

Potensi Ekstrak Biji Coklat (*Theobroma cacao* Linn) sebagai Inhibitor Tirosinase untuk Produk Pencerah Kulit

The Potency of Cocoa Bean (*Theobroma cacao* Linn) Extract as Tyrosinase Inhibitory for Skin Lightening Product

Aprillia Kurniasari^{1*}, Effionora Anwar², Joshita Djajadisastra²

¹ Program Magister Herbal, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia

² Departemen Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia

Diterima: 12 Oktober 2017

Direvisi: 22 Desember 2017

Disetujui: 5 Januari 2018

Abstrak

Hiperpigmentasi merupakan peristiwa yang terjadi akibat produksi pigmen kulit yang berlebihan. Warna kulit sangat dipengaruhi oleh keberadaan melanin, dimana keberadaan melanin sangat dipengaruhi oleh enzim tirosinase. Biji coklat (*Theobroma Cacao* Linn) merupakan salah satu bahan yang kaya akan senyawa flavonoid diantaranya adalah senyawa polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan dan inhibitor tirosinase. Tujuan penelitian ini untuk menguji potensi ekstrak biji coklat sebagai inhibitor tirosinase untuk bahan aktif pencerah kulit. Metode yang digunakan dalam penelitian adalah laboratorium eksperimental dengan beberapa pengujian antara lain kadar flavonoid total dan uji aktivitas inhibitor tirosinase. Hasil penelitian ini adalah terdapat aktivitas inhibitor tirosinase pada ekstrak etanol biji coklat. Aktivitas inhibitor tersebut dapat dilihat dari nilai IC₅₀ untuk reaksi monofenolase dan difenolase masing-masing adalah 352,05 µg mL⁻¹ dan 836,20 µg mL⁻¹. Nilai tersebut lebih besar jika dibandingkan asam kojat, untuk monofenolase sebesar 2,38 µg mL⁻¹ dan difenolase 10,74 µg mL⁻¹. Selain itu juga terdapat kandungan senyawa flavonoid total sebanyak 0,05 %b/b, sehingga ekstrak etanol biji coklat ini merupakan bahan alam yang berpotensi untuk digunakan dalam formulasi krim pemutih dalam bidang kefarmasian.

Kata kunci: Hiperpigmentasi; Inhibitor aktivitas tirosinase; Biji coklat

Abstract

Hyperpigmentation is a condition of excessive skin pigments production. The skin colour is strongly influenced by the presence of melanin that marked by the melanin tyrosinase enzyme activity. Cocoa (*Theobroma cacao* Linn) is one of the ingredients which are rich in flavonoids include polyphenolic compounds that used as antioxidants and a tyrosinase inhibitor. The aim of this study is to examine the potential of the cocoa bean extract as a tyrosinase inhibitor for skin lightening active ingredients. The method of the study was experimental laboratories, among others: total flavonoid and tyrosinase inhibitory activity assay. The result of this research was ethanol extract of cocoa had tyrosinase inhibitor activity. The inhibitory activity could be seen from the IC₅₀ for monophenolase activity were 352.05 µg mL⁻¹ and for diphenolase activity 836.20 µg mL⁻¹ respectively. This value is greater than kojic acid, for monophenolase was 2.38 µg mL⁻¹ and diphenolase was 10.74 µg mL⁻¹. The total flavonoids content was 0.05% w/w so that the ethanol extract of the cocoa bean is a natural product that potential to be used in the formulation of skin lightening cream in the pharmaceutical sciences.

Keywords: Hyperpigmentation; Tyrosinase inhibitory activities; Cocoa bean .

PENDAHULUAN

Kulit merupakan bagian tubuh paling banyak terkena radikal bebas dari sinar ultraviolet (UV) yang berasal dari paparan sinar matahari dan dapat menyebabkan hiperpigmentasi.¹ Hiperpigmentasi merupakan peristiwa yang terjadi akibat produksi pigmen kulit yang berlebihan. Proses tersebut dapat terjadi karena peningkatan proses melanogenesis yang memberikan warna coklat atau coklat kehitaman sehingga kulit menjadi gelap.² Bahan-bahan pemutih seperti merkuri dan hidrokuinon telah banyak digunakan sebagai zat aktif dalam produk kosmetik. Sejak tahun 2008, BPOM sudah melarang penggunaan beberapa bahan pemutih dalam produk kosmetika, termasuk hidrokuinon dan merkuri karena bahan-bahan tersebut merupakan racun bagi melanosit.³

Warna kulit sangat dipengaruhi oleh keberadaan melanin, dimana keberadaan melanin sangat dipengaruhi oleh enzim tirosinase. Enzim ini dapat mengkatalisis dua reaksi biosintesis melanin yaitu O-hidroksilasi dari asam amino L-tirosin menjadi L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), dan oksidasi subsekuen dari L-DOPA menjadi dopakuinon. Senyawa dopakuinon mempunyai kereaktifan yang sangat tinggi sehingga dapat mengalami polimerisasi secara spontan membentuk dopakrom yang kemudian menjadi melanin.⁵ Inhibitor tirosinase dibutuhkan dan berperan penting sebagai penghambat produksi melanin pada lapisan epidermis dan membuat kulit tampak lebih cerah.¹ Penelitian lainnya melaporkan bahwa pengujian inhibitor tirosinase dapat dilakukan dengan mengukur kemampuan ekstrak untuk menghambat fase monofenolase (substrat L-tirosin) dan difenolase (substrat L-DOPA), dengan arbutin dan asam kojat sebagai kontrol positif. Salah satu senyawa kimia yang dapat menghambat aktivitas tirosinase adalah senyawa polifenol yang merupakan kelompok flavonoid.⁶

