



Uji *In Silico* Ellagic Acid sebagai Agen Anti Hiperpigmentasi

In Silico Test Ellagic Acid as Anti Hyperpigmentation Agent

Ni Kadek Sita Febriyanti¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Bali, Indonesia

Kata kunci

hiperpigmentasi,
ellagic acid,
tyrosinase, *in silico*,
docking

Abstrak

Hiperpigmentasi merupakan masalah kulit yang terjadi akibat sintesis melanin secara berlebih. Salah satu faktor penyebab hiperpigmentasi adalah paparan sinar UV secara terus menerus pada kulit. Biosintesis melanin dikatalisis oleh enzim melanogenik yaitu tyrosinase. Sintesis melanin dapat dihambat dengan menggunakan agen anti hiperpigmentasi, salah satunya yang bersumber dari bahan alam. Ellagic acid merupakan senyawa fenolik yang banyak terdapat pada tumbuhan dan memiliki aktivitas antioksidan sehingga dapat menghambat hiperpigmentasi melalui mekanisme penghambatan ROS. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ellagic acid dalam menghambat enzim tyrosinase yang akan dibandingkan dengan native ligannya secara *in silico*. Uji *in silico* dilakukan secara docking molecular dengan tahapan yaitu preparasi serta optimasi ellagic acid menggunakan Hyperchem 8, preparasi enzim tyrosinase menggunakan Chimera 1.11.1, validasi dan docking dilakukan dengan menggunakan AutoDockTools 1.5.6 yang dilengkapi program Autodock 4 dan Autogrid 4. Metode docking molecular dapat dinyatakan valid apabila nilai RMSD (root mean square distance) yang diperoleh tidak lebih dari 3 Å. Hasil pengujian molecular docking menunjukkan bahwa ellagic acid memiliki afinitas terhadap enzim tyrosinase. Nilai energi ikatan yang diperoleh menunjukkan bahwa afinitas ellagic acid lebih kuat dan stabil pada tyrosinase dibandingkan dengan native ligand. Nilai energi ikatan antara ellagic acid dengan tyrosinase adalah -5,78 kkal/mol. Sedangkan energi ikatan antara tyrosinase dengan native ligandnya -4,83 kkal/mol, sehingga ellagic acid berpotensi sebagai agen anti hiperpigmentasi melalui mekanisme penghambatan aktivitas enzim tyrosinase

Keywords

hyperpigmentation,
ellagic acid,
tyrosinase, *in silico*,
docking

Abstract

Hyperpigmentation is a skin problem that occurs due to excess melanin synthesis. One of the factors that cause hyperpigmentation is continuous exposure to UV rays on the skin. Melanin biosynthesis is catalyzed by the melanogenic enzyme tyrosinase. Melanin synthesis can be inhibited by using anti hyperpigmentation agents, one of which is sourced from natural ingredients. Ellagic acid is a phenolic compound that is widely found in plants and has antioxidant activity so that it can inhibit hyperpigmentation through ROS inhibition mechanism. This study aims to determine the potential of ellagic acid in inhibiting the tyrosinase enzyme which will be compared with its native ligand *in silico*. The *in silico* test was carried out by molecular docking with the steps of preparation and optimization of ellagic acid using Hyperchem 8, preparation of the tyrosinase enzyme using Chimera 1.11.1, validation and docking using AutoDockTools 1.5.6 equipped with Autodock 4 and Autogrid 4. Molecular docking methods can be declared valid if the value of RMSD (root mean square distance) obtained is not more than 3 . The results of the molecular docking test showed that ellagic acid had an affinity for the tyrosinase enzyme. The bond energy values obtained indicate that the affinity of ellagic acid is stronger and more stable for tyrosinase compared to native ligands. The bond energy value between ellagic acid and tyrosinase is -5.78 kcal/mol. Meanwhile, the binding energy between tyrosinase and its native ligand is -4.83 kcal/mol, so that ellagic acid has the potential as an anti hyperpigmentation agent through the mechanism of inhibition of tyrosinase enzyme activity.

