk sebesar -5,79 kcal/mol dengan dua interaksi ikatan hidrogen pada residu asam amino His61 dan Glu256 (Lee *et al.*, 2021).

Ubi jalar memiliki senyawa antosianin yang merupakan kelompok utama senyawa polifenol dan tergolong dalam senyawa flavonoid (Islam, 2016). Senyawa antosianin telah terbukti memiliki beberapa sifat terapeutik dan fisiologis sebagai agen antineoplastik agen penangkal radiasi (Islam *et al.*, 2005). Aktivitas antosianin melalui penghilangan spesies oksigen reaktif (ROS) produksi dan kerusakan DNA yang dihasilkan yang bertanggung jawab untuk aktivasi P53 pada fibroblas dermal

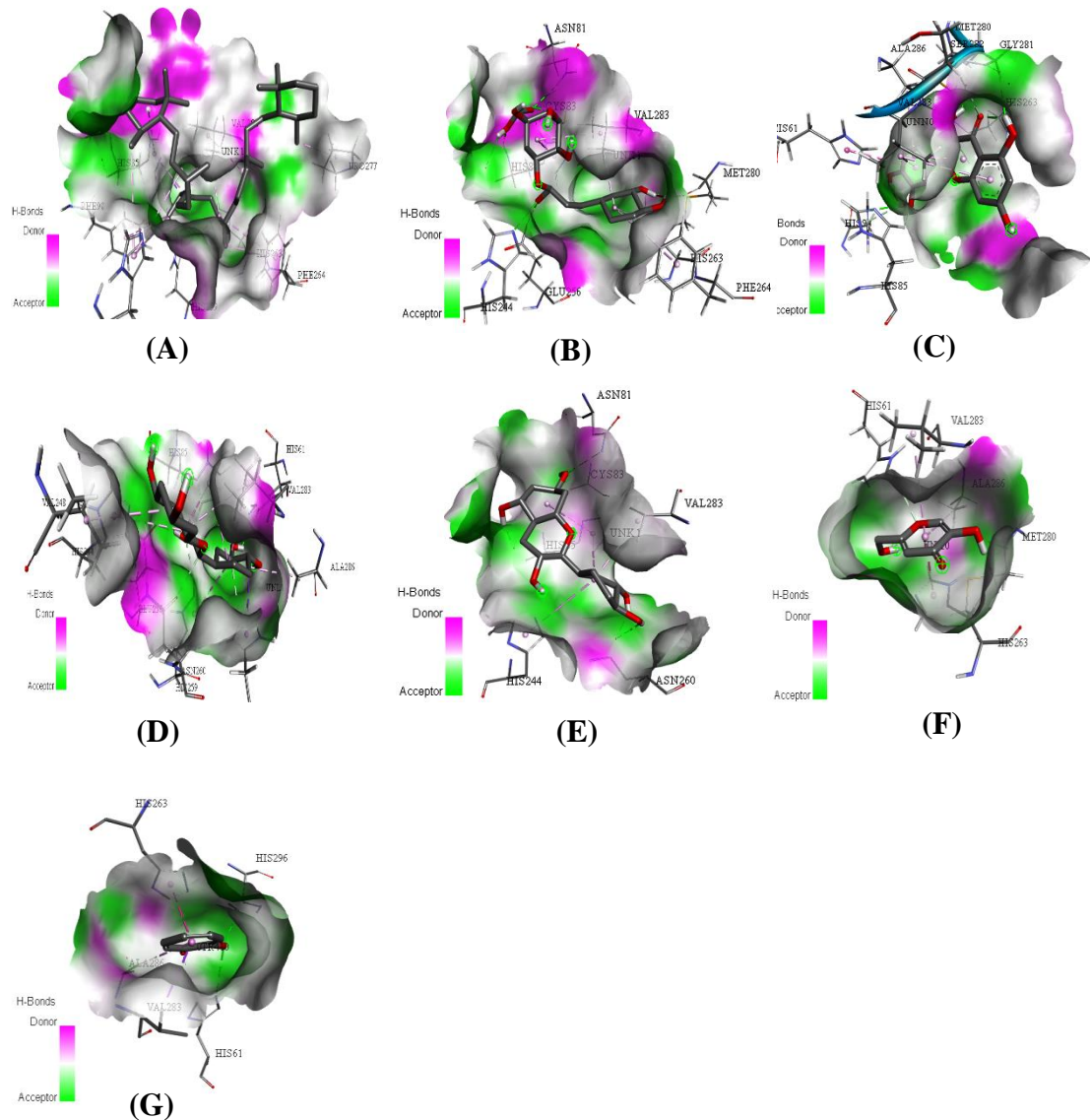
manusia yang disinari Uv-B. Antosianin dapat mengurangi kerusakan yang ditimbulkan oleh paparan yang disebabkan oleh sinar ultraviolet pada keratinosit manusia (Bae *et al.*, 2009).

Hasil penambatan antara senyawa antosianin dan protein tirosinase menunjukkan afinitas ( $\Delta G$ ) -5,70 kcal/mol dan (Ki) 66,55  $\mu\text{M}$ . Afinitas senyawa antosianin tidak berbeda jauh dengan nilai afinitas senyawa kuersetin dan katekin dikarenakan ketiga senyawa ini tergolong dalam senyawa flavonoid. Interaksi yang ditandai dengan terbentuknya ikatan hidrogen pada residu His85, Asn81, Asn260 dan Cys83. Penambatan pada antosianin terhadap tirosinase juga membentuk interaksi hidrofobik dengan terbentuknya ikatan Pi-alkyl pada residu His244 dan Val283 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 12e. Interaksi polar yang terbentuk saat penambatan menghasilkan jarak ikatan yang tergolong kuat dengan nilai 1,2 Å.

Dalam penggunaannya asam kojat sering digunakan sebagai kontrol positif dikarenakan senyawa ini memiliki kestabilan yang cukup tinggi dan efek penghambatannya terhadap reseptor protein tirosinase yang baik (Syakri *et al.*, 2020). Berdasarkan hasil pengamatan docking molekuler yang dilakukan antara senyawa asam kojat dan protein tirosinase menunjukkan nilai afinitas ( $\Delta G$ ) -5,27 kcal/mol dan (Ki) 380,37  $\mu\text{M}$  sehingga pengikatannya cukup baik terhadap protein jika dibandingkan dengan native ligan tirosinase. Asam kojat dan tropolone membentuk interaksi dalam *binding pocket* yang sama dan efek penghambatannya dikaitkan dengan kemampuan pengkelat logam langsung atau termediasi oleh air dengan satu residu histidin pengkoordinasi logam pada situs aktif protein.

Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan nilai afinitas senyawa asam kojat terhadap protein tirosinase adalah  $-5,20$  kcal/mol (Correia *et al.*, 2021). Interaksi asam kojat pada situs aktif protein membentuk interaksi ikatan hidrogen pada residu Met280 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 12f. Interaksi hidrofobik juga terbentuk di situs aktif protein pada residu Val283 melalui ikatan Pi-sigma, ikatan Pi-stacked dan Pi-alkyl terbentuk pada residu His263 dan Ala286 dan ikatan Carbon-hydrogen terbentuk pada residu His61. Pengikatan senyawa asam kojat terhadap residu asam amino protein tirosinase mirip seperti tropolone dari protein tirosinase. Jarak interaksi ikatan hidrogen yang dihasilkan dari proses penambatan dengan protein tirosinase adalah  $2,2-2,8$  Å yang tergolong dalam jenis ikatan yang kuat.

Tropolone (OTR) membentuk dua interaksi pada residu His61 dan His296 pada atom O. Terbentuknya ikatan hidrogen pada native ligan menunjukkan bahwa senyawa tersebut bersifat polar. Selain itu, tiga interaksi hidrofobik melalui ikatan Pi-sigma Val283, Pi-Pi-stacked pada residu His263 dan Pi-alkyl pada residu Ala286 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 12g.



**Gambar 13.** Hasil analisis docking molekuler (a) beta-karoten, (b) asam klorogenat, (c) kuersetin, (d) katekin, (e) antosianin, (f) asam kojat (kontrol) dan (g) tropolone (native ligan)

Gambar 13a menunjukkan hasil visualisasi kuersetin berdasarkan TPSA hasil penambatan antara senyawa beta-karoten dan protein tirosinase. Hasil tersebut tidak menunjukkan adanya ikatan hidrogen yang terbentuk dengan residu asam amino pada situs aktif protein dikarenakan tidak adanya atom yang berperan sebagai donor dan akseptor. Selain itu, beta-karoten memiliki sifat lipofilitas yang

tinggi. Walaupun demikian, penambatan tersebut menghasilkan interaksi hidrofobik seperti ikatan Pi-sigma pada residu His85, dan ikatan Pi-alkyl pada residu His244, His259, His263, Phe90, Phe260, Phe264 dan Pro277. Residu His85, His244, His259 dan Val283 membentuk tiga ikatan Pi-alkyl sedangkan pada residu Phe264 membentuk dua ikatan Pi-alkyl. Interaksi hidrofobik yang terjadi pada senyawa beta-karoten terjadi karena adanya interaksi antara molekul yang bersifat non-polar yang tidak mampu membentuk ikatan hidrogen dengan molekul air atau dengan kata lain interaksi ini sebagian besar merupakan efek entropik yang berasal dari adanya gangguan terhadap ikatan hidrogen yang sangat dinamis antara molekul air oleh zat terlarut non-polar (Malau & Sianturi, 2019).

Visualisasi hasil penambatan antara asam klorogenat dan protein tirosinase seperti pada Gambar 13b menunjukkan bahwa asam klorogenat mengikat banyak residu asam amino di area yang bersifat polar pada situs aktif protein. Interaksi yang terbentuk melalui ikatan hidrogen pada residu asam amino His85 pada atom O, O-H, Asn81 pada atom O, Cys83 pada atom O, Glu256 pada atom O, His244 dan Met280 pada atom O-H. Banyaknya ikatan hidrogen yang terbentuk dikarenakan asam klorogenat memiliki TPSA yang besar diantara senyawa ubi jalar lainnya. Pada residu His85 terbentuk tiga ikatan hidrogen dan dua ikatan hidrogen terbentuk pada residu Met280. Pada asam klorogenat memiliki jumlah atom yang berfungsi sebagai akseptor lebih banyak dibandingkan dengan atom yang berfungsi sebagai donor, sehingga pada saat proses transfer elektron antar-atom terjadi terbentuklah banyak ikatan hidrogen tersebut. Selain itu, interaksi hidrofobik juga terbentuk melalui

ikatan Pi-alkyl pada residu His85, His263, Phe264 sedangkan pada residu Val283 terbentuk dua ikatan Pi-alkyl.

Visualisasi yang ditunjukkan pada Gambar 13c merupakan hasil penambatan antara senyawa kuersetin dan protein tirosinase berdasarkan TPSA menunjukkan bahwa senyawa ini memiliki sifat polaritas yang cukup baik jika dibandingkan dengan beta-karoten. Kuersetin terikat cukup baik pada situs aktif dan tersimpan dalam *binding pocket* pada protein tirosinase, sehingga menimbulkan interaksi dengan residu asam amino seperti ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik melalui ikatan Pi-Pi stacked dan Pi-alkyl.

Ikatan hidrogen senyawa kuersetin terbentuk pada residu His94 Met280, dan Gly281 melalui atom O-H yang disebabkan oleh jumlah atom yang berfungsi sebagai akseptor lebih banyak daripada atom yang berfungsi sebagai donor yang menghasilkan jarak interaksi ikatan hidrogen pada kuersetin adalah jenis ikatan hidrogen yang terbentuk tergolong kuat dengan nilai 2,2 Å. Dengan kata lain, jumlah elektron yang dilepaskan atom dapat mengisi orbital kosong dengan energi yang tinggi (HOMO). Sedangkan interaksi hidrofobik terbentuk pada residu His61 dan His263 melalui ikatan dua Pi-Pi-stacked dan tiga ikatan Pi-alkyl terbentuk pada residu Val283. Selain itu, ditemukan adanya ikatan carbon-hydrogen pada residu His85 dan Ser282 melalui atom O.

Pengamatan yang dilakukan terhadap hasil penambatan antara senyawa katekin dan protein tirosinase seperti yang ditunjukkan pada Gambar 13d berdasarkan TPSA senyawa katekin tersimpan dalam *binding pocket* protein tirosinase dan membentuk interaksi dengan residu asam amino pada situs aktifnya.

Interaksi yang terbentuk melalui ikatan hidrogen pada residu asam amino His61 dan Glu256 pada atom O-H. Selain ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik juga terbentuk melalui ikatan Pi-sigma pada residu His263 dan dua ikatan Pi-alkyl terbentuk pada residu His85, Val283. Terbentuknya ikatan hidrogen pada senyawa katekin terjadi akibat adanya proses donor-akseptor pada area yang bersifat polar disekitar situs aktif protein dengan jarak interaksi ikatan 2,0 Å dan tergolong kuat.

Gambar 13e menunjukkan visualisasi hasil penambatan antara senyawa antosianin dan protein tirosinase. Berdasarkan TPSA senyawa tersebut, antosianin tersimpan dalam *binding pocket* dan mengikat banyak residu asam amino pada situs aktif protein tirosinase yang sama seperti katekin. Akan tetapi, antosianin membentuk ikatan hidrogen pada residu His85, Asn81, Asn260 dan Cys83 sedangkan pada katekin ikatan hidrogen terbentuk pada residu His61 dan Glu256. Interaksi ikatan hidrogen yang terbentuk dikarenakan senyawa kuersetin berada pada area yang bersifat polar. Pada residu Asn260 membentuk dua ikatan hidrogen pada atom O-H, residu His85 pada atom O-H, Cys83 pada atom H, Asn81 pada atom O melalui proses donor-akseptor. Selain ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik juga terbentuk melalui ikatan Pi-alkyl pada residu His85, His244, dan Val283. Banyaknya interaksi yang terbentuk menunjukkan bahwa antosianin memiliki peranan penting dalam pengikatannya terhadap protein tirosinase.

Beberapa penelitian docking molekuler sebelumnya, asam kojat sering digunakan sebagai senyawa pembanding untuk senyawa uji dalam inhibisi terhadap protein tirosinase. Gambar 13f menunjukkan visualisasi hasil penambatan antara asam kojat dan protein tirosinase berdasarkan TPSA. Asam kojat tersimpan dalam

*binding pocket* pada situs aktif protein tirosinase yang sama dengan tropolone (OTR), dimana senyawa ini berada di area yang bersifat polar dan mengikat beberapa residu asam amino melalui ikatan hidrogen Met280 pada atom O-H dengan jarak interaksi ikatan 2,2 Å dan tergolong ikatan yang kuat. Interaksi lain yang terbentuk seperti interaksi hidrofobik melalui ikatan Pi-sigma pada residu Val283, Pi-Pi-stacked pada residu His263 dan ikatan Pi-alkyl pada residu Ala286. Sedangkan pada residu His61 terbentuk ikatan karbon-hidrogen melalui atom O. Seperti beberapa senyawa ubi jalar interaksi ikatan hidrogen yang terbentuk pada asam kojat juga terjadi melalui proses donor-akseptor atom walaupun tidak sebanyak senyawa-senyawa ubi jalar.

Berdasarkan analisis yang dilakukan terhadap hasil dari penambatan antara tropolone terhadap protein tirosinase seperti yang ditunjukkan pada Gambar 13g diketahui bahwa tropolone berperan sebagai inhibitor alami dari protein tirosinase terikat baik pada situs aktif protein. Hal tersebut menyebabkan timbulnya interaksi dengan residu asam amino pada *binding pocket* protein tirosinase. Interaksi yang terjadi pada situs aktif protein seperti ikatan hidrogen yang terbentuk melalui atom O pada residu His61, His296 dan pada saat yang bersamaan ikatan karbon-hidrogen juga terbentuk pada residu His61 melalui atom O dengan ikatan kovalen rangkap dua. Selain itu, interaksi hidrofobik seperti ikatan Pi juga terbentuk dalam gugus benzen tropolone. Ikatan Pi-sigma terbentuk pada residu Val283, ikatan Pi-Pi-stacked pada residu His263 dan ikatan Pi-alkyl pada residu Ala286.

Ikatan hidrogen yang terbentuk pada tropolone karena adanya proses donor-akseptor antar-atom dimana proses ini dapat mendeskripsikan kapasitas ikatan



hidrogen. Sehingga, jenis ikatan hidrogen yang terbentuk berdasarkan hasil penambatan antara tropolone dan enzim tirosinase tergolong dalam kategori sedang yang disebabkan oleh jumlah afinitas elektron atau energi yang dilepaskan pada saat mengisi orbital molekul tak terisi energi yang paling rendah (LUMO). Dengan kata lain, jumlah atom yang berperan sebagai donor lebih banyak dibanding dengan atom yang berperan sebagai donor.

## **7. Analisis Parameter Prediksi ADMET Hasil Docking Molekuler**

Sejalan dengan analisis penambatan secara molekuler, evaluasi kandidat obat umumnya dilakukan melalui analisis sifat kemiripan dengan obat (*Drug Likeness*) dan profil absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitasnya (Mauliana *et al.*, 2022). Evaluasi sifat mirip obat secara umum dilakukan berdasarkan aturan Lipinski (*Rules of five*) yaitu  $MW < 500$ ,  $MLOGP < 4,15$ ,  $N \text{ or } O < 10$ , dan  $NH \text{ or } OH < 5$  (Neidle, 2012). Sedangkan prediksi ADMET dapat memberikan informasi mengenai bioavailabilitas oral, permease sel, metabolisme, eliminasi, dan toksisitas yang menjadi karakteristik farmakokinetik dan farmakodinamik dari suatu molekul obat (Nusantoro & Fadlan, 2020). Pembahasan mengenai prediksi ADMET merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh (Huang *et al.*, 2019). Tabel V menunjukkan hasil prediksi ADMET hasil docking molekuler senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat (kontrol).

**Tabel V.** Prediksi parameter ADMET hasil docking molekuler senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat (kontrol)

ADMET Parameter	Beta-Karotene	Asam Klorogenat	Kuersetin	Katekin	Antosianin	Asam kojat (Kontrol)
Log P	8,31	-2,45	0,55	-0,84	-0,84	-0,16
TPSA (A <sup>2</sup> )	-	171,07	131,36	110,38	110,38	70,67
Log S	-6,13	-1,94	-2,96	-2,93	-3,48	-1,17
Num.Rotatable Bonds	19	6	1	1	1	1
Num.H-bond acceptors	-	9	7	6	6	4
Num.H-bond donors	-	8	5	5	5	2
Skin Permeability	-2,73	-2,75	-2,73	-3,35	-3,21	-3,12
Skin Sensitisation	No	No	No	No	No	No
Log Kp (cm/s)	-7,62	-10,35	-7,05	-8,78	-8,78	-7,62
CYP1A2 Inhibition	No	No	Yes	No	No	No
Lipinski Rules	MW >500 MLOGP>4.15	NH or OH >5	Yes	Yes	Yes	Yes
Bioavailabilitas score	0,17	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55

Keterangan : Parameter ADMET menunjukkan sifat farmakokinetik senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat (kontrol)

Pendekatan secara *in silico* absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan pendekatan toksisitas (ADMET) meningkatkan peluang proses penemuan obat dengan memprediksi berbagai sifat dari farmakokinetik senyawa bioaktif. Analisis farmakokinetika ADMET umumnya dimulai dengan identifikasi kemudian berlanjut melalui tahap pengoptimalan prospek, pemilihan, dan pengembangan. Sebagian besar hasil dari program pengembangan obat telah ditentukan sebelumnya pada titik pemilihan kandidat. rentang fenomena yang dipelajari harus sangat komprehensif

dan bahkan satu parameter saja mungkin bertanggung jawab atas kegagalan obat (Singh, 2006).

Hasil prediksi ADMET menunjukkan bahwa senyawa ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) cukup baik sebagai kandidat inhibitor alami tirosinase berdasarkan lipofilitas (Log P) menunjukkan kelarutan senyawa dalam lemak, (Log S) tingkat kelarutan senyawa dalam air, TPSA, mendefinisikan kemampuan senyawa untuk masuk ke dalam sel, *skin permeability*, sensitifitas kulit, (Log Kp) menentukan kemampuan suatu senyawa dalam menembus kulit, inhibitor CYP1A2 penghambatan senyawa terhadap pembentukan sitokrom P<sub>450</sub> oleh enzim CYP1A2, aturan Lipinski dan bioavailabilitas jumlah ketersediaan senyawa saat mencapai target aksinya (Patil Pratiksha, 2022).

Analisis parameter prediksi ADMET senyawa beta-karoten seperti yang pada tabel 5 menunjukkan bahwa beta-karoten berdasarkan logaritma koefisien partisi (Log P) yaitu 8,31. Nilai tersebut menunjukkan sifat lipofilisitas senyawa ini sangat tinggi apabila dibandingkan dengan senyawa ubi lainnya. Sedangkan untuk parameter TPSA dan kelarutannya dalam air (Log S) beta-karoten dinyatakan tidak larut dalam air. Untuk parameter *rotatable bond* (fleksibilitas) beta-karoten sebagai ligan sangat tinggi (Syahputra *et al.*, 2014) seperti yang ditunjukkan pada Tabel V.

Beta-karoten memiliki permeabilitas yang tidak terlalu baik dalam menembus kulit berdasarkan parameter *skin permeability* dengan nilai -2,73 dan (Log Kp) -7,62 cm/s. *Skin sensititation* beta-karoten tidak menimbulkan respon alergi pada kulit. Beta-karoten tidak dapat menghambat enzim CYP1A2 yang memainkan peranan utama dalam metabolisme obat dalam pembentukan sitokrom P<sub>450</sub>.

Berdasarkan evaluasinya berdasarkan aturan Lipinski (*Rules of Five*) beta-karoten tidak memenuhi syarat sebagai obat dalam sediaan oral dikarenakan berat molekulnya  $> 500$  dan  $MLogP > 4,15$  dikarenakan sifatnya sangat non-polar. Adapun untuk parameter bioavailabilitas yang mendefinisikan tentang suatu ukuran kecepatan dan jumlah zat aktif yang berada dalam sirkulasi sistemik mampu mencapai target aksinya beta-karoten cukup rendah dengan nilai 0,17. Walaupun demikian, beta-karoten masih dapat diterima sebagai kandidat inhibitor alami untuk protein tirosinase dalam bentuk sediaan topikal.

Analisis terhadap senyawa ubi jalar kuersetin berdasarkan parameter prediksi ADMET menunjukkan bahwa senyawa ini memiliki lipofilisitas (Log P) yang sangat rendah dengan nilai 1,98 jika dibandingkan dengan beta-karoten. Akan tetapi kuersetin memiliki kelarutan (Log S) yang cukup tinggi dengan nilai -2,96 sehingga memiliki luas area yang bersifat polar berdasarkan TPSA dengan nilai  $131,36 \text{ \AA}^2$  yang membuktikan bahwa kuersetin bersifat polar. Luasnya area TPSA dari kuersetin tidak terlepas dari pengaruh atom donor-akseptor dimana kuersetin memiliki 5 atom sebagai donor dan 7 atom sebagai akseptor yang kemudian dari proses inilah ikatan hidrogen dapat terbentuk. Adapun fleksibilitas kuersetin sebagai ligan, senyawa ini tidak begitu fleksibel seperti beta-karoten berdasarkan nilai *rotatable bond* yang dimilikinya adalah 1.

