

## Penurunan Aktivitas Tirosinase dan Jumlah Melanin oleh Fraksi Etil Asetat Buah Malaka (*Phyllanthus emblica*) pada *Mouse Melanoma B16 Cell-Line*

Reti Hindritiani,<sup>1</sup> Diah Dhianawaty,<sup>2</sup> Muchtan Sujatno,<sup>3</sup> Endang Sutedja,<sup>1</sup> Setiawan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran-Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung, <sup>2</sup>Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, <sup>3</sup>Departemen Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

<sup>4</sup>Departemen Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

### Abstrak

Akumulasi melanin menyebabkan hiperpigmentasi dan bila terdapat pada wajah dapat menimbulkan masalah psikososial. Bahan depigmentasi dari tanaman semakin banyak digunakan. Bahan yang dikembangkan harus efektif menghambat sintesis melanin serta tidak toksik terhadap melanosit. Penelitian ini bertujuan menguji efek fraksi etil asetat buah *Phyllanthus emblica* (*P. emblica*) atau buah malaka, terhadap sintesis melanin dengan mengukur jumlah melanin dan aktivitas tirosinase, yang merupakan enzim utama sintesis melanin, secara spektrofotometrik pada kultur sel melanosit *mouse melanoma B16 cell-line*. Sitotoksitas diukur dengan metode 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Penelitian dilakukan pada November–Desember 2009 di *Department of Biochemistry and Diabetes Research Centre, Chonbuk National University Medical School, Korea Selatan*. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas tirosinase dan jumlah melanin menurun bergantung pada dosis perlakuan berbagai konsentrasi fraksi etil asetat buah *P. emblica* dengan *inhibition concentration* (IC) 50 berturut-turut 95,63 dan 16,90 µg/mL, serta *lethal dose* (LD) 50 pada konsentrasi 106,64 µg/mL. Simpulan, fraksi etil asetat buah *P. emblica* mempunyai potensi sebagai bahan depigmentasi, karena mampu menurunkan sintesis melanin melalui inhibisi aktivitas tirosinase. [MKB. 2013;45(2):118–24]

**Kata kunci:** Aktivitas tirosinase, etil asetat, melanin, *Phyllanthus emblica*

## Reduction of Tyrosinase Activity and Melanin Amount by Ethyl Acetate Fraction from Malaka (*Phyllanthus emblica*) Fruit in Mouse Melanoma B16 Cell-Line

### Abstract

Melanin accumulation can lead to hyperpigmentation, and if it occurs on the face can cause psychosocial problem. Depigmenting agents derived from plants are increasingly utilized. Agents being developed have to be effective in inhibiting melanin synthesis and should not be toxic to melanocyte. This study aimed was to examine the effect of ethyl acetate fraction from *Phyllanthus emblica* (*P. emblica*) fruit, also known as malaka fruit, towards melanin synthesis, which was measured from the melanin amount and tyrosinase activity, the key regulatory enzyme in melanin synthesis, spectrophotometrically towards melanocytes of mouse melanoma B16 cell-line. The cytotoxic effect towards melanocytes was measured with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. This study was conducted on November–December 2009 in Department of Biochemistry and Diabetes Research Centre, Chonbuk National University Medical School, South Korea. The result of this study showed that tyrosinase activity and melanin amount decreased in a dose-dependent manner towards various concentrations of ethyl acetate fraction of *P. emblica* fruit with inhibition concentration (IC) 50=95.63 and 16.90 µg/mL, respectively and lethal dose (LD) 50 concentration 106.64 µg/mL. In conclusion, ethyl acetate fraction of *P. emblica* fruit is a potential depigmenting agent, since it can reduce melanin synthesis by inhibition of tyrosinase activity. [MKB. 2013;45(2):119–24]

**Key words:** Ethyl acetate, melanin, *Phyllanthus emblica*, tyrosinase activity

---

**Korespondensi:** Reti Hindritiani, dr., Sp.KK(K), Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran-Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Jl. Pasteur No 38 Bandung, *mobile* 08156022505 *e-mail* r\_hindritiani@yahoo.com