© 2022 Jurnal Jejaring Matematika dan Sains. This work is licensed under a [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Corresponding Author:

*Alamat e-mail: sitafebriyanti10@gmail.com

PENDAHULUAN

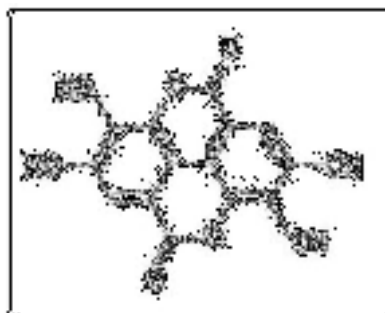
Melanin adalah pigmen yang berperan dalam proses pigmentasi yaitu pewarnaan secara endogen yang tampak pada kulit, mukosa, mata, rambut dan bagian otak. Produksi melanin yang berlebihan mengakibatkan terjadinya penggelapan warna kulit secara alami (hiperpigmentasi). Hiperpigmentasi adalah kondisi dermatologis umum yang paling sering dialami manusia dengan beragam jenis kulit [1]. Beberapa faktor yang memicu terjadinya hiperpigmentasi antara lain faktor keturunan, penyakit, paparan sinar UV, konsumsi obat – obatan dan kebiasaan merokok [2]

Selain karena deposisi melanin yang berlebihan di epidermis (hipermelanosis), hiperpigmentasi juga dapat disebabkan oleh adanya peningkatan kromofor asal non melanik (hiperkromia) dan adanya deposisi dermal endogen dan eksogen dari pigmen hemosiderin atau logam berat [3]. Warna pigmen melanin dapat bervariasi yang bergantung pada jumlah distribusi melanin dalam jaringan, seperti dari terang ke coklat gelap atau hitam (Nurniza dkk., 2018). Sinar UV menjadi faktor penyebab terbesar dari hiperpigmentasi. Paparan sinar UVA dan UVB menyebabkan pertumbuhan melanolitik dan peningkatan transfer melanosome ke keratinosit [4]

Salah satu upaya untuk mencegah hiperpigmentasi adalah dengan menggunakan agen anti hiperpigmentasi. Agen ini bekerja dengan menghambat proses pembentukan sintesis melanin baru (melanogenesis) pada enzim *tyrosinase*. Enzim ini berperan penting dalam mengontrol pigmentasi dan ukuran aktivitasnya memberikan informasi yang berguna tentang potensi melanogenik melanosit [5]. Protein *Tyrosinase* (PDB ID: 2Y9X) memiliki empat rantai yaitu rantai A, B, C, dan D. Masing-masing rantai tersebut mengikat 3 ligan yaitu yaitu *2-hydroxycyclohepta-2,4,6-trien-1-one (tropolone/ OTR)*, atom holmium, dan Cu^{2+} . Enzim ini mengikat tirosin pada sisi aktifnya dengan melakukan pengaturan untuk mengubahnya menjadi ortokuinon (dopakuinon) dan deoksi enzim [6] [7].

Hidrokuinon dengan konsentrasi 2-4% merupakan obat yang paling sering digunakan sebagai antihiperpigmentasi dengan mekanisme sebagai inhibitor enzim tirosinase. Namun, obat ini memiliki efek samping okronosis, genotoksisitas, hilangnya elastisitas kulit, gangguan pada saat penyembuhan luka dan menghasilkan metabolit benzokuinon akibat reaksinya dengan tirosinase yang karsinogenik sehingga pemakaiannya dibatasi [8]. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengembangan senyawa antihiperpigmentasi dari bahan alam yang dapat mengurangi efek samping ketika digunakan.

