

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada era modern, kosmetika telah menjadi salah satu kebutuhan utama bagi manusia (Shiba et al., 2022). Hal ini sejalan dengan pesatnya perkembangan industri kosmetik yang ditandai dengan berbagai inovasi dalam formulasi dan produk baru yang terus hadir di pasaran. Salah satu sektor yang mengalami perkembangan signifikan adalah produk kecantikan, khususnya yang berfungsi sebagai pemutih dan anti aging (Ahmed et al., 2020).

Salah satu pengembangan kosmetika saat ini yaitu dengan melakukan pencarian senyawa yang dapat menghambat enzim seperti tirosinase dan elastase. Tirosinase merupakan enzim yang berperan penting dalam proses anti aging. Enzim ini akan mengoksidasi asam amino L-DOPA membentuk dopakuinon menjadi dopakrom sehingga terbentuk melanin yang berwarna hitam dan coklat (Kim et al., 2023). Inhibitor tirosinase adalah senyawa yang bisa menghambat pembentukan melanin, dan senyawa ini adalah pendekatan terbaru yang digunakan untuk pemutih kulit sehingga pembentukan melanin bisa dengan melakukan penghambatan enzim tirosinase (Goenka & Toussaint, 2020). Sementara untuk elastase merupakan salah satu enzim protease yang termasuk dalam kelompok serin protease. Enzim ini memiliki peran penting dalam memecah elastin yaitu protein utama yang memberikan elastisitas pada jaringan ikat seperti kulit dan dinding pembuluh darah (Schechter & Berger, 1967).

Dalam tubuh manusia elastase diproduksi oleh neutrofil dan memecah beberapa zat, termasuk elastin, kolagen, dan fibronectin (Zeng et al., 2023). Oleh karena itu, penghambatan terhadap aktivitas enzim elastase ini akan menghambat terjadinya kerutan pada kulit. Pada elastase enzim protease yang berperan dalam degradasi elastin dan protein struktural utama dalam kulit. Aktivitas elastase yang berlebihan dapat menyebabkan hilangnya elastisitas kulit yang berkontribusi terhadap penuaan kulit dan pembentukan keriput sedangkan enzim tirosinase adalah enzim biosintesis melanin, yang bertanggung jawab atas pigmentasi kulit. Aktivitas tirosinase yang berlebihan dapat menyebabkan hiperpigmentasi atau bercak gelap pada kulit. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Nur et al., 2020) membuktikan bahwa tanaman yang mengandung banyak senyawa fenolik dapat memberikan aktivitas penghambatan yang baik terhadap enzim tirosinase dan elastase.

Tanaman paliasa merupakan salah satu tumbuhan asli Indonesia yang memiliki berbagai bioaktif yang mengandung senyawa kimia berupa alkaloid, flavonoid saponin, antraknon, scopoletin, kaempferol, kuarsetin (Rahim et al., 2018). Berdasarkan hasil penelitian yang melaporkan bahwa, beberapa tanaman flavonoid dan alkaloid terbukti berperan sebagai inhibitor enzim tirosinase dan elastase (Furi, Alfatma, et al., 2022). Pada penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kayu *Artocarpus heterophyllus* mengandung flavonoid, alkaloid (artocarmins A–D) dan chalcone

(artocarmitins A–C) yang memiliki aktivitas tirosinase, dengan nilai IC_{50} sebesar 76,3 μ M. Senyawa paling aktif, morachalcone A, memiliki IC_{50} 0,013 μ M, 3000 kali lebih efektif dibandingkan kontrol positif (Murlistyarini & Yuniasih, 2023). Penelitian lain menggunakan *Typhonium flagelliforme* (keladi tikus) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun keladi tikus memiliki nilai IC_{50} sebesar 13,307 mg/mL pada reaksi difenolasi, lebih tinggi dibandingkan asam kojat (IC_{50} 0,093 mg/mL). Senyawa alkaloid, steroid, flavonoid, dan saponin dalam ekstrak keladi tikus berperan sebagai inhibitor tirosinase (Solikha et al., 2023). Secara keseluruhan, senyawa flavonoid dan alkaloid dalam *Artocarpus heterophyllus* dan *Typhonium flagelliforme* menunjukkan potensi sebagai agen anti tirosinase dan elastase (Murlistyarini & Yuniasih, 2023; Solikha et al., 2023).

Dalam studi aktivitas farmakologi analisis sifat fisikokimia suatu senyawa dapat dilakukan dengan menggunakan pendekatan *in silico*. Metode *in silico* digunakan untuk memahami mekanisme molekuler penghambatan tirosinase oleh senyawa bioaktif dalam ekstrak daun paliasa dengan bantuan simulasi komputer memungkinkan prediksi interaksi molekuler antara ligan (senyawa aktif) dengan target enzim melalui *molecular docking* yang digunakan untuk memprediksi bagaimana senyawa aktif dari ekstrak daun paliasa berikatan dengan enzim elastase dan tirosinase. Teknik ini juga mendukung pengembangan berbasis struktur serta perancangan molekul yang lebih selektif dan efisien. Setelah diketahui bahwa senyawa dan protein target dapat berikatan dengan baik maka dilakukan pengujian secara *in vitro*. Pendekatan *in vitro* digunakan untuk menguji Langsung efektivitas ekstrak daun paliasa dalam menghambat elastase dan tirosinase. oleh karena itu pendekatan *in silico* ini memungkinkan kita untuk mengeliminasi pengujian banyak senyawa sampai diperoleh senyawa target yang berpotensi memiliki aktivitas farmakologi tertentu serta didapatkan prediksi profil kelarutan dan permeabilitas serta toksisitas dari senyawa target (Shaker et al., 2021).

Tanaman pada umumnya dikenal memiliki efek samping yang relatif rendah, kandungan senyawa didalamnya tetap berpotensi menimbulkan efek samping lainnya. Oleh karena itu, selain mengetahui efektivitas senyawa tersebut, penting juga untuk memahami profil farmakokinetiknya, seperti proses absorpsi serta toksisitasnya. sehingga dapat dijadikan sebagai dasar dalam memformulasi produk kosmetik yang tidak hanya efektif tetapi juga aman. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa dalam ekstrak daun paliasa yang memiliki potensi dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase dan elastase melalui pendekatan *in silico* seperti *molecular docking*, *molecular dynamic* dan analisis profil absorpsi dan toksisitas serta uji *in vitro*. Sebagai aktivitas penghambatan enzim tirosinase.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas penghambatan enzim tirosinase dari beberapa senyawa dalam ekstrak daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) secara *in vitro*?
2. Kandungan kimia apa yang terdapat dalam ekstrak daun paliasa

- (*Kleinhovia hospita* L.) Menggunakan LC-HRMS?
3. Bagaimana prediksi model interaksi senyawa kimia dalam ekstrak daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) dengan target protein enzim tirosinase dan elastase dengan menggunakan pendekatan *molecular docking* dan *molecular dynamic*?
 4. Bagaimana prediksi profil absorpsi dan reaksi toksisitas senyawa pada ekstrak daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.)?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan aktivitas penghambatan senyawa dalam ekstrak daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) pada enzim tirosinase secara *in vitro*.
2. Menganalisis kandungan kimia pada ekstrak daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) menggunakan LC-HRMS.
3. Memprediksi model interaksi senyawa kimia dalam ekstrak daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) Dengan target protein enzim tirosinase dan elastase dengan menggunakan pendekatan *Molecular docking* dan *Molecular dynamic*.
4. Memprediksi profil absorpsi dan toksisitas senyawa pada ekstrak daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.).