Kuersetin memiliki *skin permeability* yang sama seperti beta-karoten dengan nilai -2,73, tetapi untuk (Log Kp) kuersetin memiliki nilai -7,05 cm/s. Berbeda dengan beta-karoten, kuersetin dapat menghambat pembentukan sitokrom yang disebabkan oleh enzim CYP1A2. Kuersetin memenuhi parameter untuk

evaluasi sediaan obat berdasarkan aturan Lipinski dengan nilai bioavailabilitas yang cukup tinggi yaitu 0,55 yang memungkinkan kuersetin dapat dijadikan sebagai kandidat inhibitor alami terhadap protein tirosinase.

Analisis hasil prediksi ADMET antara dua senyawa ubi jalar yaitu katekin dan antosianin menunjukkan sifat lipofilisitas senyawa yang rendah dengan nilai -0,84 dikarenakan kedua senyawa ini bersifat polar. Tingkat kepolaran dari kedua senyawa ini diketahui berdasarkan nilai kelarutan (Log S) dan luas area berdasarkan TPSA masing-masing. Katekin diketahui memiliki nilai kelarutan -2,93 dan antosianin -3,48. Sedangkan TPSA dari masing-masing senyawa memiliki nilai yang sama yaitu 110,38 Å<sup>2</sup>. Struktur dari kedua senyawa ini terbilang mirip antara satu dengan yang lainnya mulai dari nilai *rotatable bonds* dengan nilai 1, atom donor-akseptor dari masing-masing adalah 5 dan 6. Berdasarkan parameter permeabilitasnya terhadap kulit, katekin memiliki nilai *skin permeability* -3,35 dan antosianin -3,21 yang menunjukkan kemampuannya cukup baik dalam mencapai target aksinya.

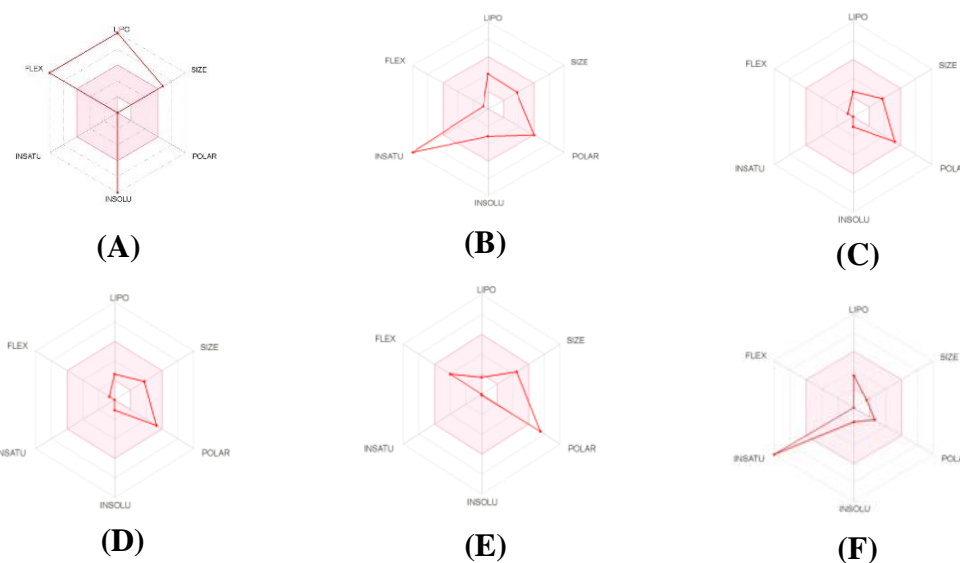
Permeabilitas terhadap kulit mempengaruhi nilai (Log Kp), dimana katekin dan antosianin memiliki nilai yang sama yaitu -8,78 cm/s. berdasarkan nilai tersebut, kedua senyawa ini lebih baik apabila dibandingkan dengan senyawa beta-karoten dan kuersetin. Sedangkan untuk parameter dalam penghambatan pembentukan sitokrom kedua senyawa ini tidak memiliki aktivitas terhadap enzim CYP1A2. Evaluasi berdasarkan aturan Lipinski (*Rules of five*) kedua senyawa ini memenuhi syarat dengan nilai bioavailabilitas cukup baik yaitu 0,55.

Analisis hasil prediksi ADMET terhadap senyawa asam klorogenat berdasarkan nilai (Log P) -2,45 yang menunjukkan sifat lipofilitasnya sangat rendah jika dibandingkan dengan senyawa ubi jalar lainnya. Akan tetapi, asam klorogenat memiliki sifat kepolaran cukup tinggi berdasarkan TPSA, senyawa ini memiliki nilai 171,07 Å<sup>2</sup>. Luas area polar asam klorogenat dipengaruhi oleh nilai kelarutannya (Log S) -1,94 sehingga menghasilkan interaksi dengan residu asam amino melalui ikatan hidrogen yang cukup banyak seperti yang ditunjukkan pada Gambar 12f. Banyaknya ikatan hidrogen yang terbentuk pada senyawa ini, tidak terlepas dari proses donor-akseptor yang terjadi antar-atom, yang mana diketahui senyawa ini memiliki jumlah atom yang berfungsi sebagai donor adalah 8 dan jumlah atom yang berfungsi sebagai akseptor 9.

Berdasarkan fleksibilitasnya sebagai ligan, asam klorogenat cukup fleksibel dengan nilai *rotatable bond* sebesar 6, walaupun tak sefleksibel beta-karoten. Pada penggunaannya untuk kulit, asam klorogenat memiliki permeabilitas yang cukup baik berdasarkan nilai *skin permeability* -2,75 dan memiliki nilai (Log Kp) -10,35 cm/s serta tidak mengiritasi kulit. Asam klorogenat diketahui tidak dapat menghambat pembentukan sitokrom P450 oleh enzim CYP1A2. Evaluasi sediaan asam klorogenat sebagai sediaan oral berdasarkan aturan Lipinski, senyawa ini tidak memenuhi syarat karena jumlah NH *or* OH > 5. Berdasarkan bioavailabilitasnya, asam klorogenat cukup baik dengan nilai 0,55. Dengan demikian, senyawa ini dapat dengan mudah mencapai target aksinya seperti yang ditunjukkan pada Tabel V.

Penggunaan asam kojat dalam sediaan obat diketahui memiliki kestabilan yang cukup baik, sehingga perlu dilakukan analisis prediksi ADMET. Berdasarkan parameter lipofilisitas senyawa ini sangat rendah dengan nilai (Log P) -0,16 yang menunjukkan senyawa ini tidak larut dalam lemak. Asam kojat diketahui memiliki luas area polar berdasarkan TPSA dengan nilai 70,67 Å<sup>2</sup> dimana nilai TPSA tersebut dipengaruhi oleh kelarutannya (Log S) -1,17. Fleksibilitas asam kojat sebagai ligan tidak sefleksibel beta-karoten dan asam klorogenat berdasarkan nilai *rotatable bond* yang dimilikinya adalah 1. Sebelumnya telah diketahui hasil penambatan antara asam kojat dan protein tirosinase menghasilkan interaksi dengan residu asam amino melalui ikatan hidrogen yang dipengaruhi oleh jumlah atom yang berfungsi sebagai donor-akseptor. Asam kojat memiliki jumlah atom yang berfungsi sebagai donor 4 dan akseptor 6. Banyak atau tidaknya jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk pada senyawa ini tidak terlepas dari jumlah atom dalam proses donor-akseptor.

Berdasarkan permeabilitasnya terhadap kulit, asam kojat memiliki nilai -3,12 dan memiliki nilai (Log Kp) yang sama dengan beta-karoten yaitu -7,62. Prediksi evaluasi terhadap sediaan berdasarkan aturan Lipinski menunjukkan bahwa asam kojat memenuhi syarat dikarenakan bioavailabilitas asam kojat cukup baik dengan nilai 0,55. Akan tetapi senyawa ini tidak dapat menghambat pembentukan sitokrom P<sub>450</sub> oleh enzim CYP1A2. Meskipun demikian, penggunaan asam kojat dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan iritasi pada kulit.



**Gambar 14.** Visualisasi radar bioavailabilitas senyawa (a) beta-karoten, (b) kuersetin, (c) katekin, (d) antosianin, (e) asam klorogenat dan (f) asam kojat (kontrol)

Keterangan : LIPO (lipofilisitas), FLEX (fleksibilitas), INSATU (saturasi), INSOLU (solubilitas), POLAR (polaritas), SIZE (ukuran)

Gambar 14 menunjukkan visualisasi radar bioavailabilitas dari senyawa ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) yang digunakan untuk mengetahui sifat fisika kimia suatu senyawa. Pengamatan dilakukan terhadap radar bioavailabilitas dari kelima senyawa ubi jalar dan asam kojat tersebut dianalisis secara intuitif, terdapat area merah muda menunjukkan kisaran optimal enam sifat yaitu lipofilisitas (LIPO), ukuran molekul (SIZE), polaritas (POLAR), solubilitas (INSOLU), (INSATU) saturasi warna suatu senyawa dan fleksibilitas (FLEX) (Patil Pratiksha, 2022).

Gambar 14a menunjukkan radar bioavailabilitas beta-karoten diketahui memiliki fleksibilitas dan lipofilisitas yang tinggi, tetapi memiliki polaritas yang sangat rendah, akan tetapi sifat farmakokinetik dari beta-karoten masih dapat diterima untuk penggunaan topikal. Farmakokinetik senyawa kuersetin berdasarkan



radar bioavailabilitas menunjukkan sifat polaritas dan kelarutan yang sangat baik jika dibandingkan dengan beta-karoten, katekin, antosianin dan asam klorogenat seperti yang ditunjukkan pada Gambar 14b. Katekin dan antosianin menunjukkan sifat fisika kimia berdasarkan polaritas, lipofilisitas dan solubilitas yang sama seperti yang ditunjukkan pada Gambar 14c dan Gambar 14d dikarenakan kedua senyawa ini memiliki struktur yang mirip. Akan tetapi, jika dilihat secara solubilitas katekin dikategorikan sangat larut terhadap pelarut jika dibandingkan dengan antosianin.

Radar bioavailabilitas sifat fisika kimia senyawa asam klorogenat menunjukkan bahwa senyawa ini memiliki polaritas yang tinggi dan cukup fleksibel sebagai ligan seperti yang terlihat pada Gambar 14e. Radar bioavailabilitas asam kojat menunjukkan bahwa senyawa ini memiliki lipofilisitas, kelarutan dan saturasi yang sangat baik. Asam kojat memiliki solubilitas dengan nilai  $-1,17$  dengan kategori sangat tinggi berdasarkan (*Log S scale*) yang menyatakan *Insoluble*  $< -10$ , *Poorly*  $< -6$ , *Moderately*  $< -4$ , *Soluble*  $< -2$ , *Very*  $< 0$  dan *Highly*  $> 0$  (Di & Kerns, 2016).

## **B. Analisis Hasil Penghambatan Enzim Tirosinase Berdasarkan Pengujian Secara In vitro**

### **1. Persiapan dan Ekstraksi Sampel Ubi jalar**

Pada penelitian ini menggunakan sampel ubi jalar segar sebanyak 1 kg. Kemudian dilakukan sortasi basah dengan tujuan untuk membersihkan sampel dari tanah yang melekat pada ubi jalar dan dilakukan perajangan. Selanjtnya sampel yang telah dirajang dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama

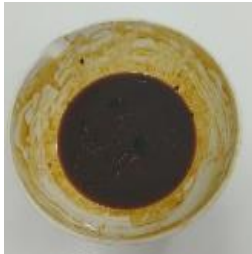
24 jam untuk mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik, sehingga simplisia tidak mudah rusak dan dapat disimpan lebih lama. Simplisia yang telah kering kemudian dibuat menjadi serbuk menggunakan blender untuk memudahkan proses ekstraksi. Sampel ubi jalar diekstraksi menggunakan metode sokletasi dengan pelarut etanol 60%.

Etanol diketahui sebagai salah satu pelarut organik yang bersifat polar dan memiliki titik didih yang rendah dengan tingkat toksisitas yang relatif kecil jika dibandingkan dengan pelarut organik lainnya (Yuan *et al.*, 2017). Pemilihan metode sokletasi tersebut berdasarkan pada penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa diperoleh banyak senyawa aktif yang terkandung dalam ubi jalar yang diduga berpotensi sebagai inhibitor dari tirosinase (Zengin *et al.*, 2017). Sistem pelarut dalam ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan. Adapun keuntungan dari metode tersebut adalah proses ekstraksi berlangsung secara terus-menerus, sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi, membutuhkan jumlah pelarut yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan maserasi (Mukhriani, 2014).

Ekstrak etanol ubi jalar yang diperoleh kemudian dipisahkan dari pelarut etanol dengan menggunakan alat rotary evaporator dan diaapkan menggunakan water bath sehingga diperoleh ekstrak kental dengan karakteristik ekstrak berbentuk padatan kental, berwarna kuning kecoklatan, bau khas ubi jalar dan memiliki rasa karamel manis. Pada Tabel VI menunjukkan persen rendemen ekstrak cukup baik yaitu sebesar 13,58% lebih dari 10% dengan berat 76,14 gram seperti yang

ditunjukkan. Tujuan dari analisa rendemen ini adalah untuk mengetahui tingkat keberhasilan pada konsentrasi berapakah proses pembuatan serbuk ekstrak etanol ubi jalar secara optimal. Tabel VI menunjukkan hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak ubi jalar.

**Tabel VI.** Pemeriksaan organoleptis ekstrak ubi jalar

Sampel	Rendemen (%)	Berat Ekstrak (g)	Karakteristik sampel	Ekstrak Kental Ubi Jalar
Umbi	13,58	76,14	Bentuk : Padatan kental Warna : Kuning Kecoklatan Bau : Aroma khas ubi jalar Rasa : Karamel dan manis	

Keterangan : % rendemen diperoleh dengan rumus perbandingan antara berat ekstrak dengan berat awal simplisia dikalikan 100 % (Sani *et al.*, 2014).





Rendemen merupakan perbandingan antara hasil banyaknya metabolit setelah dilakukan proses ekstraksi dengan berat sampel yang diperoleh. Rendemen dikatakan baik jika nilainya lebih dari 10%. Oleh karena itu rendemen ekstrak kasar yang diperoleh dinyatakan sudah cukup baik karena hasil rendemen >10% (Sani *et al.*, 2014). Ekstrak kental ubi jalar tersebut yang kemudian digunakan pada pengujian hambatan terhadap enzim tirosinase.

## 2. Analisis Hasil Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Ubi Jalar

Pendekatan secara penapisan fitokimia meliputi analisis kualitatif kandungan dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan seperti akar, batang, daun, bunga, buah dan biji terutama kandungan metabolit sekunder yang merupakan senyawa bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, glikosida, terpenoid, saponin, tannin

dan polifenolnya (Syakri *et al.*, 2020). Tabel VII menunjukkan hasil identifikasi senyawa aktif ubi jalar dengan uji reaksi tabung sebagai berikut :

**Tabel VII.** Hasil identifikasi senyawa aktif ekstrak ubi jalar secara kualitatif dengan uji reaksi tabung

Sampel	Identifikasi Senyawa			
	Alkaloid	Flavonoid	Fenolik	Saponin
Uji Reaksi Tabung				
Pereaksi	Dragendroff	(Mg) + Amil alkohol	FeCl <sub>3</sub>	Air Panas + HCl 2 N
Hasil	Negatif (-)	Positif (+)	Positif (+)	Positif (+)

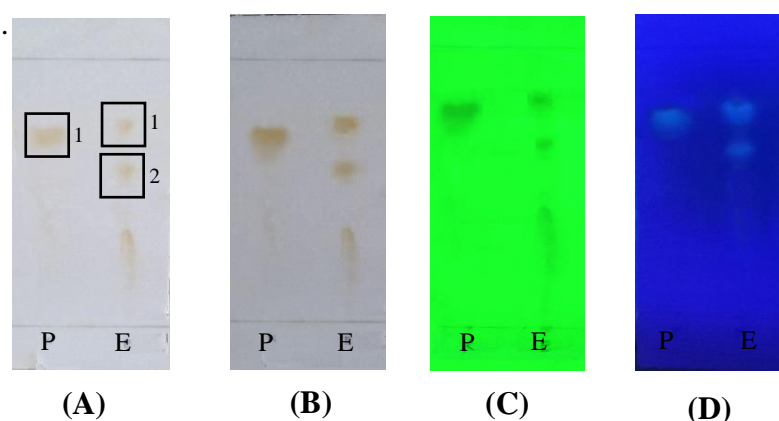
Keterangan : Alkaloid (tidak terbentuk endapan berwarna jingga), Flavonoid (terbentuk warna jingga), Fenolik (terbentuk warna hijau pekat), saponin (terbentuknya busa)

Pada penelitian ini, uji kualitatif dilakukan dengan uji reaksi tabung dan uji KLT terhadap kandungan senyawa aktif ekstrak ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) seperti alkaloid, karotenoid, flavonoid, fenolik dan saponin menggunakan pereaksi tertentu (Muthmainnah, 2017). Pengujian kandungan flavonoid dilakukan dengan mereaksikan ekstrak dengan serbuk magnesium 0,1 mg dan 0,4 ml amil alkohol (campuran asam klorida 37% dan etanol 95%). Penambahan serbuk magnesium dengan tujuan untuk mereduksi senyawa flavonoid pada ekstrak, sehingga reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga (Rusmawijayanto & Luliana, 2019).

Uji kandungan fenolik terhadap ekstrak ubi jalar yang direaksikan dengan larutan FeCl<sub>3</sub> 1% yang menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya warna hijau

pekat pada reaksi tersebut. Uji kandungan saponin terhadap ekstrak ubi jalar yang direaksikan dengan penambahan air panas dan satu tetes HCl 2 N menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya busa yang stabil setelah di gocok. Akan tetapi uji kandungan senyawa alkaloid yang dilakukan terhadap ekstrak ubi jalar dengan pereaksi dragendroff, wagner dan mayer tidak menunjukkan adanya endapan putih ataupun jingga (Syakri *et al.*, 2020).

KLT merupakan jenis kromatografi yang memiliki fase gerak cair dan fase diam adalah lapisan tipis material di atas pelat datar yang dikenal sebagai sorben. Fase gerak dikenal sebagai pelarut yang berfungsi untuk mengangkut zat terlarut melalui fase diam di mana kecepatan zat terlarut bergerak melalui fase diam tergantung pada kekuatan fase gerak saat melarutkan zat terlarut (Santiago & Strobel, 2013). Gambar 15 menunjukkan hasil identifikasi senyawa flavonoid ekstrak ubi jalar dengan metode KLT.



**Gambar 15.** Hasil identifikasi senyawa flavonoid ekstrak ubi jalar dengan metode KLT (a) pada sinar tampak, (b) setelah disemprot dengan uap amonia, (c) deteksi pada sinar UV<sub>254</sub> nm dan (d) deteksi pada sinar UV<sub>366</sub> nm

Keterangan :

P = Senyawa pembanding (Kuersetin)

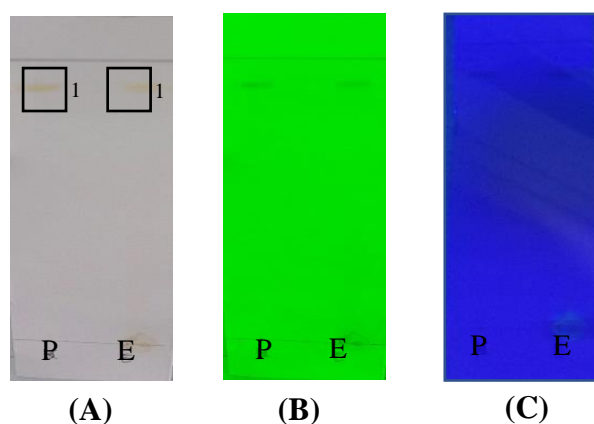
E = Ekstrak (Sampel)

Gambar 15 menunjukkan hasil pengujian senyawa flavonoid dalam ekstrak ubi jalar dan diperoleh nilai Rf standar kuersetin dan ekstrak dengan nilai masing-masing adalah 0,73 dan 0,77 dengan adanya bercak noda berwarna kuning pada plat silika. Kemudian plat KLT tersebut, disemprot dengan amonia untuk mempertegas bercak noda yang muncul. Selain itu, pada sampel juga didapatkan nilai Rf 0,62 yang menegaskan bahwa ekstrak ubi jalar memiliki kandungan senyawa flavonoid khususnya senyawa kuersetin. Setelah pengujian KLT, dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum terhadap standar kuersetin dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis untuk memastikan bahwa senyawa kuersetin dalam ekstrak ubi jalar tidak mengganggu serapan maksimum enzim seperti yang ditunjukkan pada Tabel VIII.

Pengujian kandungan flavonoid ekstrak ubi jalar dengan fase gerak n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) dan uap amonia setelah dilakukan elusi untuk menegaskan bercak noda yang terbentuk dimana pemilihan fase gerak tersebut berdasarkan penelitian sebelumnya (Kurniawan, 2022). Kuersetin digunakan sebagai pembanding karena tergolong senyawa falonoid yang paling banyak tersebar pada tumbuhan dengan nilai Rf 0,69-0,817 (Sri Rizki *et al.*, 2021).

Kemudian dilakukan pengukuran terhadap nilai Rf yang digunakan sebagai bukti dalam mengidentifikasi senyawa antara standar dan ekstrak ubi jalar menggunakan rumus perhitungan nilai Rf yaitu jarak yang tempuh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh pelarut. Pengujian terhadap kandungan senyawa aktif ekstrak ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) dengan metode KLT merupakan salah satu cara pemisahan yang berdasarkan pada pembagian campuran

dua senyawa dalam dua fase yaitu fase gerak seperti campuran beberapa pelarut dan fase berupa plat silika gel F<sub>254</sub>, dengan senyawa pembanding seperti beta-karoten, kuersetin dan asam galat seperti yang ditunjukkan pada Tabel VIII. Bercak noda standar dan sampel yang terbentuk pada lempeng KLT diidentifikasi pada lampu Uv 254 nm dan 366 nm untuk mengetahui apakah nilai Rf yang diperoleh antara keduanya tidak berbeda terlalu jauh yang menandakan keberadaan suatu senyawa pada ekstrak. Gambar 16 menunjukkan hasil identifikasi senyawa flavonoid ekstrak ubi jalar dengan metode KLT.