Ellagic acid atau asam elagat merupakan senyawa fenolik yang terdapat dalam banyak jenis sayuran, buah-buahan, kacang-kacangan, dan berbagai jenis *berry*. Sumber alami yang kaya akan *ellagic acid* diantaranya yaitu buah delima, *raspberry*, *strawberry*, *blackberry*, biji anggur, daun teh hijau, kacang walnut, dan pecan nut. *Ellagic acid* memiliki beragam efek farmakologi diantaranya berupa aktivitas antioksidan, anti-virus, anti-bakteri, anti-inflamasi, anti-karsinogenik, anti-fibrotik, anti-plasmodial, agen kemopreventif, anti-tirosinase, serta memberikan efek fotoprotektif [9]. Struktur kimia dari *ellagic acid* ditunjukkan pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Struktur Kimia *Ellagic acid* [10]

Senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan mampu mencegah hiperpigmentasi melalui mekanisme penghambatan ROS [8]. Berdasarkan penelitian secara *in vitro*, *ellagic acid* memiliki efek penghambatan proliferasi sel melanoma B16 dan menginduksi apoptosis. Mekanisme *ellagic acid* dalam penghambatan aktivitas tirosinase ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar $0,2 \pm 0,05$ mM [11].

METODE PENELITIAN

Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras berupa komputer dengan spesifikasi *processor* tipe Intel *Core* (TM) i3-7100 CPU 3,9 GHz, RAM 4 GB, dan *Harddisk* 500 GB. Perangkat lunak yang digunakan berupa sistem operasi Windows 10, program Open Babel Gui dan *Hyperchem* 8 untuk preparasi dan optimasi senyawa uji dan senyawa kontrol. Program *Chimera* 1.11 untuk preparasi protein target, dan program *AutoDock Tools* 1.5.6 dilengkapi program *Autodock* 4 dan *Autogrid* 4 untuk proses validasi dan *docking*.

Bahan Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur 3 dimensi dari *ellagic acid* diunduh pada <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Struktur protein target enzim melanogenesis yaitu *tyrosinase* (PDB ID: 2Y9X) yang diunduh dari <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.

Prosedur Penelitian

Tahap penelitian terdiri dari penyiapan *database* senyawa uji *ellagic acid* dengan struktur 3 dimensi dan dioptimasi dengan program *HyperChem* 8 serta *database* struktur 3 dimensi protein target *tyrosinase* (PDB ID: 2Y9X) dan dipreparasi menggunakan *Chimera* 1.11.1. Validasi metode dilakukan dengan *redocking native ligand* protein target pada protein target yang telah dihilangkan *native ligand*-nya. Kemudian dilakukan *docking ellagic acid* dengan protein target. Tahap terakhir adalah analisis data dengan parameter berupa nilai energi ikatan dan jenis ikatan yang terbentuk.

1. Preparasi dan Optimasi Struktur 3D Senyawa Uji dan Kontrol Positif

Struktur 3 dimensi *ellagic acid* diunduh melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Struktur 3 dimensi senyawa uji dan kontrol positif dalam format .sdf diubah menjadi format .pdb menggunakan program Open Babel Gui. Kemudian, dioptimasi menggunakan program *HyperChem8* yang lengkap dengan atom hidrogennya. Optimasi dilakukan pada struktur 3 dimensi senyawa uji menggunakan metode komputasi semi-empiris AM1 dan dilakukan kalkulasi dengan *single point* dan optimasi geometri. Optimasi senyawa uji dalam bentuk 3 dimensi bertujuan untuk menghitung energi dan optimasi geometri molekul senyawa dengan cara menyesuaikan panjang ikatan, sudut ikatan, dan sudut torsinya agar mencapai nilai kesetimbangan. Optimasi geometri bertujuan untuk meminimalisasi energi dan mencari konformasi terbaik dari molekul [12]. Senyawa yang telah dioptimasi disimpan dalam format .pdb.

