



CURRENT BIOCHEMISTRY

ISSN: 2355-7877

e-ISSN: 2355-7931

Journal homepage: <http://journal.ipb.ac.id/index.php/cbj>

Journal E-mail: current.biochemistry@apps.ipb.ac.id

CB Current
Biochemistry

In Silico Analysis of Active Compounds of Avocado Fruit (*Persea americana* Mill.) as Tyrosinase Enzyme Inhibitors

(Analisis *In Silico* Senyawa Aktif pada Alpukat (*Persea americana* Mill.) sebagai Inhibitor Enzim Tirosinase)

Puspa Julistia Puspita^{1*}, Ni Putu Peggy Liliyani¹, Laksmi Ambarsari¹

¹Department of Biochemistry, IPB University, Bogor, 16680, Indonesia

Received: 15 June 2022 ; Accepted: 13 November 2022

Corresponding author : Puspa Julistia Puspita, Departemen Biokimia FMIPA IPB;
e-mail: puspajulistia@gmail.com

ABSTRACT

Avocado is a plant in which almost all the pieces have the potential as herbs. The high phenolic and flavonoid content on the leaves, seeds and skin of avocado has the potential as a tyrosinase-related protein-1 inhibitor. This enzyme is involved in the formation of melanin related to the pigmentation process in the skin. This study attempts to analyze the potential of the active compounds from leaves, seeds, and skin of avocado that play a role in inhibiting tyrosinase activity. The research methods employed include is virtual screening, bioavailability and toxicity test, molecular docking by YASARA structure and 3D visualization by Discovery Studio Visualizer. The results showed that out of 68, 11 active compounds of avocado leaves, seeds, and skins had a binding affinity for tyrosinase-related protein-1, namely quercetin, epicatechin, apigenin, 3-hydroxytyrosol, scopoletin, abscisic acid, citric acid, coumaric acid, quinic acid, vanillin, and caffeic acid. Coumaric acid was ligand with the best potential inhibition found in leaves and bark of avocado with an energy affinity of -2,545 kcal/mole. Abscisic acid was ligand with the best potential inhibition of TYRPI, which was found in seeds of avocado with an energy affinity of -2.645 kcal/mole interacts with 17 amino acid residues.

Keywords: Avocado, Inhibitor, Melanin, Molecular Docking, Tyrosinase.

ABSTRAK

Alpukat adalah tanaman yang hampir semua bagiannya memiliki potensi sebagai herbal. Kandungan fenolik dan flavonoid yang tinggi pada daun, biji dan kulit buah alpukat memiliki potensi sebagai inhibitor tyrosinase related protein-1. Enzim ini berperan dalam pembentukan melanin yang berkaitan dengan proses pigmentasi pada kulit. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis potensi senyawa aktif dari daun, biji, dan kulit buah alpukat yang berperan dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase. Metode penelitian ini yaitu penapisan virtual, uji bioavailabilitas dan toksisitas, penambatan molekul dengan YASARA Structure, dan visualisasi 3D menggunakan Discovery Studio. Hasil penelitian menunjukkan dari 68 senyawa aktif daun, biji, dan kulit buah alpukat terdapat 11

senyawa aktif yang memiliki afinitas pengikatan yang baik terhadap tyrosinase related protein-1 yaitu kuersetin, epikatekin, apigenin, 3-Hydroxytyrosol, scopoletin, asam absisat, asam sitrat, asam kumarat, asam kuinik, vanillin, dan asam kafeik. Asam kumarat merupakan ligan uji dengan potensi inhibisi terbaik yang terdapat pada daun dan kulit buah alpukat dengan energi afinitas sebesar -2,545 kkal/mol, dan asam absisat merupakan ligan dengan potensi inhibisi TYRP1 terbaik yang terdapat pada biji alpukat sebesar -2.645 kkal/mol yang berinteraksi dengan 17 residu asam amino.

Kata kunci: Alpukat, Inhibitor, Melanin, Penambatan Molekuler, Tيروسinase

1. PENDAHULUAN

Alpukat (*Persea americana* Mill.) merupakan tanaman berbentuk pohon yang berasal dari Amerika Tengah dan Meksiko. Tanaman ini dapat tumbuh di wilayah tropis dan subtropis (Achmad dan Sugiarto, 2020). Biji, kulit, dan daun alpukat merupakan bagian tanaman alpukat yang tidak dapat dikonsumsi sehingga jarang dimanfaatkan dan berakhir sebagai limbah. Menurut Malangngi *et al.* (2012) biji alpukat memiliki kandungan senyawa polifenol, flavonoid, triterpen, kuinon, tanin, monoterpenoid dan seskuioterpenoid yang dapat menjadi sumber antioksidan penangkal radikal bebas. Daun alpukat juga memiliki kandungan senyawa aktif yang tinggi, menurut Irawati (2015) bahwa daun alpukat mengandung senyawa flavonoid, tanin katekat, kuinon, saponin, steroid/ triterpenoid, alkaloid dan fenol. Kulit buah alpukat memiliki kandungan senyawa aktif yang tak kalah melimpah dari biji dan daunnya. Kulit buah alpukat mengandung senyawa flavonoid, karotenoid, vitamin C, dan Vitamin E yang tinggi (Vinha *et al.* 2013).

Kandungan senyawa flavonoid yang cukup tinggi pada biji, daun, dan kulit buah alpukat dapat digunakan sebagai bahan aktif yang mampu mencerahkan kulit. Kulit yang sering terpapar sinar matahari dapat membuat kulit menjadi kusam dan lebih gelap dikarenakan terbentuknya melanin. Bahkan paparan berulang dari sinar UV dapat mengaktifkan sintesis melanin di kulit manusia. Sinar UV

menginduksi terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat membuat tubuh menghasilkan hormon α -melanosit (α -MSH), selanjutnya α -MSH menginduksi peningkatan regulasi enzim pembatas (*rate limiting enzyme*) untuk sintesis melanin di melanosit (Chatatikun *et al.* 2020).

Tirosinase merupakan metaloenzim dari golongan polifenol oksidase, secara genetik berlokasi di dalam kromosom nomor 11. Tirosinase terdapat pada berbagai organisme dan memiliki fungsi spesifik dalam melanogenesis (Da Silva *et al.* 2017). Melanogenesis merupakan proses sintesis atau pembentukan melanin pada kulit. Produksi melanin dalam melanosit dipicu oleh berbagai faktor fisiologis, seperti enzim melanosom dan pengatur melanogenik. Produksi pigmen pada sel melanoma murine umumnya diatur oleh komponen enzimatik melanosom, seperti tirosinase, *tyrosinase related protein-1*, dan tautomerase dopachrom. Faktor lingkungan seperti paparan sinar matahari meningkatkan aktivitas enzim tirosinase sehingga meningkatkan produksi melanin yang dapat mempengaruhi pigmentasi kulit dan penimbunannya di dalam keratinosit menyebabkan kulit mencoklat (*tanning*) (Kurniasari *et al.* 2018). Sehingga produk kosmetik yang sering digunakan adalah yang mampu melindungi kulit dari paparan sinar UV dan meningkatkan kecerahan kulit (Randhawa *et al.* 2015).