## Pendahuluan

Melanin merupakan pigmen utama menentukan warna kulit<sup>1</sup> yang disintesis pada melanosom yaitu organela khusus pada melanosit yang terletak pada lapisan basal epidermis.<sup>2</sup> Sintesis melanin dimulai dengan oksidasi asam amino L-tirosin menjadi 3,4 *dihydroxyphenylalanine* (L-DOPA) dan selanjutnya dioksidasi menjadi DOPA $quinone$ , kemudian keduanya dikatalisis oleh tirosinase. DOPA $quinone$  kemudian akan diubah menjadi DOPA $chrome$ , dan pada proses berikutnya diubah menjadi 5,6-*dihydroxyindole* (DHI) dan 5,6-*dihydroxyindole-2-carboxylic acid* (DHICA) yang akan membentuk eumelanin yaitu melanin berwarna hitam dan juga coklat. Pada proses tersebut, tirosinase juga berperan untuk mengubah DHI yang menjadi *indole-5-6-quinone*. Melanin yang terbentuk kemudian ditransfer dan didistribusikan ke keratinosit epidermal di sekitar melanosit maka akan terjadi pigmentasi kulit.<sup>1,2</sup> Dari uraian di atas tampak bahwa enzim utama dalam sintesis melanin adalah tirosinase. Enzim ini berperan untuk katalisis berbagai tahap biosintesis melanin.<sup>2</sup>

Jalur sinyal yang terutama berperan dalam transkripsi gen yang diperlukan dalam sintesis melanin di melanosit adalah jalur *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) atau *cAMP-dependent protein kinase* (PKA). Peningkatan jalur cAMP intraselular akan mengaktifasi transkripsi gen spesifik, di antaranya *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) yang merupakan faktor transkripsi utama tirosinase.<sup>2</sup>

Kelainan pigmentasi pada kulit dapat berupa hipopigmentasi, hiperpigmentasi, atau campuran hipo/hiperpigmentasi. Hiperpigmentasi lokal pada wajah yang sering dikeluhkan adalah melasma, *freckles*, dan hiperpigmentasi pascainflamasi. Kelainan ini dapat menimbulkan rasa malu dan stres pada penderita, sehingga perlu penanganan yang sebaik-baiknya. Pengobatan hiperpigmentasi terutama mempergunakan bahan depigmentasi, yaitu bahan yang dapat menghambat tahap-tahap dalam pigmentasi kulit.<sup>1</sup> Mekanisme kerja bahan depigmentasi terutama menghambat tirosinase yang merupakan enzim utama sintesis melanin. Bahan depigmentasi klasik seperti hidrokinon merupakan obat yang paling sering dipergunakan untuk pengobatan hiperpigmentasi dengan cara kerja menghambat enzim tirosinase, tetapi bersifat sitotoksik terhadap sel melanosit.<sup>3</sup> Penggunaan tanaman sebagai bahan depigmentasi semakin dikembangkan, dari beberapa penelitian diketahui berbagai ekstrak tanaman mampu menghambat sintesis melanin tanpa bersifat sitotoksik.<sup>4</sup>

*Phyllanthus emblica* (*P. emblica*)/*Embllica officinalis*/malaka (Indonesia) banyak tumbuh

tersebar di Cina, India, Malaysia, dan Indonesia. Buahnya berwarna hijau laut dan rasanya asam sepat, terkadang dimakan mentah atau sebagai manisan.<sup>5</sup> Buah ini diketahui mempunyai efek antioksidan<sup>6</sup> dan banyak digunakan sebagai obat tradisional untuk sariawan, gusi berdarah, batuk, flu, tuberkulosis, dan gangguan kekebalan tubuh.<sup>5</sup>

Peneliti sebelumnya telah menguji efek ekstrak etanol buah *P. emblica* dalam menurunkan jumlah melanin. Pengujian jumlah melanin dilakukan pada kultur sel melanosit manusia, sedangkan aktivitas tirosinase diuji tanpa menggunakan sel dengan menggunakan *mushroom tyrosinase*. Peneliti tersebut memperkirakan bahwa hambatan sintesis melanin disebabkan oleh karena terdapat *hydrolyzable tannin* yang terkandung di dalam tanaman tersebut.<sup>7</sup> Tanin merupakan senyawa fenol yang larut dalam air atau bersifat polar, sehingga diharapkan akan terfraksi dalam fraksi yang lebih polar seperti fraksi etil asetat. Buah *P. emblica* mengandung asam galat dan elagat yang merupakan komponen tanin.<sup>6</sup> Dari penelitian menggunakan tanaman lain, diketahui asam galat<sup>8</sup> dan elagat<sup>9</sup> memiliki kemampuan menghambat tirosinase. Dari satu penelitian diketahui bahwa asam galat merupakan komponen utama fraksi etil asetat buah *P. emblica*.<sup>10</sup> Belum diketahui bagaimana efek fraksi etil asetat buah *P. emblica* terhadap sintesis melanin dan sitotoksitasnya pada *mouse melanoma B16 cell-line*.