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat memberikan informasi dan pengembangan ilmu pengetahuan dibidang ilmu farmasi tentang penghambatan enzim tirosinase dan elastase melalui prediksi *in silico* dan *in vitro*. Diharapkan senyawa daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) dapat menghambat enzim tirosinase dan elastase yang berperan dalam proses hiperpigmentasi.

1.5 Teori Penelitian

1.5.1 Uraian Tanaman Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.)

Klasifikasi tanaman paliasa. Adapun klasifikasi tanaman paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) adalah sebagai berikut (USDA NRCS National Data Team, 2025).

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Malvales

Suku : Malvaceae

Marga : *Kleinhovia*

Jenis : *Kleinhovia hospita* L.



Gambar 1. Tumbuhan Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) (Angriawan, 2025)

Morfologi tanaman. Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) merupakan tumbuhan yang hidup dengan tinggi pohon berkisar antara 5-20 meter. Kulit kayu pohon ini berwarna abu-abu dengan cabang dan ranting berwarna abu-abu kehijauan. Tangkai daun berukuran 3-5,5 cm, helaian daunnya berbentuk bulat telur dengan ukuran 5,5-18 cm. Bunga paliasa berkumpul pada malai di ujung ranting berbentuk lebar dan mempunyai rambut halus dan daun pelindungnya berbentuk oval, kelopak bunganya berwarna merah muda dengan ukuran 6-19 mm. Biji paliasa berbentuk hampir bulat berwarna hitam atau coklat gelap dengan diameter 1,5-2 mm (eFloras, 2025).

Kandungan senyawa tanaman. Tumbuhan paliasa (*Kleinhovia hospita* L) mengandung senyawa kimia berupa saponin, bufadienol, antraknon, scopoletin, kaempferol, kuarsetin, serta senyawa sianogenik. Selain itu, daun dan kulit paliasa juga mengandung senyawa sianogen. Menurut penelitian Zhou et al. (2013) ditemukan adanya empat macam sikloartan triterpenoid yang berhasil diisolasi dari *K. hospita*, yaitu *Kleinhospitines* A, B, C dan D. Selain itu, telah diisolasi senyawa. eleutherol dan kaempferol 3-O- β -D-glukosida dari daun paliasa (Arung et al., 2012). Penelitian terbaru oleh Rahim et al. (2018) berhasil mengisolasi senyawa *Kleinhospitine* E dan senyawa sikloartan triterpenoid yang juga berasal dari daun paliasa (Arung et al., 2012; Rahim et al., 2018; Zhou et al., 2013).

Manfaat tanaman. Tanaman paliasa banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat untuk berbagai penyakit. Masyarakat Sulawesi Selatan menggunakan daun dari tanaman ini untuk pengobatan sakit kuning atau hepatitis (Djabir, 2019). Data RISTOJA menunjukkan bahwa secara empiris paliasa digunakan sebagai bahan pengobatan antimalaria pada 5 ramuan dari beberapa etnis seperti etnis Alfuru (kinar), Buru (kinar), dan Danar (ay kivut) di Provinsi Maluku serta etnis Kedang (angar) di Provinsi Nusa Tenggara Timur. Beberapa etnis lain juga diketahui menggunakan tumbuhan paliasa sebagai obat kencing manis, demam, hepatitis, ginjal, penyakit lambung dan kolestrol (Budiarti & Jokopriyambodo, 2020).

1.5.2 Metode *In Silico*

1.5.2.1 *Molecular Docking*

Proses mengikat antara dua molekul secara bersama disebut dengan docking. Teknik ini melibatkan prediksi interaksi antara molekul kecil dan protein pada tingkat atom (Salo-Ahen et al., 2020). *Docking* merupakan pilihan utama untuk modeling 3D struktur dari reseptor ligan kompleks dan mengevaluasi stabilitas dari kompleks tersebut yang nantinya menentukan respon biologis. Secara garis besar terdapat dua Langkah dalam molecular docking, yang pertama yaitu mencari jarak konformasi dari ligan yang berikatan dengan molekul target, dan yang kedua yaitu scoring atau mengurutkan hasil docking yang memenuhi persyaratan afinitas ikatan. Diperlukan protein kompleks dan kompleks antara protein dan asam nukleat dan dua atau lebih molekul baik itu hasil dari sintesis ataupun hasil virtual skrining. Dari hasil komputasi dan docking ditemukanlah senyawa yang berpotensi memiliki aktivitas biologis dengan melihat *binding affinity* dan jenis ikatan yang terjadi. Namun, perlu dilakukan berbagai macam evaluasi untuk melanjutkan ke tahap berikutnya (Reddy et al., 2007). Salah satu aspek kunci dari metode docking adalah pemilihan algoritma yang tepat. Ada berbagai algoritma yang dapat digunakan, seperti algoritma grid-based, algoritma Monte Carlo, dan algoritma genetic. Setiap algoritma memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing, tergantung pada kompleksitas sistem yang sedang diteliti. Misalnya, algoritma grid-based sering digunakan untuk sistem yang lebih besar karena efisiensinya dalam menghitung interaksi, sementara algoritma *Monte Carlo* lebih cocok untuk simulasi yang memerlukan eksplorasi ruang konfigurasi yang lebih luas.

Keberhasilan metode *molecular docking* juga sangat bergantung pada kualitas model protein dan ligan yang digunakan. Kesalahan dalam pemodelan dapat menyebabkan hasil yang tidak akurat, sehingga penting untuk menggunakan teknik pemodelan yang valid. Misalnya, dalam penelitian yang menunjukkan bahwa penggunaan model protein yang dihasilkan dari teknik homologi dapat meningkatkan akurasi prediksi interaksi ligan. Dengan demikian, validitas dan reliabilitas hasil docking sangat tergantung pada kualitas input data yang digunakan.

1.5.2.2 *Molecular Dynamic*

Molecular dynamic (MD) merupakan salah satu metode *in silico* yang digunakan untuk mempelajari perilaku dan interaksi molekul dalam sistem biologis. Metode ini memungkinkan peneliti untuk mensimulasikan gerakan atom dan molekul dalam waktu yang ditentukan, memberikan wawasan yang mendalam mengenai struktur dan dinamika biomolekul. Dalam konteks penelitian, MD sering diterapkan untuk memahami mekanisme interaksi antara protein dan ligan, serta untuk memprediksi stabilitas dan konformasi protein dalam berbagai kondisi lingkungan.

Salah satu keunggulan dari metode MD adalah kemampuannya untuk memberikan informasi temporal yang detail mengenai sistem yang diteliti. Dengan menggunakan algoritma tertentu, MD dapat memprediksi bagaimana molekul akan berperilaku seiring berjalannya waktu, yang sangat penting dalam studi interaksi

biomolekuler. Misalnya, dalam penelitian tentang protein G-Protein Coupled Receptors (GPCRs), MD telah digunakan untuk mempelajari perubahan konformasi yang terjadi ketika ligan berikatan dengan reseptor, yang berimplikasi pada pengembangan obat (Nygaard et al., 2013; Vaidehi & Bhattacharya, 2016).

