

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Serta Uji Iritasi Sediaan Masker *Peel-Off* Ekstrak Etanol Daun Sukun (*Artocarpus Altilis* F)

Devi Ratnasari^{1*}, Fiona Rosa Sofyanita², Padmono Citreksoko²

*email korespondensi : devi.ratnasari@fkes.unsika.ac.id

¹ Universitas Singaperbangsa Karawang

² Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor

Abstrak

Daun sukun (*Artocarpus altilis* F) diketahui memiliki senyawa metabolit sekunder salah satunya adalah flavonoid. Pada penelitian ini ekstrak etanol 96% daun sukun (*Artocarpus altilis* F) dan sediaan masker *peel-off* ekstrak etanol 96% *Artocarpus altilis* diuji aktivitas penghambatan enzim tirosinase menggunakan substrat L-tirosin dan L-dopa. Hasil uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase menunjukkan bahwa ekstrak dan sediaan tidak memiliki kemampuan penghambatan terhadap melanin yang dilihat dari nilai IC_{50} . Ekstrak etanol 96% daun sukun memiliki nilai IC_{50} dengan substrat L-tirosin sebesar 4889,467 ppm dan substrat L-Dopa sebesar 6916,626 ppm. Sediaan masker *peel-off* memiliki nilai IC_{50} dengan substrat L-tirosin sebesar 12680,48 dan untuk substrat L-Dopa sebesar 33402,96 ppm. Dilakukan uji iritasi primer pada sediaan masker *peel-off* ekstrak etanol daun sukun. Hasil uji iritasi primer tidak menunjukkan adanya iritasi pada kulit seperti edema, maupun eritema.

Kata Kunci: Ekstrak etanol 96%, Daun sukun, Masker *peel-off*, Enzim tirosinase.

Tyrosinase Enzyme Inhibition and Irritation Test for Peel-Off Mask from Breadfruit Leaf Ethanol Extract (*Artocarpus Altilis* F)

Abstract

Leaf breadfruit (*Artocarpus altilis* F) is known to have secondary metabolites one's of these are flavonoids. On the 96% ethanolic extract of *Artocarpus altilis* leaves and preparation of extract peel-off mask 96% ethanol *Artocarpus altilis* activity of tested inhibition enzyme tyrosinase use L-tyrosin substrate and L-Dopa. The results activity of inhibited test enzyme tyrosinase showed that the extract and the preparation have not ability inhibited melanin. Ethanolic 96% extract of breadfruit leaves have IC_{50} the L-tyrosine substract was 4889,467 ppm and for the L-Dopa substract was 6916,626 ppm. The peel-off mask has value the L-tirosyn substract was 12680,48 ppm and for the L-Dopa substract it was 33402,96 ppm. The primary irritation test was carried out on the peel-off mask ethanolic extract of breadfruit leaf. The primary irritation test results are not showing existence irritation on skin like edema, or erythema.

Keywords: Extract 96% ethanol, Leaf breadfruit, *Peel-off* mask, Tyrosinase enzyme.

Pendahuluan

Produk *whitening agent* atau yang kita kenal sebagai produk pencerah secara komersial tersedia untuk keperluan kosmetik agar mendapatkan penampilan kulit yang lebih cerah. *Whitening agent* tersebut juga digunakan untuk perawatan klinis gangguan pigmen seperti melasma atau hiperpigmentasi setelah inflamasi. Produk *whitening agent* yang terdapat dalam produk kosmetik di pasaran terkadang memiliki efek samping yang membahayakan kulit sehingga sedang gencar dilakukan pencarian dan isolasi senyawa kimia alami. Beberapa bahan kimia yang berasal dari tumbuhan telah diuji coba sebagai kosmetik dan produk farmasi yang bekerja mencegah produksi berlebih dari melanin di lapisan epidermal atau sebagai *whitening agent*.