Hasil penelitian lainnya menyatakan bahwa biji coklat (*Theobroma Cacao Linn*) merupakan salah satu bahan yang kaya akan senyawa flavonoid diantaranya adalah senyawa polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan dan sebagai inhibitor tirosinase.⁷ Pada penelitian sebelumnya kandungan total fenolik pada ekstrak coklat adalah sebesar 49.54 ± 3.39 mg dan jumlah kandungan flavonoid sebanyak 22.42 ± 0.98 mg. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa kandungan polifenol coklat lebih tinggi daripada yang terdapat di dalam teh hijau, anggur merah dan sebagainya. Polifenol kakao terutama adalah monomer dan oligomer dari flavan-3-ol sebagai komponen dasar. Klasifikasi polifenol kakao dalam tiga kelompok yaitu katekin (flavan-3-ols) 37%, antosianin 4%, dan proantosianidin 58%.⁸

Eksplorasi senyawa bioaktif yang potensial sebagai inhibitor tirosinase yang berasal dari sumber-sumber alami (*natural resources*) seperti biji coklat masih perlu dilakukan. Data dari penelitian serupa menyebutkan bahwa produksi biji coklat nasional secara umum mengalami peningkatan hingga tahun 2012 mencapai 433.253 Ha atau 96,27% dari target seluas 450.000 Ha.⁹ Peningkatan produksi ini diyakini dapat memberikan banyak manfaat dan peningkatan pendapatan bagi petani coklat khususnya. Produksi dari biji coklat yang tinggi tersebut dapat dijadikan solusi dalam menjawab permasalahan terkait pemanfaatan produk dari sumber alam (*natural product*) untuk bahan kosmetik. Penelitian ini fokus pada pemanfaatan dari biji coklat sebagai inhibitor tirosinase yang berpotensi dalam melindungi kulit dari paparan sinar UV. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi ekstrak biji coklat sebagai inhibitor tirosinase untuk bahan aktif pencerah kulit (*skin lightening*).

METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai dengan Desember 2016. Tempat penelitian yaitu di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia dan Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka, LPPM IPB.

Alat

Peralatan utama yang digunakan adalah *stirrer, reflux*, spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV-1800), mikroskop optik (Nikon model Eclipse E 200, Jepang), *water bath shaker*, rotary evaporator HEIDOLPH tipe Laborota 4000 Vacuum-Controlller VC 2, Sentrifugator (Kubota 5100, Jepang), penetrometer (Herzoo, Jerman), pH meter (Corning), Homogenizer (Omni-Multimix Inc., Malaysia), *Rapid Visco Analyzer*, kertas Whatman, *orbital shaker*, gelas ukur, oven (Memmert, Jerman), timbangan analitik (Sartorius), dan alat-alat pendukung analisis.

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian adalah biji coklat (*Theobroma Cacao Linn*) yang didapatkan dari Kaliandra, Lampung Selatan. Enzim Tirosinase dari jamur *Agaricus bisporus* (Sigma, Amerika Serikat), L-DOPA (Sigma, Amerika Serikat), heksametilenatetramina (Brataco, Indonesia), asam stearat (Brataco, Indonesia), metanol (Brataco, Indonesia), propilen glikol (Brataco, Indonesia), vitamin C, HCl, aseton, etil asetat, etanol (Bratacom Indonesia), reagen *Folin-Ciocalteau* (Brataco, Indonesia), akuades, asam galat (Brataco, Indonesia), larutan bufer fosfat, kuersetin, asam kojat, dan larutan L-DOPA. Penelitian ini tidak menggunakan hewan uji.

Tahapan Penelitian

Penelitian ini dimulai dari pengumpulan biji coklat yang didapat dari perkebunan di Kecamatan Kalianda,

Lampung Selatan. Pertama, sampel dipreparasi dan diblender sampai terbentuk bubuk (bubuk biji coklat). Bubuk diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi. Hasil dari ekstrak bubuk biji coklat kemudian dilakukan analisis kandungan flavonoid total dan aktivitas penghambatan enzim tirosinase.