Dalam aplikasi praktis, MD sering kali digabungkan dengan teknik lain seperti docking dan pemodelan homologi untuk meningkatkan akurasi prediksi. Misalnya, studi oleh Wang et al. (2023) menunjukkan bahwa kombinasi metode docking dengan MD dapat meningkatkan pemahaman tentang interaksi obat-reseptor, sehingga mempercepat proses penemuan obat baru. Hal ini menunjukkan bahwa MD bukan hanya berdiri sendiri, tetapi merupakan bagian dari pendekatan multidisipliner dalam penelitian biomedis.

1.5.2.3 Farmakokinetik Absorpsi dan Toksisitas

Farmakokinetik adalah ilmu yang mempelajari bagaimana obat diserap, didistribusikan, dimetabolisme, dan diekskresikan dalam tubuh (Salman et al., 2024). Dalam konteks ini, prediksi profil farmakokinetik menjadi sangat penting untuk mengoptimalkan terapi obat serta meminimalisir efek samping yang tidak diinginkan. Metode prediksi ini dapat dilakukan melalui berbagai pendekatan, termasuk model matematis, simulasi komputer, dan penggunaan data klinis yang tersedia. Salah satu metode yang paling umum digunakan adalah model farmakokinetik populasi, yang memungkinkan peneliti untuk memahami variasi respon individu terhadap obat berdasarkan karakteristik demografis dan biologis mereka.

pkCSM (Pharmacokinetics, Toxicity, and Chemical Space Modeling) merupakan alat berbasis *in silico* yang menggunakan metode machine learning untuk memprediksi parameter farmakokinetik suatu senyawa. pkCSM dapat memperkirakan parameter ADME seperti permeabilitas usus, ikatan dengan protein plasma, permeabilitas darah-otak, dan ekskresi ginjal. Dalam konteks prediksi absorpsi, pkCSM menggunakan model berbasis properti lipofilisitas ($\log P$), Polar Surface Area (PSA), serta aturan Lipinski untuk menilai kelayakan suatu senyawa dalam menembus membran biologis (Pires et al., 2015). Selain itu, pkCSM juga dapat memprediksi interaksi metabolisme dengan enzim sitokrom P450 (CYP), yang merupakan faktor penting dalam detoksifikasi obat di dalam hati.

SwissADME merupakan alat prediksi farmakokinetik yang dikembangkan oleh Swiss Institute of Bioinformatics (Daina et al., 2017a). Metode ini menggunakan berbagai model komputasi untuk menilai parameter farmakokinetik serta sifat fisikokimia dari suatu senyawa, termasuk parameter Lipinski's Rule of Five, $\log P$, dan bioavailabilitas. SwissADME juga memungkinkan prediksi spesifik terhadap interaksi senyawa dengan transporter serta permeabilitasnya terhadap berbagai membran biologis, termasuk penetrasi ke dalam sistem saraf pusat (Daina et al., 2017a). Salah satu keunggulan SwissADME adalah kemampuannya dalam memprediksi sifat farmakokinetik berbasis gastrointestinal (GI) absorption dan P-glycoprotein (P-gp) substrate, yang menentukan distribusi dan eliminasi obat dalam tubuh (Daina et al., 2017a). Selain itu, SwissADME juga dapat digunakan untuk menilai potensi suatu senyawa dalam menembus sawar darah-otak (BBB), yang

merupakan faktor penting dalam pengembangan obat neurologis (Pajouhesh & Lenz, 2005).

1.5.2.4 Mekanisme Target Protein Enzim Tirosinase dan Enzim Elastase

Enzim tirosinase dan elastase berperan penting dalam proses biologis, termasuk pigmentasi kulit dan elastisitas jaringan.

1. Enzim Tirosinase

Tirosinase adalah enzim yang berperan penting dalam biosintesis melanin, pigmen yang menentukan warna kulit, rambut, dan mata pada manusia. Enzim ini mengkatalisis dua reaksi utama dalam proses melanogenesis Hidroksilasi L-tirosin menjadi L-DOPA (-3,4-dihidroksifenilalanin) Reaksi ini dikenal sebagai aktivitas monofenolase, di mana tirosinase menambahkan gugus hidroksil pada L-tirosin untuk membentuk L-DOPA Oksidasi L-DOPA menjadi dopaquinon Reaksi ini disebut aktivitas diphenolase, di mana L-DOPA dioksidasi menjadi dopaquinon, yang selanjutnya mengalami serangkaian reaksi non-enzimatik untuk menghasilkan melanin. Aktivitas tirosinase dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk paparan sinar ultraviolet (UV) yang dapat meningkatkan aktivitas enzim ini, sehingga meningkatkan produksi melanin dan menyebabkan hiperpigmentasi pada kulit (Kim & Uyama, 2005). Beberapa senyawa telah diidentifikasi sebagai inhibitor tirosinase, yang bekerja dengan menghambat aktivitas enzim ini dan mengurangi produksi melanin. Contohnya, flavonoid seperti quersetin dan asam kojat diketahui memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas tirosinase dengan mengkhelat ion tembaga pada situs aktif enzim, sehingga mencegah oksidasi L-DOPA menjadi dopaquinon (Chang, 2009).

2. Enzim Elastase

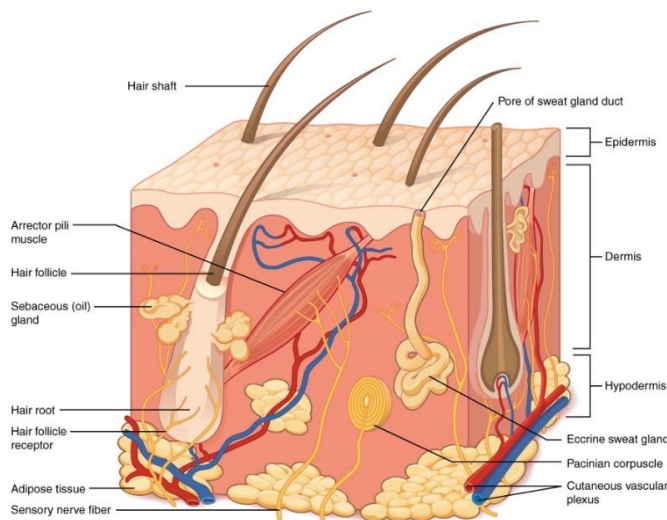
Elastase adalah enzim proteolitik yang termasuk dalam serin protease dan berperan dalam degradasi protein elastin, komponen utama yang memberikan elastisitas pada jaringan seperti kulit, paru-paru, dan pembuluh darah. Elastase memotong ikatan peptida pada residu alanin, valin, serin, glisin, leusin, dan isoleusin, yang mengarah pada pemecahan elastin dan protein matriks ekstraseluler lainnya (Antonicelli et al., 2007). Pada kondisi normal, aktivitas elastase diatur oleh inhibitor alami seperti α 1-antitripsin. Namun, ketidakseimbangan antara elastase dan inhibitorynya dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Sebagai contoh, pada kondisi obesitas, peningkatan aktivitas elastase dan penurunan kadar α 1-antitripsin dapat menyebabkan resistensi insulin, peradangan, dan penurunan elastisitas jaringan. Beberapa senyawa telah diidentifikasi sebagai inhibitor elastase, yang bekerja dengan menghambat aktivitas enzim ini dan mencegah degradasi elastin. Contohnya, peptida yang mengandung asam 2-metilkarbazat telah ditemukan dapat menghambat elastase pankreas dan elastase granulosit manusia. Inhibisi ini bersifat reversibel dan non-kompetitif, menunjukkan bahwa pengikatan pada situs selain situs aktif enzim penting untuk aktivitas penghambatan in mekanisme kerja enzim tirosinase dan elastase, serta pengembangan inhibitor spesifik, memiliki implikasi penting dalam bidang medis dan kosmetik, terutama dalam pengelolaan kondisi seperti hiperpigmentasi kulit dan penurunan elastisitas jaringan akibat penuaan atau

penyakit (Maeda, 2022).

