

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Struktur kulit manusia mempunyai banyak lapisan yang berperan dalam pertahanan tubuh. Diantara lapisan tersebut terdapat suatu pigmen melanin yang disintesis dalam sel dendritik yaitu melanosit yang ditemukan pada lapisan dasar epidermis (Harry,1982). Pigmen melanin merupakan pigmen yang dapat mempengaruhi warna kulit. Kulit hitam diproduksi karena meningkatnya aktivitas melanosit yang ditunjukkan dengan semakin meningkatnya produksi melanosom jika dibandingkan dengan kulit putih (Harry, 1982). Namun kulit hitam bukanlah suatu masalah serius yang harus dihindari karena kulit yang lebih gelap lebih berpotensi dalam menahan sengatan radiasi matahari. Tetapi bila konsentrasi pigmen melanin berlebihan dapat mengakibatkan beberapa gangguan yang merugikan, seperti hiperpigmentasi yang saat ini menjadi perbincangan. Oleh karena itu, banyak industri berupaya untuk menghasilkan produk-produk baru dipasaran khususnya dalam kosmetik sebagai sediaan pencerah kulit dengan prinsip utamanya dalam menghambat pembentukan melanin. Tirosinase merupakan enzim yang berfungsi mengatur biosintesis melanin. Pembentukan melanin dapat dihambat dengan cara menurunkan sintesis tirosinase, menurunkan transfer tirosinase, dan menghambat aktivitas tirosinase (Avanti dkk, 2002).

Salah satu senyawa yang banyak berperan dalam menghambat enzim tirosinase adalah asam kojat dan etil-heksil-*p*-metoksisinamat. Selain itu senyawa lain yang diketahui berperan dalam menghambat tirosinase adalah asam sinamat, dengan aktivitas hambatan terhadap enzim tirosinase secara

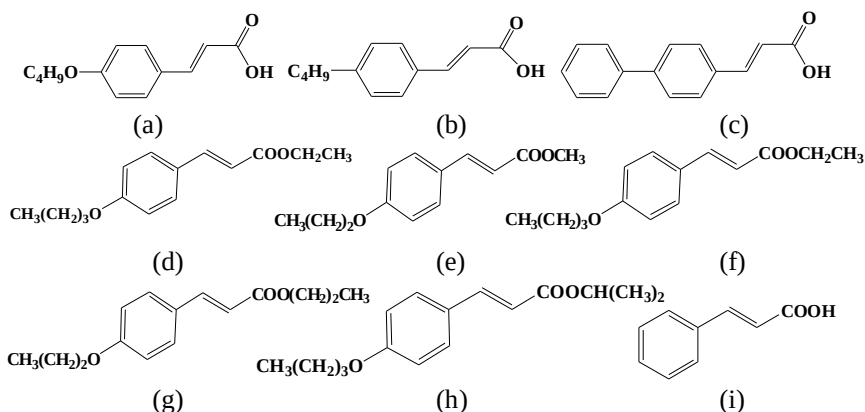
kompetitif dan non kompetitif (Tan *et al.*, 2002). Pada penelitian terdahulu (Hartanti dan Rudyanto, 2008), untuk tujuan lain telah disintesis asam sinamat dan beberapa turunannya, yaitu asam 4-butoksisinamat, asam 4-butilsinamat, asam 4-*t*-butilsinamat, dan asam 4-fenilsinamat dengan reaksi *Knoevenagel*. Metode ini dilakukan dengan mereaksikan benzaldehida, 4-butoksibenzaldehida, 4-butilbenzaldehida, 4-*t*-butilbenzaldehida dan 4-fenilbenzaldehida sebagai bahan awal dengan asam malonat serta menggunakan katalisator piridina atau piperidina yang dipanaskan sampai gas karbondioksida habis (Harwood and Moody, 1989). Keempat senyawa ini telah dibuktikan mampu menghambat enzim tirosinase, dengan urutan potensi aktivitas enzim tirosinase dari besar ke kecil berturut-turut adalah asam 4-butoksisinamat, asam 4-fenilsinamat, asam 4-*t*-butilsinamat dan asam 4-*n*-butilsinamat. Dari keempat senyawa ini asam 4-butoksisinamat dan 4-fenilsinamat memiliki harga IC_{50} lebih kecil dibandingkan asam sinamat, sehingga potensi menghambat enzim tirosinase lebih besar dari pada asam sinamat. Sedangkan asam 4-*t*-butilsinamat dan asam 4-*n*-butilsinamat memiliki harga IC_{50} berturut-turut dua kali dan tiga kali lebih besar dibandingkan asam sinamat (Gunadi, 2007; Hartanti dan Setiawan, 2009). Pada penelitian lain (Hartanti, Setiawan, dan Rudyanto, 2006), diketahui bahwa hasil sintesis turunan asam 4-butoksisinamat dengan reaksi esterifikasi yaitu metil-*p*-butoksisinamat, etil-*p*-butoksisinamat dan propil-*p*-butoksisinamat dapat digunakan pula sebagai inhibitor tirosinase yang diketahui aktivitasnya melalui harga IC_{50} berturut-turut 0,1835 mM, 0,2410 mM, dan 0,5048 mM. Kedelapan turunan asam sinamat tersebut mempunyai aktivitas inhibisi terhadap enzim tirosinase lebih besar dari asam sinamat.