2. Preparasi Protein Target

Preparasi protein target diawali dengan memilih struktur protein dalam bentuk aktif yang berikatan dengan *native ligand* yaitu enzim melanogenesis seperti *tyrosinase* (PDB ID: 2Y9X). Preparasi protein target diawali dengan memisahkan *native ligand* dari protein target dengan menggunakan program *Chimera* 1.11.1. yang bertujuan untuk menyediakan ruang (*pocket cavity*). *Native ligand* yang telah terpisah digunakan untuk validasi metode [13].

3. Validasi Metode *Molecular Docking*

Validasi metode *molecular docking* dilakukan dengan program *AutoDock Tools* 1.5.6 yang dilengkapi program *Autodock4* dan *Autogrid4*. Validasi metode dilakukan dengan men-*docking*-kan kembali (*redocking*) *native ligand* protein target pada protein target yang telah dihilangkan *native ligand*-nya. Parameter validasi metode *molecular docking* adalah nilai *Root mean square deviation* (RMSD) $\leq 3,0 \text{ \AA}$. *Docking* Senyawa Uji dan Kontrol Positif pada Protein Target

Senyawa uji dan senyawa kontrol dalam format .pdb di-*docking*-kan pada protein target tanpa *native ligand*-nya menggunakan metode yang sudah tervalidasi. Program *docking* yang digunakan adalah *AutoDock Tools* 1.5.6 dilengkapi program *Autodock* 4 dan *Autogrid* 4. Proses *docking* senyawa uji pada protein target memperoleh hasil berupa nilai energi ikatan dan jenis ikatan hidrogen yang terbentuk, kemudian dilakukan analisis terhadap hasil yang diperoleh.

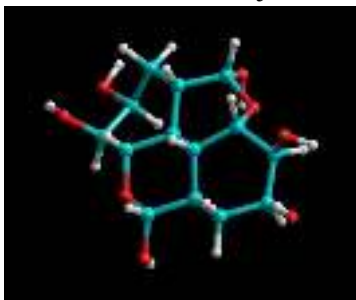
Analisis Data

Hasil *molecular docking* yang diperoleh berupa energi ikatan dan jenis ikatan yang terbentuk. Energi ikatan digunakan untuk menunjukkan kekuatan ikatan antara senyawa dengan protein. Semakin rendah nilai energi ikatan, maka ikatan yang terbentuk semakin kuat dan stabil. Jenis ikatan (Hidrogen, Van der Waals, Hidrofobik, dan Elektrostatik) yang terbentuk digunakan untuk menganalisis mekanisme interaksi yang terbentuk. [7]

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Struktur 3D Senyawa *Ellagic acid*

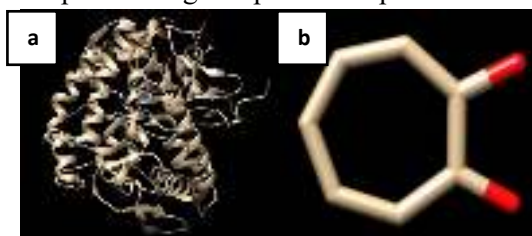
Optimasi struktur 3D senyawa uji dilakukan dengan kalkulasi *single point* dan optimasi geometri. Kalkulasi *single point* bertujuan untuk menentukan energi total molekul dari struktur *ellagic acid* [14]. Energi yang diperoleh saat kalkulasi *single point ellagic acid* adalah $-4.359,98$. Selanjutnya dilakukan optimasi geometri yang bertujuan untuk meminimalisasi energi total, sehingga diperoleh struktur senyawa uji yang paling stabil. Adanya penurunan nilai energi total senyawa dari kalkulasi *single point* ke optimasi geometri mengindikasikan optimasi telah berhasil [15]. Hasil optimasi penurunan energi total yang diperoleh dari senyawa asam galat adalah $-4.413.75$. Gambar 2 menunjukkan hasil optimasi 3D senyawa *ellagic acid*.