1.5.2.5 Kulit

Kulit dikenal sebagai organ terbesar pada tubuh manusia yang memiliki peranan penting tidak hanya sebagai pelindung fisik, tetapi juga sebagai komponen utama dalam sistem pertahanan tubuh. Organ ini membentuk batas antara lingkungan luar dengan jaringan internal, sekaligus berperan dalam berbagai proses fisiologis yang mendukung keseimbangan tubuh. Pada orang dewasa, kulit memiliki berat rata-rata sekitar 9 pon dan menutupi luas permukaan tubuh sekitar 20 kaki persegi atau setara dengan $\pm 1,86 \text{ m}^2$. Bagian dalam kulit memiliki jaringan pembuluh darah yang sangat luas dan kompleks. Apabila seluruh pembuluh darah tersebut disusun secara memanjang dari ujung ke ujung, panjangnya dapat mencapai lebih dari 11 mil. Secara anatomi, kulit tersusun atas dua lapisan utama, yaitu epidermis yang merupakan lapisan terluar dan dermis yang berada di bagian bawah epidermis (Sherwood, 2016).

Dalam menjalankan fungsinya, kulit bertindak sebagai sistem proteksi yang melindungi tubuh dari berbagai pengaruh eksternal, seperti radiasi ultraviolet (UV), paparan bahan kimia, faktor fisik, serta invasi mikroorganisme. Selain fungsi perlindungan, kulit juga berperan dalam menjaga keseimbangan cairan tubuh dengan mencegah kehilangan air secara berlebihan, mengatur suhu tubuh melalui mekanisme termoregulasi, serta memiliki kemampuan regeneratif yang memungkinkan terjadinya proses perbaikan jaringan secara alami (Earlia et al., 2022).



Gambar 2. Anatomi Kulit (Diadaptasi dari Betts et al. (2022), Di Bawah Lisensi *Creative Commons Attribution*, CC-BY-3.0)

Menunjukkan struktur anatomi kulit manusia yang terdiri dari tiga lapisan utama yaitu epidermis, dermis, dan hipodermis (subkutis). Epidermis merupakan lapisan terluar yang berfungsi sebagai pelindung terhadap lingkungan luar. Dermis berada di bawah epidermis dan mengandung pembuluh darah, kelenjar keringat, kelenjar sebasea,

saraf, serta folikel rambut. Lapisan terdalam yaitu hipodermis tersusun atas jaringan ikat longgar dan jaringan adiposa yang berfungsi sebagai penyimpan energi, pelindung organ, serta pengatur suhu tubuh (Sherwood, 2016) Lapisan kulit (Sloane 2003).

1.2.5.6 Struktur Kulit

1. Epidermis

Epidermis merupakan lapisan paling luar dari kulit yang tersusun atas epitel skuamosa berlapis yang mengalami proses keratinisasi. Lapisan ini tidak memiliki pembuluh darah sehingga nutrisi diperoleh melalui difusi dari jaringan dermis di bawahnya. Epidermis berfungsi sebagai pelindung utama tubuh terhadap faktor lingkungan seperti mikroorganisme, radiasi ultraviolet, dan kehilangan cairan tubuh. Ketebalan epidermis berbeda pada setiap bagian tubuh, dengan lapisan yang lebih tebal ditemukan pada telapak tangan dan telapak kaki. Pada daerah tersebut epidermis tersusun atas lima lapisan utama yang mencerminkan tahap diferensiasi keratinosit dari lapisan basal hingga permukaan kulit.

a. Stratum basalis

Stratum basale merupakan lapisan terdalam epidermis yang tersusun atas satu lapis sel basal berbentuk kuboid atau kolumnar. Sel-sel pada lapisan ini bersifat proliferaatif dan mengalami pembelahan mitosis secara aktif untuk menghasilkan keratinosit baru yang kemudian terdorong ke lapisan di atasnya. Selain keratinosit, lapisan ini juga mengandung melanocytes yang berperan dalam produksi melanin serta sel Merkel yang berfungsi sebagai reseptor sensorik.

b. Stratum spinosum

Stratum spinosum terdiri atas beberapa lapisan sel keratinosit yang saling berhubungan melalui struktur penghubung antar sel yang disebut desmosom. Ikatan ini memberikan tampilan seperti duri atau tonjolan ketika diamati secara mikroskopis. Lapisan ini juga berperan dalam mempertahankan kekuatan mekanik epidermis serta mengandung sel Langerhans yang berfungsi dalam mekanisme pertahanan imun kulit.

c. Stratum granulosum

Stratum granulosum tersusun atas tiga hingga lima lapisan sel yang mengandung granula keratohialin. Granula ini berperan dalam proses keratinisasi dengan membantu penggabungan filamen keratin di dalam sel. Sel-sel pada lapisan ini mengalami perubahan struktural berupa perataan bentuk sel, penebalan membran sel, serta degenerasi inti dan organel sel sebagai bagian dari proses diferensiasi menuju pembentukan lapisan pelindung epidermis.

d. Stratum lucidum

Stratum lucidum merupakan lapisan tipis yang bersifat transparan dan hanya ditemukan pada kulit tebal seperti telapak tangan dan telapak kaki. Lapisan ini tersusun atas sel-sel keratinosit yang telah mati, tidak memiliki inti sel, dan mengandung protein eleidin yang berasal dari keratohialin sehingga memberikan tampilan jernih pada lapisan tersebut.

e. Stratum korneum

Stratum korneum adalah lapisan paling luar epidermis yang terdiri dari sekitar 15–30 lapisan sel mati yang telah mengalami keratinisasi sempurna. Sel-sel ini berbentuk pipih dan dikenal sebagai korneosit. Lapisan ini berfungsi sebagai penghalang utama terhadap penetrasi mikroorganisme, zat kimia, serta kehilangan air dari tubuh. Sel-sel pada lapisan ini secara terus-menerus mengalami deskuamasi dan digantikan oleh sel baru dari lapisan di bawahnya.

2. Dermis

Dermis merupakan lapisan kulit yang terletak di bawah epidermis dan dipisahkan oleh membran basal. Lapisan ini tersusun atas jaringan ikat yang kaya akan serat kolagen dan elastin sehingga memberikan kekuatan serta elastisitas pada kulit. Selain itu, dermis mengandung berbagai struktur seperti pembuluh darah, ujung saraf, folikel rambut, serta kelenjar keringat dan kelenjar sebacea yang berperan dalam fungsi fisiologis kulit.