Berdasarkan sintesis yang sudah banyak dilakukan, seharusnya saat ini sudah dilakukan upaya dalam pengembangan obat baru karena dengan

metode *trial and error* saja akan menghasilkan hasil yang tidak efektif, tidak ekonomis dan kurang terarah. Metode lain yang dapat digunakan yaitu metode QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) atau HKSA (Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas) yang menjelaskan hubungan kuantitatif struktur kimia dan aktivitas biologis yang dilakukan dan merupakan bagian penting rancangan obat, dalam usaha mendapatkan suatu obat baru dengan aktivitas yang lebih besar, selektivitas yang lebih tinggi, toksisitas atau efek samping sekecil mungkin dan kenyamanan yang lebih besar (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Dalam metode QSAR tersebut, peneliti perlu mensintesis banyak senyawa agar mendapatkan korelasi yang lebih baik. Namun saat ini metode baru yaitu *molecular docking* dapat digunakan untuk memprediksi interaksi senyawa dengan target protein reseptornya, sehingga perancangan turunan suatu senyawa untuk tujuan peningkatan aktivitas biologisnya dapat dilakukan dengan lebih cepat dan terarah. Dengan demikian tidak perlu dilakukan percobaan sintesis obat baru sebelum diperoleh rancangan struktur senyawa yang paling optimal atau sesuai harapan. Hal ini lebih lanjut akan mengurangi penggunaan pelarut organik dan bahan-bahan kimia sehingga mengurangi polutan yang dilepaskan ke lingkungan.

Molecular docking dapat digunakan sebagai pembuktian ilmiah bahwa ada korelasi antara interaksi *in silico* ligan-reseptor berdasarkan parameter *docking* dengan interaksi ligan-reseptor secara *in vitro* berdasarkan atas harga IC_{50} . Hasil pengujian aktivitas inhibisi secara *in vitro* asam sinamat ini banyak dilakukan terhadap tirosinase yang berasal dari epidermis katak (*Rana esculenta ridibunda*) dan *mushroom* (*Neurospora crasa*) (Avanti dkk, 2002; Avanti, 2003; Gunadi, 2007). Oleh karena itu nilai IC_{50} yang dihasilkan masih merupakan hasil dugaan terhadap daya hambat enzim tirosinase dari manusia. Hal ini disebabkan adanya perbedaan

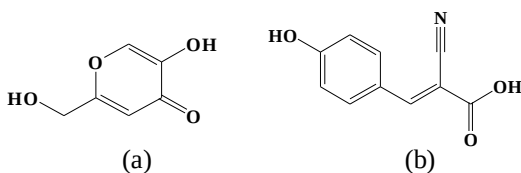
antara struktur enzim tirosinase dari manusia dan dari epidermis katak maupun *mushroom*. Untuk aplikasi dalam sediaan kosmetik sebagai pencerah kulit, informasi mengenai IC_{50} terhadap tirosinase dari manusia ini sangat diperlukan. Selain dengan melakukan pengujian *in vitro* atau *in vivo*, prediksi aktivitas inhibisi tirosinase manusia dapat diprediksi secara *in silico* dengan program *molecular docking*. Dalam penelitian ini akan dipelajari interaksi asam sinamat dan kedelapan senyawa turunannya yang telah terbukti merupakan inhibitor tirosinase, di mana strukturnya dapat dilihat pada gambar 1.1.