Kosmetika yang beredar dipasaran saat ini masih banyak yang mengandung bahan-bahan kimia berbahaya yang dapat menimbulkan efek samping, seperti mengelupas, tipis, iritasi dan timbul rasa terbakar atau gangguan kesehatan bagi penggunaanya (Dominika dan Hasyim 2019; Herlina dan Vestabilivy 2019). Oleh karena itu diperlukan senyawa aktif yang mampu menjadi inhibitor tirosinase yang aman dan efektif dalam mengurangi produksi melanin pada kulit sehingga dapat mencerahkan warna kulit. Pengujian potensi senyawa aktif dari alpukat terhadap tirosinase dilakukan melalui simulasi penambatan molekular. Menurut Giantari *et al.*, (2019) melalui simulasi penambatan molekular, katekin dapat dengan baik menghambat aktivitas tirosinase. Adnyani *et al.*, (2019) juga melakukan simulasi penambatan molekular senyawa kuersetin terhadap tirosinase dan menyatakan bahwa kuersetin dapat dengan baik menghambat enzim tirosinase. Sehingga, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi setiap senyawa bioaktif dari biji, daun, dan kulit buah alpukat dengan menganalisis interaksi molekular senyawa dengan enzim tirosinase

2. METODOLOGI

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak YASARA *Structure* Ver.19.9.17, Ligplot+ 4.3.5, *Discovery Studio Visualizer* dan PyMOL untuk visualisasi interaksi antara ligan dengan reseptor. Bahan-bahan yang digunakan yaitu struktur tiga dimensi enzim tirosinase manusia yang diperoleh dari basis data *RCSB Protein Data Bank* dengan kode PDB (*Protein Data Bank*) 5M8M. Struktur ini memiliki resolusi 2.65 Å dan telah terdapat struktur kristalografinya. Ligan uji yang digunakan yaitu struktur tiga dimensi 68 senyawa aktif dari daun, biji, dan kulit buah alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan format .sdf, yang diperoleh dari basis data *PubChem*. Ligan alami

yang digunakan merupakan ligan yang tertambat *human tyrosinase* 5M8M yaitu asam kojat.

Preparasi Reseptor (Mulatsari *et al.* 2019)

Struktur tirosinase 5M8M diunduh pada situs basis data *RCSB Protein Data Bank* www.rcsb.org/pdb dipilih tirosinase yang memiliki resolusi kristalogi kurang atau sama dengan 2.5 Å dan stabil dalam bentuk struktur 3D. Reseptor 5M8M.pdb kemudian di *load* dari file pdb ke YASARA. Struktur 3D tirosinase 5M8M kemudian dibersihkan dari molekul air. Hapus ligan asli dan hapus bagian dari struktur yang tidak terlibat dalam *docking* sehingga hanya tersisa protein target dengan sisi aktif (*pocket*) untuk berikatan dengan senyawa uji. Kemudian dilakukan penambahan hidrogen dengan cara (*Edit>Add>Hydrogen to : all*). Struktur tersebut disimpan dalam bentuk format PDB.

Preparasi Struktur Ligan dan Analisis Stabilitas Ligan (Modifikasi Farhan 2019)

Preparasi struktur ligan uji dilakukan menggunakan perangkat lunak YASARA *Structure*. Seluruh ligan diunduh dalam struktur tiga dimensi dengan format .sdf melalui database PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> kemudian disimpan dalam bentuk format PDB menggunakan perangkat lunak YASARA *Structure*.

Hasil preparasi tersebut kemudian dioptimasi geometri ligan dengan membuat simCELL kemudian ditambahkan molekul air. Setelah itu, pilih menu *Option* kemudian pilih *Macro & Movie* lalu pilih *Play Macro* dan *browse 'em_runclean.mcr'* lalu pilih OK dan tunggu hingga proses optimasi geometri selesai. File ligan kemudian disimpan ke dalam format PDB.

Validasi Metode Penambatan Molekuler (Modifikasi Aswad et al. 2020 dan Farhan 2019)

Ligan alami asam kojat (KOJ 514) yang menempel pada struktur *tyrosinase related protein-1* dipisahkan terlebih dahulu dan dipreparasi. Setelah itu dilakukan penambatan molekuler terarah dengan aturan ukuran *gridbox* 90° dan koordinat x,y,dan z masing-masing 3.8 Å dengan spasi 1.0 Å. Selanjutnya, dilakukan *running docking* untuk validasi *gridbox* dan kemudian dilakukan perhitungan RMSD (*Root Mean Square Deviation*) menggunakan perangkat lunak YASARA Structure.

Penapisan Virtual dan Uji bioavailabilitas (Dallakyan dan Olson 2015)

Semua ligan yang telah dipreparasi disimpan dalam format (.PDB). Selanjutnya ligan uji dan pembanding dianalisis afinitas ikatannya menggunakan aplikasi PyRx-*Virtual Screening Tool*. Hasil prediksi selanjutnya dipilih berdasarkan besarnya nilai energi afinitas (ΔG).

Ligan-ligan tersebut kemudian diuji bioavailabilitas untuk melihat laju absorpsi zat aktif dalam tubuh berdasarkan aturan Lipinski meliputi lima parameter yaitu massa molekul, lipofilisitas, donor ikatan hidrogen, akseptor ikatan hidrogen, dan refraksi molar melalui laman

<http://www.scfbiiitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>

Prediksi Toksisitas Ligan (Ochieng et al. 2017)

Prediksi toksisitas ligan uji dilakukan menggunakan perangkat lunak *online* Admetstar 1.0. Ligan yang akan digunakan

diunduh pada laman PubChem dalam format SMILES. Prediksi dilakukan dengan mengunggah struktur ligan pada <http://lmm.ecust.edu.cn/admetstar1/>, kemudian dioperasikan dengan memilih opsi 'Predict'. Hasil prediksi kemudian akan ditampilkan setelah beberapa saat.

Analisis Energi Afinitas dan Konstanta Inhibisi (Modifikasi Farhan 2019)

Ligan dan tirosinase reseptor yang telah dipreparasi dalam format .pdb kemudian disimpan dalam format .scene lalu dimasukkan ke dalam folder kerja. Setelah itu, pilih menu *option* kemudian pilih *Macro & Movie* lalu pilih *Play Macro* dan *browse* 'dock_runlocal.mcr' lalu pilih OK. Nilai *binding energy* yang negatif menunjukkan bahwa proses penambatan molekuler perlu diulang kembali dengan ukuran *gridbox* yang berbeda sampai didapatkan *binding energy* positif. Hasil penambatan molekuler menghasilkan nilai Energi afinitas (*binding affinity* ^{ΔG}) dan Konstanta disosiasi (Kd). Nilai energi afinitas kemudian digunakan untuk menghitung Konstanta Inhibisi (Ki).