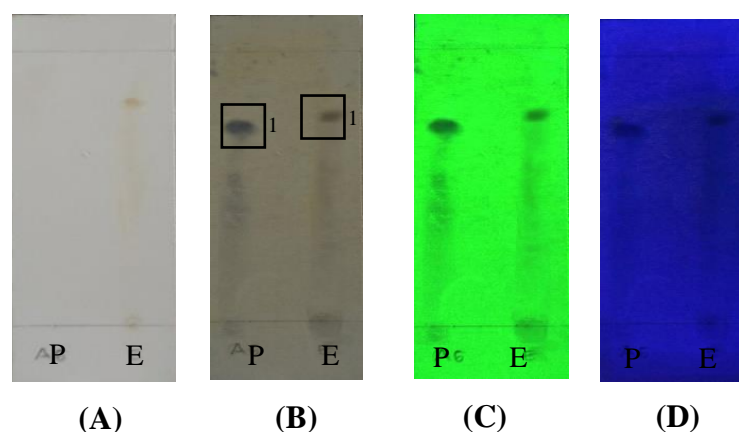


**Gambar 16.** Hasil identifikasi senyawa karotenoid ekstrak ubi jalar dengan metode KLT (a) sinar tampak (b) deteksi pada sinar UV<sub>254</sub> nm dan (c) deteksi pada sinar UV<sub>366</sub> nm

Keterangan :  
 P = Senyawa pembanding (Beta-karoten)  
 E = Ekstrak (Sampel)

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Prasetyo (2020) terhadap kandungan karotenoid ekstrak ubi jalar yang diketahui mengandung senyawa beta-karoten dengan metode kromatografi menggunakan fase gerak n-heksan : aseton (9:1). Eluen dibuat sebanyak 30 ml, dengan cara mencampur 27 mL n-heksan dengan 3 ml benzene dalam botol eluen dan dikocok hingga homogen. Identifikasi senyawa

karotenoid yang dilakukan terhadap ekstrak ubi jalar menggunakan metode kromatografi dengan pembanding senyawa beta-karoten murni diperoleh nilai Rf masing-masing sebesar 0,86 dan 0,86 dengan bercak noda berwarna kuning cerah yang terbentuk. Senyawa beta-karoten yang digunakan sebagai standar diketahui memiliki nilai Rf 0,86 dengan satu spot bercak noda yang terbentuk pada lempeng KLT (Kusbandari & Susanti, 2017). Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa ekstrak ubi jalar mengandung senyawa karotenoid khususnya senyawa beta-karoten. Gambar 17 menunjukkan hasil identifikasi senyawa flavonoid ekstrak ubi jalar dengan metode KLT.



**Gambar 17.** Hasil identifikasi senyawa fenolik ekstrak ubi jalar dengan metode KLT (a) sinar tampak, (b) setelah disemprot  $\text{FeCl}_3$ , (c) deteksi pada sinar  $\text{UV}_{254}$  nm dan (d) deteksi pada sinar  $\text{UV}_{366}$  nm

Keterangan :

P = Senyawa pembanding (Asam galat)

E = Ekstrak (Sampel)

Uji kualitatif fenolik dengan metode kromatografi menggunakan fase gerak dengan campuran asam format : etil asetat : air (4:1:5), dengan fase diamnya menggunakan plat silika gel  $\text{F}_{254}$ , kemudian disemprot dengan  $\text{FeCl}_3$  untuk menegaskan bercak noda yang muncul pada plat silika. Berdasarkan penelitian



Ramadhani *et al.*, (2021) menyatakan bahwa nilai Rf pembanding asam galat sebesar 0,78-0,81. Nilai Rf asam galat dan ekstrak ubi jalar yang diperoleh pada pengujian dengan metode KLT tidak memiliki perbedaan yang cukup jauh dengan nilai masing-masing adalah 0,81 dan 0,84 yang menandakan ekstrak ubi jalar mengandung senyawa fenolik. Tabel VIII menunjukkan hasil pengujian kandungan senyawa aktif ekstrak ubi jalar.

**Tabel VIII.** Hasil pengujian kandungan senyawa aktif ekstrak ubi jalar secara kualitatif dengan metode KLT

<b>Sampel</b>	<b>Standar</b>	<b>Rf Sampel</b>	<b>Rf Standar</b>	<b><math>\lambda_{max}</math> Standar</b>	<b>Golongan senyawa</b>
Ekstrak ubi jalar	Kuersetin	0,77 0,62	0,73	435,24 nm	Flavonoid
Ekstrak ubi jalar	$\beta$ -Karoten	0,86	0,86	449,40 nm	Karotenoid
Ekstrak ubi jalar	Asam Galat	0,84	0,81	756,50 nm	Fenolik

Keterangan : Standar (senyawa pembanding), Sampel (ekstrak ubi jalar),  $\lambda_{max}$  standar (panjang gelombang senyawa pembanding)

Studi intervensi menunjukkan bahwa ubi jalar dapat meningkatkan asupan kadar vitamin A dan secara umum dapat meningkatkan kesehatan (Low *et al.*, 2017). Beta-karoten merupakan karotenoid predominan yang terakumulasi pada akar simpanan ubi jalar berdaging jingga dan merupakan prekursor vitamin A (Gemenet *et al.*, 2020). Penelitian Drapal & Fraser (2019) dengan analisis HPLC-PDA terkait kandungan beta-karoten dalam ubi jalar varietas *orange* kandungan beta-karoten, total karotenoid (TCC) dan kandungan total pro-vitamin A (TPAC) terdeteksi pada umbi ubi jalar varietas orange dengan jumlah nilai masing-masing adalah 10,7, 24,6 dan 13,8  $\mu\text{g/g}$ .

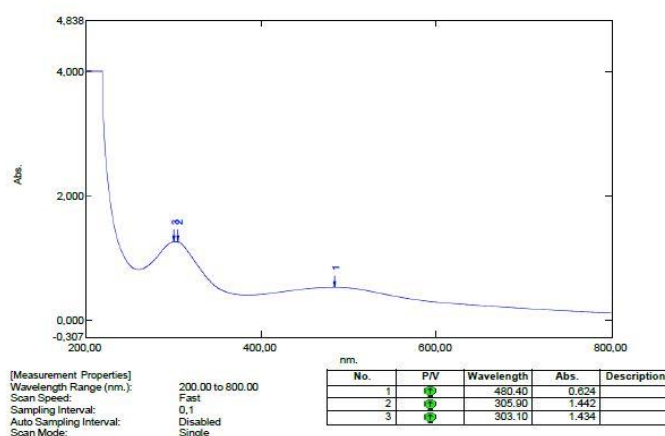
Penelitian yang dilakukan Oloniyo *et al.*, (2021) terkait kandungan flavonoid total terutama senyawa kuersetin dalam umbi ubi jalar ditentukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu menyatakan nilai TFC tertinggi diamati pada sampel ubi jalar sebesar 34,70 mg/g dengan kapasitas antioksidan total (TAC) berkisar antara 21,60 hingga 45,30  $\mu\text{mol}$  AAE. Nilai TAC tertinggi 45,30  $\mu\text{mol}$  AAE yang menjelaskan bahwa konsentrasinya dihitung dan dinyatakan sebagai setara mg kuersetin per gram (QE)/g sampel. Banyak penelitian melaporkan bahwa tumbuhan ubi jalar memiliki aktivitas antioksidan. Akan tetapi, masih terdapat kekurangan informasi mengenai profil fitokimia dan bioaktivitas dari senyawa aktif tersebut. Penelitian terkait perbandingan komposisi fitokimia sepuluh varietas ubi jalar dengan metode HPLC menyatakan bahwa ubi jalar varietas orange memiliki kandungan senyawa asam klorogenat dengan nilai  $(1,37 \pm 0,09 \text{ mg GAE}/100 \text{ g})$ .

Asam klorogenat merupakan salah satu dari sekian banyak senyawa fenolik yang terkandung dalam ubi jalar yang menunjukkan korelasi terkait aktivitas antioksidan yang tinggi dengan total nilai *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) dan PBS Wash masing-masing sebesar  $1,19 \pm 0,15 \text{ (mmol TE}/100 \text{ g FW)}$  dan  $181,15 \pm 18,24 \text{ (}\mu\text{mol QE}/100 \text{ g FW)}$  dengan kontribusi sekitar 15,22% (Sun *et al.*, 2019). Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Oloniyo *et al.*, (2021) menyatakan bahwa kandungan total fenolik (TPC) ubi jalar berkisar antara  $(16,20 - 40,70 \text{ mg/g GAE})$ .

### **3. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase**

Pengujian aktivitas penghambatan enzim tirosinase pada penelitian ini berdasarkan metode yang digunakan Suhesti (2018) dengan L-DOPA sebagai

substrat dan asam kojat sebagai kontrol positif. Pada pengujian ini penentuan panjang gelombang maksimum enzim tirosinase perlu dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan serapan maksimum dari enzim dengan menggunakan alat Uv-vis dengan rentang panjang gelombang 200-800 nm. Prinsip kerja dari metode secara in vitro ini berdasarkan terhadap adanya produk dopakrom yang merupakan hasil oksidasi L-DOPA oleh enzim tirosinase. Senyawa pemutih kulit akan berkompetisi dengan L-DOPA tersebut untuk berikatan dengan enzim tirosinase. Kompetisi tersebut akan mengurangi jumlah produk dopakrom yang akan dihasilkan sehingga aktivitas penghambatan senyawa pemutih dapat dihitung. Dopakrom yang terbentuk akan berwarna jingga tua hingga merah sehingga dapat diukur serapannya dengan cara kolorimetri dengan menggunakan alat spektrofotometri Uv-vis pada panjang gelombang maksimum (Marliana *et al.*, 2016). Gambar 18 menunjukkan hasil pengukuran panjang gelombang maksimum penyerapan dopakrom dengan menggunakan metode spektrofotometri uv-vis.



**Gambar 18.** Penentuan panjang gelombang maksimum dopakrom pada rentang 200-800 nm dengan spektrofotometer uv-vis

Panjang gelombang maksimum yang digunakan untuk melakukan analisis adalah panjang gelombang maksimum dimana suatu zat memberikan penyerapan paling tinggi yang disebut  $\lambda_{\text{maks}}$ . Hal ini disebabkan jika pengukuran dilakukan pada panjang gelombang yang sama, maka data yang diperoleh makin akurat atau kesalahan yang muncul semakin kecil. Adapun pada penelitian ini menggunakan campuran larutan dapar fosfat (pH 6,5) 500  $\mu\text{L}$ , L-DOPA (0,6 mM) 250  $\mu\text{L}$  dan larutan tirosinase 250  $\mu\text{L}$ . Dapar fosfat digunakan sebagai blanko yang bertujuan agar absorbansi yang terukur hanyalah absorbansi atau penyerapan zat yang diinginkan.

Berdasarkan penelitian sebelumnya enzim tirosinase memiliki panjang gelombang maksimum pada 477 nm. Tetapi setelah dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum terhadap enzim tirosinase panjang gelombang tersebut tidak muncul pada spektrofotometer Uv-vis dikarenakan perbedaan konsentrasi substrat L-DOPA yang digunakan. Pada penelitian ini, hasil yang diperoleh dari pengukuran panjang gelombang maksimum enzim tirosinase yaitu pada panjang gelombang maksimum 480,40 nm seperti yang ditunjukkan pada Gambar 18. Beberapa penelitian lain yang telah dilakukan terhadap panjang gelombang maksimum enzim tirosinase menyebutkan bahwa panjang gelombang maksimum enzim tirosinase berada pada 480 nm (Abidin *et al.*, 2019). Sehingga panjang gelombang tersebut yang kemudian digunakan dalam pengukuran persen inhibisi dan  $\text{IC}_{50}$  pada sampel ekstrak kental ubi jalar dan asam kojat.

Sebelumnya penentuan panjang gelombang maksimum enzim tirosinase menggunakan substrat L-DOPA dengan konsentrasi 2,5; 5; 7,5 dan 10 mM.

Konsentrasi substrat merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim, peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan kecepatan reaksi ( $V$ ) hingga tercapai kecepatan maksimal ( $V_{\max}$ ). Akan tetapi jika peningkatan konsentrasi substrat dilakukan lebih lanjut maka tidak akan meningkatkan kecepatan reaksi dan enzim dikatakan jenuh karena sisi aktif enzim telah terisi dengan adanya interaksi dengan substrat (Mahardika, 2012).

Pengujian spektrofotometer Uv-vis pada konsentrasi L-DOPA dengan nilai absorbansi yang dihasilkan setelah dilakukan pengukuran lebih dari 1, dikarenakan kecepatan dan reaksi enzim telah jenuh. Adapun absorbansi dikatakan baik berada dikisaran 0,2-0,8. Sehingga untuk memenuhi syarat tersebut, konsentrasi substrat L-DOPA diturunkan menjadi 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mM. Pemilihan konsentrasi substrat L-DOPA tersebut berdasarkan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa pada konsentrasi 0,2-0,6 mM L-DOPA dapat meningkatkan kemampuan senyawa aktif secara efektif dan reversibel dalam menghambat enzim tirosinase pada reaksi difenolase (Liu *et al.*, 2015). Substrat L-DOPA dengan konsentrasi 0,6 mM memiliki nilai absorbansi 0,624, karena pada konsentrasi ini substrat dapat terisi pada sisi aktif enzim. Faktor lain yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim adalah suhu, dimana reaksi katalis enzim sensitif terhadap perubahan suhu.

Peningkatan suhu akan meningkatkan laju reaksi baik yang dikatalisis maupun yang tidak dikatalisis dengan meningkatkan energi kinetik dan frekuensi tumbukan molekul-molekul yang bereaksi. Namun, energi panas juga dapat meningkatkan energi kinetik enzim hingga ke suatu titik yang melebihi hambatan energi kinetik enzim untuk merusak interaksi non-kovalen. Rantai polipeptida

enzim kemudian mulai terurai, atau mengalami denaturasi. Selain itu, faktor pH juga berpengaruh hampir semua laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim memperlihatkan ketergantungan yang signifikan terhadap pH. Hubungan aktivitas dengan pH memperlihatkan keseimbangan antara denaturasi enzim pada pH tinggi atau rendah dan efek pada keadaan yang bermuatan dari enzim, substrat, atau keduanya (Mahardika, 2012).

Pada pengujian penghambatan tirosinase dalam penelitian ini berdasarkan konsentrasi dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Suhesti (2017) dimana konsentrasi senyawa kontrol asam kojat yang digunakan adalah 6; 7; 8; 9 dan 10 ppm. Sedangkan untuk konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 50; 60; 75; 85 dan 100 ppm. Optimasi dan kuantifikasi yang menggambarkan linearitas, presisi dan akurasi total kadar kandungan senyawa aktif ekstrak ubi jalar menyatakan hubungan linear antara daerah puncak dan konsentrasi (0 hingga 100 ppm) ditemukan ditemukan untuk semua senyawa fenolik kecuali asam kafeat, yang menunjukkan respons linier hanya dalam rentang konsentrasi 0 hingga 50 ppm (Padda & Picha, 2007).

Pengujian penghambatan tirosinase pada penelitian ini, dilakukan tiga kali replikasi terhadap lima konsentrasi asam kojat yang bertujuan untuk mencari presisi dan linearitas dari konsentrasi yang digunakan. Selain itu, replikasi juga digunakan untuk mendapatkan harga estimasi kesalahan eksperimen dan menambah ketepatan hasil eksperimen serta mengurangi tingkat kesalahan (Regency *et al.*, 2019). Uji aktivitas penghambatan tirosinase dilakukan secara *in vitro* untuk mengetahui daya hambat atau inhibisi senyawa aktif ekstrak ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam).

Nilai  $IC_{50}$  merupakan kemampuan suatu senyawa dalam menghambat enzim tirosinase sebagai target aksinya apabila nilai  $IC_{50}$  tersebut dibawah 50  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan potensi penghambatan aktivitas enzim tirosinase dalam kategori sangat kuat. Sedangkan nilai  $IC_{50}$  berada dibawah 100  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan potensi penghambatan dengan kategori kuat (Aprilliani, 2018).

Berdasarkan hasil analisis menggunakan spektrofotometer Uv-vis yang dilakukan diperoleh hasil penghambatan asam kojat terhadap enzim tirosinase untuk ketiga replikasi pengujian yang dilakukan dengan nilai rata-rata  $IC_{50}$   $6,06 \pm 0,01$   $\mu\text{g/ml}$ . Penelitian terkait penggunaan asam kojat sebagai kontrol inhibitor enzim tirosinase yang dilakukan Srisayam *et al.*, (2014) menyatakan aktivitas penghambatan asam kojat terhadap enzim tirosinase dengan nilai  $IC_{50}$   $6,1 \pm 0,4$   $\mu\text{g/ml}$ . Aktivitas penghambatan enzim tirosinase pada penelitian ini diperoleh berdasarkan perhitungan persen inhibisi ketiga replikasi dari lima konsentrasi asam kojat.

Secara teori, nilai  $IC_{50}$  asam kojat yang diperoleh pada penelitian ini termasuk dalam kategori sangat kuat dalam menghambat enzim tirosinase dikarenakan akumulasi tirosinase dan melanin dalam sel menyebabkan melasma dan hiperpigmentasi dengan kata lain enzim memiliki peranan sebagai sentral dalam biosintesis melanin. Sehingga iluminasi molekul dan jalur yang mengatur aktivitas tirosinase dapat mengidentifikasi area target (Taghizadeh *et al.*, 2018). Tabel IX menunjukkan hasil pengujian persen inhibisi dan  $IC_{50}$  aktivitas penghambatan enzim tirosinase asam kojat.

**Tabel IX.** Hasil uji persen inhibisi dan nilai IC<sub>50</sub> aktivitas penghambatan enzim tirosinase asam kojat

Konsentrasi asam kojat	Replikasi						Rata-rata IC <sub>50</sub> ± SD
	Inhibisi (%)			IC <sub>50</sub> (µg/ml)			
	I	II	III	I	II	III	
6 ppm	50,58	50,39	50,78				
7 ppm	52,15	51,76	51,56				
8 ppm	55,09	55,49	55,09	6,04	6,07	6,08	6,06 ± 0,02
9 ppm	56,07	55,88	56,27				
10 ppm	61,76	61,17	61,76				

Keterangan : Nilai ± SD (n=3) dinyatakan sebagai rata-rata IC<sub>50</sub>0,02 dari pengujian tiga replikasi

Hasil IC<sub>50</sub> asam kojat pada uji aktivitas hambatan terhadap enzim tirosinase dalam pengujian ini diperoleh dari persamaan regresi linear berdasarkan perbandingan antara konsentrasi dan nilai persen inhibisi ketiga replikasi dari lima konsentrasi asam kojat yang digunakan. Pengujian yang dilakukan terhadap absorbansi dari tiga replikasi konsentrasi asam kojat diperoleh nilai rata-rata persen inhibisi sebesar 50,78 hingga 61,76 %. Nilai (R) square masing-masing replikasi menunjukkan nilai ≤ 1 pada rentang konsentrasi yang diberikan, sehingga dapat diterima untuk suatu metode analisis yang valid (Harmita, 2004).

Berdasarkan hasil analisis menggunakan spektrofotometer Uv-vis yang dilakukan, diperoleh hasil penghambatan asam kojat terhadap enzim tirosinase untuk ketiga replikasi pengujian yang dilakukan dengan nilai rata-rata IC<sub>50</sub> 6,06 ± 0,01 µg/ml. Penelitian terkait penggunaan asam kojat sebagai kontrol inhibitor enzim tirosinase yang dilakukan Srisayam *et al.*, (2014) menyatakan aktivitas penghambatan asam kojat dengan nilai IC<sub>50</sub> 6,1 ± 0,4 µg/ml. Berdasarkan hasil pengujian aktivitas penghambatan, menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut



asam kojat menghasilkan penghambatan  $IC_{50}$  secara kompetitif terhadap enzim tirosinase berdasarkan aktivitasnya dengan kategori penghambatan sangat kuat. Interaksi asam kojat dan enzim tirosinase membentuk kelat logam tembaga pada sisi aktif enzim tirosinase ditandai dengan penurunan terhadap pembentukan dopakrom dan penurunan intensitas warna yang terbentuk (Fan *et al.*, 2017).

Tumbuhan ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) secara teori diketahui memiliki potensi sebagai inhibitor enzim tirosinase karena memiliki kandungan senyawa beta-karoten, kuersetin, katekin, antosianin dan asam klorogenat. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa senyawa kuersetin dapat menghambat enzim tirosinase secara *in vitro* menunjukkan bahwa kuersetin adalah inhibitor kompetitif dengan  $IC_{50}$   $44,38 \pm 0,13$  mM dan mencapai aktivitas antitirosinase yang lebih tinggi dibandingkan asam kojat (Jakimiuk *et al.*, 2022). Senyawa katekin dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan melalui uji DPPH dengan nilai  $49.10 \pm 1.70\%$  (Li *et al.*, 2018).

Selain aktivitasnya yang terkait dengan mekanisme penghambatan terhadap ROS, katekin juga terlibat dalam mekanisme aksi enzim tirosinase melalui aktivitas biologisnya (Isemura, 2019). Senyawa antosianin diketahui memiliki peranan sebagai inhibitor enzim tirosinase pada reaksi katalitik dengan aktivitas penghambatan  $IC_{50}$   $41,3 \pm 3,2$   $\mu$ M (Yang *et al.*, 2022).

Beberapa turunan senyawa antosianin juga dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase dengan nilai  $IC_{50}$  masing-masing luteolinidin ( $39,21 \pm 2,71$   $\mu$ M), deoksimalvidin ( $20,31 \pm 4,308$   $\mu$ M), sianidin-3-O-glukosida ( $77,91 \pm 4,804$   $\mu$ M), dan malvidin-3-O-glukosida ( $27,60 \pm 4,202$   $\mu$ M)

(Correia *et al.*, 2021). Penelitian terkait aktivitas asam klorogenat terhadap enzim tirosinase sebelumnya telah dilakukan, dimana penelitian tersebut melaporkan bahwa asam klorogenat memiliki nilai  $IC_{50}$  berkisar antara  $5,00 \mu\text{g/mL} \pm 0,23$  hingga  $8,49 \mu\text{g/mL} \pm 0,59$  (Freitas *et al.*, 2016).

Penelitian lain juga melaporkan tentang aktivitas penghambatan enzim tirosinase asam klorogenat dengan nilai penghambatan  $IC_{50}$   $51,2 \pm 1,3\%$  (Ha-na *et al.*, 2019). Sejalan dengan penelitian-penelitian tersebut, ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) diketahui memiliki potensi yang cukup besar sebagai kandidat inhibitor alami enzim tirosinase dengan kandungan senyawa aktif yang dimilikinya. Hal tersebut dibuktikan setelah dilakukan penelitian terkait aktivitas penghambatannya terhadap tirosinase secara *in vitro*. Tabel IX menunjukkan hasil pengujian persen inhibisi dan  $IC_{50}$  aktivitas penghambatan enzim tirosinase ekstrak ubi jalar.