Tujuan penelitian ini untuk menguji efek fraksi etil asetat buah *P. emblica* terhadap jumlah melanin, aktivitas tirosinase, dan sitotoksitas pada kultur sel *melanosit mouse melanoma B16 cell-line*. Penurunan sintesis melanin itu dinilai setelah sel terlebih dahulu diinduksi menggunakan *isobutyl methyl xanthine* (IBMX) yang dapat meningkatkan kadar cAMP intraselular, sehingga terjadi sintesis melanin melalui jalur c-AMP.<sup>11</sup>

## Metode

Buah *P. emblica* diambil dari hutan di kampung Cikundul desa Cijagang, kecamatan Cikalong Kulon Cianjur. Identifikasi tanaman dilakukan di tempat Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Padjadjaran. *Mouse melanoma B16 cell-line* diperoleh dari *Korean Cell-Line Bank* (Seoul, Korea). Sel dikultur pada media *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) dengan penambahan *fetal bovine serum* (FBS) 10%, penisilin 100 U/mL, streptomisin 0,1 mg/mL, dan amfoterisin B 0,25 µg/mL. Induksi sintesis melanin dilakukan dengan menambahkan IBMX (Sigma).

Ekstraksi buah *P. emblica* dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, FMIPA Universitas Padjadjaran dengan metode maserasi sederhana. Buah *P. emblica* dipotong sekecil-kecilnya dan dikeringkan pada suhu ruangan selama 12–24 jam. Bahan direndam dengan metanol selama 7 hari, dilakukan penyaringan, maserat ditampung, kemudian dievaporasi sehingga diperoleh ekstrak metanol pekat. Ekstrak metanol pekat diencerkan dengan sejumlah air, ditambahkan n-heksana, lalu ditempatkan dalam corong pisah, kemudian dievaporasi sehingga diperoleh fraksi n-heksana dan air. Fraksi air ditambah etil asetat (EtoAc), ditempatkan di dalam corong pisah, kemudian dievaporasi sehingga diperoleh fraksi etil asetat dan air.

Pengujian sintesis melanin dan sitotoksitas dilakukan di *Department of Biochemistry and Diabetes Research Centre, Chonbuk National University Medical School*, Korea Selatan pada bulan November–Desember 2009. Sampel uji dibuat menggunakan pelarut *dimethylsulphoxide* (DMSO) (Sigma) dengan konsentrasi 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, dan 100 µg/mL.

Aktivitas tirosinase diukur mempergunakan metode yang diadopsi berdasarkan Lv dkk.<sup>11</sup> dengan menilai kemampuan tirosinase dalam mengkatalisis L-tirosin menjadi DOPAchrome. DOPAchrome yang terbentuk berbanding lurus dengan aktivitas tirosinase dan juga dapat diukur serapannya pada panjang gelombang 475 nm. Sel dengan pertumbuhan 40% memenuhi cawan kultur diberi IBMX, diinkubasi selama 72 jam, dicuci sebanyak 2 kali menggunakan *phosphate-buffered saline* (PBS) dan dilisiskan dengan larutan 20 mM tris-0,1% triton X-100 (pH 7,5). Bahan uji dengan berbagai konsentrasi ditambahkan pada sel dan disimpan dalam suhu 4 °C selama 30 menit. Setelah itu dilaksanakan sentrifugasi 12.000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Supernatan sebagian dipisahkan untuk uji protein dan sebagian dipergunakan untuk uji aktivitas tirosinase dengan ditambahkan larutan L-DOPA segar (L-DOPA 0,1% dalam *sodium phosphate* 0,1M, pH 6,8), diinkubasi pada suhu 37 °C, dan perubahan serapan diukur pada menit ke-10, 20, 30 dan 60 dengan spektrofotometer (*Spectra MAX PLUS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*). Hasil pemeriksaan dihitung sebagai persentase terhadap kontrol, yaitu sel yang hanya diberi perlakuan IBMX.