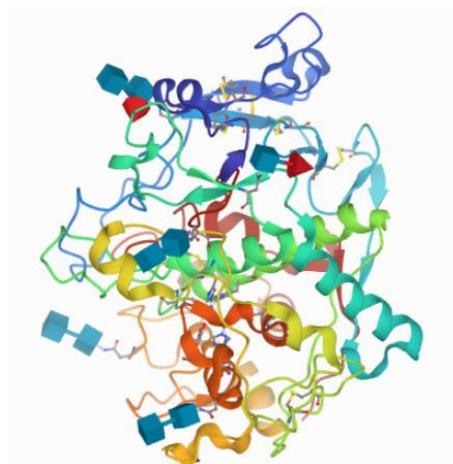
Visualisasi 3D kompleks ligan uji-reseptor dalam analisis penambatan molekuler ligan-reseptor ini ditentukan yang paling mendekati model interaksi ligan kontrol-reseptor menggunakan perangkat lunak YASARA Structure. Hasil penggabungan disimpan ke dalam bentuk format PDB kemudian dianalisis ikatan hidrogen, dan interaksi hidrofobik menggunakan perangkat lunak Ligplot+ 4.3.5., serta interaksi lainnya dengan *Discovery Studio Visualizer*.

3. HASIL

Struktur Ligan dan Kestabilan Reseptor

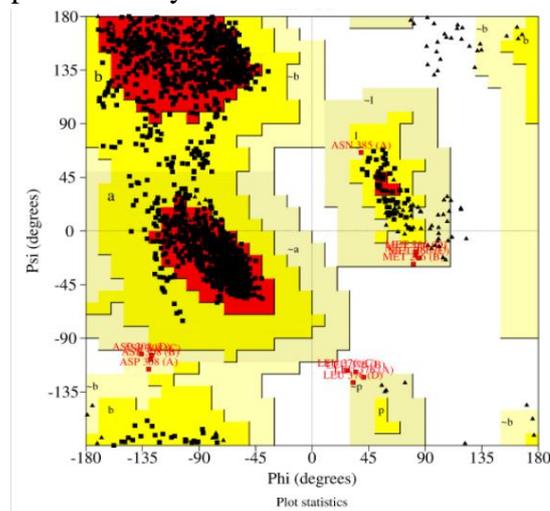
Ligan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ligan uji yang berasal dari senyawa aktif biji, daun, dan kulit buah alpukat yaitu sebanyak 68 senyawa aktif. Ligan uji diunduh dalam bentuk 3D dari laman PubChem dengan format .sdf. Ligan dipreparasi menggunakan *gridbox* berukuran 5Å. Selanjutnya ligan diminimisasi energinya dengan menambahkan molekul air. Minimisasi energi ligan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan agar mendapatkan kondisi ligan yang paling stabil.

Struktur tiga dimensi reseptor *human tyrosinase* diunduh melalui basis data *The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* <https://www.rcsb.org/structure/5M8M>, merupakan basis data yang menyimpan dan menyediakan akses data protein. Reseptor *human tyrosinase* dengan kode PDB ID 5M8M, memiliki resolusi 2.65 Å dan dengan panjang sekuens yaitu 446. Struktur tersebut merupakan struktur tersier dari enzim tirosinase pada manusia. Enzim *human tyrosinase* (Gambar 1) terdiri dari empat subunit yang sama (tetradimer). Struktur protein ini memiliki ligan yang tertambat secara alami yaitu asam kojat, dan dua atom logam Zn yang terdapat pada sisi aktif enzim. TYRP1 (*Tyrosinase Related Protein-1*) memiliki 4 domain yaitu domain peptida sinyal, domain intramelanosomal (atau luminal), domain trans-membran α -heliks dan domain sitoplasma (Lai *et al.* 2017). Residu asam amino pada sisi aktif TYRP1 yaitu Arg 374, His 377, His 381, His 404, Ser 394, His 224, His 215, His 192, Thr 391, dan Tyr 362 yang berinteraksi langsung dengan substrat yaitu L-tirosine (Lai *et al.* 2017).



Gambar 1 Struktur Reseptor 5M8M

Analisis kestabilan reseptor pada laman PROCHECK menghasilkan plot Ramachandran (Gambar 2) dengan persentase jumlah residu pada kuadran I (*most favoured regions*) sebesar 85.7% dengan 1209 residu, kuadran II (*additional allowed regions*) sebesar 13.5% dengan 204 residu, kuadran III (*generously allowed regions*) sebesar 0.7% dengan 11 residu, dan kuadran IV (*disallowed regions*) sebesar 0.1% dengan 2 residu. Sebagian besar residu berada pada kuadran I yang merupakan daerah yang disukai. Hasil plot Ramachandran juga menunjukkan terdapat residu lain seperti residu ujung sebanyak 8 residu, glisin sebanyak 124 residu, dan prolin sebanyak 136 residu.



Gambar 2 Plot Ramachandran reseptor 5M8M

Penapisan Virtual, Bioavailabilitas dan Toksisitas

Penapisan virtual merupakan tahap awal yang dilakukan untuk menyeleksi calon ligan uji (senyawa aktif) yang berasal dari biji, daun dan kulit buah alpukat dalam jumlah besar sesuai dengan parameter yang telah ditentukan. Penapisan virtual dilakukan menggunakan *software* PyRx dengan cara penentuan afinitas pengikatan ligan alami dan ligan uji pada reseptor. Pemilihan ligan uji yang berpotensi didasarkan pada kedekatan nilai energi afinitas dengan ligan alami. Ligan alami merupakan ligan (inhibitor) yang sudah tertambat langsung pada reseptor. Penapisan virtual dilakukan terhadap 68 ligan uji dari hasil studi pustaka dan ligan alami terhadap reseptor 5M8M. Ligan dari penapisan virtual kemudian dilakukan uji Bioavailabilitas dengan tujuan untuk mengetahui potensi ligan untuk dapat diserap oleh sel. Parameter yang digunakan ada 5 berdasarkan pada aturan Lipinski, yaitu berat molekul kurang dari 500 Da, Log P tidak melebihi 5, jumlah donor hidrogen kurang dari 5, jumlah akseptor hidrogen kurang dari 10, dan refraktivitas molar 40-130. Ligan hasil penapisan, bioavailabilitas kemudian digunakan untuk uji toksisitas. Uji ini dimaksudkan untuk mengetahui ligan-ligan yang berpotensi toksik apabila dikonsumsi sebagai herbal ataupun obat oral.