**Tabel X.** Hasil uji persen inhibisi dan nilai  $IC_{50}$  aktivitas penghambatan enzim tirosinase ekstrak ubi jalar

Konsentrasi asam kojat	Replikasi						Rata-rata $IC_{50} \pm SD$
	Inhibisi (%)			$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	I	II	III	I	II	III	
50 ppm	47,92	47,92	47,58				
60 ppm	48,58	48,75	48,91				
75 ppm	52,57	52,41	52,07	63,22	63,26	63,50	$63,32 \pm 0,15$
85 ppm	54,40	54,24	54,90				
100 ppm	56,07	55,74	56,23				

Keterangan : Nilai  $\pm SD$  (n=3) dinyatakan sebagai rata-rata  $IC_{50} \pm 0,15$  dari pengujian tiga replikasi

Pengembangan terhadap tumbuhan ini, terkait aktivitasnya sebagai inhibitor alami dari enzim tirosinase berdasarkan kemampuan senyawa aktifnya. Pengujian penghambatan yang dilakukan terhadap nilai absorbansi ekstrak ubi jalar dari kelima konsentrasi yaitu (50; 60; 75; 85; 100 ppm) dengan tiga kali replikasi bertujuan untuk mendapatkan persen inhibisi ekstrak ubi jalar dengan nilai rata-rata 47,80 sampai 56,01%. Berdasarkan perbandingan antara konsentrasi dan persen inhibisi ekstrak ubi jalar, diperoleh persamaan regresi linear yang digunakan untuk mendapatkan nilai  $IC_{50}$ . Berdasarkan ketiga persamaan regresi linear tersebut didapatkan nilai rata-rata  $IC_{50}$   $63,32 \pm 0,15$   $\mu\text{g/ml}$  dengan koefisien determinasi ( $R$  square 97%. Berdasarkan hasil  $IC_{50}$  tersebut, aktivitas ekstrak ubi jalar dalam menghambat enzim tirosinase dengan jenis penghambatan secara kompetitif dan reversibel atau penghambatan terhadap sisi aktif enzim yang kuat tetapi dapat dilepaskan (Mahardika, 2012).

Pengujian secara *in silico* menunjukkan bahwa senyawa aktif ubi jalar memiliki afinitas, konstanta inhibisi dan terikat cukup baik dengan residu asam amino pada situs aktif protein tirosinase yang dibuktikan dengan hasil penghambatan  $IC_{50}$  ekstrak ubi jalar terhadap enzim tirosinase setelah dilakukan uji penghambatan secara *in vitro* dengan nilai  $IC_{50}$   $63,32 \pm 0,15$   $\mu\text{g/ml}$  yang tergolong dalam kategori kuat. Tabel XI menunjukkan hasil pengujian normalitas  $IC_{50}$  asam kojat (kontrol) dan ekstrak ubi jalar dengan menggunakan metode Shapiro Wilk.

**Tabel XI.** Hasil uji normalitas IC<sub>50</sub> asam kojat (kontrol) dan ekstrak ubi jalar

Normalitas				
Data	Sampel	Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Sig.
IC <sub>50</sub>	Ekstrak	0,855	3	0,253*
	Asam Kojat	0,987	3	0,780*

Keterangan: \*Nilai Sig. dinyatakan sebagai rata-rata persen inhiibisi dan IC<sub>50</sub> berdasarkan pengujian tiga replikasi menunjukkan data terdistribusi normal atau  $P > 0,05$ .

Dalam menganalisa data penelitian, penggunaan program SPSS sangat diperlukan untuk pengambilan keputusan dari hasil penelitian. Analisis yang dilakukan seperti uji normalitas bertujuan untuk menilai sebaran data pada kelompok atau variabel, apakah sebaran data tersebut terdistribusi normal atau tidak yang diambil dari populasi. Pengujian normalitas dilakukan berdasarkan metode Shapiro-Wilk yang digunakan untuk mengidentifikasi apakah suatu peubah acak mengikuti distribusi normal. Uji ini sering diaplikasikan dalam analisis regresi untuk pemeriksaan asumsi normalitas dan digunakan untuk menganalisis sampel kurang dari 100. Analisis parametrik yang dilakukan terhadap normalitas nilai IC<sub>50</sub> antara ekstrak ubi jalar dan asam kojat diperoleh nilai signifikansi masing-masing adalah 0,253 dan 0,780 diasumsikan telah terdistribusi normal dengan nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 atau  $P > 0,05$ . Berdasarkan nilai tersebut, analisis pengujian dapat dilanjutkan menggunakan metode Independent sample t-test untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna nilai IC<sub>50</sub> antara ekstrak ubi jalar dan asam kojat. Tabel XII menunjukkan hasil pengujian Independent sample t-test data nilai IC<sub>50</sub> asam kojat dan ekstrak ubi jalar.

**Tabel XII.** Hasil uji Independent sample t-test data nilai IC<sub>50</sub> asam kojat dan ekstrak ubi jalar

Independent sample t-test						
Data	Sampel	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Sig.	Sig. (2-tailed)
IC <sub>50</sub>	Ekstrak	63,32	0,15	0,08	0,054	0,000*
	Asam Kojat	6,06	0,02	0,01		

Keterangan: \*Nilai dinyatakan sebagai rata-rata IC<sub>50</sub> ± SD (n=3) pengujian tiga replikasi, menunjukkan perbedaan bermakna terhadap IC<sub>50</sub> P < 0,05.

Beberapa tahapan yang perlu dilakukan pada saat melakukan uji statistik parametrik yang dapat mempengaruhi pada saat pengambilan keputusan seperti menentukan hipotesis, menentukan homogenitas, melakukan uji Independent sample t-test dan menarik kesimpulan (Rumana *et al.*, 2022). Pada penelitian ini, hipotesis yang digunakan adalah (H<sub>0</sub>) diasumsikan terdapat perbedaan signifikan antara persen inhibisi dan IC<sub>50</sub> ekstrak ubi jalar dan asam kojat. Untuk alternatif digunakan (H<sub>1</sub>) yang diasumsikan tidak terdapat perbedaan signifikan antara persen inhibisi dan IC<sub>50</sub> ekstrak ubi jalar dan asam kojat. Analisis statistik parametrik terhadap data IC<sub>50</sub> ekstrak ubi jalar dan asam kojat (kontrol) menggunakan metode Independent sample t-test dikarenakan pada penelitian ini hanya terdapat dua variabel data dari dua sampel yang tidak berpasangan (Magdalena & Krisanti, 2019).

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna nilai IC<sub>50</sub> antara ekstrak ubi jalar dan asam kojat dimana kedua sampel ini dinyatakan tidak berpasangan. Pengujian statistik parametrik ini dapat dilakukan apabila data yang diperoleh normal dan homogen. Sebelumnya telah dilakukan pengujian normalitas terhadap data persen inhibisi dan IC<sub>50</sub> ekstrak ubi jalar dan

asam kojat yang menunjukkan data terdistribusi dengan normal dengan nilai signifikansi masing-masing  $> 0,05$ . Pengambilan keputusan terhadap analisis pengujian ini berdasarkan signifikansi dua arah dengan nilai *sig (2-tailed)*. Apabila nilai *sig (2-tailed)*  $< 0,05$ , maka terdapat perbedaan bermakna antara kedua sampel. Jika nilai *sig (2-tailed)*  $> 0,05$ , maka tidak terdapat perbedaan yang bermakna kedua sampel (Rumana *et al.*, 2022).

Pada pengujian tersebut diperoleh nilai Sig. Levene's  $0,884 > 0,05$  yang menyatakan bahwa nilai persen inhibisi antara ekstrak ubi jalar dan asam kojat adalah homogen, sehingga pengambilan keputusan terhadap nilai rata-rata persen inhibisi antara ekstrak ubi jalar dan asam kojat berdasarkan pada nilai *sig (2-tailed)* yaitu sebesar  $0,240 > 0,05$ . Berdasarkan nilai tersebut, dapat ditarik kesimpulan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan  $P > 0,05$  terhadap nilai persen inhibisi antara ekstrak ubi jalar dan asam kojat. Analisis statistik yang dilakukan terhadap nilai  $IC_{50}$  antara ekstrak ubi jalar diperoleh *Levene's test*  $0,054 > 0,05$  yang diasumsikan bahwa nilai keduanya homogen. Pengambilan keputusan analisis parametrik terhadap nilai  $IC_{50}$  antara ekstrak ubi jalar dan asam kojat sama seperti yang dilakukan pada nilai persen inhibisi yang berdasarkan nilai *sig (2-tailed)* yaitu sebesar  $0,000 < 0,05$  sehingga keputusan yang diambil terhadap rata-rata nilai  $IC_{50}$  adalah terdapat perbedaan bermakna diantara keduanya atau  $P < 0,05$ .

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. Kesimpulan

1. Berdasarkan hasil pengujian senyawa aktif ubi jalar terhadap enzim tirosinase yang dilakukan secara *in silico* diperoleh energi ikatan ( $\Delta G$ ) beta-karoten -6,05 kcal/mol, asam klorogenat -6,05 kcal/mol, kuersetin -5,87 kcal/mol, katekin -5,77 kcal/mol dan antosianin -5,70 kcal/mol dengan konstanta inhibisi ( $K_i$ ) masing-masing 36,72  $\mu\text{M}$ , 36,90  $\mu\text{M}$ , 45,30  $\mu\text{M}$ , 59,38  $\mu\text{M}$  dan 66,55  $\mu\text{M}$ . Analisis parameter ADMET yang diperoleh dari kelima senyawa aktif ubi jalar menunjukkan sifat farmakokinetik seperti lipofilitas (Log P), polaritas (Log S), fleksibilitas, permeabilitas kulit, sensitivitas kulit dan bioavailabilitas yang cukup baik. Sehingga dapat disimpulkan, senyawa aktif ubi jalar memiliki aktivitas yang cukup baik dalam menghambat enzim tirosinase dengan adanya interaksi ikatan pada situs aktif enzim tirosinase.
2. Berdasarkan hasil pengujian secara *in vitro* diperoleh nilai  $IC_{50}$  ekstrak ubi jalar terhadap enzim tirosinase adalah  $63,32 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$  yang menunjukkan aktivitas penghambatan ekstrak ubi jalar terhadap enzim tirosinase cukup baik. Sehingga dapat disimpulkan, ekstrak ubi jalar sebagai kandidat pengganti inhibitor sintetik mengingat potensi penghambatan senyawa aktif yang dimilikinya cukup baik terhadap enzim tirosinase.

## **B. Saran**

Pengujian yang dilakukan terhadap ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) baik secara *in silico* maupun *in vitro* menunjukkan hasil penghambatan yang cukup baik terkait aktivitasnya sebagai inhibitor enzim tirosinase dikarenakan kandungan senyawa aktif yang dimilikinya. Dengan demikian perlu dilakukan uji kuantitatif terhadap kadar kandungan senyawa aktif ekstrak ubi jalar untuk memaksimalkan aktivitasnya, mengingat adanya senyawa seperti beta-karoten, asam klorogenat, kuersetin, katekin dan antosianin yang diketahui memiliki peranan penting baik sebagai antioksidan maupun sebagai inhibitor enzim tirosinase.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z., Khaeriah, U., Pratama, M., & Baits, M. (2019). Tyrosinase Inhibitor Activity Measurement of Crude and Purified Extract of Moringa Leaves (*Moringa oleifera* L.). *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology Journal Homepage*, 1(1), 52–58.
- Agustina, W., Susanti, E., Yunita, N., & Yamtinah, S. (2018). Modul Chem Office (Chem Draw & Chem 3D). Modul Chemoffice, 1–22.
- Allouche, A. (2012). Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *Journal of Computational Chemistry*, 32, 174–182.
- Aprilliani, A. (2018). Uji inhibisi aktivitas enzim tirosinase beberapa jenis tumbuhan anggota suku Zingiberaceae. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 14 (1), 46–57.
- Asadzadeh, A., Fassihi, A., Yaghmaei, P., & Pourfarzam, M. (2015). In silico approach for designing potent inhibitors against tyrosinase. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12 (9), 181–187.
- Bae, J. Y., Lim, S. S., Kim, S. J., Choi, J. S., Park, J., Ju, S. M., Han, S. J., Kang, I. J., & Kang, Y. H. (2009). Bog blueberry anthocyanins alleviate photoaging in ultraviolet-B irradiation-induced human dermal fibroblasts. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(6), 726–738.
- Bauer, A., Parsonage, M., Knapp, M., Lemmi, V., & Adelaja, B. (2014). Costs of perinatal mental health problems Centre for Mental Health. November.
- Broto, S. (2011). Docking analog kurkumin turunan peperazindion dengan tubulin (1TUB) rantai beta menggunakan autodock vina dan autodock1. 12(1), 14–18.
- Cheng, J. X., Li, Y. Q., Cai, J., Zhang, C. F., Akihisa, T., Li, W., Kikuchi, T., Liu, W. Y., Feng, F., & Zhang, J. (2021). Phenolic compounds from *Ficus hispida* L.f. as tyrosinase and melanin inhibitors: Biological evaluation, molecular docking, and molecular dynamics. *Journal of Molecular Structure*, 1244.
- Clifford, I. O., Kingsley, E., Chika, C. O., & Chinyere, I. I. (2014). Effects of Osmotic Dewatering and Oven Drying on  $\beta$ -Carotene Content of Sliced Light Yellow-Fleshed Sweet Potato (*Ipomea batatas* L). *Nigerian Food Journal*, 32(2), 25–32.
- Correia, P., Oliveira, H., Araújo, P., Brás, N. F., Pereira, A. R., Moreira, J., de Freitas, V., Mateus, N., Oliveira, J., & Fernandes, I. (2021). The role of anthocyanins, deoxyanthocyanins and pyranoanthocyanins on the modulation of tyrosinase activity: An in vitro and in silico approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12).

- De Freitas, M. M., Fontes, P. R., Souza, P. M., Fagg, C. W., Guerra, E. N. S., De Medeiros Nóbrega, Y. K., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y., Simeoni, L. A., Homem-de-Mello, M., & Magalhães, P. O. (2016). Extracts of *Morus nigra* L Leaves Standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: Tyrosinase inhibition and cytotoxicity. *11*(9), 1–24.
- Dhanik, A., McMurray, J. S., & Kavraki, L. E. (2013). DINC : A new AutoDock-based protocol for docking large ligands. *13*(1), 1–14.
- Di, L., & Kerns, E. H. (2016). Solution Stability Methods. *Drug-Like Properties*, 31, 393–400.
- Drapal, M., & Fraser, P. D. (2019). Determination of carotenoids in sweet potato (*Ipomoea batatas* L., Lam) tubers: Implications for accurate provitamin A determination in staple sturdy tuber crops. *Phytochemistry*, 167 (3), 112102.
- Eger, E., Schwabe, M., Schulig, L., Hübner, N.-O., Bohnert, J. A., Bornscheuer, U. T., Heiden, S. E., Müller, J. U., Adnan, F., Becker, K., Correa-Martinez, C. L., Guenther, S., Idelevich, E. A., Baecker, D., & Schaufler, K. (2022). Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Counteracts Fitness and Virulence Costs That Accompanied Ceftazidime-Avibactam Resistance Acquisition. *Microbiology Spectrum*, 10(3).
- Eluagu Ester and Onimawo. (2015). Effect of Blanching on the Mineral Composition and Antinutritional Factors. *2*, 124–128.
- Fan, M., Zhang, G., Hu, X., Xu, X., & Gong, D. (2017). Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. *Food Research International*, 100(7), 226–233.
- Gaba, M., Shaheed, A., Ajit, B., Jujhar, S., & Memorial, S. (2015). An overview on Molecular Docking *International Journal of Drug Development & Research* ISSN 0975-9344. Review Paper. February 2010.
- Gemenet, D. C., da Silva Pereira, G., De Boeck, B., Wood, J. C., Mollinari, M., Olukolu, B. A., Diaz, F., Mosquera, V., Ssali, R. T., David, M., Kitavi, M. N., Burgos, G., Felde, T. Zum, Ghislain, M., Carey, E., Swanckaert, J., Coin, L. J. M., Fei, Z., Hamilton, J. P., Buell, C. R. (2020). Quantitative trait loci and differential gene expression analyses reveal the genetic basis for negatively associated  $\beta$ -carotene and starch content in hexaploid sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Theoretical and Applied Genetics*, 133(1), 23–36.
- Giantari, N. K. M., Prayoga, I. W. I., & Laksmiani, N. P. L. (2019). Aktivitas Agen Pencerah Kulit Dari Katekin Secara in Silico. *Jurnal Kimia*, 196.
- Girija, C. R., Karunakar, P., Poojari, C. S., Begum, N. S., & Syed, A. A. (2010). Molecular docking studies of curcumin derivatives with multiple protein targets for procarcinogen activating enzyme inhibition. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*, 3(6), 200–203.

- Goodsell, D. S., Sanner, M. F., Olson, A. J., & Forli, S. (2021). The AutoDock suite at 30. *Protein Science*, 30(1), 31–43.
- Govindarasu, M., Ganeshan, S., Ansari, M. A., Alomary, M. N., AlYahya, S., Alghamdi, S., Almehmadi, M., Rajakumar, G., Thiruvengadam, M., & Vaiyapuri, M. (2021). In silico modeling and molecular docking insights of kaempferitrin for colon cancer-related molecular targets. *Journal of Saudi Chemical Society*, 25(9), 101319.
- Ha-na, Park, D., Park, J., Song, S., Lee, S., & Yoon, G. (2019). molecules Tyrosinase Inhibition Antioxidant Effect and Cytotoxicity Studies of the Extracts of *Cudrania tricuspidata* Fruit Standardized. *Molecules*, MDPI.
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi dan Cara Penggunaannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117.
- Hasrawati. (2019). Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase Ekstrak N-Heksan Umbi Wortel (*Daucus carrota* L.). *UIN Alauddin Makassar*, 6(1), 5–10.
- Hu, Y. H., Zhuang, J. X., Yu, F., Cui, Y., Yu, W. W., Yan, C. L., & Chen, Q. X. (2016). Inhibitory effects of cefotaxime on the activity of mushroom tyrosinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(4), 385–389.
- Huang, S., Ren, Y., Peng, X., Qian, P., & Meng, L. (2019). Computer-aid drug design, synthesis, and anticoagulant activity evaluation of novel dabigatran derivatives as thrombin inhibitors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 137(6), 104965.
- Isemura, M. (2019). Catechin in human health and disease. *Molecules*, 24(3).
- Islam, M. S., Jalaluddin, M., Garner, J. O., Yoshimoto, M., & Yamakawa, O. (2005). Artificial shading and temperature influence on anthocyanin compositions in sweetpotato leaves. *HortScience*, 40(1), 176–180.
- Islam, S. (2016). Some Bioactive Constituents, Antioxidant, and Antimutagenic Activities in the Leaves of *Ipomoea batatas* Lam. Genotypes. *American Journal of Food Science and Technology*, Vol. 4, 2016, Pages 70-80, 4(3), 70–80.
- Ismaya, W. T., Rozeboom, J., Weijn, A., Mes, J. J., & Fusetti, F. (2011). Crystal Structure of *Agaricus bisporus* Tyrosinase. *Biochemistry*, 50, 5477–5486.
- Jakimiuk, K., Sari, S., Milewski, R., Supuran, C. T., Şöhretoğlu, D., & Tomczyk, M. (2022). Flavonoids as tyrosinase inhibitors in in silico and in vitro models: basic framework of SAR using a statistical modelling approach. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 421–430.
- Jiang, Y., AkhavanAghdam, Z., Tsimring, L. S., & Hao, N. (2017). Coupled feedback loops control the stimulus-dependent dynamics of the yeast transcription factor Msn2. *Journal of Biological Chemistry*, 292(30), 12366–12372.

- Jourdan, J. (2020). Drug repositioning : a brief overview. 1–7.
- Junaidi, J. (2010). Statistik Uji Kruskal-Wallis. Fakultas Ekonomi Universitas Jambi, June, 1–5.
- Kasperczyk, S., Dobrakowski, M., Kasperczyk, J., Ostałowska, A., Zalejska-Fiolka, J., & Birkner, E. (2014). Beta-carotene reduces oxidative stress, improves glutathione metabolism and modifies antioxidant defense systems in lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(1), 36–41.
- Khan, B. A., Akhtar, N., Hussain, I., Abbas, K. A., & Rasul, A. (2013). Whitening efficacy of plant extracts including *Hippophae rhamnoides* and *Cassia fistula* extracts on the skin of Asian patients with melasma. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 30(4), 226–232.
- Kho, K., Sim, Y. Y., & Nyam, K. L. (2019). Antioxidant activities of tea prepared from kenaf (*Hibiscus cannabinus* L. KR9) leaves at different maturity stages. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3), 2009–2016.
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(11), 935–949.
- Kontoyianni, M., McClellan, L. M., & Sokol, G. S. (2004). Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(3), 558–565.
- Kurniawan, A. (2022). Uji Kandungan Flavonoid Pada Ekstrak Kulit Dan Daging Kentang Secara Kualitatif Dan Kuantitatif. *Benzena Pharmaceutical Scientific Journal*, 1(01), 29–38.
- Kusbandari, A., & Susanti, H. (2017). Beta Carotene Content And Free Radical Scavenging Activity Of Cantaloupe (*Cucumis Melo* Var. *Cantalupensis* L.) Extract Against Dpph (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Using Uv-Visible. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Community*, 14(1), 37–42.
- Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., & Dijkstra, B. W. (2017). Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 Reveals a Binuclear Zinc Active Site Important for Melanogenesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 56(33), 9812–9815.
- Lee, H. (2019). Effects of hydrophobic and hydrogen-bond interactions on the binding affinity of antifreeze proteins to specific ice planes. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 87, 48–55.
- Lee, K. E., Bharadwaj, S., Sahoo, A. K., Yadava, U., & Kang, S. G. (2021). Determination of tyrosinase-cyanidin-3-O-glucoside and (-/+)-catechin binding modes reveal mechanistic differences in tyrosinase inhibition. *Scientific Reports*, 11(1), 1–25.