Dermis terdiri atas dua lapisan utama, yaitu:

a. Lapisan papiler

Lapisan papilar merupakan lapisan dermis yang paling superfisial dan tersusun atas jaringan ikat areolar yang longgar. Lapisan ini mengandung fibroblas, sel mast, dan makrofag serta memiliki banyak pembuluh darah yang berfungsi untuk memberikan nutrisi pada epidermis. Selain itu, papila dermal yang menonjol ke arah epidermis berperan dalam meningkatkan luas permukaan kontak antara epidermis dan dermis serta mengandung reseptor sensorik untuk rangsangan sentuhan.

b. Lapisan retikuler

Lapisan retikular merupakan bagian dermis yang lebih dalam dan tersusun atas jaringan ikat padat tidak teratur yang kaya akan serat kolagen dan elastin. Struktur ini memberikan kekuatan tarik serta elastisitas pada kulit. Seiring bertambahnya usia, degradasi serat kolagen dan elastin dapat menyebabkan berkurangnya elastisitas kulit dan munculnya kerutan.

3. Hipodermis (subkutis)

Hipodermis atau jaringan subkutan merupakan lapisan terdalam yang menghubungkan kulit dengan jaringan atau organ di bawahnya. Lapisan ini sebagian

besar tersusun atas jaringan adiposa yang berfungsi sebagai cadangan energi, bantalan mekanis, serta isolator termal bagi tubuh. Selain itu, hipodermis juga mengandung pembuluh darah dan ujung saraf yang berperan dalam fungsi metabolik dan sensorik kulit (Betts, et al 2023).

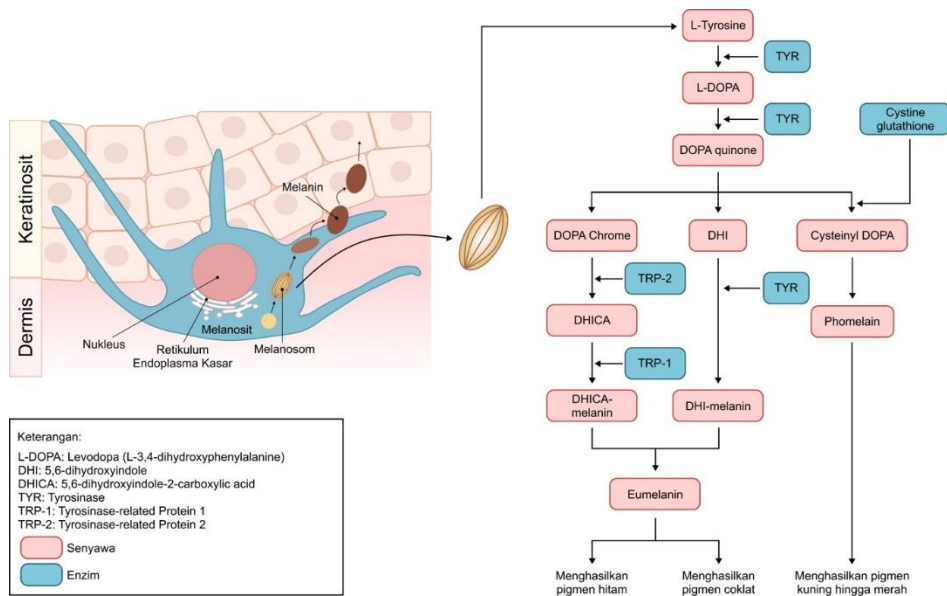
1.5.2.7 Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi merupakan kondisi kelainan pada kulit yang ditandai dengan peningkatan produksi pigmen melanin secara berlebihan sehingga menyebabkan warna kulit menjadi lebih gelap (Pratiwi et al., 2021). Kondisi ini dapat dipicu oleh berbagai faktor, antara lain paparan radiasi sinar ultraviolet (UV), proses inflamasi, perubahan hormonal, maupun penggunaan obat-obatan tertentu (Pannindriya, 2021). Penanganan hiperpigmentasi dapat dilakukan dengan menggunakan agen antihiperpigmentasi yang bekerja dengan cara menghambat proses biosintesis melanin (Pratiwi et al., 2021). Melanin merupakan pigmen biologis yang berperan dalam menentukan warna kulit serta memiliki fungsi protektif terhadap kerusakan kulit akibat radiasi ultraviolet. Selain itu, melanin juga berperan dalam proses detoksifikasi dengan membantu menetralkan senyawa kimia yang bersifat toksik (Jayanti et al., 2022).

Upaya untuk mencegah terjadinya produksi melanin yang berlebihan dapat dilakukan melalui penghambatan aktivitas enzim tirosinase. Kehadiran inhibitor tirosinase akan menghambat reaksi enzimatik yang dikatalisis oleh enzim tersebut. Tirosinase merupakan enzim kunci dalam proses pembentukan melanin, sehingga penghambatan aktivitasnya dapat menjadi strategi efektif dalam mencegah dan mengurangi terjadinya hiperpigmentasi pada kulit. Enzim ini berfungsi mengkatalisis reaksi hidroksilasi L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) yang selanjutnya dioksidasi menjadi dopakuinon. Dopakuinon merupakan senyawa yang sangat reaktif dan dapat mengalami polimerisasi secara spontan sehingga menghasilkan pigmen melanin (Riani et al., 2023).

Proses pembentukan melanin atau melanogenesis berlangsung di dalam organ sel yang disebut melanosom. Melanogenesis diawali dengan oksidasi asam amino tirosin menjadi dopakuinon melalui aktivitas enzim tirosinase. Selanjutnya, dopakuinon dapat mengalami proses autooksidasi membentuk DOPA dan dopakrom. Senyawa DOPA juga berfungsi sebagai substrat bagi enzim tirosinase dan dapat kembali dioksidasi menjadi dopakuinon. Melanin yang dihasilkan dalam melanosom secara umum terbagi menjadi dua jenis utama, yaitu eumelanin dan feomelanin. Eumelanin merupakan polimer yang bersifat tidak larut dan memberikan warna cokelat hingga hitam pada jaringan kulit. Sementara itu, feomelanin merupakan polimer yang relatif lebih larut dan memberikan warna kuning hingga kemerahan pada kulit. Melanin merupakan pigmen biologis yang terbentuk melalui serangkaian reaksi oksidasi dan polimerisasi yang kompleks. Eumelanin dihasilkan melalui proses oksidasi senyawa dihidroksiindol (DHI) dan dihidroksiindol-2-karboksilat (DHICA), yang merupakan produk turunan dari dopakrom. Sementara itu, feomelanin terbentuk

dari dopakuinon yang selanjutnya bereaksi dengan asam amino yang mengandung sulfur, seperti sistein atau glutathion, menghasilkan senyawa antara berupa cysteinyl-DOPA atau glutathionyl-DOPA. Komposisi melanin pada individu dengan warna kulit lebih gelap umumnya didominasi oleh eumelanin dengan jumlah feomelanin yang relatif lebih rendah (Putri et al., 2018).