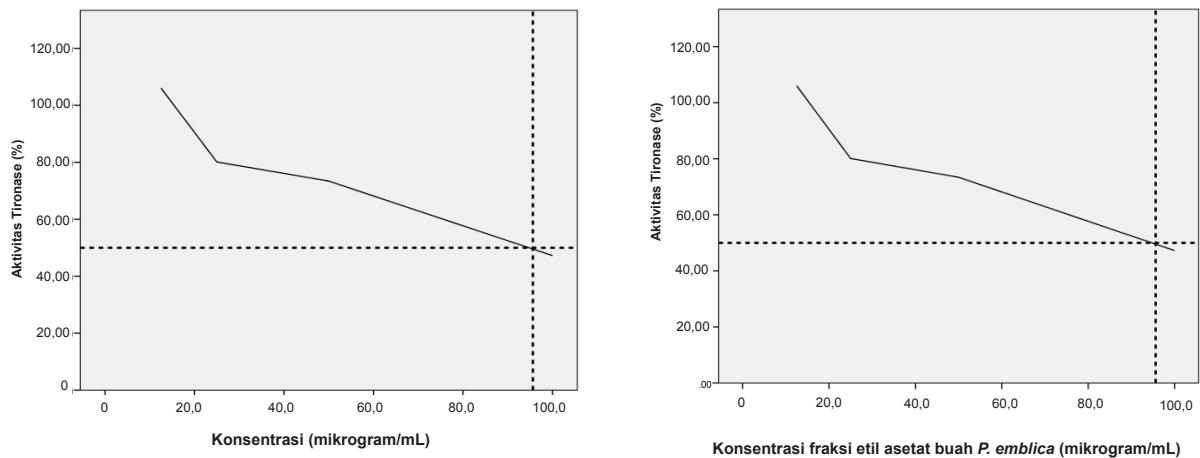
Cara pengukuran jumlah melanin dilakukan menggunakan metode yang diadopsi berdasarkan metode Lv dkk.<sup>11</sup> Sel dengan pertumbuhan 80% memenuhi cawan kultur dicuci dua kali dengan PBS, dilepaskan dari dasar cawan menggunakan tripsin 0,25%, ditambahkan DMEM, diresuspensi menggunakan pipet, kemudian dimasukkan ke

dalam 6 *well-plate* dan diinkubasi pada suhu 37 °C, kelembaban udara 95% dan tekanan 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Setelah itu dilakukan tahap perlakuan, yaitu ditambahkan pelarut saja, IBMX saja, dan IBMX+bahan uji, kemudian diinkubasi 72 jam. Sel selanjutnya dipanen dengan dicuci dua kali menggunakan PBS dan dilisiskan dengan larutan 20 mM tris-0,1% triton X-100 (pH 7,5). Larutan sebagian dipisahkan untuk uji protein dan sebagian dilanjutkan untuk pengukuran jumlah melanin dengan dipresipitasi mempergunakan *trichloroacetic acid* (TCA) 20% dan 10%, dikeringkan dengan *ethyl alcohol:diethyl ether* (3:1) dan *diethyl ether*, dibiarkan dalam udara terbuka selama 30 menit, kemudian dilarutkan dalam KOH 0,85 M dan dipanaskan dalam penangas selama ±15 menit. Serapan larutan lalu diukur dengan spektrofotometer (Beckman, DU 5.30) pada panjang gelombang 440 nm. Hasil pemeriksaan dihitung sebagai persentase terhadap sel yang hanya diberi perlakuan IBMX.

Uji protein yang menggambarkan jumlah sel dilakukan dalam pengujian mempergunakan sel. Hasil serapan aktivitas tirosinase maupun jumlah melanin harus dibagi dengan jumlah sel, sehingga didapatkan hasil aktivitas tirosinase dan jumlah melanin setiap sel secara akurat. Uji protein dilakukan dengan metode yang diadopsi berdasarkan Lv dkk.<sup>11</sup> Supernatan dari larutan sel diberi protein assay buffer (*dye reagent concentrate*) dan serapannya diukur pada 595 nm dengan spektrofotometer (Beckman, DU 5.30).