Hasil penapisan diperoleh energi afinitas ligan alami yaitu -5.8 kkal/mol. Sehingga dipilih ligan uji yang memiliki nilai energi afinitas yang berada pada rentang -5.6 kkal/mol - 8.9 kkal/mol. Ligan uji yang memenuhi kriteria tersebut sebanyak 49 ligan uji. Ligan uji dengan energi afinitas terendah yaitu *persin*, *tricaprylin*, dan *persenone A* sebesar -5.6 kkal/mol, dan ligan uji dengan afinitas tertinggi yaitu rutin sebesar -8.9 kkal/mol

(Data tidak ditampilkan). Uji bioavailabilitas mengeliminasi 5 ligan *Hesperidin*, *Procyanidin_B1*, *Procyanidin_B2*, *Proanthocyanidin*, dan *Rutin*. Asam kojat sebagai ligan alami sekaligus ligan pembanding dalam penelitian ini memenuhi seluruh aturan Lipinski, hal ini menunjukkan bahwa asam kojat memiliki bioavailabilitas yang baik.

Ligan-ligan yang telah memenuhi aturan Lipinski kemudian dianalisis toksisitasnya menggunakan laman analisis *online* Admetsar 1.0. Parameter yang digunakan dalam uji toksisitas ada tiga yaitu inhibisi *Human Ether-A-Go-Go Related Gene* (herG), karsinogenisitas, dan toksisitas oral akut (Data tidak ditampilkan). Hasil analisis herG menunjukkan bahwa seluruh ligan uji merupakan golongan inhibitor lemah dengan *Phorbol 12,13-dibutyrate* memiliki nilai tertinggi sebesar 0.9933 dan Vitamin K dengan nilai terendah sebesar 0.5675.

Berdasarkan hasil uji karsinogenitas, terdapat 3 ligan yang tergolong karsinogen yaitu *Tricaprylin* dengan nilai 0.5000 yang merupakan nilai terendah, *Palmityl oleate* dengan nilai 0.5589, dan *3-methylbuty* dengan nilai 0.779. Nilai tertinggi terdapat pada ligan *Phloridzin* sebesar 0.9695. Hasil analisis toksisitas oral menunjukkan bahwa terdapat dua ligan yang termasuk dalam golongan II yaitu *kaemferol* dan *kuersetin*. Sebagian besar ligan didominasi oleh golongan III dan IV, yaitu sebanyak 26 ligan pada golongan III dan 9 ligan pada golongan IV. Nilai Toksisitas Oral Akut tertinggi yaitu pada *Palmityl oleate* sebesar 0.8627, dan terendah pada ligan *Epi-dihydrophaseic_acid* dengan nilai sebesar 0.3849.

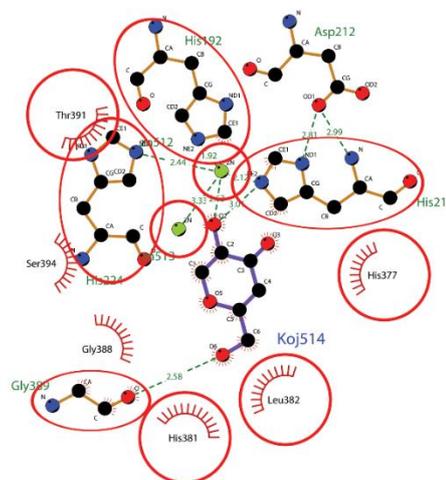
Validasi *Gridbox* dan Penambatan Molekuler

Validasi penambatan molekuler merupakan tahapan yang penting dalam penentuan ukuran *gridbox* pada reseptor 5M8M. Penelitian ini menggunakan sisi aktif reseptor 5M8M sebagai situs penambatan ligan untuk menghambat aktifitas dari enzim *tyrosinase related protein-1*. Reseptor 5M8M memiliki tiga buah ligan alami yaitu asam kojat, Zn, dan *2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose*. Asam kojat merupakan ligan (inhibitor) yang mengikat sisi aktif reseptor. Pembuatan *gridbox* didasarkan pada situs pengikatan asam kojat, Penentuan *gridbox* terbaik dibuat dari rentang 1Å - 5Å dengan beda 0.1Å pada setiap *gridbox*. Tabel 4 menunjukkan percobaan penentuan ukuran *gridbox* terbaik berdasarkan parameter energi afinitas dan RMSD. Validasi dilakukan dengan pengulangan 999 kali dan menghasilkan *gridbox* terbaik yaitu berukuran 4.0 Å dengan nilai energi afinitas sebesar 3.972 dan nilai RMSD sebesar 0.0884 Å. Selanjutnya ukuran *gridbox* ini digunakan dalam penambatan molekuler dengan *software* YASARA Structure.

Reseptor yang telah dipreparasi dan telah ditentukan situs penambatannya siap untuk dilakukan penambatan molekuler dengan ligan uji. Hasil analisis berupa *file log* yang berisi informasi tentang nilai energi afinitas, konstanta disosiasi, dan residu asam amino pada reseptor yang berinteraksi dengan ligan. Ligan dengan nilai energi afinitas yang rendah (bernilai negatif) kemudian dilakukan analisis jenis ikatan. Hasil penambatan molekuler kemudian dianalisis jenis interaksinya secara 2D menggunakan *software* Ligplot+ dan secara 3D menggunakan *software* Discovery Studio Visualizer. Visualisasi 2D menggunakan Ligplot+ dapat menampilkan

jenis ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik. Visualisasi 3D menampilkan interaksi ligan dengan residu asam amino dan ketepatan penambatan ligan pada sisi aktif reseptor.

Berdasarkan hasil penelitian terdapat sebelas ligan dengan nilai energi afinitas negatif yaitu Apigenin, Asam Kafeat, Asam Koumarat, Kuercetin, Vanilin, Asam Kuinat, Epikatekin, Asam Absisat, *Scopoletin*, dan *3-Hydroxytyrosol-3-O-glucoside*. Asam kojat sebagai ligan alami memiliki ikatan hidrogen pada asam amino His215 dengan jarak 3.01 Å dan asam amino Gly389 dengan jarak 2.58 Å (Gambar 3). Apigenin memiliki ikatan hidrogen pada asam amino Tyr362 dengan jarak 3.31 Å pada atom O2 dan 2.81 Å pada atom O1.



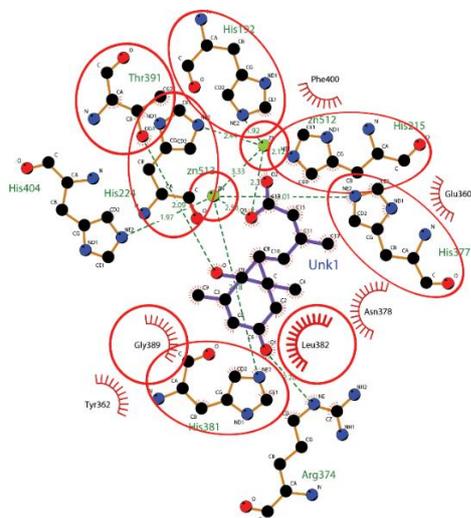
Gambar 3 Interaksi Asam Kojat

Asam Kafeat memiliki ikatan hidrogen pada dua asam amino yaitu Gly388 dengan jarak 2.93 Å dan Gly389 dengan jarak 2.49 Å. Asam Sitrat memiliki ikatan hidrogen pada asam amino Thr391 dengan jarak 3.03 Å. Asam Koumarat memiliki ikatan hidrogen pada tiga asam amino His377 dengan jarak 3.23 Å, His381 dengan jarak 2.97 Å, dan His215 dengan jarak 3.34 Å.