Gambar 2. Hasil Optimasi Struktur 3D *Ellagic acid*

Preparasi Protein Target

Preparasi protein target bertujuan untuk memisahkan struktur protein target dengan *native ligand*, yang mana struktur protein target tanpa *native ligand* dan struktur *native ligand* yang diperoleh akan digunakan dalam proses validasi metode *molecular docking*. Pemilihan rantai protein target *tyrosinase* didasarkan pada letak berikatannya *native ligand* yang memiliki aktivitas inhibisi terhadap protein target sehingga mempermudah penentuan koordinat (*pocket*) pada ligan pada saat proses *docking*. Preparasi protein target enzim melanogenesis (*tyrosinase*) dengan PDB ID: 2Y9X memiliki 4 rantai yaitu rantai A, B, C, dan D. Keempat rantai tersebut memiliki *native ligand* yang sama yaitu *tropolone* (0TR) yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor *tyrosinase* [16]. Pada penelitian ini rantai *tyrosinase* yang dipilih adalah rantai A dengan *native ligand* 0TR. Hasil preparasi protein target dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Preparasi Protein Target (a). *tyrosinase* tanpa *native ligand*. (b) *native ligand* tropolone (0TR)

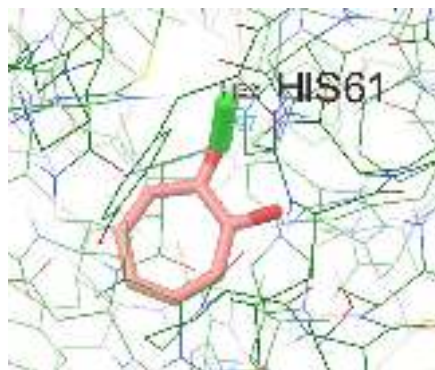
Validasi Metode *Molecular Docking*

Metode *molecular docking* memerlukan suatu validasi untuk mengetahui kedekatan antara posisi ligan hasil *docking* dengan protein target. Nilai RMSD akan menunjukkan kedekatan atau kemiripan *native*

ligand antara struktur kristalografi dengan eksperimental yang di-*docking*-kan pada suatu protein. Validasi metode *molecular docking* dilakukan dengan melakukan *redocking* antara protein target tyrosinase tanpa *native ligand* dengan *native ligand* OTR yang telah dipisahkan sebelumnya padan program *Auto-dock 1.5.6* Hasil dan visualisasi interaksi dari proses validasi metode dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 4.

Tabel 1. Hasil Validasi Metode

Konformasi	Energi Ikatan (kkal/mol)	RMSD	Asam Amino Yang Berikatan	Ikatan Hidrogen
1	-4,83	2,19	HIS61	HE2-OA2
2	-4,80	2,19	HIS61	HE2-OA1
3	-4,83	2,14	HIS61	HE2-OA1
4	-4,80	2,20	HIS61	HE2-OA1
5	-4,80	2,19	HIS61	HE2-OA1
6	-4,82	2,17	HIS61	HE2-OA2
7	-4,83	2,18	HIS61	HE2-OA2
8	-4,83	2,16	HIS61	HE2-OA2
9	-4,83	2,18	HIS61	HE2-OA2
10	-4,81	2,21	HIS61	HE2-OA1



Gambar 4. Visualisasi Hasil Validasi Metode Konformasi 3

Parameter keberhasilan validasi metode *molecular docking* adalah nilai *root mean square distance* (RMSD) yang merupakan penyimpangan posisi dari *native ligand* yang berikatan dengan protein setelah di-*docking*-kan dibandingkan dengan posisi ikatan *native ligand* saat sebelum dipisahkan, sehingga akan diperoleh nilai simpangan dari masing-masing konformasi yang terbentuk. Metode dinyatakan valid jika memiliki nilai RMSD $\leq 3 \text{ \AA}$ [17]. Semakin kecil nilai RMSD yang diperoleh menunjukkan bahwa prediksi pose *ligand* semakin dekat ke konformasi *native ligand* saat sebelum dipisahkan. Hasil validasi metode *molecular docking* sudah memenuhi persyaratan yaitu nilai RMSD 2.14 \AA pada konformasi 3.