Gambar 3. Jalur Biosintesis Melanin (Diadaptasi dan dimodifikasi dari Ferreira et al, (2023), di bawah lisensi Creative Commons Attribution, CC-BY-4.0)

Proses biosintesis melanin diawali dari asam amino tirosin yang dikatalisis oleh enzim tirosinase (TYR) menjadi 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA). Senyawa L-DOPA kemudian mengalami oksidasi lebih lanjut oleh enzim yang sama menjadi dopakuinon. Dopakuinon selanjutnya dapat mengalami siklisasi spontan membentuk leukodopakrom, yang kemudian teroksidasi menjadi dopakrom. Dopakrom dapat dikonversi menjadi dua jalur utama, yaitu pembentukan 5,6-dihidroksiindol (DHI) atau 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilat (DHICA). Reaksi ini melibatkan enzim tirosinase-related protein (TRP), khususnya TRP-2 dan TRP-1. Senyawa DHI dan DHICA selanjutnya mengalami proses oksidasi dan polimerisasi membentuk pigmen eumelanin.

Pada jalur alternatif, dopakuinon dapat berikatan dengan senyawa yang mengandung gugus tiol seperti sistein atau glutathion sehingga membentuk cysteinyl-DOPA. Senyawa ini kemudian mengalami beberapa tahap reaksi lanjutan yang menghasilkan benzotiazina intermediates, seperti 5-hidroksi-1,4-benzotiazinalanin (HBTA), yang pada akhirnya akan membentuk pigmen feomelanin. Interaksi antara jalur eumelanin dan feomelanin menghasilkan variasi pigmen yang dikenal sebagai mixed-melanin. Berbagai penelitian melaporkan bahwa sejumlah senyawa sintetis mampu menghambat aktivitas enzim tirosinase serta proses

melanogenesis pada melanosit, contohnya merkuri dan hidrokuinon. Namun demikian, penggunaan senyawa tersebut dalam jangka panjang berpotensi menimbulkan efek samping yang berbahaya bagi kesehatan kulit. Oleh sebab itu, pengembangan senyawa bioaktif yang berasal dari bahan alam menjadi alternatif yang lebih aman sebagai agen penghambat tirosinase (Rauf et al., 2020).

Senyawa alami yang diketahui memiliki potensi sebagai inhibitor tirosinase antara lain golongan flavonoid dan senyawa fenolik. Flavonoid dapat menekan proses melanogenesis melalui penghambatan langsung terhadap aktivitas enzim tirosinase. Mekanisme penghambatan ini umumnya bersifat kompetitif terhadap substrat enzim. Selain itu, senyawa fenolik juga memiliki kemampuan sebagai agen pengkelat ion tembaga (Cu^{2+}). Ion Cu^{2+} berperan sebagai kofaktor penting pada enzim tirosinase yang membantu proses pengikatan substrat pada sisi aktif enzim. Apabila kofaktor tersebut terkelasi atau terlepas dari enzim, maka kemampuan tirosinase dalam mengikat substrat akan menurun sehingga proses pembentukan melanin dapat terhambat.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini diawali dengan pendekatan *in vitro* guna mengevaluasi efektivitas penghambatan enzim tirosinase pada ekstrak daun Paliasa, setelah itu dilakukan uji LC-HRMS dimana untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat pada daun paliasa. Selanjutnya uji *in silico* dengan menggunakan perangkat lunak berbasis jaringan dan aplikasi web untuk memprediksi potensi senyawa aktif dalam ekstrak daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) sebagai inhibitor enzim tirosinase.

2.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia, kimia farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang beralamat di Jalan Perintis Kemerdekaan Km. 10 Tamalanrea, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi Selatan pada bulan Mei-Juli 2025.

2.3 Alat dan Bahan

2.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras berupa Komputer dengan spesifikasi Processor AMD Ryzen7 5800 X 8-core, CPU @ 3.80 GHz, RAM 32.0 GB, Windows 11 Pro 64-bit Operating system, and NVIDIA Graphics Driver 560.94. The software used was Software Tools, UCSF Chimera, Yasara Structure, and pkCSM Online Tools. UCSF Chimera, BIOVIA Discovery Studio Visualizer, Yasara Structure, a set of LC-HRMS, Autodock Vina tools, Marvin Sketch, Chimera, Discovery Studio 2016, and Microsoft Excel. Alat-alat gelas (Pyrex®), Rotary vacuum evaporator, neraca analitik (Sartorius®), microplate reader, ELISA reader, pipet mikro, timbangan analitik (*Ohaus*®) dan spuit (*OneMed*®)

2.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Etanol 96% Pro Analysis, etil asetat, n-heksan, butanol, larutan DMSO, L-DOPA, Tirosinase kit, buffer fosfat dan isolat ekstrak daun paliasa. struktur kompleks enzim tirosinase (PDB ID: 2Y9X dan 5CE9), struktur kompleks enzim Elastase (PDB ID: 1BRU), <https://www.rcsb.org/structure/1BRU> struktur kompleks enzim Tirosinase (yang diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) Data yang digunakan adalah protein target yang diperoleh dari Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). Protein target dalam penelitian ini yaitu enzim tirosinase <https://www.rcsb.org/structure/2Y9X> dan (PDB ID: 5CE9) <https://doi.org/10.2210/pdb5CE9/pdb>. Selain itu juga digunakan data ligan berupa senyawa-senyawa pada ekstrak daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) berupa struktur tiga dimensi.

2.4 Prosedur Kerja

2.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel daun Paliasa diperoleh dari daerah Rompegading, Kabupaten Maros, identifikasi karakteristik daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) berukuran panjang 10-15 cm dan lebarnya antara 5,8 cm. Sampel kemudian disortasi basah dan dicuci secara berulang menggunakan air mengalir untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada sampel. Selanjutnya dilakukan perajangan, sampel daun Paliasa dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 2 × 24 jam. lalu dilakukan penghalusan sampel menggunakan blender merek Philips dan dilakukan pengayakan dengan menggunakan ayakan nomor mesh 20/100 sehingga dihasilkan simplisia daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.). Setelah itu, dilakukan profiling KLT untuk membandingkan komponen senyawa pada tiap ekstrak. Jarak antar noda (nilai Rf) dihitung menggunakan rumus berikut.

$$Rf = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak eluen}}$$

Analisis menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan dengan menggunakan pelat silika gel GF254 yang berukuran 6 cm × 1 cm sebagai fase diam. Sebelum digunakan dalam proses analisis, pelat tersebut terlebih dahulu diaktivasi melalui pemanasan di dalam oven pada suhu 100 °C selama 60 menit dengan tujuan menghilangkan kandungan air yang terdapat pada permukaan pelat. Setelah proses aktivasi selesai, dibuat garis batas pada bagian bawah dan atas pelat dengan jarak masing-masing sekitar 1 cm sebagai penanda posisi penotolan sampel dan batas pergerakan eluen.

Untuk pemisahan digunakan fase gerak berupa campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 7:3. Fase gerak terlebih dahulu dimasukkan ke dalam chamber hingga tercapai kondisi jenuh. Selanjutnya, pelat KLT yang telah diberi totolan sampel ditempatkan secara tegak di dalam chamber yang berisi eluen tersebut. Selama proses elusi, eluen akan bergerak naik melalui lapisan silika gel akibat gaya kapiler sambil membawa komponen senyawa yang terdapat pada sampel sehingga terjadi proses pemisahan. Pengembangan dihentikan ketika pelarut telah mencapai garis batas atas yang telah ditentukan. Setelah itu, pelat diangkat dari chamber dan dibiarkan hingga kering.