Ligan uji Kuercetin memiliki ikatan hidrogen pada dua asam amino yaitu

Arg321 dengan jarak 3.26 Å pada atom O1, 3.27 Å pada atom O3, dan 3.15 Å pada atom O3, dan asam amino Arg374 dengan jarak 2.42 Å. Vanilin memiliki ikatan hidrogen pada asam amino Tyr362 dengan jarak 2.48 Å. Asam Kuinik memiliki ikatan hidrogen pada asam amino Thr391 dengan jarak 2.90 Å pada atom O4 dan 2.99 Å pada atom O6 dan asam amino Tyr362 dengan jarak 2.52 Å.

Epikatekin memiliki ikatan hidrogen pada asam amino Arg321 dengan jarak 2.89 Å. Asam Absisat memiliki ikatan hidrogen pada asam amino Arg374 dengan jarak 2.28 Å, asam amino Thr391 dengan jarak 2.09 Å, atom Zn513 dengan jarak 2.50 Å dan atom Zn512 dengan jarak 2.31 Å (Gambar 4) dan pada Gambar 5 Asam absisat memiliki situs tambat yang tepat pada sisi aktif enzim. *Scopoletin* memiliki dua ikatan hidrogen pada asam amino Tyr362 dengan jarak 2.90 Å pada atom O2 dan 2.10 Å pada atom O2. *3-Hydroxytyrosol_3-O-glucoside* memiliki ikatan hidrogen pada asam amino Arg374 dengan jarak 2.87 Å. *Proanthocyanidin* memiliki interaksi hidrofobik dengan sepuluh asam amino pada sisi aktif dan berikatan hidrogen dengan salah satu residu katalitik yaitu His 215.



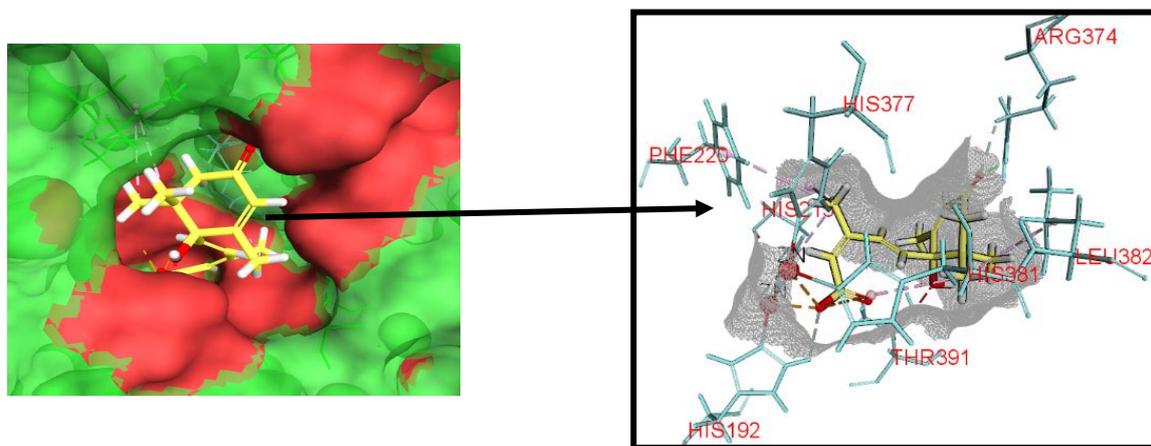
Gambar 4 Interaksi ligan Asam Absisat

Energi Afinitas dan Konstanta Inhibisi

Energi afinitas merupakan parameter penting untuk mengetahui ketepatan penambatan molekuler ligan terhadap reseptor. Energi afinitas adalah nilai yang menggambarkan kemampuan suatu ligan untuk menempel pada reseptor (energi ikatan). Terdapat 11 ligan dengan nilai energi afinitas yang baik yaitu dengan nilai paling negatif, seperti Kuersetin, Epikatekin Apigenin, *3-Hydroxytyrosol_3-O-glucoside*, *Scopoletin*, Asam Absisat, Asam sitrat, Asam Koumarat, Asam Kuinat Vanillin, dan Asam Kafeat Kuersetin merupakan ligan uji dengan energi afinitas paling negatif dengan nilai -4.974 Kkal/mol sedangkan Asam kafeik memiliki energi afinitas paling positif yaitu -0.299 Kkal/mol.

Nilai energi afinitas diperlukan untuk menghitung konstanta inhibisi (K_i) ligan uji. Konstanta inhibisi diartikan sebagai kemampuan penghambatan suatu ligan terhadap aktivitas reseptor. Nilai konstanta inhibisi berbanding lurus dengan energi afinitas. Semakin kecil nilai konstanta inhibisi (K_i) maka semakin kecil konsentrasi ligan yang diperlukan untuk dapat menghambat aktivitas enzim/reseptor. Hal ini juga berarti bahwa semakin kecil nilai K_i maka semakin kuat ikatan yang terbentuk antara ligan dan reseptor. Ligan yang memiliki energi afinitas yang lebih kecil dari ligan alami, kemudian dilanjutkan untuk dianalisis (Data tidak ditampilkan).

Kuersetin memiliki konstanta inhibisi paling kecil yaitu $2.2387 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ dan *Proanthocyanidin* memiliki nilai konstanta inhibisi paling besar yaitu $3.8552 \times 10^{104} \mu\text{M}$. Asam Kafeat dan Asam Absisat memiliki konstanta inhibisi yang cukup baik, namun nilainya lebih besar dari ligan alami asam kojat yaitu berturut-turut $6.0337 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ dan $1.1456 \times 10^{-2} \mu\text{M}$.



Gambar 5 Penambatan molekuler Asam Absisat

4. PEMBAHASAN

Senyawa aktif yang melimpah pada biji, daun, dan kulit buah alpukat seperti fenolik dan flavonoid memiliki potensi untuk menginhibisi aktivitas enzim *tyrosinase related protein 1* sehingga dapat mengurangi pembentukan melanin berlebih pada kulit (Şöhretoğlu *et al.* 2018). Potensi senyawa aktif lainnya terhadap aktivitas enzim tirosinase yang terdapat pada bagian tanaman Alpukat belum diketahui. Berdasarkan penelitian ini, sebanyak 69 ligan dari alpukat dilakukan proses penapisan virtual, bioavailabilitas, toksisitas hingga didapat 12 ligan yang berpotensi sebagai inhibitor tirosinase. Semua struktur tiga dimensi ligan diunduh pada laman <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> kemudian dipreparasi dengan menggunakan perangkat lunak YASARA *Structure*, dan dilakukan minimisasi energi pada ligan sehingga interaksi yang dihasilkan oleh ligan akan lebih stabil (Land dan Humble 2018).