Metode 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide atau MTT assay dipergunakan untuk uji Sitotoksitas. Sel dengan pertumbuhan 80% memenuhi cawan kultur dicuci dan dilepaskan dari dasar cawan, selanjutnya ditambahkan DMEM, diresuspensi menggunakan pipet dan dimasukkan dalam 96 *wells-plate*. Sel kemudian ditambah pelarut DMSO saja sebagai kontrol dan yang lainnya ditambahkan bahan uji dengan berbagai konsentrasi, diinkubasi selama 24 jam. Medium diaspirasi dan sel diberi larutan MTT (5 mg/mL dalam PBS), ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Larutan MTT diaspirasi kembali, kemudian sel diberi DMSO dan serapan diukur pada 570 nm dengan spektrofotometer (*Spectra MAX PLUS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*). Seluruh prosedur dilakukan sebanyak 2 kali.

Perbedaan variabel rata-rata antara berbagai kelompok perlakuan diuji dengan analisis varian dua arah (*two way ANOVA*) dan dilanjutkan Uji Duncan untuk mengetahui secara spesifik perlakuan yang menunjukkan perbedaan yang nyata. Seluruh penghitungan statistika dikerjakan menggunakan piranti lunak SPSS versi 15.0.



Gambar 1 Penurunan Aktivitas Tirosinase Fraksi Etil Asetat Buah *P. emblica*

### Hasil

Aktivitas tirosinase menurun bergantung pada dosis dengan *inhibition concentration 50%* (IC50) pada konsentrasi 95,63 µg/mL oleh perlakuan dengan fraksi etil asetat buah *P. emblica* (Gambar 1). Fraksi etil asetat buah *P. emblica* juga dapat menurunkan jumlah melanin bergantung pada dosis IC50 konsentrasi 16,90 µg/mL (Gambar 2).

Korelasi antara aktivitas tirosinase dan jumlah melanin sebesar  $r=0,95$  yang berarti terdapat korelasi yang sangat tinggi antara kedua variabel tersebut. Hal ini menunjukkan pola searah yaitu apabila aktivitas tirosinase turun, maka produk akhirnya yaitu melanin akan turun.

Jumlah sel-sel mati pada perlakuan dengan fraksi etil asetat buah *P. emblica* menunjukkan peningkatan mulai konsentrasi 50 µg/mL dengan *lethal dose 50%* (LD50) pada konsentrasi 106,64 µg/mL (Gambar 3).