Enzim yang berperan penting pada jalur sintesis melanin adalah tirosinase. Tirosinase memiliki aktivitas hidroksilasi tirosin, oksidasi L-Dopa (3,4- dihidroksifenilalanin) dan oksidasi hidroksiindol, tirosinase dapat mengatalisis beberapa langkah dalam biosintesis melanin.¹ Enzim tirosinase bekerja mengubah tirosin menjadi 3,4- dihidroksifenilalanin (DOPA) dan kemudian menjadi dopakuinon yang selanjutnya melalui

beberapa tahap transformasi dikonversi menjadi melanin.²

Flavonoid merupakan polifenol alami yang banyak ditemukan dalam daun, batang dan bunga. Kemampuan depigmentasi kulit dari flavonoid dengan cara menghambat secara langsung aktivitas tirosinase pada proses melanogenesis. Ikatan flavonoid dengan tembaga serta efek antioksidannya dilaporkan berperan dalam menghambat kerja enzim tirosinase.³

Masker *peel off* merupakan sediaan kosmetik perawatan kulit wajah yang berbentuk gel dan setelah diaplikasikan ke kulit wajah dalam waktu tertentu akan mengering. Sediaan ini akan membentuk lapisan film transparan yang elastis, sehingga dapat dikelupas.⁴

Metode

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas (pyrex), timbangan analitik (ACS), oven (sharp), desikator, blender (myako), plate 96 sumuran dan microplate reader (ELISA).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sukun (*Artocarpus*

altilis F) yang sudah tua, Polivinil alkohol, Hidroksipropil Metilselulosa, Propilenglikol, Metil Paraben, Propil Paraben, etanol 96%, akuades, enzim tirosinase, substrat L-Dopa, substrat L-tyrosine, dapar fosfat pH 6,5.

Ekstraksi

Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sukun. Daun sukun yang digunakan berwarna hijau tua. Daun sukun diidentifikasi atau dideterminasi di Herbarium LIPI Cibinong. Daun sukun yang telah dipetik dicuci dahulu lalu dirajang dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 2x24 jam. Setelah itu, dilakukan penghalusan simplisia menggunakan blender dan diayak.

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi, simplisia daun sukun yang telah dihaluskan direndam dengan pelarut etanol terpilih yaitu etanol 96% pada botol coklat. Direndam selama 24 jam dengan 6 jam pertama sesekali dilakukan pengadukan. Kemudian diulangi lagi hingga 3 kali perlakuan.

Pembuatan sediaan

Sediaan serum dibuat dengan kandungan konsentrasi ekstrak sebesar 40%. Pemilihan konsentrasi ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa konsentrasi 40% memiliki aktivitas antioksidan yang baik⁷. Formula sediaan masker dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Formula Sediaan Masker Peel-Off Ekstrak Etanol Daun Sukun

No	Bahan	Basis b/b	Konsentrasi 40% b/b	fungsi
1	Ekstrak	-	40	Zat Aktif
2	PVA	12	12	Pembentukan
3	HPMC	1	1	Peningkatan Viskositas
4	Propilenglikol	15	15	Humektan
5	Metilparaben	0,2	0,2	Pengawet
6	Propinparaben	0,1	0,1	Pengawet
7	Aquades	Ad 100	Ad 100	Pelarut

Pada pembuatan sediaan masker peel-off ekstrak etanol daun sukun dimulai dengan

melarutkan ekstrak dalam sebagian propilenglikol sedikit demi sedikit hingga

ekstrak larut sempurna. Kemudian di dalam tempat terpisah, PVA dikembangkan dengan aquades panas ($\pm 80^{\circ}\text{C}$) hingga mengembang sempurna, lalu dihomogenkan. Selanjutnya HPMC dikembangkan dalam aquades panas ($\pm 80^{\circ}\text{C}$) dengan pengadukan yang konstan hingga mengembang. Pada wadah terpisah lainnya, metil paraben dan propil paraben secara berturut-turut ke dalam PVA yang telah mengembang lalu diaduk hingga homogen. Ditambahkan ekstrak yang telah dilarutkan dalam propilenglikol sedikit demi sedikit, lalu diaduk hingga homogen, kemudian ditambahkan aquades hingga jumlah yang diinginkan dan diaduk kembali hingga homogen.