Reseptor yang digunakan pada penelitian ini adalah kristal protein *human tyrosinase related protein 1* yang memiliki dua atom Zn pada sisi aktifnya dengan kode PDB ID 5M8M. Reseptor 5M8M merupakan struktur tersier dari enzim tirosinase yang telah dikristalkan. Reseptor juga merupakan

protein tetramer dengan empat subunit yaitu subunit A, B, C, D dengan fungsi yang sama.

Penelitian ini hanya menggunakan salah satu subunit yaitu subunit A dengan ligan alami yang tertambat pada reseptor yaitu asam kojat dengan resolusi struktur kristal 5M8M yaitu 2.65 Å. Resolusi reseptor yang digunakan pada penelitian ini sudah memenuhi ketentuan. Reseptor *human tyrosinase* (5M8M) yang digunakan berdasarkan hasil Ramachandran menunjukkan jumlah residu asam amino pada kuadran I (85.7 %), kuadran II (13.5 %), kuadran III (0.7%), dan kuadran IV (0.1%), ini menandakan bahwa struktur model memiliki kualitas yang stabil karena memiliki residu non glisin pada *disallowed regions* berada dibawah 15% yaitu 0.1%. Kualitas struktur protein dikatakan baik jika residu non-glisin pada daerah *outlier* lebih kecil dari 15%. Protein dengan kualitas struktur yang baik memiliki persentase residu yang berada pada daerah yang diinginkan (*favored region*) >50% dan persentase residu berada pada daerah yang dihindari (*outlier region*) <15% (Mannige *et al.* 2016).

Berdasarkan hasil penapisan virtual terdapat 49 ligan yang memiliki nilai afinitas yang mendekati afinitas asam kojat. Ligan uji tersebut terdiri dari 25 ligan yang berasal

dari biji alpukat, 13 ligan yang berasal dari daun alpukat, dan 11 ligan dari kulit buah alpukat. Asam kojat yang merupakan ligan alami digunakan pula sebagai pembanding dikarenakan asam kojat telah terbukti memiliki aktivitas sebagai inhibitor tirosinase (Hashemi dan Emami 2015). Asam kojat juga telah banyak digunakan pada produk komersil sebagai agen pencerah kulit seperti dalam krim kulit, *lotion*, sabun, dan produk perawatan gigi (Saeedi et al. 2019). Analisis bioavailabilitas ligan uji pada penelitian ini menggunakan aturan Lipinski (*Lipinski's Rule of Five*). Lipinski et al. (2001) mengatakan bahwa suatu obat memiliki penyerapan atau transport yang buruk ketika obat tersebut memiliki lebih dari 5 donor ikatan hidrogen, lebih dari 10 akseptor ikatan hidrogen, berat molekul (MWT) lebih besar dari 500 g/mol dan nilai Log P (CLogP) lebih besar dari 5 (atau MlogP. 4.15). Sebanyak 49 ligan uji yang telah melalui proses penapisan virtual, dilanjutkan dengan analisis bioavailabilitas ligan.

Berdasarkan hasil penelitian terdapat 44 jenis ligan uji yang lolos analisis bioavailabilitas dan dapat dilanjutkan untuk analisis toksisitas ligan. *Proanthocyanidin* tereliminasi karena melanggar lebih dari 2 aturan Lipinski, namun penambatan molekuler tetap dilakukan pada ligan ini dikarenakan *proanthocyanidin* merupakan senyawa aktif (ligan) dengan kemampuan sebagai antioksidan yang jumlahnya cukup banyak dalam biji dan kulit buah alpukat (Ramos-jerz et al. 2013). Zolghadri et al. (2019) dalam penelitiannya mengatakan bahwa *proanthocyanidin* dan turunannya *procyanidin* yang merupakan golongan tanin memiliki kemampuan sebagai inhibitor tirosinase. Penelitian lainnya juga membuktikan bahwa senyawa *proanthocyanidin* daun teh kulkivar

Huangjingui dan *Qilan* memiliki kemampuan yang kuat sebagai inhibitor tirosinase (Song et al. 2017).

Analisis toksisitas ligan merupakan analisis lanjutan untuk menentukan kandidat obat yang aman tanpa menimbulkan efek kimia merugikan bagi tubuh. Analisis toksisitas ligan umumnya dilakukan untuk mengetahui tingkat karsinogenitas suatu ligan (Prasetyawati et al. 2019). Penyerapan, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas (ADMET) memainkan peran penting dalam penemuan obat dan penilaian bahaya lingkungan. Analisis ini menggunakan *server online* yang memberikan informasi mengenai toksisitas dan karsinogenitas ligan (Moon et al. 2017).

Hasil analisis menunjukkan bahwa Ligan yang digunakan pada penelitian ini seluruhnya merupakan inhibitor lemah sehingga ligan-ligan tersebut tidak menyebabkan aritmia jantung. Selain itu, hasil analisis menunjukkan bahwa semua ligan uji tidak bersifat karsinogen kecuali 3 ligan yaitu *Tricaprylin Palmityl oleate*, dan *3-methylbuty*.

Toksisitas oral akut diklasifikasikan menjadi 4 kategori yaitu kategori I dengan $LD_{50} \leq 50$ mg/kg, kategori II 50 mg/kg < $LD_{50} \leq 500$ mg/kg, kategori III 500 mg/kg < $LD_{50} \leq 5000$ mg/kg, dan kategori IV yaitu $LD_{50} > 5000$ mg/kg (Paris et al. 2015). Berdasarkan hasil analisis terdapat 2 ligan yang dengan toksisitas akut oral kategori II yaitu kaemferol dan kuersetin, hal ini berarti bahwa senyawa ini dapat memberikan dampak negatif pada tubuh dengan dosis pemberian yang cukup rendah.

Ligan yang mengalami seleksi secara bertahap kemudian terpilih 11 yang dilanjutkan untuk penambatan molekuler untuk melihat interaksi yang terbentuk berdasarkan energi afinitas, K_i dan jenis

ikatan yang terbentuk. Hasil penambatan molekuler menunjukkan bahwa adanya perbedaan interaksi residu asam amino antara reseptor dan ligan uji dengan reseptor dan ligan pembanding/ligan alami. Lai *et al.* (2017) telah meneliti bahwa asam kojat sebagai ligan alami reseptor *human tyrosinase related protein 1* (5M8M) berinteraksi pada residu His 192, His 215, His 224, Thr 391, Tyr 362, Arg 374, His 377, His 381, His 404, dan Ser 394. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Noh *et al.* (2020), residu histidin yang terdapat pada sisi aktif *human tyrosinase* memiliki peran yang penting dalam proses katalitik enzim. Residu histidin yang tetap (dilestarikan) di sekitar ion tembaga mungkin memainkan peran berbeda dalam stabilitas, fleksibilitas, dan struktur konformasi tambahan untuk aktivitas katalitik tirosinase. Penelitian tersebut mengkonfirmasi, bahwa tiga residu histidin, H180, H202 dan H211, dari tirosinase manusia di sekitar situs CuA sangat penting untuk aktivitas enzim. Asam kojat sebagai ligan alami pada *human tyrosinase* menghambat memiliki potensi untuk menghambat aktivitas tirosinase dan pembentukan melanin secara *in vivo* pada sel melanoma tikus B16F10 (Mann *et al.* 2018)