- Li, F., Jin, H., Xiao, J., Yin, X., Liu, X., Li, D., & Huang, Q. (2018). The simultaneous loading of catechin and quercetin on chitosan-based nanoparticles as effective antioxidant and antibacterial agent. In *Food Research International* (Vol. 111). Elsevier Ltd.
- Liu, J., Chen, Y., Zhang, X., Zheng, J., Hu, W., & Teng, B. (2022). Hop Tannins as Multifunctional Tyrosinase Inhibitor: Structure Characterization, Inhibition Activity, and Mechanism. *Antioxidants*, 11(4), 1–15.
- Liu, W. yu, Zou, C. ming, Hu, J. hua, Xu, Z. jun, Si, L. qin, Liu, J. jun, & Huang, J. geng. (2020). Kinetic Characterization of Tyrosinase-catalyzed Oxidation of Four Polyphenols. *Current Medical Science*, 40(2), 239–248.
- Liu, X., Jia, Y. long, Chen, J. wei, Liang, G., Guo, H. yun, Hu, Y. hua, Shi, Y., Zhou, H. T., & Chen, Q. X. (2015). Inhibition effects of benzylideneacetone, benzylacetone, and 4-phenyl-2-butanol on the activity of mushroom tyrosinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(3), 275–279.
- López, R. (2014). Capillary surfaces with free boundary in a wedge. *Advances in Mathematics*, 262, 476–483.
- Low, J. W., Mwanga, R. O. M., Andrade, M., Carey, E., & Ball, A. M. (2017). Tackling vitamin A deficiency with biofortified sweetpotato in sub-Saharan Africa. *Global Food Security*, 14(1), 23–30.
- M.T.H. Khan. (2012). Novel Tyrosinase Inhibitors From Natural Resources - Their Computational Studies. *Current Medicinal Chemistry*, 19(14), 2262–2272.
- Magdalena, R., & Krisanti, M. A. (2019). Analisis Penyebab dan Solusi Rekonsiliasi Finished Goods Menggunakan Hipotesis Statistik dengan Metode. *Jurnal TEKNO (Civil Engineering, Elektrical Engineering and Industrial Engineering)* Vol. 16, No : 1 (4) 2019 , p-ISSN:1907-5243, e-ISSN: 2655-8416 Analisis, 16(4), 35–48.
- Mahardika, H. (2012). Uji penghambatan tiroxinase secara in vitro krim yang mengandung asam azelat. *Skripsi Prodi Farmasi F.MIPA UI Jakarta*, 1–143.
- Malau, N. D., & Sianturi, M. (2019). Analisa interaksi hidrofobik terhadap kestabilan termal enzim xilanase *Aspergillus niger*. *Jurnal EduMatSains*, 3(2), 215–227.
- Mansour, R., Toldo, J. M., & Barbatti, M. (2022). Role of the Hydrogen Bond on the Internal Conversion of Photoexcited Adenosine. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 13(26), 6194–6199.
- Marliana, E., Tjahjandarie, T. S., & Tanjung, M. (2016). Aktivitas antioksidan senyawa flavonoid dari *Macaranga pearsonii* Merr. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 13(2), 4–7.
- Mauliana, L., Jamil, A. S., & Siti, S. (2022). *Curcuma longa* as a Natural Immunomodulator for Preventing infection from COVID 19 With an In silico

- Approach. *Jurnal Biologi Tropis*, 22(2), 345–352.
- Meiliana, C. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan dan Penghambatan Tirosinase serta Uji Manfaat Gel Ekstrak Kulit Batang Taya (*Nauclea subdita*) terhadap Kulit. 6(2), 98–107.
- Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., Cui, M. (2011). Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design. Curr. Comput. Aid. Dru. Des.*, 7(2), 146–157.
- Meng Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M., X. Y. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer Aided Drug Design*, 7(2), 146–157.
- Miao, M., & Xiang, L. (2020). Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. In *Advances in Pharmacology* (1). 87. Elsevier Inc.
- Mohanraj, R., & Sivasankar, S. (2014). Sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) - A valuable medicinal food: A review. *Journal of Medicinal Food*, 17(7), 733–741.
- Morris, G. M., & Lim-wilby, M. (2017). *Molecular Docking*. 443, 365–382.
- Mukherjee, P. K., Maity, N., Nema, N. K., & Sarkar, B. K. (2011). Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine*, 19(1), 64–73.
- Muthmainnah. (2017). Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Etanol Buah Delima (*Punica Granatum* L.) Dengan Metode Uji Warna. *BMC Public Health*, 5(1), 1–8.
- Neidle, S. (2012). Design Principles for Quadruplex-binding Small Molecules. *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*, 151–174.
- Nguyen, H. X., Nguyen, N. T., Nguyen, M. H. K., Le, T. H., Do, T. N., Hung, T. M., & Nguyen, M. T. T. (2016). Tyrosinase inhibitory activity of flavonoids from *Artocarpus heterophyllous*. *Chemistry Central Journal*, 10(1), 4–9.
- Nur, S., Aswad, M., Nursamsiar, N., Burhan, A., Sami, F. J., & Yulianti, R. (2020). Inhibitory Tyrosinase Activity Assay from Lyophilisate, Extract and Fractions of Kersen Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia Dan Pelayanan Kesehatan Tradisional*, 1(1), 105–111.
- Nusantoro, Y. R., & Fadlan, A. (2020). Analisis Sifat Mirip Obat, Prediksi ADMET, dan Penambatan Molekular Isatinil-2-Aminobenzoilhidrazon dan kompleks logam transisi Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) Terhadap BCL2-XL. *Akta Kimia Indonesia*, 5(2), 114.
- Ochiai, A., Tanaka, S., Imai, Y., Yoshida, H., Kanaoka, T., Tanaka, T., & Taniguchi, M. (2016). New tyrosinase inhibitory decapeptide: Molecular insights into the role of tyrosine residues. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(6), 607–613.

- Oki, T., Nagai, S., Yoshinaga, M., Nishiba, Y., & Suda, I. (2006). Contribution of  $\beta$ -carotene to radical scavenging capacity varies among orange-fleshed sweet potato cultivars. *Food Science and Technology Research*, 12(2), 156–160.
- Oloniyo, R. O., Omoba, O. S., & Awolu, O. O. (2021). Biochemical and antioxidant properties of cream and orange-fleshed sweet potato. *Heliyon*, 7(3).
- Oyama, T., Yoshimori, A., Takahashi, S., Yamamoto, T., Sato, A., Kamiya, T., Abe, H., Abe, T., & Tanuma, S. ichi. (2017). Structural insight into the active site of mushroom tyrosinase using phenylbenzoic acid derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(13), 2868–2872.
- Padda, M. S., & Picha, D. H. (2007). Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L) roots. *Journal of Food Science*, 72(7), 412–416.
- Patil Pratiksha, D. N. S. (2022). In silico pharmacokinetic analysis of Morinda citrifolia phytochemicals and their potential antagonistic effect on prostatic carcinoma proteins. E-Namtila Publishing, 3, 83–96.
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18).
- Prasetyo, H. (2020). Analisa Penetapan Kadar B-Karoten Pada Ubi Jalar Oranye (*Ipomoea batatas* L. Lam) Mentah, Rebus dan Goreng dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. 21(1), 1–9.
- Pratoko, D. K. (2012). Molecular Docking Senyawa Fitokimia Piper Longum (L.) Terhadap Reseptor Siklooksigenase-2 (Cox-2) Sebagai Antiinflamasi. *Chemistry Progress*, 5(1), 31–36.
- Puspitasari, A. D., & Proyogo, L. S. (2017). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, 1(2), 1–8.
- Ramadhani, M. A., Kumalahati, A., Jusman, A. H., & L, N. F. (2021). Perbandingan Aktivitas Penurunan Glukosa pada Ekstrak dan Nanoekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) dengan Metode In Vitro. *Generics: Journal of Research in Pharmacy*, 1(2), 28–36.
- Regency, P., Muhibbah, R., Mudzakir, A. K., Setyawan, H. A., Tangkap, D. P., Perikanan, J., & Diponegoro, U. (2019). *Journal of Fisheries Resources Utilization Management and Technology* 8, 26–33.
- River, W., Fertig, W. F., Massatti, R. T., Nelson, B. E., Hartman, R. L., & Herbarium, R. M. (2013). Annotated Checklist of the Vascular Flora. 7(6), 905–939.
- Rumana, N. A., Sitoayu, L., & Nuzrina, R. (2022). Pelatihan Peningkatan Kemampuan Analisis Statistik Kesehatan Menggunakan Aplikasi Spss Pada Mahasiswa Tingkat Akhir. *Community Development Journal: Jurnal*

Pengabdian Masyarakat, 3(1), 314–319.

- Rusmawijayanto, T., & Luliana, S. (2019). Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Senggani (*Melastoma malabathricum* L.) Metode Perkolasi Thin Layer Chromatography Profile Of Leaf Ethanol Extract Senggani (*Melastoma Malabathricumshot* L.) Percolation Method. *Jurnal Farmasi Kalbar, Universitas Tanjungpura*, 4(1).
- Saeed, M., Shoaib, A., Tasleem, M., Alabdallah, N. M., Alam, M. J., El Asmar, Z., Jamal, Q. M. S., Bardakci, F., Alqahtani, S. S., Ansari, I. A., & Badraoui, R. (2021). Assessment of antidiabetic activity of the shikonin by allosteric inhibition of protein-tyrosine phosphatase 1b (Ptp1b) using state of art: An in silico and in vitro tactics. *Molecules*, 26(13).
- Sagala, Z., & Telaumbanua, K. (2020). Formulasi, Uji stabilitas dan Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase Sediaan Krim dari Ekstrak Buah Harendong (*Melastoma affine* D. Don). *Indonesia Narutal Research Pharmaceutical Journal*, 5(2), 149–173.
- Santiago, M., & Strobel, S. (2013). Thin layer chromatography. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 533). Elsevier Inc.
- Sarfaraz, S., Muneer, I., & Liu, H. (2020). Combining fragment docking with graph theory to improve ligand docking for homology model structures. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 0123456789.
- Sari, R. K., Utami, R., Batubara, I., Carolina, A., Febriany, S., Hasil, D., Fakultas, H., & Bogor, I. P. (2015). Aktivitas Antioksidan dan Inhibitor Tirosinase Ekstrak Metanol Mangium (*Acacia mangium*) ( Antioxidant and Tyrosinase Inhibitor Activities of Methanol Extracts of *Acacia mangium*). 13(1).
- Sholikha, M., & Puspitasari, L. (2023). Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd) Blume ) secara In vitro. 16(1), 1–6.
- Singh, S. (2006). Preclinical Pharmacokinetics: An Approach Towards Safer and Efficacious Drugs. *Current Drug Metabolism*, 7(2), 165–182.
- Solis-Vasquez, L., Santos-Martins, D., Koch, A., & Forli, S. (2020). Evaluating the energy efficiency of opencl-accelerated autodock molecular docking. *Proceedings - 2020 28th Euromicro International Conference on Parallel, Distributed and Network-Based Processing, PDP 2020*, 162–166.
- Sri Irianty, R., & Yenti, S. R. (2014). Pengaruh Perbandingan Pelarut Etanol-Air Terhadap Kadar Tanin Pada Sokletasi Daun Gambir (*Uncaria Gambir* Roxb). *Sagu*, 13(1), 1–7.
- Sri Rizki, F., & Ferdinand, A. (2021). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Pandan Hutan Jenis Baru *Freycinetia Sessiliflora* Rizki. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 4(1), 1–6.



- Srisayam, M., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Tanthanuch, W., & Thumanu, K. (2014). Application of FTIR microspectroscopy for characterization of biomolecular changes in human melanoma cells treated by sesamol and kojic acid. *Journal of Dermatological Science*, 73(3), 241–250.
- Sugiyono. (2018). *Metode Penelitian kuantitatif, kualitatif dan R&D* (cetakan ke 3). Bandung: Alfabeta cv.
- Sun, Y., Pan, Z., Yang, C., Jia, Z., & Guo, X. (2019). Comparative assessment of phenolic profiles, cellular antioxidant and antiproliferative activities in ten varieties of sweet potato (*Ipomoea batatas* L) storage roots. *Molecules*, 24(24).
- Syahputra, G., Ambarsari L, & T, S. (2014). Simulasi docking kurkumin enol, bisdemetoksikurkumin dan analognya sebagai inhibitor enzim12-lipoksigenase. *Biofisika*, 10(1), 55–67.
- Syakri, S., Khaerani, & Hasrawati. (2020). Pengujian Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase Ekstrak N-Heksan dari Umbi Wortel (*Daucus carrota* L). *Jurnal Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Alaudin Makassar*, 8(2), 1–8.
- Syamsul, E. S., Nugroho, A. E., & Pramono, S. (2017). Aktivitas Antidiabetes Kombinasi Ekstrak Terpurifikasi Herba Sambiloto (*Andrographis Paniculata* (Burn.F.) Ness.) dan Metformin Pada Tikus Dm Tipe 2 Resisten Insulin. *Majalah Obat Tradisional*, 16(3), 124–132.
- Taghizadeh, S. F., Davarynejad, G., Asili, J., Riahi-Zanjani, B., Nemati, S. H., & Karimi, G. (2018). Chemical composition, antibacterial, antioxidant and cytotoxic evaluation of the essential oil from pistachio (*Pistacia khinjuk*) hull. *Microbial Pathogenesis*, 124(6), 76–81.
- Tang, H., Cui, F., Li, H., Huang, Q., & Li, Y. (2018). Understanding the inhibitory mechanism of tea polyphenols against tyrosinase using fluorescence spectroscopy, cyclic voltammetry, oximetry, and molecular simulations. *RSC Advances*, 8(15), 8310–8318.
- Truong, V. D., McFeeters, R. F., Thompson, R. T., Dean, L. L., & Shofran, B. (2007). Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweetpotato (*Ipomea batatas* L.) cultivars in the United States. *Journal of Food Science*, 72(6), 343–349.
- Woolery-Lloyd, H., & Kammer, J. N. (2011). Treatment of Hyperpigmentation. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 30(3), 171–175.
- Yang, S. Y., Kim, J. H., Su, X., & Kim, J. A. (2022). The Luteolinidin and Petunidin 3-O-Glucoside: A Competitive Inhibitor of Tyrosinase. *Molecules*, 27(17), 1–7.
- Yuan, S., Chan, H. C. S., & Hu, Z. (2017). Using PyMOL as a platform for computational drug design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 7(2).

- Yuan, Y., Win Aung, K. K., Ran, X. K., Wang, X. T., Dou, D. Q., & Dong, F. (2017). A new sesquiterpene lactone from yacon leaves. *Natural Product Research*, 31(1), 43–49.
- Zengin, G., Locatelli, M., Stefanucci, A., Macedonio, G., Novellino, E., Mirzaie, S., Dvoráckó, S., Carradori, S., Brunetti, L., Orlando, G., Menghini, L., Ferrante, C., Recinella, L., Chiavaroli, A., Leporini, L., & Mollica, A. (2017). Chemical characterization, antioxidant properties, anti-inflammatory activity, and enzyme inhibition of *Ipomoea batatas* L. leaf extracts. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 1907–1919.
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 279–309.

## RINGKASAN

Ekstrak tumbuhan berpotensi menunda proses penuaan dan pigmentasi kulit dengan melawan ROS dan melindungi kulit dari sinar Uv. Tumbuhan ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) merupakan salah satu tumbuhan sumber karoten yang dianggap sebagai komponen pro-vitamin A terpenting dalam makanan yang kaya akan karotenoid. Ubi jalar diketahui memiliki kandungan senyawa aktif seperti beta-karoten, asam klorogenat, kuersetin, katekin dan antosianin. Tirosinase juga merupakan enzim pembatas kecepatan dalam jalur melanogenesis adalah salah satu dari tiga jenis enzim spesifik pigmen dalam melanosom, dan ada secara luas pada mamalia, tumbuhan, bakteri dan jamur.

Enzim tirosinase mengkatalisis hidroksilasi monofenol menjadi o-difenol (aktivitas monofenolase) dan kemudian menjadi o-kuinon (aktivitas difenolase), dan akhirnya menjadi melanin. Akumulasi melanin yang berlebihan dapat menyebabkan beberapa gangguan pigmentasi, seperti bintik-bintik penuaan, bintik-bintik melasma dan melanoma menghambat over ekspresi tirosinase dapat menurunkan generasi melanin. Selain itu, enzim tirosinase terlibat dalam biosintesis melanin dan mengkatalisis dua reaksi berbeda yaitu aktivitas monofenolase dan difenolase dalam sintesis melanin.

Dalam pengembangan kosmetika senyawa-senyawa kimia tersebut memiliki banyak khasiat, salah satunya adalah sebagai pencerah kulit berdasarkan inhibisinya terhadap enzim tirosinase sebagai target aktivitasnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak ubi jalar memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim tirosinase secara *in silico* dan *in vitro*.

Penelitian dilakukan dalam dua tahap. Tahap satu adalah studi komputasi docking molekuler yang meliputi : (1) Preparasi protein (reseptor) dan ligan dengan Biovia DS (2) Optimasi geometri dengan Avogadro dan Chem 3D (3) Validasi metode *docking* dan *docking* molekuler terhadap protein (2Y9X) dengan Autodock-4 (5) Studi ADMET dengan website pkCSM dan SwissADME (6) Evaluasi aturan lipinski rule. Tahap kedua adalah studi *in vitro* dengan uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase dengan tahapan: (1) Pembuatan

ekstrak etanol 60% (2) Pengujian parameter spesifik ekstrak (3) Pengujian aktivitas hambatan pada enzim tirosinase dengan kontrol obat asam kojat. Data yang diperoleh dari studi *in silico* adalah afinitas binding energi ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi ( $K_i$ ) lima zat aktif terhadap reseptor (2Y9X) dan parameter ADMET yang dibandingkan dengan asam kojat. Sedangkan data uji *in vitro* diperoleh persentase nilai inhibisi tirosinase berupa nilai  $IC_{50}$ .

Berdasarkan pendekatan yang dilakukan secara *in silico* melalui metode *docking* molekuler diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa kelima senyawa aktif ubi jalar memiliki afinitas ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi ( $K_i$ ) yang cukup baik terhadap enzim tirosinase seperti beta-karoten  $\Delta G = -6,05$  kcal/mol,  $K_i = 36,72$   $\mu M$ , asam klorogenat  $\Delta G = -6,05$  kcal/mol,  $K_i = 36,90$   $\mu M$ , kuersetin  $\Delta G = -5,87$  kcal/mol,  $K_i = 45,30$   $\mu M$ , katekin  $\Delta G = -5,77$  kcal/mol,  $K_i = 59,38$   $\mu M$  dan antosianin  $\Delta G = -5,70$  kcal/mol,  $K_i = 66,55$   $\mu M$ . Analisis parameter ADMET yang diperoleh dari kelima senyawa aktif ubi jalar menunjukkan sifat farmakokinetik seperti lipofilitas (Log P), polaritas (Log S), fleksibilitas, permeabilitas kulit, sensitivitas kulit dan bioavailabilitas yang cukup baik. Berdasarkan pendekatan yang dilakukan secara *in vitro* terhadap ekstrak ubi jalar dan asam kojat dengan  $IC_{50}$  masing-masing  $63,32 \pm 0,15$  dan  $6,06 \pm 0,02$   $\mu g/ml$ .

Berdasarkan pendekatan yang dilakukan secara *in vitro* terhadap ekstrak kental ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) dengan konsentrasi yang digunakan pada saat pengujian adalah (50, 60, 75, 85, 100) ppm dan asam kojat sebagai kontrol positif dengan konsentrasi (6, 7, 8, 9, 10) ppm, diperoleh hasil berupa nilai  $IC_{50}$  untuk ekstrak ubi jalar adalah  $63,32 \pm 0,15$   $\mu g/mL$ . Berdasarkan nilai penghambatan tersebut, ekstrak ubi jalar termasuk dalam kategori kuat. Sedangkan pengujian penghambatan terhadap enzim tirosinase yang dilakukan pada asam kojat, diperoleh nilai  $IC_{50}$  dengan nilai  $6,06 \pm 0,02$   $\mu g/ml$  dan tergolong dalam kategori sangat kuat. Terlihat perbedaan yang bermakna terhadap nilai  $IC_{50}$  atau aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase antara ekstrak ubi jalar dan asam kojat setelah dilakukan analisis dengan metode Independent sample t- test berdasarkan nilai sig.(2-tailed)  $0,00 < 0,05$ . Meskipun demikian, penggunaan ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam) masih dapat diterima

sebagai inhibitor alami pengganti inhibitor sintetik mengingat potensi penghambatan senyawa aktif yang dimilikinya cukup baik terhadap enzim tirosinase.

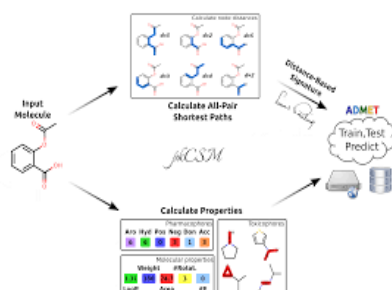
## LAMPIRAN PENELITIAN

**Lampiran 1.** Pengujian secara in silico berdasarkan docking molekuler

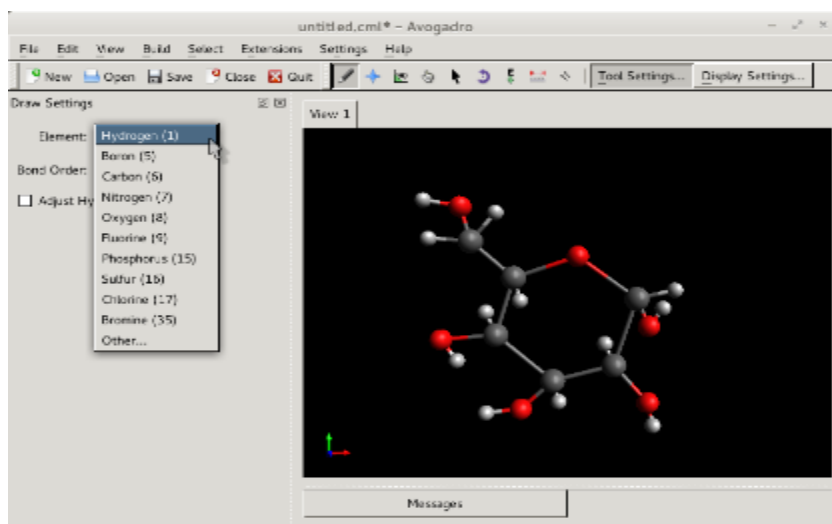
**Lampiran 2.** Software yang digunakan dalam metode docking molekuler



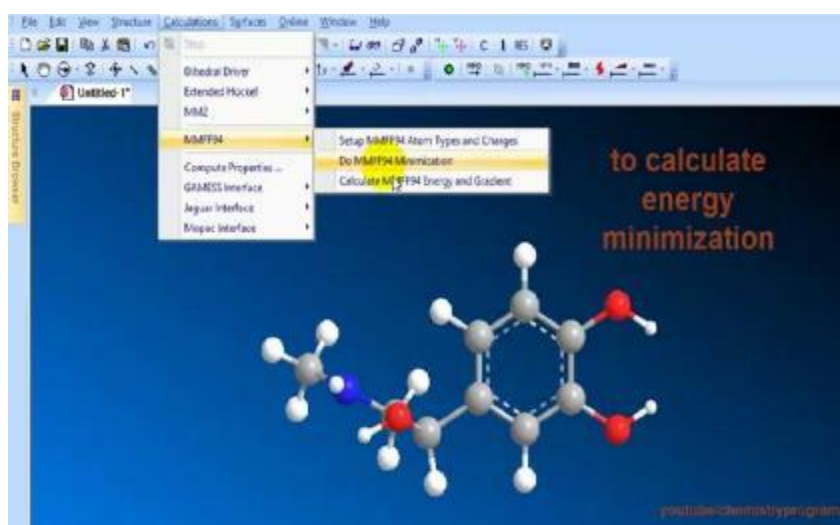
**Lampiran 3.** Website yang digunakan dalam metode docking molekuler



**Lampiran 4.** Optimasi geometri dan minimasi energi senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat



Optimasi geometri dan penambahan atom hidrogen pada senyawa menggunakan software avogadro



Minimasi energi pada senyawa menggunakan software Chem 3D

## Lampiran 5. Validasi metode docking molekuler

## Lampiran 6. Hasil Penentuan Koordinat Sumbu X, Y, Z dan pembuatan grid box

```

Current Working Directory = "E:\NATIVE LIGAN"

-----
                SETTING UP DEFAULT PARAMETER LIBRARY
-----

Random number generator was seeded with values 1600, 1639754962.
Docking parameter file (DPF) used for this docking:          dock.dpf
DPF> autodock_parameter_version 4.2          # used by autodock to validate parameter set

        Autodock parameter version 4.2.
DPF> outlev 1          # diagnostic output level

Output Level = 1 ADT-COMPATIBLE OUTPUT DURING DOCKING.
DPF> intelec          # calculate internal electrostatics

Electrostatic energies will be calculated for all non-bonds between moving atoms.
DPF> seed pid time          # seeds for random generator

Random number generator was seeded with values 1600, 1639754962.
DPF> ligand_types A OA          # atoms types in ligand

DPF> fld makromolekul.maps.fld          # grid_data_file

Opening Grid Map Dimensions file:          makromolekul.maps.fld
Grid Point Spacing =          0.375 Angstroms

Even Number of User-specified Grid Points = 40 x-points
                                          40 y-points
                                          40 z-points

Coordinates of Central Grid Point of Maps = (22.548, 2.483, -93.071)

```

## Lampiran 7. Hasil validasi metode docking molekuler

Number of multi-member conformational clusters found = 2, out of 10 runs.