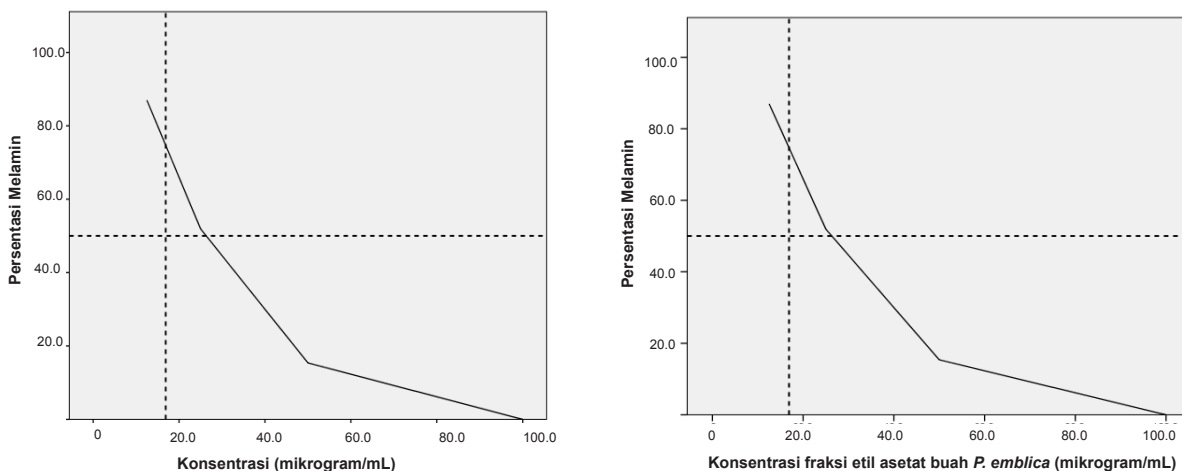
### Pembahasan

Metode yang paling banyak dipergunakan untuk penapisan bahan depigmentasi yaitu uji hambatan tirosinase. Beberapa peneliti sudah melakukan konfirmasi dengan mengukur penurunan jumlah melanin.<sup>12</sup> Kultur sel, termasuk *melanoma B16 cell-line*, merupakan bahan yang baik untuk uji efek hambatan sintesis melanin *in vitro*.<sup>3</sup> Pada penelitian ini fraksi etil asetat buah *P. emblica* dapat menurunkan aktivitas tirosinase dan jumlah melanin bergantung pada dosis mulai konsentrasi 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, dan 100 µg/mL dengan IC50 berturut-turut 95,63 µg/mL dan 16,90 µg/mL. Hindritriani dkk.<sup>13</sup> mendapatkan ekstrak metanol buah *P. emblica* menurunkan aktivitas tirosinase lebih kuat dibanding fraksi etil asetat (IC50=73,083 µg/mL) dan menurunkan jumlah melanin lebih lemah bila dibandingkan dengan fraksi etil asetat (IC50=42,853 µg/mL)

Tabel Persamaan Probit pada Aktivitas Tirosinase, Jumlah Melanin, dan Jumlah Sel Mati

Variabel	Parameter	Nilai	p	Interval Kepercayaan (95%)
Aktivitas tirosinase	Konsentrasi	-0,013	0,000	-0,017--0,008
	Konstanta	1,199	0,000	1,029--1,369
	Persamaan probit	$Y=-0,013+1,199 X$	0,618	
Jumlah melanin	Konsentrasi	-0,030	0,000	-0,038--0,22
	Konstanta	0,513	0,000	0,373--0,654
	Persamaan probit	$Y=-0,030+0,513 X$	0,001	
Jumlah sel mati	Konsentrasi	0,016	0,000	0,012--0,021
	Konstanta	-1,749	0,000	-1,902--1,597
	Persamaan probit	$Y=0,016-1,749 X$	0,226	





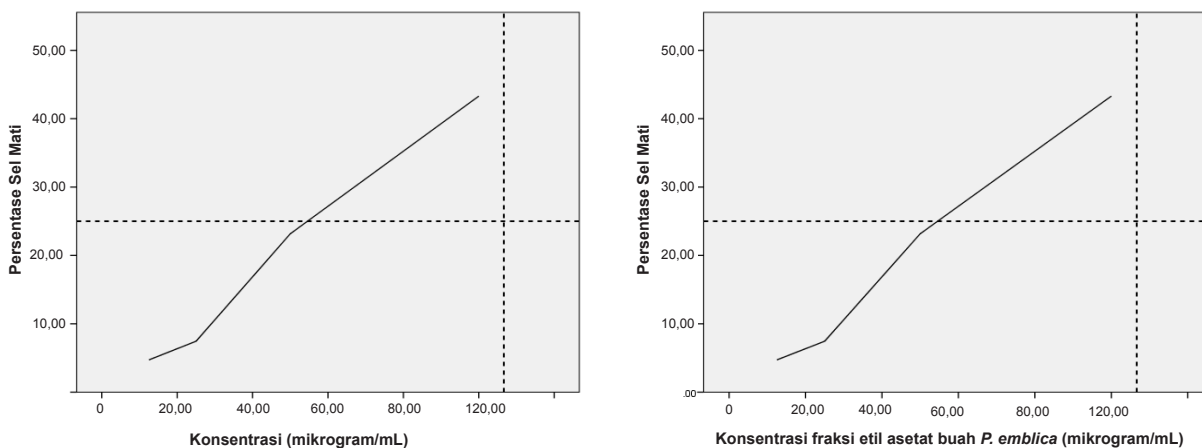
Gambar 2 Penurunan Jumlah Melanin oleh Fraksi Etil Asetat Buah *P. emblica*

pada *melanoma B16 cell-line*. Chaudhuri dkk.<sup>7</sup> mengukur penurunan jumlah melanin disebabkan ekstrak etanol buah *P. emblica* dengan konsentrasi 50 µg/mL pada kultur sel melanosit manusia, dan mendapatkan hambatan produksi melanin sebesar 41–47% pada inkubasi hari ke-11. Uji hambatan aktivitas tirosinase dilakukan tanpa sel, yaitu mempergunakan *mushroom tyrosinase* dan disimpulkan bahwa ekstrak etanol buah *P. emblica* menghambat aktivitas tirosinase.