Hasil visualisasi 2D menunjukkan bahwa terdapat dua jenis interaksi antara ligan dan reseptor, yaitu interaksi ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Ikatan hidrogen memainkan peranan penting di alam yaitu dalam pelipatan protein, interaksi protein-ligan, dan reaksi katalisis (Chen *et al.* 2016). Menurut Rachmania (2019), ikatan hidrogen dapat menstabilkan interaksi antara ligan dan reseptor, serta dapat mempengaruhi nilai ΔG atau energi afinitas. Interaksi hidrofobik juga memegang peranan penting dalam interaksi ligan reseptor. Interaksi hidrofobik dapat menstabilkan pengikatan ligan pada situs

target, dan membantu mengubah afinitas pengikatan dan efektivitas obat. Peningkatan jumlah atom hidrofobik di permukaan sisi aktif dapat lebih meningkatkan aktivitas biologis obat (Varma *et al.* 2010).

Ligan uji Asam Absisat dan Asam Koumarat merupakan dua ligan yang paling banyak berinteraksi dengan residu asam amino penting pada sisi aktif reseptor. Asam Absisat memiliki 2 ikatan hidrogen yaitu pada residu Arg 374, Thr 391 dan 15 interaksi hidrofobik yaitu pada residu His 192, His 215, Glu 216, Phe 220, His 224, Glu 360, Tyr 362, His 377, Asn 378, His 381, Leu 382, Gly 389, Gln 390, Ser 394, Phe 400. Asam Koumarat berikatan hidrogen pada 3 residu asam amino His 215, His 377, dan His 381 dan 9 Interaksi hidrofobik pada residu His 192, Glu 216, Phe 220, Tyr 362, Arg 374, Asn 378, Thr 391, Ser 394, Phe 400. Kedua jenis ligan ini memiliki kesamaan yaitu sama-sama berikatan hidrogen dengan logam Zn 512 dan Zn 513. Hal ini memiliki kesamaan dengan asam kojat (KOJ514) sebagai ligan alami yang sama-sama membentuk ikatan hidrogen dengan logam Zn 512 dan Zn 513. Asam Absisat dan Asam Koumarat juga masih memiliki interaksi dengan asam amino penting pada sisi aktif *tyrosinase* yaitu pada residu Ser 394, His 215, dan Thr 391.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 11 ligan menghasilkan energi afinitas negatif yang berarti bahwa semakin negatif nilai energi afinitas, maka interaksi yang terbentuk semakin kuat dan stabil. Nilai energi afinitas ligan alami Asam Kojat yaitu -3.972 Kkal/mol. Ligan dengan afinitas yang lebih kuat dari afinitas Asam Kojat yaitu Kuersetin dan Epikatekin. Ligan uji Kuersetin dan Epikatekin memiliki energi afinitas paling negatif yaitu -4.974 Kkal/mol dan -4.875 Kkal/mol, sedangkan ligan uji lainnya memiliki nilai yang lebih positif dari

ligan alami. Hal ini meandakan bahwa dalam konteks energi ikatan Kuersetin dan epikatekin memiliki kemampuan interaksi yang kuat dengan reseptor. Namun, baik Kuersetin dan Epikatekin sama-sama tidak berinteraksi atau berikatan hidrogen dengan residu penting pada sisi aktif yaitu Ser 394. Hal yang berbeda terjadi pada Asam Koumarat dan Asam Absisat, dengan energi ikatan yang lebih tinggi dari ligan alami yaitu -2.545 Kkal/mol dan -2.645 Kkal/mol, namun memiliki banyak interaksi dengan residu asam amino pada sisi aktif, dan berinteraksi dengan residu-residu penting (residu katalitik) sesuai yang disebutkan dalam literatur yaitu Arg 374, His 215, dan Ser 394 (Lai et al. 2017).

Kemampuan suatu ligan menginhibisi aktivitas suatu reseptor dapat dianalisis melalui konstanta inhibisi (K_i) ligan. Konstanta inhibisi erat kaitannya dengan energi afinitas. Semakin kecil konstanta inhibisi (K_i) maka, semakin kuat afinitas pengikatan dan semakin sedikit jumlah obat yang dibutuhkan untuk menghambat aktivitas enzim tersebut. Semakin kecil nilai K_i maka semakin kuat pengikatan ligan terhadap protein (Klebe 2013).

Berdasarkan hasil penelitian seluruh ligan uji belum termasuk golongan ligan potensial berdasarkan nilai konstanta inhibisinya, namun Kuersetin dan Epikatekin memiliki nilai K_i yang mendekati 100 μ M. Analisis kelayakan ligan uji berpotensi sebagai inhibitor dapat juga dianalisis melalui interaksi ligan uji dengan residu sisi aktif reseptor. Ligan uji Asam Absisat dan Asam Koumarat banyak berinteraksi pada residu asam amino penting pada reseptor membentuk ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik. Asam Absisat berinteraksi dengan residu penting pada reseptor yaitu His 215 dan Ser 394. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa

ABA (*Abscisic acid*) diketahui memiliki banyak manfaat bagi kesehatan manusia diantaranya memainkan peran kunci dalam metabolisme glukosa, peradangan, memori dan menghambat pertumbuhan tumor (Balino et al. 2019). Menurut hasil penelitian dari Zolghadri et al. (2019) senyawa asam fenolik seperti asam koumarat dan asam vanilik telah teruji memiliki kemampuan sebagai inhibitor tirosinase. Zolghadri et al. (2019) juga menyebutkan turunan glukosida kombinasi struktural resorsinol dan glukosa, signifikan untuk menginduksi efek penghambatan tirosinase. Oleh karena itu, Asam Absisat dan Asam Koumarat memiliki potensi sebagai inhibitor enzim human tirosinase karena berinteraksi langsung dengan residu penting pada sisi aktif reseptor (memiliki situs pengikatan yang hampir sama dengan substrat), sehingga dapat menghambat pembentukan melanin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Departemen Biokimia yang memberikan akses terhadap YASARA *structure* sehingga penelitian ini dapat berhasil.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad Z, Sugiarto B. 2020. Ekstraksi antosianin dari biji alpukat sebagai pewarna alami. *J Teknol Technoscientia*. 12(2):134-143.
- Adnyani KD, Lestari LWE, Prabowo H, Siaka PAIA, Laksmiani NPL. 2019. Aktivitas dari kuersetin sebagai agen pencerah kulit secara in silico. *J Kim*. 13(2):207-212. doi:10.24843/jchem.2019.v13.i02.p14.
- Aswad M, Christine L, Hardianti B. 2020. Studi penambatan molekul senyawa-senyawa bioaktif dari kulit akar murbei (*Morus sp.*). *Maj*