Docking Ellagic acid pada Protein Target

Docking ellagic acid pada protein target tyrosinase dilakukan dengan program *AutoDock 1.5.6* menggunakan koordinat yang sama pada saat proses validasi. Hasil dan visualisasi interaksi *docking* yang terjadi antara *ellagic acid* dengan protein *tyrosinase* dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 5. Energi ikatan menunjukkan afinitas antara senyawa dengan protein target, semakin negatif energi ikatan yang diperoleh maka semakin stabil ikatan yang terbentuk [18].

Tabel 2. Hasil Docking *Ellagic acid* dengan *Tyrosinase*

Konformasi	Energi Ikatan (Kkal/Mol)	Asam Amino Yang Berikatan	Ikatan Hidrogen
1	-4,96	HIS244	HE2-O
2	-4,53	-	-
3	-4,52	-	-
4	-5,65	HIS244	HE2-O
5	-5,46	HIS244	HE2-O
6	-4,55	-	-
7	-5,78	HIS244	HE2-O
8	-5,59	HIS244	HE2-O
9	-4,49	-	-
10	-5,60	HIS244	HE2-O



Gambar 5. Visualisasi Hasil *Docking* pada Konformasi 7

Energi ikatan antara *ellagic acid* dan protein target tyrosinase adalah -5,78 kkal/mol yang membentuk ikatan hidrogen dengan asam amino HIS244. Berdasarkan hasil yang diperoleh maka diketahui bahwa *ellagic acid* memiliki potensi sebagai agen antihiperpigmentasi melalui mekanisme inhibisi *tyrosinase*. Secara *in vitro*, *ellagic acid* memiliki efek penghambatan proliferasi sel melanoma B16 dan menginduksi apoptosis. Mekanisme *ellagic acid* dalam penghambatan aktivitas tirosinase yang ditunjukkan dengan nilai IC50 yaitu $0,2 \pm 0,05$ mM [11].

Penelitian terhadap senyawa fenolik lain seperti asam kafeat, asam sinamat, asam ferulat, dan asam p-kumarat juga menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap enzim *tyrosinase* dengan menggunakan metode yang sama pada protein target enzim *tyrosinase* (PDB ID: 5I38). Energi ikatan asam kafeat, asam sinamat, asam ferulat, dan asam p-kumarat berturut-turut adalah -6,4; -6,1; -5,9; dan -6,1 kkal/mol [19]. Hasil penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa asam sinamat memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim *tyrosinase* dengan energi ikatan sebesar -4,08 kkal/mol [20]

KESIMPULAN

Ellagic acid memiliki afinitas dan membentuk ikatan hidrogen dengan protein *tyrosinase*. Berdasarkan hasil *docking*, *ellagic acid* berpotensi sebagai antihiperpigmentasi secara *in silico* melalui penghamatan enzim *tyrosinase*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan dalam pelaksanaan penelitian ini.