Uji penghambatan enzim tirosinase ekstrak daun sukun dan sediaan masker peel-off

Pembuatan larutan ekstrak dan larutan sediaan masker *peel-off* dilakukan dengan melarutkan 8 mg ekstrak padat menggunakan DMSO hingga didapat konsentrasi sebesar 8000 ppm. Ekstrak dan sediaan masker *peel-off* ini merupakan stok yang nantinya akan diencerkan dalam buffer natrium fosfat (70mM dan pH 6.5). Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada pengujian ini adalah 8000, 4000, 2000, 1000 ppm. Pengujian ini

menggunakan asam kojat sebagai kontrol positif dan diuji pada konsentrasi 31,25, 62,5, 125, 250 ppm. Konsentrasi pada sediaan masker *peel-off* yang digunakan pada pengujian ini sama dengan ekstrak yaitu 8000, 4000, 2000, 1000 ppm. Kontrol positif yang digunakan merupakan masker *peel-off* yang beredar di pasaran dengan konsentrasi yang sama yaitu 8000, 4000, 2000, 1000 ppm. Pengujian ini menggunakan plate dengan 96 sumur, pada lubang-lubang sumur tersebut dimasukkan ekstrak dari berbagai konsentrasi sebanyak 70 μL lalu ditambahkan dengan 30 μL tirosinase, masing-masing konsentrasi dilakukan dengan tiga kali ulangan. Setelah itu, plate disimpan di dalam ruangan inkubasi yang bertemperatur (37°C) selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan substrat (2mM L-Tirosin dan 12 mM L-Dopa) sebanyak 110 μL ke dalam tiap-tiap lubang sumur, kemudian disimpan kembali plate tersebut ke dalam ruang inkubasi selama 30 menit. Panjang optik dari tiap sumur kemudian ditentukan menggunakan Elisa reader pada panjang gelombang 492 nm untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambat 50% (IC50). Persen inhibisi dihitung dengan cara membandingkan serapan sampel sebelum dan setelah penambahan ekstrak maupun sediaan.

$$\% \text{ inhibisi} = [(A-B)/A] \times 100\%$$

Uji iritasi sediaan masker *peel-off* (Irsan dkk, 2003)

Uji iritasi dilakukan terhadap 10 orang panelis yang dilakukan dengan mengoleskan sediaan masker *peel-off* seluas 2 cm pada tangan kanan. Untuk penentuan skor berdasarkan skor pada uji sampel adalah sebagai berikut:

- a. Eritema
Tidak ada eritema = 0
Eritema sangat ringan = 1
Eritema ringan = 2
Eritema sedang = 3
Eritema berat = 4
- b. Edema
Tidak ada edema = 0
Edema sangat ringan = 1
Edema ringan = 2
Edema sedang = 3
Edema berat = 4

Indeks iritasi dihitung dengan cara menjumlahkan nilai dari setiap relawan percobaan setelah 24 jam pemberian masker gel, kemudian dibagi 4. Penilaian iritasinya sebagai berikut:

- 0,00 = Tidak mengiritasi
0,04 - 0,99 = Sedikit mengiritasi
1,00 - 2,99 = Iritasi ringan
3,00 - 5,99 = Iritasi sedang
6,00-8,00 = Iritasi berat

Hasil

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi, simplisia daun sukun sebanyak 2 kg dimasukan kedalam botol coklat dan dimasukan pelarut etanol 96% direndam selama 24 jam dengan 6 jam pertama sesekali dilakukan pengadukan. Kemudian diulangi lagi hingga 3 kali perlakuan. Hasil maserasi yang diperoleh kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dipekatan kembali menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu dan tekanan yang sesuai hingga diperoleh ekstrak yang kental dan diperoleh nilai rendemen ekstrak daun sukun. Rendemen ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis* F) dengan pelarut etanol 96% diperoleh sebesar 6,44%. Hasil penentuan kadar air diperoleh rata-rata hasil kadar air dan serbuk daun sukun sebesar 7,5%. Hasil ini sesuai dengan persyaratan penentuan kadar air oleh MMI yaitu kurang dari 10%.

Uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh ekstrak etanol daun sukun dilakukan dengan menggunakan asam kojat sebagai kontrol positif dan sebagai pembanding digunakan masker *peel-off* yang beredar di pasaran. Hasil uji IC_{50} pada ekstrak daun sukun dengan substrat L-tirosin memiliki nilai sebesar 4889,467 ppm dan

substrat L-Dopa sebesar 6916,626 ppm. Asam kojat memiliki nilai IC_{50} 21,625 ppm untuk substrat L-tirosin dan 73,115 ppm untuk substrat L-Dopa, jika dibandingkan nilai IC_{50} ekstrak daun suku jauh lebih besar dibandingkan dengan standar asam kojat.

Hasil uji IC_{50} pada sediaan masker *peel-off* dengan substrat L-tirosin memiliki nilai sebesar 12680,48 ppm dan substrat L-Dopa sebesar 33402,96 ppm. Dibandingkan dengan masker pembanding atau kontrol positif masker *peel-off* yang ada di pasaran memiliki nilai IC_{50} 297067 ppm untuk substrat L-Tirosin dan 2233103 ppm untuk substrat L-Dopa, nilai IC_{50} pada kontrol positif lebih besar dari masker *peel-off* yang dibuat. Pada kedua penelitian tersebut

menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun suku dan sediaan masker *peel-off* tidak adanya penghambatan aktivitas enzim tirosinase karena nilai IC_{50} substrat L-tirosin (monofenolase) maupun L-Dopa (difenolase) >1000 ppm.

Dari pengamatan yang dilakukan didapatkan nilai indeks dari uji iritasi 0,00 sehingga tidak didapatkan adanya reaksi iritasi dari 10 orang panelis. Parameter penilaian yang digunakan pada uji iritasi adalah edema dan eritema selama 24 jam, sehingga sediaan masker *peel-off* dapat digunakan secara aman dan tidak menimbulkan reaksi iritasi pada kulit. Adapun hasil pengujian iritasi dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Uji Iritasi pada Basis dan Masker Peel-Off

Perlakuan	Hasil Pengamatan	
	Eritema	Edema
Basis	0,00	0,00
Masker Peel-off Konsentrasi 40%	0,00	0,00

Pembahasan

Ekstraksi daun sukun dilakukan dengan cara maserasi. Kelebihan dari metode ini yaitu relative sederhana, tidak memerlukan alat yang rumit, relatif mudah, murah dan dapat menghindari rusaknya komponen senyawa akibat panas.

Pelarut yang digunakan adalah etanol, dengan pertimbangan bahwa sifat dari etanol mudah menguap, murah, mudah didapat dan aman. Prinsip dari ekstraksi sendiri adalah penarikan senyawa-senyawa dari tanaman oleh pelarut yang sesuai, baik dari segi keamanan atau kepolarannya. Berdasarkan pengujian sebelumnya menunjukkan bahwa etanol 96% mampu menarik flavonoid dalam jumlah yang lebih besar⁷. Ekstraksi selanjutnya dilakukan dengan cara maserasi. Setelah dimaserasi, kemudian dilakukan penyaringan dan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental dan diperoleh rendemen ekstrak daun sukun.

Kadar air merupakan banyaknya air yang terkandung dalam bahan yang dinyatakan dalam persen. Kadar air merupakan salah satu karakteristik yang penting pada suatu sampel, karena air dapat mempengaruhi penampakan dan tekstur masker.

Tirosinase merupakan enzim monooksigenase yang berperan sebagai katalisator pada reaksi hidrosilaksi monofenol menjadi bentuk difenol (monofenolase) dan oksidasi difenol menjadi kuinon (difenolase). Tirosinase memiliki peranan penting dalam pembentukan melanin selama proses melanogenesis karena kemampuannya menghidroksilasi L-tirosin (monofenol) menjadi L-Dopa (difenol) dan mengoksidasi L-dopa menjadi dopakuinon (senyawa kuinon). Dopakuinon yang terbentuk akan bereaksi secara spontan membentuk dopakrom. Peran tirosinase dalam proses melanogenesis terjadi karena tirosinase memiliki gugus tembaga (Cu) yang merupakan active site yang dapat berkaitan dengan substrat pada proses pembentukan melanin (Arung, 2006).