Tirosinase merupakan enzim utama dalam sintesis melanin karena mempunyai kemampuan mengkatalisis tiga reaksi yang berbeda dalam satu jalur biokimia sintesis melanin, dengan cara mengubah L-tirosin menjadi DOPA, mengubah DOPA menjadi DOPAquinone, dan DHI menjadi indole-5-6-quinone, dengan hasil akhir berupa

melanin yang berwarna hitam.<sup>2</sup> Pada penelitian didapatkan penurunan aktivitas tirosinase diikuti penurunan produk akhir yaitu melanin dengan korelasi sangat tinggi ( $r=0,95$ ) antara aktivitas tirosinase dan jumlah melanin.

Sintesis melanin diregulasi oleh berbagai jalur sinyal. Jalur sinyal yang berperan dalam transkripsi gen yang diperlukan dalam sintesis melanin di melanosit adalah jalur *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) atau *cAMP-dependent protein kinase* (PKA), jalur *diacylglycerol* (DAG)/protein kinase C (PKC), jalur *mitogen-activated protein* (MAP) kinase, dan jalur *cyclic guanosine monophosphate* (cGMP). Jalur cAMP mempunyai peran sangat penting dalam regulasi sintesis melanin.<sup>2</sup> Pada jalur ini, cAMP intraselular akan mengaktivasi transkripsi gen yang spesifik



Gambar 3 Jumlah Sel Mati pada Perlakuan dengan Fraksi Etil Asetat Buah *P. emblica*

melalui cAMP-dependent protein kinase (PKA). *Cyclic adenosine monophosphate* mengaktivasi PKA dengan cara mengikat subunit regulator PKA yang akan mengakibatkan subunit katalitik PKA terlepas dan teraktivasi. Subunit katalitik PKA kemudian bertranslokasi ke nukleus dan akan memfosforilasi cAMP response-element binding protein (CREB), sehingga dapat menginduksi transkripsi MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*)<sup>14</sup> yang merupakan faktor transkripsi paling utama untuk enzim tirosinase.<sup>2</sup> Telah diketahui sebelumnya bahwa peningkatan cAMP intraselular akan menginduksi sintesis melanin. *Isobutyl methyl xanthine* (IBMX) dapat meningkatkan kadar cAMP intraselular dengan cara menghambat enzim fosfodiesterase, yaitu enzim yang mendegradasi cAMP menjadi AMP, sehingga terjadi sintesis melanin.<sup>11</sup> Pada penelitian ini sintesis melanin dalam sel melanosit terlebih dahulu diinduksi oleh penambahan IBMX dan dengan perlakuan ekstrak etil asetat pada buah *P. emblica* terjadi penurunan jumlah melanin dan aktivitas tirosinase. Hambatan sintesis melanin oleh ekstrak etil asetat buah *P. emblica* pada penelitian dapat dikatakan terjadi melalui jalur cAMP, walaupun mekanisme di tingkat molekular masih harus dibuktikan.

Buah *P. emblica* mengandung asam galat dan elagat yang merupakan komponen tanin.<sup>6</sup> Chaudhuri dkk.<sup>7</sup> menduga bahwa bahan aktif buah *P. emblica* yang berpotensi menghambat sintesis melanin adalah komponen tanin. Dari berbagai penelitian diketahui bahwa asam galat dari daun *Eucalyptus globulus*<sup>8</sup> dan asam elagat dari ekstrak buah delima (*Punica granatum* L.)<sup>9</sup> mampu menghambat tirosinase. Kumaran dan Karunakaran<sup>10</sup> mendapatkan bahwa fraksi etil asetat buah *P. emblica* mempunyai komponen utama asam galat. Pada penelitian ini fraksi etil asetat *P. emblica* mempunyai efek menurunkan aktivitas tirosinase. Hal ini kemungkinan karena kandungan asam elagat serta komponen asam galat yang tinggi di dalam fraksi etil asetat buah *P. emblica*. Masih harus dibuktikan bahan aktif apa dari fraksi etil asetat buah *P. emblica* yang berperan menghambat aktivitas tirosinase.