- Farm dan Farmakol.* 23(3):85–100. doi:10.20956/mff.v23i3.9399.
- Balino P, Cadenas AG, Malo DL, Romero FJ, Muriach M. 2019. Is there a role for abscisic acid, a proven anti-inflammatory agent, in the treatment of ischemic retinopathies. *Antioxidants*. 8(104) : 1-11.
- Chatatikun M, Supjaroen P, Promlat P, Chantarangkul C, Waranuntakul S, Nawarat J, Tangpong J, Chiabchalard A. 2020. Antioxidant and tyrosinase inhibitory properties of an aqueous extract of *Garcinia atroviridis* Griff. ex. T. Anderson fruit pericarps. *Pharmacogn J.* 12(1):71–78.
- Chen D, Oezguen N, Urvil P, Ferguson C, Dann SM, Savidge TC. 2016. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Sci Adv.* 2(3). doi:10.1126/sciadv.1501240.
- Dallakyan, Sargis; Olson A. 2015. Participation in global governance: Coordinating “the voices of those most affected by food insecurity.” *Glob Food Secur Gov.* 1263:243–250.
- Da Silva AP, De Silva NF, Andrade EHA, Gratieri T, Setzer WN, Maia JGS, Da Silva JKR. 2017. Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) essential oils. *PLoS One.* 12(5):1–17.
- Dominika N, Hasyim H. 2019. Perlindungan hukum terhadap konsumen atas penjualan kosmetik berbahaya di Indonesia: suatu pendekatan kepustakaan. *Niagawan.* 8(1):60–67.
- Farhan M. 2019. Penambatan molekuler senyawa aktif okra (*Abelmoschus esculentus* L.) pada enzim α -glukosidase sebagai kandidat obat antidiabetes melitus.[skripsi].Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor.
- Giantari NKM, Prayoga IWI, Laksmiani NPL. 2019. Aktivitas agen pencerah kulit dari katekin secara in silico. *J Kim.* 13(2):196–200.
- Hashemi SM, Emami S. 2015. Kojic acid-derived tyrosinase inhibitors: synthesis and bioactivity. *Pharm Biomed Res.* 1(1):1–17.
- Herlina, Vestabilivy E. 2019. Pengaruh pengetahuan dan penggunaan kosmetik pemutih terhadap kulit wajah pada mahasiswi STIKes Persada Husada Indonesia. 6(20):30–40.
- Irawati NAV. 2015. Antihypertensive effects of avocado leaf extract (*Persea americana* Mill). *Majority.* 4(1):44–48.
- Kurniasari A, Anwar E, Djajadisastra J. 2018. Potensi ekstrak biji coklat (*Theobroma cacao* Linn) sebagai inhibitor tirosinase untuk produk pencerah kulit. *J Kefarmasian Indones.* 8(1):34–43.
- Klebe G. 2013. Drug design: methodology, concepts, and mode-of-action. *Drug Des Methodol Concepts, Mode-of-Action.*:61–87. doi:10.1007/978-3-642-17907-5.
- Lai X, Wichers HJ, Soler-Lopez M, Dijkstra BW. 2017. Structure of human tyrosinase related protein 1 reveals a binuclear zinc active site important for melanogenesis. *Angew Chemie - Int Ed.* 56:9812–9815.
- Land H, Humble MS. 2018. YASARA: A tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. Volume ke-4.

- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 46:3–26. doi:10.1016/j.addr.2012.09.019.
- Malangngi L, Sangi M, Paendong J. 2012. Penentuan kandungan tanin dan uji aktivitas antioksidan ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.). *J MIPA.* 1(1):5–10.
- Tobias M, Wolfram G, Jan B, Kerstin E, Cathrin S, Horst W, Franz S, Vincent J. H, Klaus-HR, Ludger K. 2018. Inhibition of Human Tyrosinase Requires Molecular Motifs Distinctively Different from Mushroom Tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology.* 138(7): 1601-1608.
- Mannige RV, Kundu J, Whitelam S. 2016. The Ramachandran Number: An Order Parameter for Protein Geometry. *Plos One.* 1-14.
- Moon A, Khan D, Gajbhiye P, Jariya M. 2017. Insilico prediction of toxicity of ligands utilizing admetsar. *Int J Pharma Bio Sci.* 8(3):674–677. doi:10.22376/ijpbs.2017.8.3.b674-677.
- Mulatsari E, Mumpuni E, Sandy K. 2019. Penapisan virtual senyawa dalam tanaman familia *annonaceae* sebagai ligan pada reseptor estrogen alfa (ER- α). *J Sains dan Edukasi Sains.* 2(2):70–76.
- Noh H, Lee SJ, Jo HJ, Choi HW, Hong S, Kong KH. 2020. Histidine residues at the copper-binding site in human tyrosinase are essential for its catalytic activities. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 35(1):726–732. doi:10.1080/14756366.2020.1740691.
- Ochieng PJ, Sumaryada T, Okun D. 2017. Molecular docking and pharmacokinetic prediction of herbal derivatives as maltase-glucoamylase inhibitor. *Asian J Pharm Clin Res.* 10(9):392–398.
- Paris M, Strickland J, Allen D, Casey W. 2015. Using acute oral toxicity data to estimate acute dermal hazard classification and labeling of pesticide actives. *NICEATM SOT 2015 Poster.*:1–17.
- Ramos-Jerz M, Villanueva S, Jerz G, Winterhalter P, Deters AM. 2013. *Persea americana* Mill. seed: fractionation, characterization, and effects on human keratinocytes and fibroblasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2013. 1-12.
- Randhawa M, Seo I, Liebel F, Southall MD, Kollias N, Ruvolo E. 2015. Visible light induces melanogenesis in human skin through a photoadaptive response. *Plos One.* 1-14.
- Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K. 2019. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 110(2019) : 582-593.
- Şöhretoğlu D, Sari S, Barut B, Özel A. 2018. Tyrosinase inhibition by some flavonoids: Inhibitory activity, mechanism by in vitro and in silico studies. *Bioorg Chem.* 81:168–174.
- Song W, Zhu X, Ding XD, Yang HB, Qin ST, Chen H, Wei SD. 2017. Structural features, antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of proanthocyanidins in leaves of two tea cultivars. *International Journal of Food Properties.* 20(6) : 1348–1358.

- Varma AK, Patil R, Das S, Stanley A, Yadav L, Sudhakar A. 2010. Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of Drug-Designing. *PLoS One*. 5(8). doi:10.1371/journal.pone.0012029.
- Vinha AF, Moreira J, Barreira SVP. 2013. Physicochemical parameters, phytochemical composition and antioxidant activity of the algarvian avocado (*Persea americana* Mill.). *J Agric Sci*. 5(12):100–109.
- Zolghadri S, Bahrami A, Khan H, Tareq M, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, Saboury AA. 2019. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 34(1):279–309. doi:10.1080/14756366.2018.1545767.