REFERENSI

- [1] Clark, A. K., and R. K. Simvani, 'Phytochemicals in the treatment of hyperpigmentation', *Botanics: Targets and Therapy*, Vol 6, No (6), 89-96, 2016.
- [2] Nurniza, N., et al, 'Penatalaksanaan Perawatan Hiperpigmentasi Pada Gingiva Dengan Metode Scrapping Menggunakan Pisau Bedah: Studi Kasus' *Majalah Sainstekes*, Vol 5, No 2, 074-078, 2018.
- [3] Garcia, R. M. G., and S. C. Molina, 'Drug-Induced Hyperpigmentation: Review and Case Series', [Journal of the American Board of Family Medicine, Vol 32, No. 4, 628–638, 2016.](#)
- [4] Chandra, M., Levitt, J. And C. A. Pensabene, 'Hydroquinone Therapy for Post-inflammatory Hyperpigmentation Secondary to Acne: Not Just Prescribable Dermatologists' *Acta Derm Venereol*, Vol 92, 232–235, 2012.
- [5] Allgisna, K.N., S. Hindun., dan N. Rantika, 'Perbandingan Beberapa Ekstrak Kulit Buah sebagai Anti-hiperpigmentasi', *Jurnal Sains dan Kesehatan*, Vol 3, No 2, 335-432. 2021.
- [6] Laksmiani, N. P. L. and I. P. W. Nugraha, 'Depigmentation Activity of Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Extract through Tyrosinase, Tyrosinase Related Protein-1 and Dopachrome Tautomerase Inhibition' *Biomedical & Pharmacology Journal*, Vol 12, No 2, 799-808. [2019.](#)
- [7] BRENDA. (2021). *Information on EC 1.14.18.1 – Tyrosinase*, *The Comprehensive Enzyme Information System*. Diakses 16 Januari 2022, < <https://www.brendaenzymes.org/enzyme.php?ecno=1.14.18.1>>
- [8] Widyastuti, M. D., et al, 'Aktivitas Antihiperpigmentasi Likopen Secara In Silico', *Jurnal Kimia*, Vol 14, No 2, 2020.
- [9] Baek, B., et al, 'Ellagic Acid Plays a Protective Role Against UV-B-Induced Oxidative Stress by Up-Regulating Antioxidant Components in Human Dermal Fibroblasts' *Korean Journal Physiol Pharmacol*, Vol 20, No 3, 269-277, 2016.
- [10] Mathai, R.T., et al, 'Amla in the Prevention of Aging: Scientific Validation of the Ethnomedicinal Claims' *Foods and Dietary Supplements in the Prevention and Treatment of Disease in Older Adults*, 29-35, 2015.
- [11] Huang, Q., et al, 'Antityrosinase mechanism of ellagic acid in vitro and its effect on mouse melanoma cells' *Journal of Biochemistry*, Vol 00, 1-9, 2019.
- [12] Mukesh, B. and K. Rakesh, 'Molecular Docking: a Review' *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, Vol 2, No 6, 1746-1751, 2011.
- [13] Ferreira, G. L., et al, 'Molecular docking and Structure-Based Drug Design Strategies' *Molecules*, 20, 13384- 13421, 2015.
- [14] Candra, G. N. H. dan I. M. A. Wijaya, 'Molecular Docking Kaempferol Sebagai Antiinflamasi pada Aterosklerosis Secara In Silico' *Pharmauho: Jurnal Farmasi, Sains, dan Kesehatan*, Vol 6, No 1, 1-6, 2020.
- [15] Adnyani, K. D., et al, A Comprehensive Review on an Important Unani Drug Mulethi (Root of *Glycyrrhiza glabra* Linn', *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, Vol 10, No 3, 488-493, 2021
- [16] Ismaya, W.T., et al, 'Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone' *Biochemistry*, Vol 50, No 24, 5477–5486, 2011.
-

-
- [17] Jain, A.N. and A. Nicholls, A, 'Recommendations for Evaluation of Computational Method' Journal Computer Aided Molecular Design, Vol, 22 133-139, 2008.
- [18] Laksyani, N. P. L., N. L. P. V. Paramita, and I. M. A. G. Wirasuta, 'In Vitro and In Silico Antioxidant Activity of Purified Fractions from Purple Sweet Potato Ethanolic Extract', *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 8 No 8, 177-181, 2016.
- [19] Pannindriya, P., M. Safithri, DAN K. Tarman, 'Analisis In Silico Senyawa Aktif Spirulina platensis Sebagai Inhibitor Tirosinase', *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, Vol 24 No 1, 70-77, 2021.
- [20] Jung, H. J., et al, 'In vitro and in silico insights into tyrosinase inhibitors with (E)-benzylidene-1-indanone derivatives, Computational and Structural Biotechnology Journal, 17, 1255–1264, 2019.