Fraksi etil asetat buah dari *P. emblica* juga diketahui memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi bila dibandingkan dengan fraksi lainnya.<sup>5,10</sup> Kemungkinan bahan ini dapat juga menurunkan sintesis melanin dengan menghambat *superoxide anion radical*.<sup>7</sup> *Superoxide anion radical* dapat meningkatkan proses oksidasi L-tirosin menjadi L-DOPA sebanyak 40 kali lipat.<sup>15</sup>

Bahan depigmentasi tersebut harus efektif dapat menghambat sintesis melanin dan tidak toksik terhadap sel melanosit.<sup>3</sup> Pada penelitian ini uji sitotoksitas dilakukan menggunakan

MTT assay. *Dimethylsulphoxide* bersifat toksik, sehingga digunakan sebagai pembanding untuk membuktikan bahwa kematian sel pada penelitian ini bukan akibat DMSO, tetapi disebabkan oleh ekstrak bahan uji. Jumlah sel mati oleh perlakuan dengan fraksi etil asetat buah *P. emblica* mulai meningkat pada konsentrasi 50 µg/mL dengan LD50 pada konsentrasi 106,64 µg/mL (Gambar 3). Hindritriani dkk.<sup>13</sup> melakukan uji sitotoksitas dengan MTT assay pada ekstrak metanol buah *P. emblica* dan mendapatkan ekstrak metanol relatif lebih tidak sitotoksik, jumlah sel hidup masih lebih dari 90% pada konsentrasi 50 maupun 100 µg/mL, dengan nilai LD50 pada 239,207 µg/mL.

Simpulan, fraksi etil asetat buah *P. emblica* mampu menurunkan jumlah melanin melalui penurunan aktivitas tirosinase, sehingga memiliki aktivitas sebagai bahan depigmentasi.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih ditujukan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui *Sandwich-like* Program tahun 2009, serta kepada Byung-Hyun Park dan Jin-Woo Park dari *Department of Biochemistry and Diabetes Research Center, Chonbuk National University Medical School*, Korea Selatan yang telah membimbing dan memberi izin menggunakan fasilitas laboratorium.

## Daftar Pustaka

1. Baumann L, Saghari S. Skin pigmentation and pigmentation disorders. Dalam: Baumann L, Saghari S, Weisberg E, penyunting. *Cosmetic dermatology principles and practice*. Edisi ke-2. New York: McGraw-Hill Co; 2009. hlm. 98–108.
2. Park HY, Yaer M. Biology of melanocytes. Dalam: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K, penyunting. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. Edisi ke-8. New York: McGraw-Hill; 2012. hlm. 795–81.
3. Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res*. 2006;19(6):550–71.
4. Zhu W, Gao J. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agent for the improvement of skin pigmentation disorders. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2008; 13(1):20–4.
5. Liu X, Cui C, Zhao M, Wang J, Luo W,

- Yang B, dkk. Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities. *Food Chem.* 2008;109(4):909–15.
6. Dharmaranda S. emblic myrobalans: amla, key herb of ayurvedic medicine 2003 (diunduh 16 April 2009). Tersedia dari: <http://www.itmonline.org/arts/amla.htm>.
  7. Chaudhuri RK, Lascu Z, Puccetti G. Inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* tannins on melanin synthesis. *Cosm & Toil.* 2007;122:73–80.
  8. Hasegawa T, Takano F, Takata T, Niiyama M, Ohta T. Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry.* 2008;69(3):747–53.
  9. Yoshimura M, Watanabe Y, Kasai K, Yamakoshi J, Koga T. Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosinase activity and ultraviolet-induced pigmentation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69(12):2368–73.
  10. Kumaran A, Karunakaran RJ. Nitric oxide radical scavenging active components from *Phyllanthus emblica* L. *Plant Foods for Hum Nutr.* 2006;61(1):1–5.
  11. Lv N, Koo JH, Yoon HY, Yu J, Kim KA, Choi IW, dkk. Effect of *Angelica gigas* extract on melanogenesis in B16 melanoma cells. *Int J Mol Med.* 2007;20(5):763–7.
  12. Smit N, Vicanova J, Pavel S. The hunt for natural skin whitening agents. *Int J Mol Sci.* 2009;10(12):5326–49.
  13. Hindritiani R, Kurnia D, Setiawan, Sujatno M, Sutedja E. Penurunan sintesis melanin oleh ekstrak metanol buah *Phyllanthus emblica* pada mouse melanoma B16 cell line. *MDVI.* 2011;38(4):154–9.
  14. Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet.* 2004;38:3654–11.
  15. Wood JM, Schallreuter KU. Studies on the reactions between human tyrosinase, superoxide anion, hydrogen peroxide and thiols. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1074(3): 378–85.