Penelitian ini menggunakan *microplate* 96 sumuran karena mempunyai keuntungan relative cepat. Pengujian aktivitas inhibitor tirosinase dilakukan pada ekstrak daun sukun, asam kojat, sediaan masker peel-off daun sukun, dan masker pembanding untuk mengetahui daya penghambatan yang lebih baik. Kontrol positifnya pada ekstrak menggunakan asam kojat dan pada masker menggunakan salah satu masker yang ada di pasaran. Baik

tidaknya suatu ekstrak dalam menghambat kerja enzim tirosinase ekstrak yang diujikan dalam menghambat kerja dilihat dari nilai IC_{50} nya. IC_{50} (*Inhibitor Concentration*) adalah kemampuan ekstrak yang diujikan dalam menghambat kerja enzim tirosinase sebesar 50%. aktivitas tirosin tirosinase menggunakan instrumen microplate reader (ELISA).

Nilai IC_{50} menentukan tinggi rendahnya ekstrak daun sukun dan sediaan masker *peel-off* sebagai inhibitor tirosinase untuk penghambat pembentukan melanin. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin berpotensi senyawa tersebut sebagai inhibitor tirosinase.

Berdasarkan hasil uji iritasi pada Tabel 2, basis maupun masker *peel-off* tidak menunjukkan adanya iritasi kulit pada 10 panelis golongan eritema maupun edema selama 24 jam. Sediaan masker *peel-off* dan basis yang dioleskan pada punggung tangan dan didiamkan selama 24 jam kemudian dilihat apakah terdapat iritasi pada kulit yang digolongkan eritema maupun edema. Eritema sendiri merupakan iritasi kemerahan pada kulit dan edema merupakan terjadinya pembengkakan.

Iritasi yang tidak muncul pada formula masker yang dibuat, dengan bahan polivinil alkohol (PVA) dan Propilenglikol merupakan bahan pelarut mengandung

alkohol tetapi tidak mengiritasi kulit. Karena pada umumnya yang bersifat stabil dan tidak menguap adalah yang terbaik.

Kesimpulan

Ekstrak etanol 96% daun sukun (*Artocarpus altilis* F) dan sediaan masker *peel-off* ekstrak etanol 96% daun sukun tidak memiliki kemampuan penghambatan terhadap enzim tirosinase. Selain itu sediaan masker *peel-off* ekstrak etanol daun sukun (*Artocarpus altilis* F) dengan konsentrasi 40% tidak memiliki efek iritasi seperti gejala edema atau erythema terhadap kulit yang sudah diuji pada 10 panelis.

Saran

Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut dengan substrat yang sama yaitu L-Dopa dan L-Tirosin dengan sediaan yang berbeda agar memastikan apakah mempengaruhi nilai IC_{50} dari sediaan yang berbeda.

Daftar Pustaka

1. Uyen LDP, D.H Nguyen., EK Kim. Mechanism of skin pigmentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2008; 13(4):83-95.
2. Fitrie A. Histologi dari Melanosit. Fakultas Kedokteran Bagian Histologi, Sumatera Utara: Universitas Sumatera Utara. 2004. Hlm 4-5.
3. Ohguchi K, T Tanaka. T Kido. Effects of hydroxystilbene derivatives on tyrosinase activity. *Biochemistry Biophysical Research Community*. 2003; 307(4):861-63.
4. Morris, K. Depilatories Mask Scrubs and Bleaching Preparation, Paucher's Perfumes Cosmetics and Soaps. Chapman and Hall: London. Hlm 393.
5. Arung ET, IW Kusuma. YM Iskandar. S Yasutake. K Shimizu. And R Kondo. Screening of Indonesian plants for tyrosinase inhibitory activity. *Journal Wood Science*. 2006: 520-525.
6. Irsan, M.A., Pakki, E.& Usmar. Uji Iritasi Krim Antioksidan Ekstrak Biji Lengken (Euphoria longana Stend) Pada Kulit Kelinci (Oryctolagus cuniculus). *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 2013; 17:55-60.
7. Nuraliyah. Formulasi Masker peel-off Ekstrak Etanol Daun Sukun (Artocarpus Altilis F) sebagai Anti Oksidan dengan Metode DPPH [SKRIPSI]. Bogor: Sekolah Tinggi Teknologi Industri Farmasi Bogor. 2017Hlm 4-12.