Gambar 1.1. Struktur senyawa uji turunan asam sinamat (a) Asam 4-butoksisinamat; (b) Asam 4-butilsinamat; (c) Asam 4-fenilsinamat; (d) Asam-4-*t*-butilsinamat; (e) Metil-*p*-butoksisinamat; (f) Etil-*p*-butoksisinamat; (g) Propil-*p*-butoksisinamat; (h) Isopropil-*p*-butoksisinamat; (i) Asam sinamat.

Struktur protein tirosinase dari manusia saat ini belum tersimpan pada PDB (*Protein Data Bank*), sehingga perlu dilakukan pemodelan struktur *human tyrosinase* terlebih dahulu dengan program *Swiss Model*, di mana urutan asam amino (*sequence*) reseptor didapatkan dari *Genbank* dengan kode AAA61242.1, AAA61244.1, AAB60319.1, dan AAK00805.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/12656248?report=fasta>). Kemudian,

struktur yang terpilih diidentifikasi berdasarkan nilai QMEAN pada rentang 0-1 dan QMEAN6 *Score* dengan syarat $> 0,5$ (Benkert *et al.*, 2011) selain itu didasarkan pada data empiris struktur tunggal protein dalam diagram Ramachandran sehingga dapat ditentukan validasi struktur terpilih dari reseptor hasil pemodelan. Langkah selanjutnya, dilakukan proses *docking* menggunakan program Autodock untuk menentukan interaksi ligan-reseptor. *Docking* dilakukan menggunakan metode *blind docking* dengan program Autodock karena program ini merupakan program yang dapat mengevaluasi sisi aktif reseptor yang belum diketahui (Huey *et al.*, 2011). *Blind docking* dilakukan terhadap reseptor *human tyrosinase* dengan senyawa asam alfa-siano-4-hidroksisinamat dan asam kojat yang sudah diketahui aktivitasnya sebagai penghambat pembentukan melanin dari struktur 3NQ1 pada PDB. Struktur senyawa tersebut dapat dilihat pada gambar 1.2. Senyawa ini digunakan sebagai dasar penentuan residu katalitik karena memiliki kemiripan struktur dengan senyawa uji delapan turunan asam sinamat dan telah diketahui dapat menghambat tirosinase (Qiu *et al.*, 2009).



Gambar 1.2. Struktur senyawa perbandingan (a) asam kojat; (b) asam alfa-siano-4-hidroksisinamat.

Berdasarkan metode pendekatan tersebut, penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk mengetahui sisi aktif reseptor, serta hubungan antara aktivitas *in vitro* dan *in silico* ligan-reseptor. Selain itu berguna dalam prediksi penentuan daya hambat aktivitas melanogenesis reseptor tirosinase

pada manusia dan dapat digunakan untuk menentukan asam amino serta ikatan kimia yang terlibat dalam interaksi ligan-reseptor.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diungkapkan di atas, maka dapat dirumuskan masalah yang akan diteliti yaitu:

1. Bagian manakah yang merupakan sisi aktif pada reseptor *human tyrosinase*?
2. Asam-asam amino dan ikatan kimia apa saja yang terlibat dalam interaksi ligan-reseptor terhadap kedelapan turunan asam sinamat?
3. Bagaimana prediksi aktivitas hambatan pembentukan melanin secara *in silico* dari kedelapan turunan asam sinamat terhadap reseptor *human tyrosinase*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah

1. Memprediksikan sisi aktif reseptor *human tyrosinase*.
2. Mengetahui asam-asam amino dan ikatan kimia yang terlibat dalam interaksi ligan-reseptor terhadap kedelapan turunan asam sinamat.
3. Memprediksi aktivitas hambatan pembentukan melanin secara *in silico* dari reseptor *human tyrosinase* terhadap kedelapan turunan asam sinamat sebagai senyawa uji.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Secara umum diharapkan dapat memberikan informasi tambahan dan dasar bagi penelitian selanjutnya di bidang farmasi, khususnya dalam pengembangan sediaan kosmetika dalam usahanya memperoleh senyawa baru yang dapat digunakan sebagai bahan pencerah kulit dan usaha pencegahan terhadap hiperpigmentasi kulit.
2. Secara khusus diharapkan dari hasil penelitian ini dapat diprediksi sisi aktif reseptor *human tyrosinase* dan aktivitas inhibitor senyawa uji terhadap reseptor sebagai senyawa penghambat pembentukan melanin.