RMSD TABLE

Rank	Sub-Rank	Run	Binding Energy	Cluster RMSD	Reference RMSD	Grep Pattern
1	1	1	-5.00	0.00	0.99	RANKING
1	2	9	-5.00	0.05	1.00	RANKING
1	3	3	-5.00	0.05	1.00	RANKING
1	4	7	-5.00	0.10	0.99	RANKING
1	5	8	-4.99	0.18	1.06	RANKING
1	6	4	-4.98	0.10	1.00	RANKING
1	7	10	-4.96	0.37	1.12	RANKING
2	1	5	-4.94	0.00	2.20	RANKING
2	2	6	-4.93	0.10	2.21	RANKING
2	3	2	-4.92	0.07	2.21	RANKING



## Lampiran 8. Hasil docking molekuler tropolone (native ligan), senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat (kontrol)

LOWEST ENERGY DOCKED CONFORMATION from EACH CLUSTER

---

Keeping original residue number (specified in the input PDBQ file) for outputting.

```

MODEL      1
USER      Run = 1
USER      Cluster Rank = 1
USER      Number of conformations in this cluster = 7
USER
USER      RMSD from reference structure      = 0.995 A
USER
USER      Estimated Free Energy of Binding   = -5.00 kcal/mol  [(1)+(2)+(3)-(4)]
USER      Estimated Inhibition Constant, Ki = 214.89 uM (micromolar) [Temperature = 298.15 K]
USER
USER      (1) Final Intermolecular Energy   = -5.00 kcal/mol
USER          vdW + Hbond + desolv Energy   = -4.93 kcal/mol
USER          Electrostatic Energy         = -0.07 kcal/mol
USER      (2) Final Total Internal Energy   = +0.00 kcal/mol
USER      (3) Torsional Free Energy        = +0.00 kcal/mol
USER      (4) Unbound System's Energy      [(2)] = +0.00 kcal/mol
USER

```

### Tropolone (Native ligan)

LOWEST ENERGY DOCKED CONFORMATION from EACH CLUSTER

---

Keeping original residue number (specified in the input PDBQ file) for outputting.

```

MODEL      49
USER      Run = 49
USER      Cluster Rank = 1
USER      Number of conformations in this cluster = 95
USER
USER      RMSD from reference structure      = 84.314 A
USER
USER      Estimated Free Energy of Binding   = -6.05 kcal/mol  [(1)+(2)+(3)-(4)]
USER      Estimated Inhibition Constant, Ki = 36.72 uM (micromolar) [Temperature = 298.15 K]
USER
USER      (1) Final Intermolecular Energy   = -11.72 kcal/mol
USER          vdW + Hbond + desolv Energy   = -11.71 kcal/mol
USER          Electrostatic Energy         = -0.01 kcal/mol
USER      (2) Final Total Internal Energy   = -3.36 kcal/mol
USER      (3) Torsional Free Energy        = +5.67 kcal/mol
USER      (4) Unbound System's Energy      [(2)] = -3.36 kcal/mol
USER

```

### Beta-karoten

LOWEST ENERGY DOCKED CONFORMATION from EACH CLUSTER

---

Keeping original residue number (specified in the input PDBQ file) for outputting.

```

MODEL      38
USER      Run = 38
USER      Cluster Rank = 1
USER      Number of conformations in this cluster = 58
USER
USER      RMSD from reference structure      = 93.426 A
USER
USER      Estimated Free Energy of Binding   = -5.87 kcal/mol  [(1)+(2)+(3)-(4)]
USER      Estimated Inhibition Constant, Ki = 45.30 uM (micromolar) [Temperature = 298.15 K]
USER
USER      (1) Final Intermolecular Energy   = -7.12 kcal/mol
USER          vdW + Hbond + desolv Energy   = -7.10 kcal/mol
USER          Electrostatic Energy         = -0.02 kcal/mol
USER      (2) Final Total Internal Energy   = -2.91 kcal/mol
USER      (3) Torsional Free Energy        = +1.79 kcal/mol
USER      (4) Unbound System's Energy      [(2)] = -2.91 kcal/mol
USER

```

### Kuersetin

---

 LOWEST ENERGY DOCKED CONFORMATION from EACH CLUSTER
 

---

Keeping original residue number (specified in the input PDBQ file) for outputting.

```

MODEL      14
USER      Run = 14
USER      Cluster Rank = 1
USER      Number of conformations in this cluster = 18
USER
USER      RMSD from reference structure      = 91.433 A
USER
USER      Estimated Free Energy of Binding   = -5.77 kcal/mol [(1)+(2)+(3)-(4)]
USER      Estimated Inhibition Constant, Ki = 59.38 uM (micromolar) [Temperature = 298.15 K]
USER
USER      (1) Final Intermolecular Energy   = -7.56 kcal/mol
USER      vdW + Hbond + desolv Energy       = -7.29 kcal/mol
USER      Electrostatic Energy              = -0.26 kcal/mol
USER      (2) Final Total Internal Energy   = -1.41 kcal/mol
USER      (3) Torsional Free Energy         = +1.79 kcal/mol]
USER      (4) Unbound System's Energy [(2)] = -1.41 kcal/mol
  
```

### Katekin

---

 LOWEST ENERGY DOCKED CONFORMATION from EACH CLUSTER
 

---

Keeping original residue number (specified in the input PDBQ file) for outputting.

```

MODEL      86
USER      Run = 86
USER      Cluster Rank = 1
USER      Number of conformations in this cluster = 25
USER
USER      RMSD from reference structure      = 90.224 A
USER
USER      Estimated Free Energy of Binding   = -5.70 kcal/mol [(1)+(2)+(3)-(4)]
USER      Estimated Inhibition Constant, Ki = 66.55 uM (micromolar) [Temperature = 298.15 K]
USER
USER      (1) Final Intermolecular Energy   = -7.49 kcal/mol
USER      vdW + Hbond + desolv Energy       = -7.31 kcal/mol
USER      Electrostatic Energy              = -0.17 kcal/mol
USER      (2) Final Total Internal Energy   = -1.67 kcal/mol
USER      (3) Torsional Free Energy         = +1.79 kcal/mol
USER      (4) Unbound System's Energy [(2)] = -1.67 kcal/mol
  
```

### Antosianin

---

 LOWEST ENERGY DOCKED CONFORMATION from EACH CLUSTER
 

---

Keeping original residue number (specified in the input PDBQ file) for outputting.

```

MODEL      50
USER      Run = 50
USER      Cluster Rank = 1
USER      Number of conformations in this cluster = 13
USER
USER      RMSD from reference structure      = 89.475 A
USER
USER      Estimated Free Energy of Binding   = -6.05 kcal/mol [(1)+(2)+(3)-(4)]
USER      Estimated Inhibition Constant, Ki = 36.90 uM (micromolar) [Temperature = 298.15 K]
USER
USER      (1) Final Intermolecular Energy   = -9.63 kcal/mol
USER      vdW + Hbond + desolv Energy       = -9.52 kcal/mol
USER      Electrostatic Energy              = -0.10 kcal/mol
USER      (2) Final Total Internal Energy   = -4.51 kcal/mol
USER      (3) Torsional Free Energy         = +3.58 kcal/mol
USER      (4) Unbound System's Energy [(2)] = -4.51 kcal/mol
  
```

### Asam klorogenat

LOWEST ENERGY DOCKED CONFORMATION from EACH CLUSTER

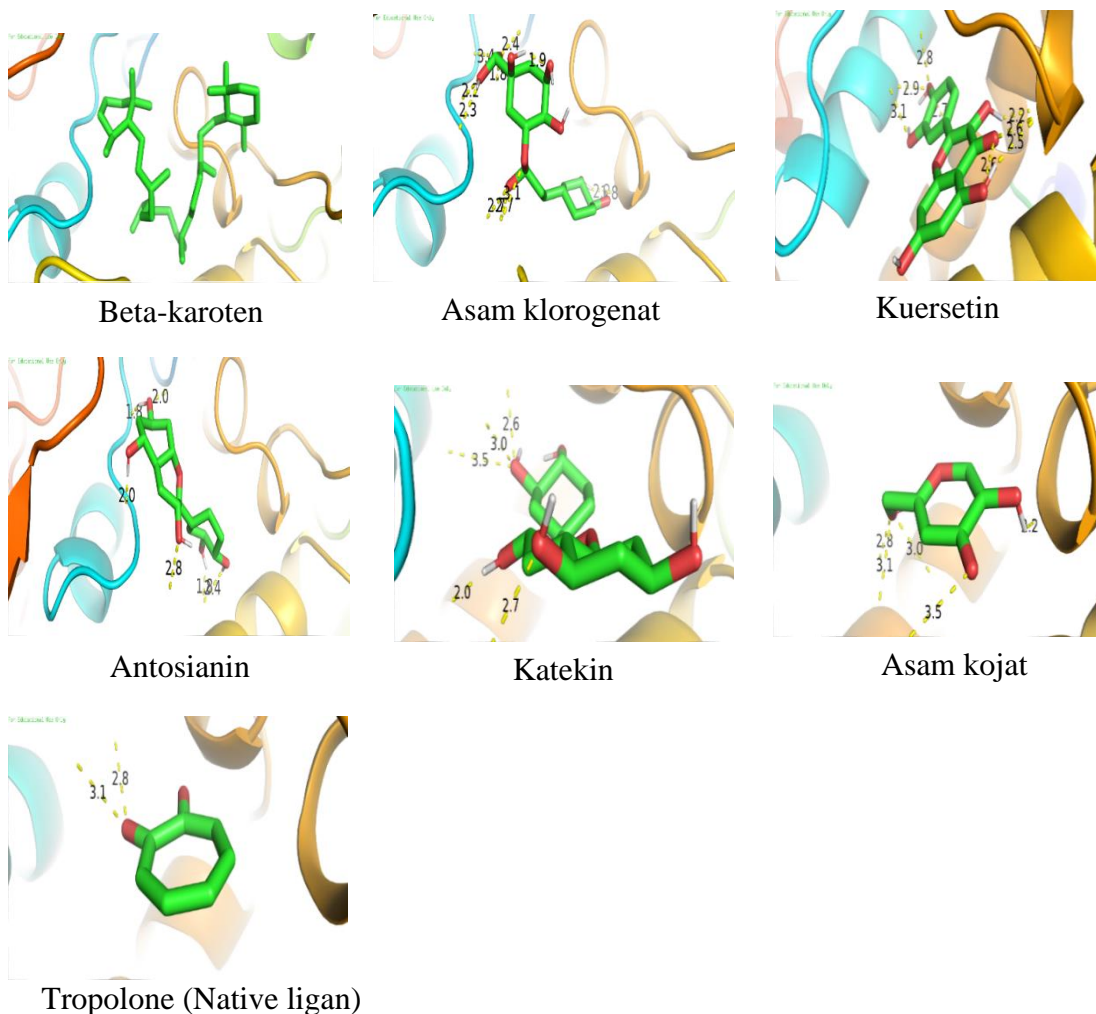
Keeping original residue number (specified in the input PDBQ file) for outputting.

```

MODEL          5
USER          Run = 5
USER          Cluster Rank = 1
USER          Number of conformations in this cluster = 8
USER
USER          RMSD from reference structure      = 95.930 A
USER
USER          Estimated Free Energy of Binding  = -5.27 kcal/mol [(1)+(2)+(3)-(4)]
USER          Estimated Inhibition Constant, Ki = 380.37 uM (micromolar) [Temperature = 298.15 K]
USER
USER          (1) Final Intermolecular Energy  = -5.56 kcal/mol
USER          vdW + Hbond + desolv Energy      = -5.41 kcal/mol
USER          Electrostatic Energy            = -0.15 kcal/mol
USER          (2) Final Total Internal Energy  = -0.88 kcal/mol
USER          (3) Torsional Free Energy        = +0.89 kcal/mol
USER          (4) Unbound System's Energy     [(2)] = -0.88 kcal/mol
  
```


### Asam Kojat

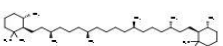
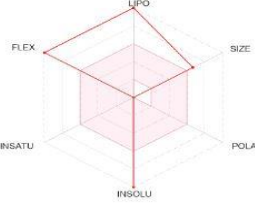
## Lampiran 9. Jarak interaksi ikatan hidrogen tropolone (native ligan) senyawa aktif ubi jalar dan asam kojat



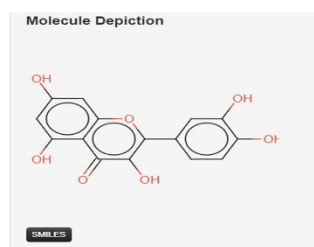
## Lampiran 10. Hasil prediksi ADMET dengan menggunakan website pKCSM dan swissADME

## Lampiran 11. Hasil prediksi ADMET beta-karoten

Molecule Depiction		Property	Model Name	Predicted Value	Unit
 SMILES		Absorption	Water solubility	-6.132	Numeric (log mol/L)
		Absorption	Caco2 permeability	1.229	Numeric (log Papp in 10 <sup>-6</sup> cm/s)
		Absorption	Intestinal absorption (human)	90.406	Numeric (% Absorbed)
		Absorption	Skin Permeability	-2.737	Numeric (log Kp)
		Absorption	P-glycoprotein substrate	No	Categorical (Yes/No)
		Absorption	P-glycoprotein I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
		Absorption	P-glycoprotein II inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
		Distribution	VDss (human)	-0.063	Numeric (log L/kg)
		Distribution	Fraction unbound (human)	0	Numeric (Fu)
		Distribution	BBB permeability	1.154	Numeric (log BB)
Distribution	CNS permeability	-0.642	Numeric (log PS)		
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	Categorical (Yes/No)		
Metabolism	CYP3A4 substrate	Yes	Categorical (Yes/No)		
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)		
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)		
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)		
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)		
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)		
Excretion	Total Clearance	0.8	Numeric (log ml/min/kg)		
Excretion	Renal OCT2 substrate	No	Categorical (Yes/No)		
Toxicity	AMES toxicity	No	Categorical (Yes/No)		
Toxicity	Max. tolerated dose (human)	-0.203	Numeric (log mg/kg/day)		
Toxicity	hERG I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)		
Toxicity	hERG II inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)		
Toxicity	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	2.108	Numeric (mol/kg)		
Toxicity	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	0.639	Numeric (log mg/kg_bw/day)		
Toxicity	Hepatotoxicity	No	Categorical (Yes/No)		
Toxicity	Skin Sensitisation	No	Categorical (Yes/No)		
Toxicity	T.Pyiformis toxicity	0.288	Numeric (log ug/L)		
Toxicity	Minnow toxicity	-5.74	Numeric (log min)		

Molecule 1		Water Solubility	
 SMILES: <chem>C[C@@H](CCC[C@H](CC[C@@H]1C@@H)(C)CCC1(C)C)C(C)CCC[C@H](CC[C@@H](CC[C@@H]1C@@H)(C)CCC1(C)C)C</chem>		Log S (ESOL)	-13.56
		Solubility	1.55e-11 mg/ml ; 2.78e-14 mol/l
		Class	Insoluble
		Log S (Ali)	-18.50
		Solubility	1.77e-16 mg/ml ; 3.17e-19 mol/l
		Class	Insoluble
		Log S (SILICOS-IT)	-11.75
		Solubility	9.87e-10 mg/ml ; 1.77e-12 mol/l
		Class	Insoluble
		Pharmacokinetics	
Pharmacokinetics		BBB permeant	No
Pharmacokinetics		P-gp substrate	Yes
Pharmacokinetics		CYP1A2 inhibitor	No
Pharmacokinetics		CYP2C19 inhibitor	No
Pharmacokinetics		CYP2C9 inhibitor	No
Pharmacokinetics		CYP2D6 inhibitor	No
Pharmacokinetics		CYP3A4 inhibitor	No
Pharmacokinetics		Log K <sub>p</sub> (skin permeation)	3.25 cm/s
Pharmacokinetics		Druglikeness	
Pharmacokinetics		Lipinski	No; 2 violations: MW>500, MLOGP>4.15
Pharmacokinetics		Ghose	No; 4 violations: MW>480, WLOGP>5.6, MR>130, #atoms>70
Pharmacokinetics		Veber	No; 1 violation: Rotors>10
Pharmacokinetics		Egan	No; 1 violation: WLOGP>5.88
Pharmacokinetics		Muegge	No; 3 violations: XLOGP3>5, Heteroatoms>2, Rotors>15
Pharmacokinetics		Bioavailability Score	0.17
Physicochemical Properties		Formula	C40H78
Physicochemical Properties		Molecular weight	559.05 g/mol
Physicochemical Properties		Num. heavy atoms	40
Physicochemical Properties		Num. arom. heavy atoms	0
Physicochemical Properties		Fraction Csp3	1.00
Physicochemical Properties		Num. rotatable bonds	19
Physicochemical Properties		Num. H-bond acceptors	0
Physicochemical Properties		Num. H-bond donors	0
Physicochemical Properties		Molar Refractivity	189.65
Physicochemical Properties		TPSA	0.00 Å <sup>2</sup>
Lipophilicity		Log P <sub>ow</sub> /w (ILOGP)	8.31
Lipophilicity		Log P <sub>ow</sub> /w (XLOGP3)	18.26
Lipophilicity		Log P <sub>ow</sub> /w (WLOGP)	13.92

## Lampiran 12. Hasil prediksi ADMET kuersetin

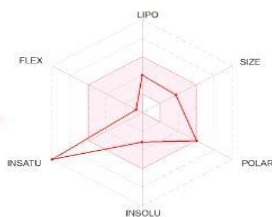


**Molecule properties:**

Descriptor	Value
Molecular Weight	302.238
LogP	1.968
#Rotatable Bonds	1
#Acceptors	7
#Donors	5

Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Absorption	Water solubility	-2.966	Numeric (log mol/L)
Absorption	Caco2 permeability	-0.7	Numeric (log Papp in 10 <sup>-6</sup> cm/s)
Absorption	Intestinal absorption (human)	73.204	Numeric (% Absorbed)
Absorption	Skin Permeability	-2.735	Numeric (log Kp)
Absorption	P-glycoprotein substrate	Yes	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Distribution	VDss (human)	0.811	Numeric (log L/kg)
Distribution	Fraction unbound (human)	0.149	Numeric (Fu)
Distribution	BBB permeability	-1.4	Numeric (log BB)
Distribution	CNS permeability	-3.29	Numeric (log PS)
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Excretion	Total Clearance	0.433	Numeric (log ml/min/kg)
Excretion	Renal OCT2 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	AMES toxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Max. tolerated dose (human)	0.541	Numeric (log mg/kg/day)
Toxicity	hERG I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	hERG II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	2.521	Numeric (mol/kg)
Toxicity	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	2.381	Numeric (log mg/kg_bw/day)
Toxicity	Hepatotoxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Skin Sensitisation	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	<i>T. Pyriformis</i> toxicity	0.303	Numeric (log ug/L)
Toxicity	Minnow toxicity	3.507	Numeric (log mM)

### Molecule 1

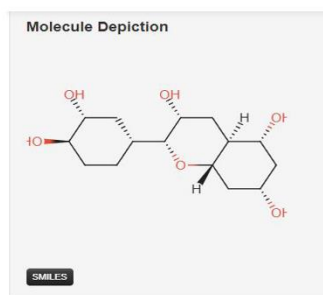


SMILES Oc1cc(O)c2c(c1)oc(c(=O)O)c1ccc(c(c1)O)O

Physicochemical Properties	
Formula	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
Molecular weight	302.24 g/mol
Num. heavy atoms	22
Num. arom. heavy atoms	16
Fraction Csp <sup>3</sup>	0.00
Num. rotatable bonds	1
Num. H-bond acceptors	7
Num. H-bond donors	5
Molar Refractivity	78.04
TPSA	131.36 Å <sup>2</sup>
Lipophilicity	
Log P <sub>ow</sub> (ILOGP)	1.63
Log P <sub>ow</sub> (XLOGP3)	1.54
Log P <sub>ow</sub> (WLOGP)	1.99

Water Solubility	
Log S (ESOL)	-3.16
Solubility	2.11e-01 mg/ml ; 6.98e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (Ali)	-3.91
Solubility	3.74e-02 mg/ml ; 1.24e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (SILICOS-IT)	-3.24
Solubility	1.73e-01 mg/ml ; 5.73e-04 mol/l
Class	Soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	Yes
CYP3A4 inhibitor	Yes
Log K <sub>p</sub> (skin permeation)	-7.05 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Weber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

## Lampiran 13. Hasil prediksi ADMET katekin

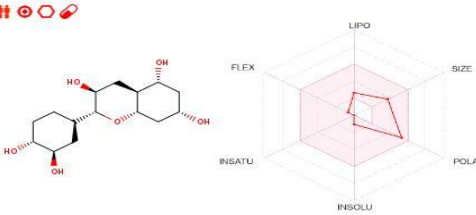


### Molecule properties:

Descriptor	Value
Molecular Weight	302.367
LogP	-0.8415
#Rotatable Bonds	1
#Acceptors	6
#Donors	5

Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Absorption	Water solubility	-2.931	Numeric (log mol/L)
Absorption	Caco2 permeability	0.179	Numeric (log Papp in 10 <sup>-6</sup> cm/s)
Absorption	Intestinal absorption (human)	55.966	Numeric (% Absorbed)
Absorption	Skin Permeability	-3.351	Numeric (log Kp)
Absorption	P-glycoprotein substrate	Yes	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Distribution	VDss (human)	-0.158	Numeric (log L/kg)
Distribution	Fraction unbound (human)	0.742	Numeric (Fu)
Distribution	BBB permeability	-0.785	Numeric (log BB)
Distribution	CNS permeability	-3.595	Numeric (log PS)
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Excretion	Total Clearance	1.223	Numeric (log ml/min/kg)
Excretion	Renal OCT2 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	AMES toxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Max. tolerated dose (human)	1.11	Numeric (log mg/kg/day)
Toxicity	HERG I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	HERG II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	1.988	Numeric (mol/kg)
Toxicity	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	2.351	Numeric (log mg/kg_bw/day)
Toxicity	Hepatotoxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Skin Sensitisation	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	T.Pyriformis toxicity	0.278	Numeric (log ug/L)
Toxicity	Minnow toxicity	4.679	Numeric (log mL)

**Molecule 1**



SMILES: O[C@@H]1C[C@@H]2O[C@H](C[C@@H]3CC[C@H](C[C@@H](C3)O)O)[C@H](C[C@@H]2[C@@H](C1)O)O

**Physicochemical Properties**

Formula	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>
Molecular weight	302.36 g/mol
Num. heavy atoms	21
Num. arom. heavy atoms	0
Fraction Csp <sup>3</sup>	1.00
Num. rotatable bonds	1
Num. H-bond acceptors	6
Num. H-bond donors	5
Molar Refractivity	74.77
TPSA	110.38 Å <sup>2</sup>

**Lipophilicity**

Log P <sub>o/w</sub> (LOGP)	1.61
Log P <sub>o/w</sub> (XLOGP3)	-0.90
Log P <sub>o/w</sub> (WLOGP)	-0.84

**Water Solubility**

Log S (ESOL)	-1.08
Solubility	2.51e+01 mg/ml ; 8.29e-02 mol/l
Class	Very soluble
Log S (Ali)	-0.94
Solubility	3.51e+01 mg/ml ; 1.16e-01 mol/l
Class	Very soluble
Log S (SILICOS-IT)	1.18
Solubility	4.53e+03 mg/ml ; 1.50e+01 mol/l
Class	Soluble

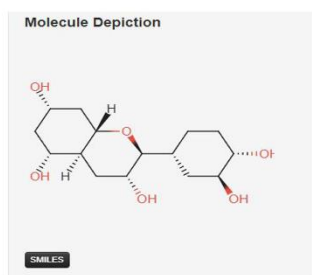
**Pharmacokinetics**

GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	Yes
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K <sub>p</sub> (skin permeation)	-8.78 cm/s

**Druglikeness**

Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	No; 1 violation: WLOGP<-0.4
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

## Lampiran 14. Hasil prediksi ADMET antosianin

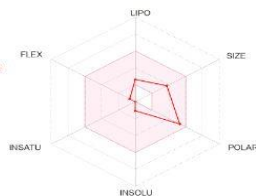
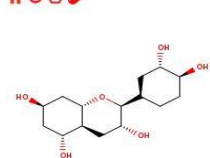


### Molecule properties:

Descriptor	Value
Molecular Weight	302.367
LogP	-0.8415
#Rotatable Bonds	1
#Acceptors	6
#Donors	5

Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Absorption	Water solubility	-3.487	Numeric (log mol/L)
Absorption	Caco2 permeability	0.124	Numeric (log Papp in 10 <sup>-6</sup> cm/s)
Absorption	Intestinal absorption (human)	52.861	Numeric (% Absorbed)
Absorption	Skin Permeability	-3.219	Numeric (log Kp)
Absorption	P-glycoprotein substrate	Yes	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Distribution	VDss (human)	-0.11	Numeric (log L/kg)
Distribution	Fraction unbound (human)	0.727	Numeric (Fu)
Distribution	BBB permeability	-0.831	Numeric (log BB)
Distribution	CNS permeability	-3.246	Numeric (log PS)
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Excretion	Total Clearance	1.219	Numeric (log ml/min/kg)
Excretion	Renal OCT2 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	AMES toxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Max. tolerated dose (human)	1.07	Numeric (log mg/kg/day)
Toxicity	hERG I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	hERG II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	1.853	Numeric (mol/kg)
Toxicity	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	2.418	Numeric (log mg/kg_bw/day)
Toxicity	Hepatotoxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Skin Sensitisation	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	<i>T.Pyriformis</i> toxicity	0.273	Numeric (log ug/L)
Toxicity	Minnow toxicity	5.204	Numeric (log mL)

### Molecule 1



SMILES O[C@H]1[C@@H]2[C@@H]3[C@@H]([C@@H]3CC[C@@H]([C@H](C3)O)O)[C@@H]1[C@@H]2O

#### Physicochemical Properties

Formula	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>
Molecular weight	302.36 g/mol
Num. heavy atoms	21
Num. arom. heavy atoms	0
Fraction Csp <sup>3</sup>	1.00
Num. rotatable bonds	1
Num. H-bond acceptors	6
Num. H-bond donors	5
Molar Refractivity	74.77
TPSA	110.38 Å <sup>2</sup>
<b>Lipophilicity</b>	
Log <i>P</i> <sub>ow</sub> (ILOGP)	-1.54
Log <i>P</i> <sub>2/w</sub> (XLOGP3)	-0.90
Log <i>P</i> <sub>ow</sub> (WLOGP)	-0.84

#### Water Solubility

Log S (ESOL)	-1.08
Solubility	2.51e+01 mg/ml ; 8.29e-02 mol/l
Class	Very soluble
Log S (Ali)	-0.94
Solubility	3.51e+01 mg/ml ; 1.16e-01 mol/l
Class	Very soluble
Log S (SILICOS-IT)	1.18
Solubility	4.53e+03 mg/ml ; 1.50e+01 mol/l
Class	Soluble

#### Pharmacokinetics

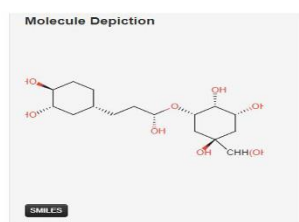
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	Yes
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log <i>K</i> <sub>p</sub> (skin permeation)	-8.78 cm/s

#### Druglikeness

Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	No; 1 violation: WLOGP<-0.4
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

Act  
Go t

## Lampiran 15. Hasil prediksi ADMET asam klorogenat

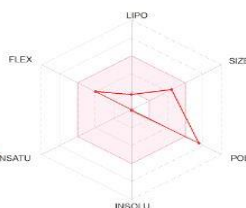
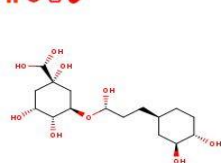


### Molecule properties:

Descriptor	Value
Molecular Weight	366.407
LogP	-2.4505
#Rotatable Bonds	6
#Acceptors	9
#Donors	8

Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Absorption	Water solubility	-1.94	Numeric (log mol/L)
Absorption	Caco2 permeability	-0.236	Numeric (log Papp in 10 <sup>-6</sup> cm/s)
Absorption	Intestinal absorption (human)	43.675	Numeric (% Absorbed)
Absorption	Skin Permeability	-2.757	Numeric (log Kp)
Absorption	P-glycoprotein substrate	Yes	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Distribution	VDss (human)	-0.518	Numeric (log L/kg)
Distribution	Fraction unbound (human)	0.661	Numeric (Fu)
Distribution	BBB permeability	-1.658	Numeric (log BB)
Distribution	CNS permeability	-5.225	Numeric (log PS)
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Excretion	Total Clearance	1.219	Numeric (log ml/min/kg)
Excretion	Renal OCT2 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	AMES toxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Max. tolerated dose (human)	1.07	Numeric (log mg/kg/day)
Toxicity	hERG I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	hERG II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	1.853	Numeric (mol/kg)
Toxicity	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	2.418	Numeric (log mg/kg_bw/day)
Toxicity	Hepatotoxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Skin Sensitisation	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	T.Pyiformis toxicity	0.273	Numeric (log ug/L)
Toxicity	Minnow toxicity	5.204	Numeric (log mM)

### Molecule 1



SMILES O=C(O)[C@@H](O)[C@@H](O)[C@@H](O)[C@@H](O)[C@@H](O)[C@@H](O)[C@@H](O)[C@@H](O)[C@@H](O)O

#### Physicochemical Properties

Formula	C16H30O9
Molecular weight	366.40 g/mol
Num. heavy atoms	25
Num. arom. heavy atoms	0
Fraction Csp3	1.00
Num. rotatable bonds	6
Num. H-bond acceptors	9
Num. H-bond donors	8
Molar Refractivity	85.22
TPSA	171.07 Å <sup>2</sup>
<b>Lipophilicity</b>	
Log P <sub>ol/w</sub> (ILOGP)	1.02
Log P <sub>ol/w</sub> (XLOGP3)	-2.55
Log P <sub>ol/w</sub> (WLOGP)	-2.45

#### Water Solubility

Log S (ESOL)	-0.11
Solubility	2.85e+02 mg/ml ; 7.78e-01 mol/l
Class	Very soluble
Log S (Ali)	-0.50
Solubility	1.17e+02 mg/ml ; 3.18e-01 mol/l
Class	Very soluble
Log S (SILICOS-IT)	2.18
Solubility	5.58e+04 mg/ml ; 1.52e+02 mol/l
Class	Soluble

#### Pharmacokinetics

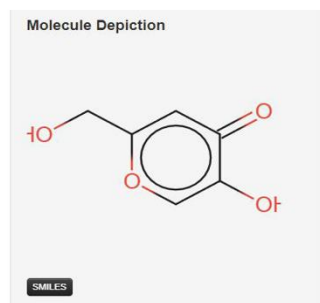
GI absorption	Low
BBB permeant	No
P-gp substrate	Yes
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K <sub>p</sub> (skin permeation)	-10.35 cm/s

#### Druglikeness

Lipinski	Yes; 1 violation: NHorOH>5
Ghose	No; 1 violation: WLOGP<=0.4
Veber	No; 1 violation: TPSA>140
Egan	No; 1 violation: TPSA>131.6
Muegge	No; 3 violations: XLOGP3<=-2, TPSA>150, H-bond>5
Bioavailability Score	0.55



## Lampiran 16. Hasil prediksi ADMET asam kojat

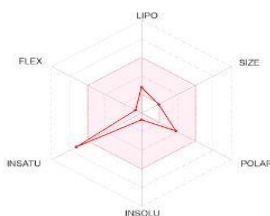
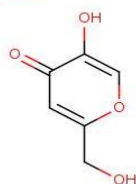


### Molecule properties:

Descriptor	Value
Molecular Weight	142.11
LogP	-0.1623
#Rotatable Bonds	1
#Acceptors	4

Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Absorption	Water solubility	-1.934	Numeric (log mol/L)
Absorption	Caco2 permeability	0.646	Numeric (log Papp in 10 <sup>-6</sup> cm/s)
Absorption	Intestinal absorption (human)	93.115	Numeric (% Absorbed)
Absorption	Skin Permeability	-3.125	Numeric (log Kp)
Absorption	P-glycoprotein substrate	No	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Distribution	VDss (human)	0.028	Numeric (log L/kg)
Distribution	Fraction unbound (human)	0.831	Numeric (Fu)
Distribution	BBB permeability	0.119	Numeric (log BB)
Distribution	CNS permeability	-2.992	Numeric (log PS)
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Excretion	Total Clearance	0.663	Numeric (log ml/min/kg)
Excretion	Renal OCT2 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	AMES toxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Max. tolerated dose (human)	-0.071	Numeric (log mg/kg/day)
Toxicity	hERG I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	hERG II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	1.731	Numeric (mol/kg)
Toxicity	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	1.93	Numeric (log mg/kg_bw/day)
Toxicity	Hepatotoxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Skin Sensitisation	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	<i>T.Pyiformis</i> toxicity	-0.272	Numeric (log ug/L)
Toxicity	Minnow toxicity	3.148	Numeric (log mM)

### Molecule 1



SMILES OCC1=CC(=O)C(O)=C1O

#### Physicochemical Properties

Formula	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
Molecular weight	142.11 g/mol
Num. heavy atoms	10
Num. arom. heavy atoms	6
Fraction Csp <sup>3</sup>	0.17
Num. rotatable bonds	1
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	2
Molar Refractivity	33.13
TPSA	70.67 Å <sup>2</sup>

#### Lipophilicity

Log <i>P</i> <sub>o/w</sub> (ILOGP)	1.12
Log <i>P</i> <sub>o/w</sub> (XLOGP3)	-0.64
Log <i>P</i> <sub>o/w</sub> (WLOGP)	-0.31

#### Water Solubility

Log S (ESOL)	-0.70
Solubility	2.86e+01 mg/ml ; 2.01e-01 mol/l
Class	Very soluble
Log S (Ali)	-0.37
Solubility	6.05e+01 mg/ml ; 4.25e-01 mol/l
Class	Very soluble
Log S (SILICOS-IT)	-1.17
Solubility	9.72e+00 mg/ml ; 6.84e-02 mol/l
Class	Soluble

#### Pharmacokinetics

GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log <i>K</i> <sub>p</sub> (skin permeation)	-7.62 cm/s

#### Druglikeness

Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	No; 3 violations: MW<160, MR<40, #atoms<20
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	No; 1 violation: MW<200
Bioavailability Score	0.55

**Lampiran 17.** Pengujian penghambatan enzim tirosinase secara in vitro

**Lampiran 18.** Alat yang digunakan dalam pengujian in vitro



Rangkaian alat soklet



Rotary evaporator



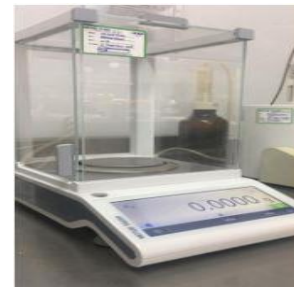
Oven



Waterbath



Spektrofotometer Uv-vis



Neraca analitik



Tabung reaksi



Magnetik stirer



Labu ukur



Gelas ukur



Gelas kimia



pH Meter



Pipet tetes



Lampu Uv



Batang pengaduk

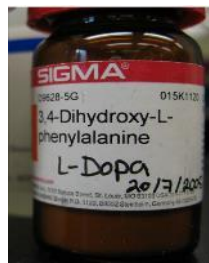
**Lampiran 19.** Bahan yang digunakan dalam uji reaksi tabung, KLT dan pengujian penghambatan enzim tirosinase secara in vitro



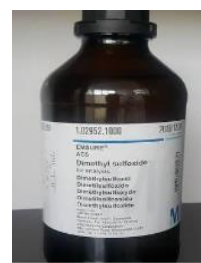
Enzim tirosinase  
(Sigma)



Asam Kojat  
(Sigma)



L-DOPA  
(Sigma)



DMSO



Kalium Fosfat  
( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )



Natrium Hidroksida  
(NaOH)



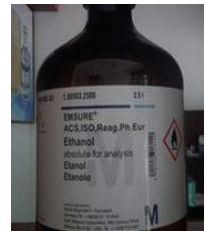
Kuersetin  
(Sigma)



B-Karoten  
(Sigma)



Asam Galat  
(Merck)



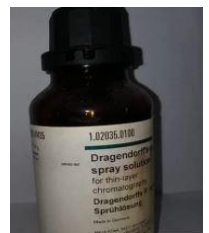
Etanol



Aquadest



Folin-Ciocalteu



Dragendorff



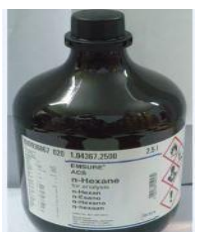
Etil Asetat



Amonia



$\text{FeCl}_3$



n-Heksan



HCl



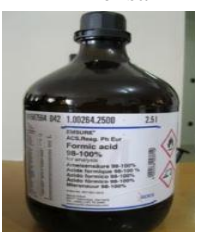
KOH



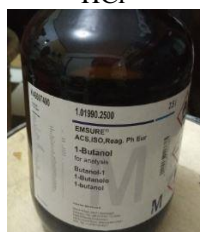
$\text{AlCl}_3$



Kloroform



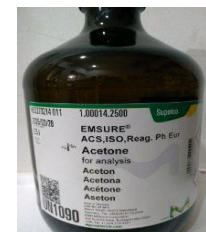
Asam Format



n- Butanol



Serbuk (Mg)



Aseton



Asam Asetat

**Lampiran 20. Simplisia ubi jalar**

Proses perajangan sampel



Proses pengeringan sampel



Proses penimbangan sampel



Ekstrak kental ubi jalar

**Lampiran 21. Metode ekstraksi dan ekstrak ubi jalar**

Sokletasi

**Lampiran 22.** Hasil skirining fitokimia berdasarkan uji reaksi tabung secara kualitatif terkait kandungan senyawa aktif ekstrak ubi jalar



Ekstrak ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam)



Uji kandungan alkaloid (-)



Uji kandungan Flavonoid (+)



Uji kandungan fenolik (+)



Uji Kandungan Saponin (+)

**Lampiran 23.** Perhitungan nilai Rf sampel dan senyawa pembanding

**Rumus Nilai Rf**

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh sampel}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Diketahui jarak yang ditempuh pelarut =  $10 - 1,5 - 1 = 7,5$  cm

1. Kandungan Flavonoid

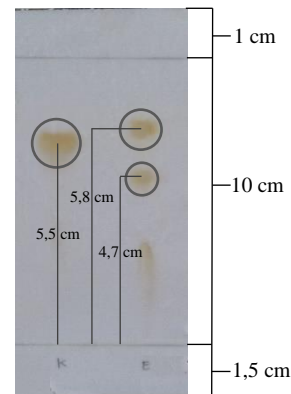
a. Pembanding (Kuersetin)

$$Rf = \frac{5,5}{7,5} = 0,73$$

b. Ekstrak Ubi Jalar

$$Rf_1 = \frac{5,8}{7,5} = 0,77$$

$$Rf_2 = \frac{4,7}{7,5} = 0,62$$



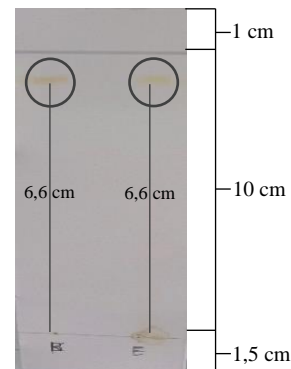
2. Kandungan Karotenoid

a. Pembanding (Beta-karoten)

$$Rf = \frac{6,5}{7,5} = 0,86$$

b. Ekstrak Ubi Jalar

$$Rf = \frac{6,5}{7,5} = 0,86$$



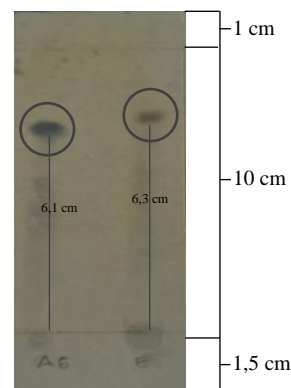
3. Kandungan Fenolik

a. Pembanding (Asam galat)

$$Rf = \frac{6,1}{7,5} = 0,81$$

b. Ekstrak Ubi Jalar

$$Rf = \frac{6,3}{7,5} = 0,84$$

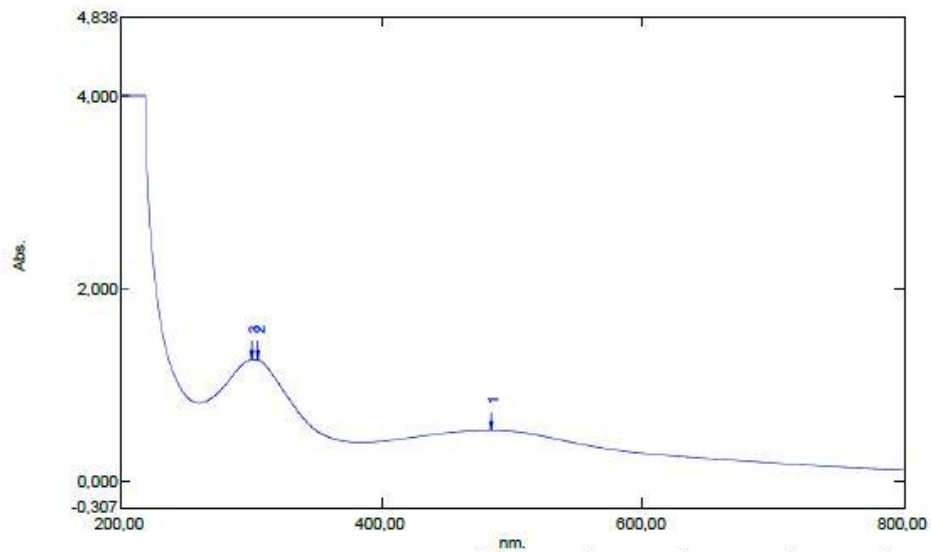


**Lampiran 24.** Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum enzim tirosinase dengan substrat L-DOPA 0,6 mm

### Spectrum Peak Pick Report

01/01/2191 08:08:53

Data Set: LAMDA MAKS ENZIM + L-Dopa 0,6 mM - RawData



[Measurement Properties]  
 Wavelength Range (nm.): 200.00 to 800.00  
 Scan Speed: Fast  
 Sampling Interval: 0,1  
 Auto Sampling Interval: Disabled  
 Scan Mode: Single

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	⊕	480.40	0.624	
2	⊕	305.90	1.442	
3	⊕	303.10	1.434	

[Instrument Properties]  
 Instrument Type: UV-1900 Series  
 Measuring Mode: Absorbance  
 Slit Width: 1,0 nm  
 Light Source Change Wavelength: 340,0 nm  
 S/R Exchange: Normal

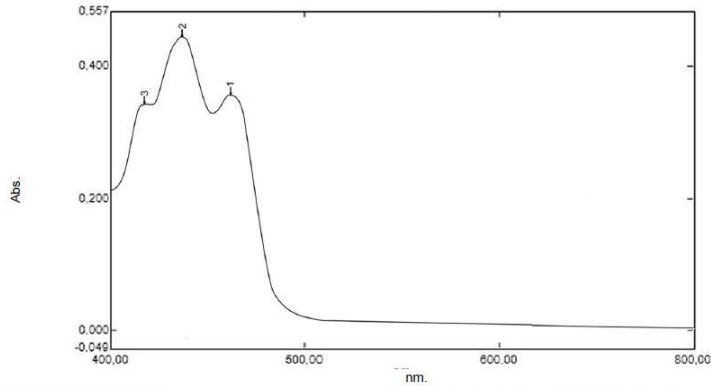
[Attachment Properties]  
 Attachment: None

[Operation]  
 Threshold: 0,0010000  
 Points: 4  
 InterPolate: Disabled  
 Average: Disabled

[Sample Preparation Properties]  
 Weight:  
 Volume:  
 Dilution:  
 Path Length:  
 Additional Information:

**Lampiran 25.** Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum standar beta-karoten, kuersetin dan asam galat pada konsentrasi 50 ppm

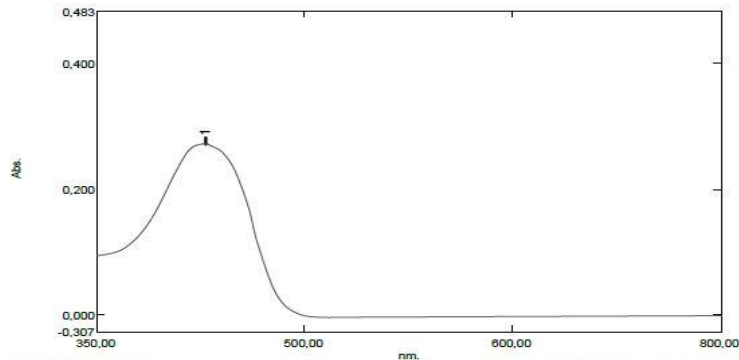
Data Set: LAMDA MAKS Beta - Karoten 50 ppm - RawData



[Measurement Properties]  
 Wavelength Range (nm.): 400.00 to 800.00  
 Scan Speed: Fast  
 Sampling Interval: 0.1  
 Auto Sampling Interval: Disabled  
 Scan Mode: Single

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	476.40	0.379	
2	●	449.40	0.465	
3	●	427.60	0.374	

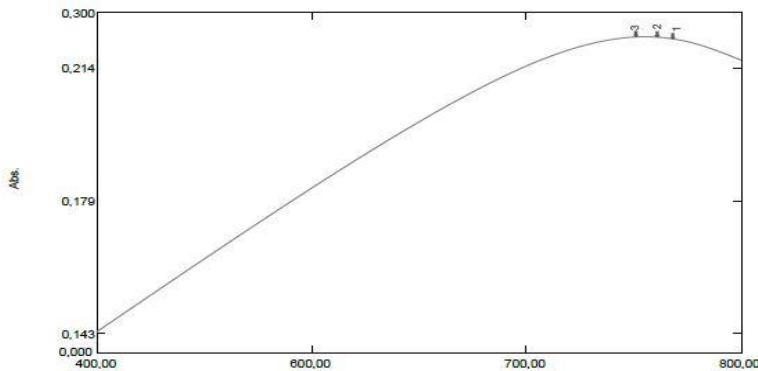
Data Set: LAMDA MAKS Kuersetin 50 ppm - RawData



[Measurement Properties]  
 Wavelength Range (nm.): 350.00 to 800.00  
 Scan Speed: Fast  
 Sampling Interval: 0.1  
 Auto Sampling Interval: Disabled  
 Scan Mode: Single

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	435.40	0.352	

Data Set: LAMDA MAKS Asam Galat 50 ppm - RawData

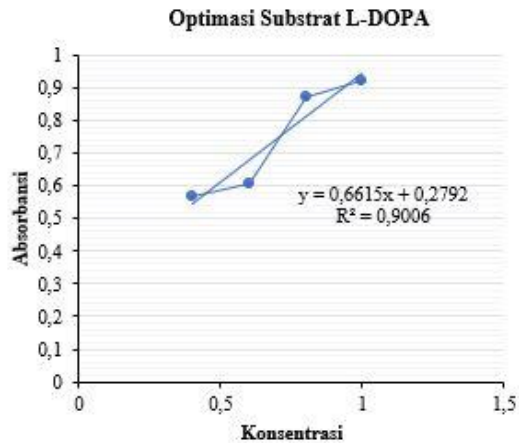


[Measurement Properties]  
 Wavelength Range (nm.): 400.00 to 800.00  
 Scan Speed: Fast  
 Sampling Interval: 0.1  
 Auto Sampling Interval: Disabled  
 Scan Mode: Single

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	768.20	0.307	
2	●	756.40	0.306	
3	●	742.85	0.285	



**Lampiran 26.** Hasil optimasi substrat L-DOPA dan perhitungan unit enzim tirosinase



Perhitungan Unit Enzim Yang Digunakan

Diketahui :

Enzim Tirosinase solid 1000 Unit/mg

$$\frac{1000 \text{ Unit}}{1 \text{ mg Solid}} = \frac{240 \text{ Unit/ml}}{\text{Solid yang ditimbang}}$$

$$\text{Solid yang ditimbang} = \frac{1 \text{ mg solid} \times 240 \text{ Unit/ml}}{1000 \text{ Unit}} = 0,24 \text{ mg/ml}$$

Untuk Larutan Enzim Tirosinase 10 ml

$$0,24 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} = 2,4 \text{ mg}$$

**Lampiran 27.** Hasil uji penghambatan enzim tirosinase asam kojat



Kontrol Negatif



Asam kojat + Kontrol negatif

**Lampiran 28.** Hasil uji penghambatan enzim tirosinase ekstrak ubi jalar (*Ipomoea batatas* L. Lam)



Kontrol Negatif



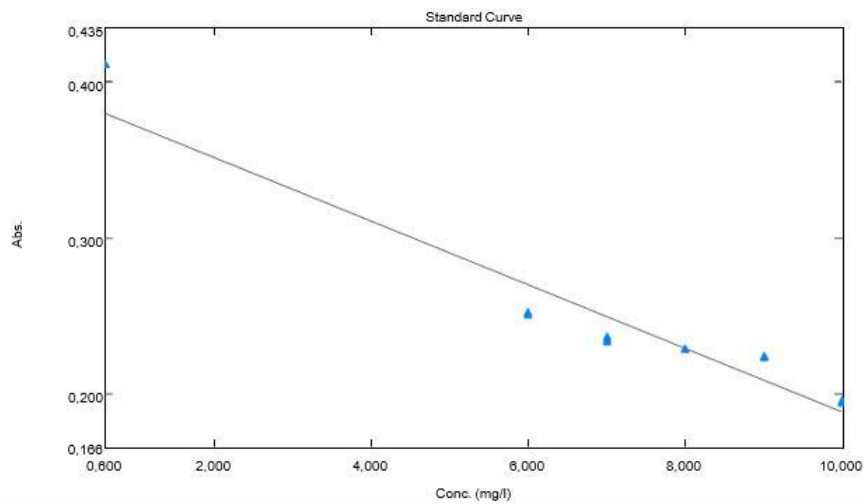
Ekstrak Ubi Jalar + Kontrol Negatif

## Lampiran 29. Hasil pengukuran absorbansi asam kojat (kontrol)

### Standard Table Report

01/01/2191 07:57:52

File Name: G:\LPT\Hasil Analisis\2022\11-November\Rian Saputra\ASAM KOJAT\Absorbansi As. kojat.pho



Standard Table

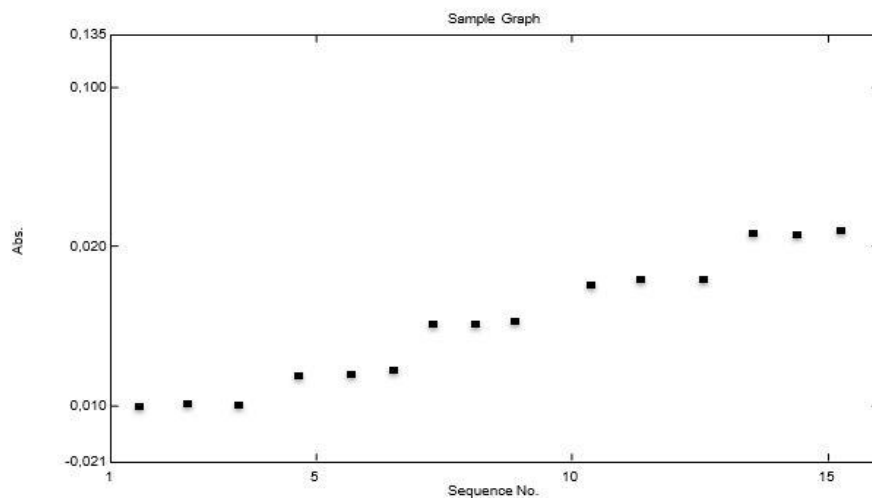
	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL480,40	Wgt.Factor	Comments
1	1:1	Standard		6.000	0.252	1.000	
2	1:2	Standard		6.000	0.253	1.000	
3	1:3	Standard		6.000	0.251	1.000	
4	2:1	Standard		7.000	0.244	1.000	
5	2:2	Standard		7.000	0.249	1.000	
6	2:3	Standard		7.000	0.247	1.000	
7	3:1	Standard		8.000	0.229	1.000	
8	3:2	Standard		8.000	0.227	1.000	
9	3:3	Standard		8.000	0.229	1.000	
10	4:1	Standard		9.000	0.224	1.000	
11	4:2	Standard		9.000	0.225	1.000	
12	4:3	Standard		9.000	0.223	1.000	
13	5:1	Standard		10.000	0.195	1.000	
14	5:2	Standard		10.000	0.198	1.000	
15	5:3	Standard		10.000	0.195	1.000	
16	KN	Standard		0.600	0.510	1.000	

**Lampiran 30.** Hasil pengukuran absorbansi ekstrak ubi jalar sebagai validasi pada panjang gelombang maksimum enzim tirosinase

**Sample Table Report**

15/03/2019 08:59:58

File Name:G:\KO\Hasil Analisis\2023\03-Maret\Rian Saputra\Ekstrak Ubi Jalar\ABS BLANKO SAMPEL.unk



Sample Table

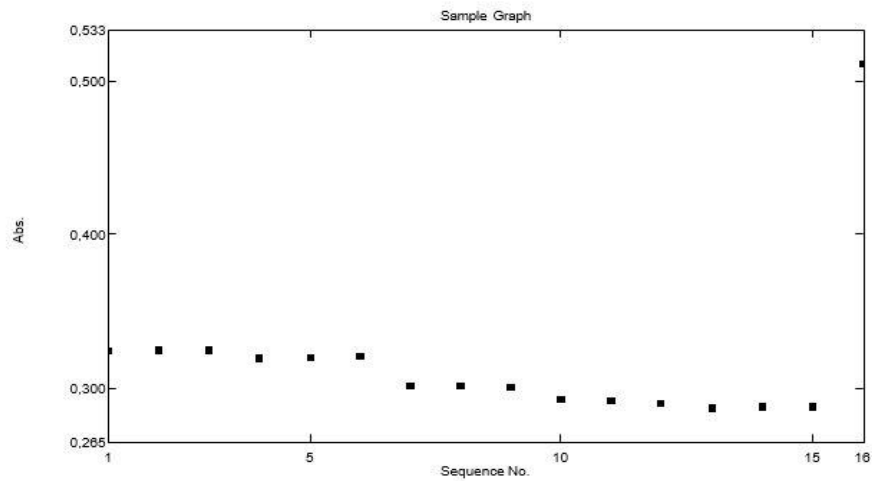
	Sample ID	Type	Conc	WL480,40	Comments
1	50:1	Sample	50.000	0.011	
2	50:2	Sample	50.000	0.012	
3	50:3	Sample	50.000	0.010	
4	60:1	Sample	60.000	0.013	
5	60:2	Sample	60.000	0.014	
6	60:3	Sample	60.000	0.014	
7	75:1	Sample	75.000	0.016	
8	75:2	Sample	75.000	0.015	
9	75:3	Sample	75.000	0.016	
10	85:1	Sample	85.000	0.018	
11	85:2	Sample	85.000	0.017	
12	85:3	Sample	85.000	0.019	
13	100:1	Sample	100.000	0.023	
14	100:2	Sample	100.000	0.021	
15	100:3	Sample	100.000	0.023	

### Lampiran 31. Hasil pengukuran absorbansi ekstrak ubi jalar

#### Sample Table Report

01/01/2191 07:59:58

File Name:G:\LPT\Hasil Analisis\2022\11-November\Rian Saputra\Ekstrak Ubi Jalar\ABS SAMPEL.unk



Sample Table

	Sample ID	Type	Conc.	WL480,40	Comments
1	50:1	Sample	50.000	0.324	
2	50:2	Sample	50.000	0.325	
3	50:3	Sample	50.000	0.325	
4	60:1	Sample	60.000	0.322	
5	60:2	Sample	60.000	0.322	
6	60:3	Sample	60.000	0.321	
7	75:1	Sample	75.000	0.301	
8	75:2	Sample	75.000	0.301	
9	75:3	Sample	75.000	0.304	
10	85:1	Sample	85.000	0.292	
11	85:2	Sample	85.000	0.292	
12	85:3	Sample	85.000	0.290	
13	100:1	Sample	100.000	0.287	
14	100:2	Sample	100.000	0.287	
15	100:3	Sample	100.000	0.286	
16	KN	Sample	0.600	0.601	

### Lampiran 32. Hasil perhitungan persen inhibisi dan IC<sub>50</sub> asam kojat

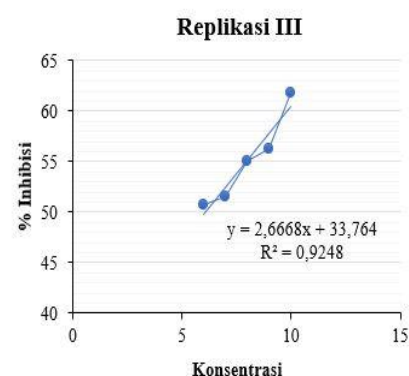
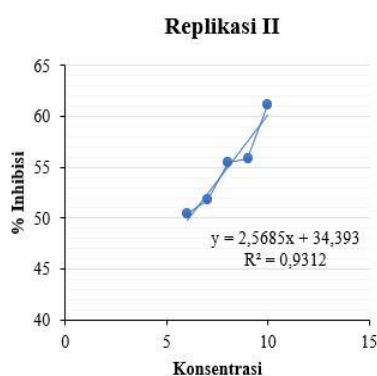
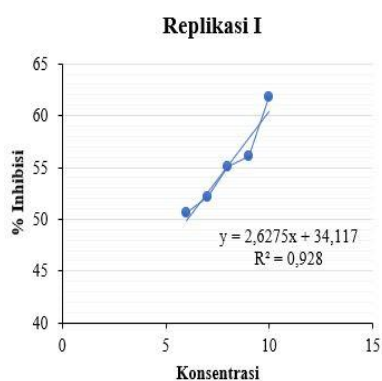
Replikasi I						
No	Kons. (ppm)	Abs.	KN	(KN-Abs)	(Abs/KN)	% Inhibisi
1	6	0,252	0,510	0,258	0,505882	50,58824
2	7	0,244	0,510	0,266	0,521568	52,15786
3	8	0,229	0,510	0,281	0,550980	55,09804
4	9	0,224	0,510	0,286	0,560784	56,07843
5	10	0,195	0,510	0,315	0,617647	61,76571

Replikasi II						
No	Kons. (ppm)	Abs.	KN	(KN-Abs)	(Abs/KN)	% Inhibisi
1	6	0,253	0,510	0,257	0,503922	50,39222
2	7	0,249	0,510	0,261	0,511765	51,17665
3	8	0,227	0,510	0,283	0,554902	55,49002
4	9	0,225	0,510	0,285	0,558824	55,88224
5	10	0,198	0,510	0,312	0,611765	61,17650

Replikasi III						
No	Kons. (ppm)	Abs.	KN	(KN-Abs)	(Abs/KN)	% Inhibisi
1	6	0,251	0,510	0,259	0,507843	50,78431
2	7	0,247	0,510	0,263	0,515686	51,56863
3	8	0,229	0,510	0,281	0,550980	55,09804
4	9	0,223	0,510	0,287	0,562745	56,27451
5	10	0,195	0,510	0,315	0,617647	61,76471



#### Perhitungan IC<sub>50</sub>

##### Replikasi I

$$y = 2,6275x + 34,117$$

$$50 = 2,6275x + 34,117$$

$$50 - 34,117 = 2,6275x$$

$$IC_{50} = \frac{15,883}{2,6275} = 6,04 \mu\text{g/ml}$$

##### Replikasi II

$$y = 2,5685x + 34,393$$

$$50 = 2,5685x + 34,393$$

$$50 - 34,393 = 2,5685x$$

$$IC_{50} = \frac{15,607}{2,5685} = 6,07 \mu\text{g/ml}$$

##### Replikasi III

$$y = 2,6668x + 33,764$$

$$50 = 2,6668x + 33,764$$

$$50 - 33,764 = 2,6668x$$

$$IC_{50} = \frac{16,236}{2,6668} = 6,08 \mu\text{g/ml}$$

**Lampiran 33.** Hasil perhitungan persen inhibisi dan IC<sub>50</sub> ekstrak ubi jalar  
(*Ipomoea batatas* L. Lam)

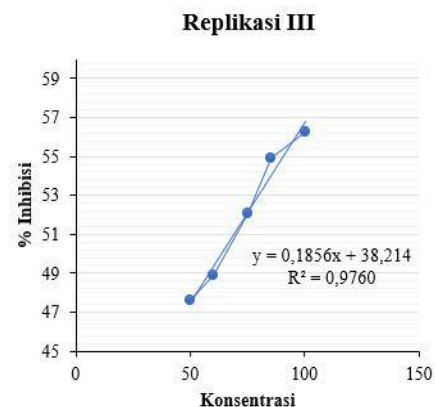
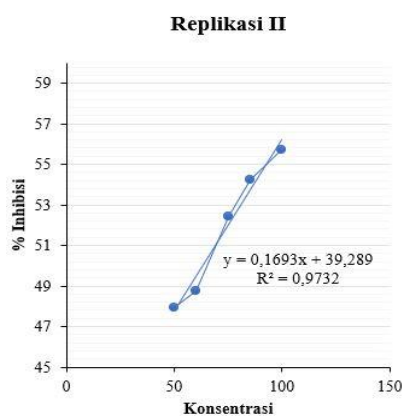
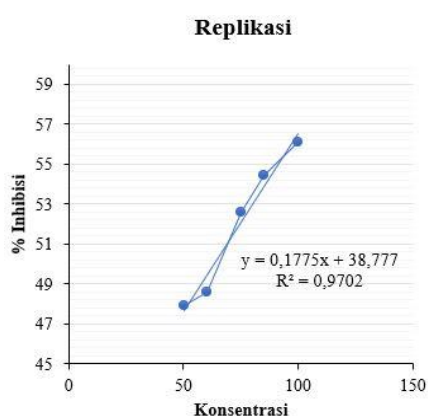
Replikasi I								
No	Kons. (ppm)	Abs.2	Abs. 1	Abs.2-Abs.1	KN	KN-(Abs.2-Abs.1)	Abs.2-Abs.1/KN	% Inhibisi
1	50	0,324	0,011	0,313	0,601	0,288	0,479201331	47,92013311
2	60	0,322	0,013	0,309	0,601	0,292	0,485856905	48,58569052
3	75	0,301	0,016	0,285	0,601	0,316	0,525790349	52,57903494
4	85	0,292	0,018	0,274	0,601	0,327	0,544093178	54,40931780
5	100	0,287	0,023	0,264	0,601	0,337	0,560732113	56,07321131

Replikasi II								
No	Kons. (ppm)	Abs. 2	Abs. 1	Abs.2-Abs.1	KN	KN-(Abs.2-Abs.1)	Abs.2-Abs.1/KN	% Inhibisi
1	50	0,325	0,012	0,313	0,601	0,288	0,479201331	47,92013311
2	60	0,322	0,014	0,308	0,601	0,293	0,487520799	48,75207987
3	75	0,301	0,015	0,286	0,601	0,315	0,524126456	52,41264559
4	85	0,292	0,017	0,275	0,601	0,326	0,542429285	54,24292845
5	100	0,287	0,021	0,266	0,601	0,335	0,557404326	55,74043261

Replikasi III								
No	Kons. (ppm)	Abs. 2	Abs. 1	Abs.2-Abs.1	KN	KN-(Abs.2-Abs.1)	Abs.2-Abs.1/KN	% Inhibisi
1	50	0,325	0,010	0,315	0,601	0,286	0,475873544	47,58735441
2	60	0,321	0,014	0,307	0,601	0,294	0,489184692	48,91846922
3	75	0,304	0,016	0,288	0,601	0,313	0,520798669	52,07986689
4	85	0,290	0,019	0,271	0,601	0,330	0,549084859	54,90848586
5	100	0,286	0,023	0,263	0,601	0,338	0,562396007	56,23960067



**Rumus Perhitungan IC<sub>50</sub>**

Replikasi I

$$y = 0,1775x + 38,777$$

$$50 = 0,1775x + 38,777$$

$$50 - 38,777 = 0,1775x$$

$$IC_{50} = \frac{11,33}{0,1775} = 63,22 \mu\text{g/ml}$$

Replikasi II

$$y = 0,1693x + 39,289$$

$$50 = 0,1693x + 39,289$$

$$50 - 39,289 = 0,1693x$$

$$IC_{50} = \frac{10,71}{0,1693} = 63,26 \mu\text{g/ml}$$

Replikasi III

$$y = 0,1856x + 38,214$$

$$50 = 0,1856x + 38,214$$

$$50 - 38,214 = 0,1856x$$

$$IC_{50} = \frac{11,33}{0,1775} = 63,50 \mu\text{g/ml}$$

**Lampiran 34.** Uji normalitas data IC<sub>50</sub> ekstrak ubi jalar dan asam kojat dengan SPSS

Tests of Normality							
Hasil	Kolmogorov Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
IC <sub>50</sub>	Ekstrak Ubi Jalar	.337	3	.	.855	3	.253
	Asam Kojat	.292	3	.	.923	3	.463

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives							
Hasil				Statistic	Std. Error		
IC <sub>50</sub>	Ekstrak Ubi Jalar	Mean		63.3267	.08743		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	62.9505			
			Upper Bound	63.7029			
		5% Trimmed Mean		.			
		Median		63.2600			
		Variance		.023			
		Std. Deviation		.15144			
		Minimum		63.22			
		Maximum		63.50			
		Range		.28			
		Interquartile Range		.			
		Skewness		1.597	1.225		
		Kurtosis		.	.		
		Asam Kojat	Asam Kojat	Mean		6.0633	.01202
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6.0116	
					Upper Bound	6.1150	
5% Trimmed Mean				.			
Median				6.0700			
Variance				.000			
Std. Deviation				.02082			
Minimum				6.04			
Maximum				6.08			
Range				.04			
Interquartile Range				.			
Skewness				-1.293	1.225		
Kurtosis				.	.		

**Lampiran 35. Uji Independent t-test data IC<sub>50</sub> ekstrak ubi jalar dan asam kojat**

**T-test**

<b>Group Statistics</b>					
Hasil		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
IC <sub>50</sub>	Ekstrak Ubi Jalar	3	63.3267	.15144	.08743
	Asam Kojat	3	6.0633	.02082	.01202

**Independent Samples Test**

% Inhibisi	Levene's Test		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Equal variances assumed	10.087	.054	648.842	4	.000	57.263	.08825	57.01	57.50
Equal variances not assumed			648.842	2.076	.000	57.263	.08825	57.01	57.50