Bercak hasil pemisahan kemudian diamati menggunakan lampu ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Untuk memperjelas visualisasi senyawa flavanoid, pelat KLT disemprot menggunakan pereaksi vanilin-asam sulfat (H₂SO₄) dan selanjutnya dipanaskan pada suhu 110 °C selama 10 menit sehingga muncul warna atau fluoresensi khas. Setiap bercak yang terbentuk selanjutnya dihitung nilai faktor retensinya (Rf) dan dibandingkan dengan nilai Rf senyawa standar.

2.4.2 Determinasi Sampel

Penentuan identifikasi sampel paliasa digunakan melalui proses determinasi di

Laboratorium Farmakognosi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin dengan No. surat: 004/SKIT/Farmakognosi/V/2025. Hasil kunci determinasi: 94. *Malvaceae*, 1b...,6a..., 7b...,9b (14.Kleinhovia), Sampel yang di analisis teridentifikasi sebagai *Kleinhovia hospita* L. yang termasuk dalam famili *Malvaceae*.

2.5 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase

Uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase dilakukan menggunakan metode kolorimetri dengan mengukur pembentukan dopakrom, suatu senyawa berwarna merah kecoklatan yang dihasilkan dari oksidasi L-tirosine atau L-DOPA dalam sistem enzimatik tirosinase. Proses ini penting dalam penelitian inhibitor tirosinase, terutama untuk pengembangan agen depigmentasi dalam bidang kosmetik dan farmasi (Kim & Uyama, 2005).

Ekstrak uji awalnya dilarutkan dalam DMSO, kemudian diencerkan menggunakan buffer fosfat pH 6,8. Substrat yang digunakan adalah L-DOPA dengan konsentrasi 1 mmol/L. Enzim tirosinase disiapkan dengan cara melarutkannya dalam buffer fosfat (pH 6,8) dengan konsentrasi 0,05M hingga mencapai aktivitas 2 μ L/mL. Sebanyak 10 mg masing-masing ekstrak daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) yaitu ekstrak etanol, n-heksan, etil asetat dan n-butanol, ditimbang. Larutan stok disiapkan dengan melarutkan ekstrak ke dalam 200 μ L dimetil sulfoksida (DMSO) kemudian ditambahkan 800 μ L larutan dapar. Larutan stok ini dihomogenkan menggunakan vortex agar ekstrak tercampur dengan merata (Zolghadri et al., 2019).

Selanjutnya, dilakukan pengenceran bertingkat untuk memperoleh konsentrasi akhir 1250, 625, 312,5, dan 156,25, 78,125, 39,0625ppm. Pengenceran dilakukan secara serial dengan mengambil 500 μ L dari konsentrasi sebelumnya hingga mencapai konsentrasi terendah. Masing-masing larutan kemudian dipipet ke dalam sumur mikrotiter plate 96 well sesuai kelompok perlakuan (Chang, 2009).

Pengujian dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu:

1. Kelompok blangko: terdiri atas 100 μ L larutan dapar, 60 μ L enzim tirosinase, dan 40 μ L substrat L-Dopa.
2. Kelompok sampel: terdiri atas 50 μ L larutan ekstrak, 60 μ L enzim tirosinase, dan 40 μ L substrat L-Dopa.
3. Kelompok kontrol: terdiri atas 150 μ L larutan dapar dan 50 μ L ekstrak tanpa substrat.

Reaksi enzimatik yang terbentuk diukur menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 490 nm untuk menentukan nilai absorbansi. Hasil pengukuran kemudian dianalisis untuk menghitung persen inhibisi aktivitas tirosinase. Selanjutnya, nilai IC₅₀ masing-masing ekstrak ditentukan berdasarkan hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan persen inhibisi (Masuda et al., 2005; Solano et al., 2006). Aktivitas anti tirosinase dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{[A - (B - C)]}{A} \times 100\%$$

A: Absorbansi blangko (enzim+substrat)

B: Absorbansi sampel + enzim + substrat

C: Absorbansi sampel Kontrol (Sampel + dapar)

Aktivitas penghambatan tirosinase kemudian ditunjukkan sebagai IC₅₀

2.6 Identifikasi Profil Metabolit Dengan LC-HRMS

Hasil skrining ekstrak etil asetat di analisis dengan LC-HRMS (Coorpora Yogyakarta) senyawa bioaktif pada ekstrak etail asetat daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) Sebanyak 5 mg sampel di encerkan dalam 1000 µL metanol HPLC-Grade kemudian dihomogenkan menggunakan vortex (Thermo Scientific) selama 1 menit metabolomik dilakukan menggunakan sistem *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) Thermo Scientific™ Vanquish™ yang dipasangkan dengan spektrometer massa resolusi tinggi Thermo Scientific™ Orbitrap™ Exploris 240 HRMS (Bremen, Jerman). Sampel daun paliasa yang telah diekstraksi dengan metanol grade HPLC dipersiapkan melalui homogenisasi, ultrasonikasi, sentrifugasi, dilusi, serta filtrasi menggunakan membran nilon 0,2 µm sebelum diinjeksi ke instrumen.

Prosedur Pemisahan kromatografi dilakukan pada kolom Thermo Scientific™ Accucore™ Phenyl Hexyl (100 mm × 2,1 mm ID, 2,6 µm particle size) dengan fase gerak berupa campuran air yang mengandung 0,1% asam format (fase pelarut A) H₂O (MS Grade) dan asetonitril dengan 0,1% asam format (fase pelarut B) asetonitril MS Gradien elusi dimulai dari 5% fase B, meningkat hingga 90% dalam 16 menit, dipertahankan selama 4 menit, kemudian dikembalikan ke kondisi awal hingga total waktu analisis runtime 25 menit. Laju alir ditetapkan sebesar 0,3 mL/menit, suhu kolom dijaga pada 40 °C, dan volume injeksi sampel adalah 5 µL.

Deteksi senyawa dilakukan dengan ionisasi electrospray (H-ESI) pada mode positif dan negatif. Rentang pemindaian massa adalah 70–800 m/z dengan resolusi tinggi, sementara fragmentasi ion dilakukan dengan energi tumbukan normalisasi pada beberapa tingkat. Data spektrum massa yang diperoleh dianalisis menggunakan perangkat lunak Compound Discoverer 3.3 dengan pencocokan terhadap basis data MzCloud, MassList, dan ChemSpider. Identifikasi senyawa didasarkan pada kecocokan spektrum massa dengan toleransi kesalahan massa ≤ ±5 ppm (Supriadi et al., 2025).

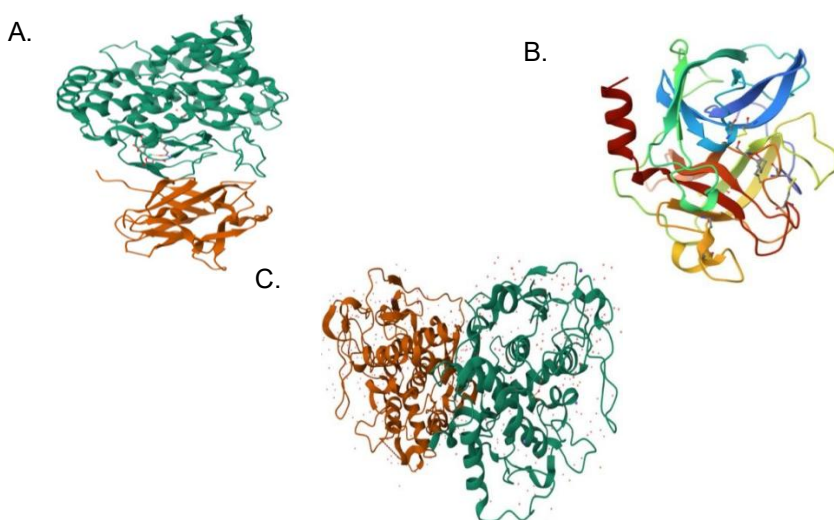
2.7. Analisis *In Silico* Senyawa Daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.)

2.7.1. Molecular Docking

Untuk mengevaluasi mekanisme penghambatan, *molecular docking* dilakukan pada struktur kompleks enzim Tirosinase (PDB ID:2Y9X), (PDB ID:5CE9) struktur kompleks enzim Elastase (PDB ID: 1BRU) yang diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB). Tahap preparasi dilakukan menggunakan perangkat lunak Chimera untuk menyiapkan protein dan ligan dengan menggunakan fitur Dockprep. Protokol docking diatur dalam ukuran kotak yang sebelumnya ditentukan dalam program AutoDock Vina (Morris et al., 2009). Algoritma Lamarckian digunakan dan diatur untuk menghasilkan 9 konformasi. Visualisasi interaksi dilakukan dalam program Discovery Studio Visualizer. Struktur ligan dan protein dimasukkan ke UCSF-Chimera® yang terhubung dengan Autodock Vina untuk melakukan *molecular docking*. Selanjutnya

dilakukan proses *docking* dengan menentukan *grid-box* dan direktori penyimpanan file melalui menu Autodock Vina (Nugraha, 2023). *Grid-box* dibangun mengelilingi kantong pengikat pada setiap protein untuk mendapatkan posisi dan ukuran *grid-box* untuk docking lokal. Faktor-faktor yang mempengaruhi pengikatan ligan dianalisis oleh *molecular docking* di Autodock Vina, yang diperluas ke UCSF-Chimera® (Amengor et al., 2024). Untuk memastikan konsistensi, setiap percobaan *docking* dilakukan dalam empat proses teknis. Dalam setiap putaran, Autodock Vina menghasilkan sembilan peringkat postur berdasarkan energi pengikatnya. Pemilihan posisi terbaik ditentukan dengan mengevaluasi energi pengikatan ligan dan kemampuan ligan dalam membentuk interaksi optimal dengan residu asam amino protein target. Verifikasi *molecular docking* dilakukan dengan *re-docking* ligan alami dan menghitung RMSD ligan hasil re-docking menggunakan PyMOL (Amengor et al., 2024). Terakhir, menganalisis hasil *docking* yaitu skor energi bebas ikatan dan interaksi ligan-reseptor. Adapun visualisasi interaksi ligan-reseptor dianalisis menggunakan perangkat lunak Discovery Studio (Nugraha, 2023).

Struktur ligan berupa senyawa yang terdapat pada ekstrak daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) Terlebih dahulu dilakukan preparasi ligan pada Chimera 1.18 pada menu *dock-prep* dimana struktur senyawa-senyawa tersebut diunduh dari pubchem dengan memasukkan kode SMILES Sementara untuk reseptor (Protein target) berupa enzim tirosinase (**Gambar 2**) diunduh pada *Protein Data Bank* (PDB) <https://www.rcsb.org/structure/2Y9X>), (<https://www.rcsb.org/structure/1BRU>), (<https://doi.org/10.2210/pdb5CE9/pdb>) serta enzim elastase dipreparasi terlebih dahulu pada menu *dock-prep*. Tahap selanjutnya dengan menentukan gridbox dan direktori penyimpanan file dan *molecular docking* melalui menu Autodock Vina. Sementara untuk visualisasi menggunakan aplikasi Discovery Studio.



Gambar 4. Struktur 3D Senyawa Enzim Tirosinase (A) (PDB 2Y9X), (B), Struktur 3D Enzim Elastase (PDB 5CE9) (C) Enzim Elastase (PDB 1BRU)

2.7.2 Analisis Hasil Simulasi Penambatan Molekuler

Analisis hasil penambatan molekuler kemudian dilanjutkan dengan proses identifikasi dan evaluasi terhadap pola interaksi yang terjadi antara makromolekul enzim tirosinase maupun elastase dengan senyawa uji, yang ditentukan berdasarkan nilai energi bebas ikatannya. Residu asam amino yang berkontribusi dalam pembentukan interaksi tersebut selanjutnya diobservasi dan dipetakan menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio, sehingga karakteristik ikatan dan stabilitas kompleks ligan–reseptor dapat dianalisis secara lebih mendalam (Priani & Fakih, 2021).

2.7.3 Molecular Dynamic

Stabilitas kompleks dari hasil konformasi terbaik pada tahap penambatan molekul dianalisis lebih lanjut menggunakan simulasi dinamika molekuler pada perangkat lunak YASARA Structure (YASARA Bioscience GmbH, Wina, Austria) (Land & Humble, 2018). Medan gaya yang digunakan adalah Amber14 dalam kondisi batas periodik (Wang et al., 2004). Kompleks diatur pada suhu 310 K dan pH 7,4. Pelarut TIP3P dan counterion (Na^+ , Cl^-) ditambahkan untuk menetralkan sistem. Kemudian, sistem dijalankan selama 100 ns pada rentang waktu 0,25 fs. Data lintasan dikumpulkan setiap 25 ps dan digunakan untuk menganalisis *Root Mean Square Deviation* (RMSD), *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF), dan *Radius of Gyration* (RG).

2.8. Prediksi Profil Absorpsi dan Toksisitas Senyawa

Prediksi profil absorpsi toksisitas senyawa daun paliasa dihitung dipkCSM® (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>) dengan menginput *file* struktur dalam format Canonical SMILES (Aswad et al., 2024). Selanjutnya dilakukan analisis bioavailabilitas menggunakan *rules of 5 Lipinski* dan profil farmokinetik-toksisitas berdasarkan parameter-parameter yang dihasilkan (Nugraha, 2023).

Prediksi profil absorpsi dan toksisitas senyawa dalam ekstrak daun paliasa analisis profil absorpsi dan toksisitas senyawa dalam ekstrak daun Paliasa dilakukan untuk memahami sifat fisikakimia senyawa aktifnya. Parameter yang dianalisis meliputi kelarutan, lipofilisitas, permeabilitas kulit, serta potensi toksisitas seperti skin sensitization. Prediksi Absorpsi dan toksisitas, skin sensitization dilakukan menggunakan perangkat lunak berbasis komputasi dengan menggunakan pkCSM *OnlineTools*. Pendekatan ini dilakukan dengan memasukkan kode SMILES dari setiap senyawa ke dalam perangkat prediksi tersebut. Data yang diperoleh memberikan gambaran menyeluruh mengenai potensi absorpsi dan toksisitas senyawa, yang sangat penting dalam menentukan formulasi optimal ekstrak daun paliasa untuk aplikasi dalam produk kosmetik topikal. Evaluasi ini bertujuan memastikan keamanan dan efektivitas ekstrak dalam perannya sebagai agen pemutih kulit dan agen anti-aging (Pires et al., 2015)