Preparasi ekstrak bubuk biji coklat

Preparasi ekstrak bubuk biji coklat ini menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol (70%). Pertama, disiapkan 1 gram bubuk biji coklat dilarutkan dalam 200 mL pelarut etanol (70%) pada erlenmeyer dan di kocok setiap harinya selama 30 menit, setelah 3 hari dilakukan penyaringan menggunakan saringan teh dan kertas Whatman 42. Maserasi dilakukan hingga pelarut bewarna bening. Setelah proses maserasi selesai dilakukan evaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 45°C.⁷

Kadar flavonoid total ekstrak bubuk biji

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,25 g kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Proses hidrolisis dilakukan dengan menambahkan 1 mL larutan heksametilenatetramina 0,5% (b/v), 20 mL aseton dan 2 mL larutan HCl 25%. Pemanasan dilakukan menggunakan refluks selama 30 menit. Filtrat hasil hidrolisis disaring menggunakan kertas saring ke dalam labu takar 100 mL, sedangkan residu yang terbentuk ditambahkan dengan 20 mL aseton dan direfluks kembali selama 30 menit. Filtrat digabungkan, sedangkan residu ditambahkan dengan 20 mL aseton dan dihidrolisis kembali. Filtrat digabungkan kembali, kemudian larutan dan ditera dengan aseton.¹⁰

Sebanyak 20 mL filtrat hasil hidrolisis dan 20 mL akuades dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian diekstraksi dengan etil asetat (ekstrak yang pertama dengan 15

mL etil asetat, ekstraksi kedua dan ketiga dengan 10 mL etil asetat). Fraksi etil asetat dikumpulkan dalam labu takar 50 mL, kemudian larutan ditera dengan etil asetat. Larutan diambil sebanyak 10 mL ke dalam labu takar 25 mL dan direaksikan dengan 1 mL AlCl₃ 2% (b/v) kemudian ditera dengan larutan asam asetat glasial dalam metanol 5% (v/v). Pengukuran larutan dilakukan pada panjang gelombang 370,8 nm. Standar dibuat dengan kuersetin murni ditimbang sebanyak 0,0025 g, kemudian dilarutkan dengan asam asetat glasial dalam metanol 5% (v/v) dalam labu takar 25 mL. Selanjutnya dibuat deret standar dengan konsentrasi 0,5; 5; 10; 15; dan 25 ppm.

Uji penghambatan tirosinase ekstrak biji coklat

Pengujian inhibitor tirosinasi dimodifikasi dari penelitian sebelumnya.⁷ Ekstrak ditimbang sebanyak 0,3 g dan ditambahkan 10 mL etanol 70%. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan filtrat dengan basis ekstrak biji coklat. Larutan filtrat atau ekstrak ditampung untuk diuji aktivitasnya sebagai inhibitor tirosinase. Larutan bufer fosfat 50 mM (pH 6,8), larutan L-DOPA 0,7 mM, dan larutan tirosinase (496 unit/mL) dimasukkan ke dalam empat tabung reaksi dengan jumlah yang tersaji pada Tabel 1.

Tabung A, larutan buffer fosfat, larutan L-DOPA, dan ekstrak biji coklat (blangko negatif) dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelahnya, ditambahkan larutan tirosinase, diinkubasi kembali

selama 25 menit pada suhu kamar. Di akhir proses, serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Tabung B, larutan buffer fosfat, larutan L-DOPA, dan ekstrak biji coklat (blangko negatif) dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian inkubasi pada suhu kamar selama 35 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Tabung C, larutan buffer fosfat, larutan L-DOPA, dan ekstrak biji coklat dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelahnya, ditambahkan larutan tirosinase, diinkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Di akhir proses, serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Tabung D, larutan buffer fosfat, larutan L-DOPA, dan ekstrak biji coklat dipipet ke dalam tabung reaksi kemudian inkubasi pada suhu kamar selama 35 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Perhitungan persentase inhibisi tirosinase

Nilai aktivitas penghambatan enzim tirosinase diperoleh dengan menghitung penghambatan dopakrom yang terbentuk menggunakan rumus persamaan. Untuk mengetahui pengaruh kestabilan fisik dengan aktivitas ekstrak, maka uji penghambatan tirosinase dari ekstrak biji coklat yang dilakukan dengan 3 kali ulangan.

Tabel 1. Komposisi bahan yang digunakan dalam uji penghambatan enzim tirosinase

Bahan	Tabung (µL)			
	1	2	3	4
Larutan buffer fosfat	2200	2384	2200	2384
L-DOPA (0,7 mM)	666	666	666	666
Ekstrak biji coklat	200	200	200	200
Tirosinase	(blangko negatif) 184	(blangko negatif) -	184	-

$$\begin{aligned} \% \text{inhibisi} &= \frac{DK - DK^t}{DK} \times 100\% \\ &= \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100\% \dots (1) \end{aligned}$$

Keterangan:

DK = dopakrom yang terbentuk tanpa adanya penghambatan; DK^t = dopakrom yang terbentuk dengan adanya penghambatan; A = serapan larutan blangko negatif dengan enzim; B = serapan larutan blangko negatif tanpa enzim; C = serapan larutan sampel dengan enzim; D = serapan larutan sampel tanpa enzim.

Perhitungan Nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan kurva regresi linear antara % inhibisi (sumbu y) dan konsentrasi ekstrak (sumbu x). Persamaan regresi linear dapat rumuskan sebagai berikut :

$$y = a + bx \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan :

y = Variabel Dependen; x = Variabel Independen; A = Konstanta; b = Koefisien Regresi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

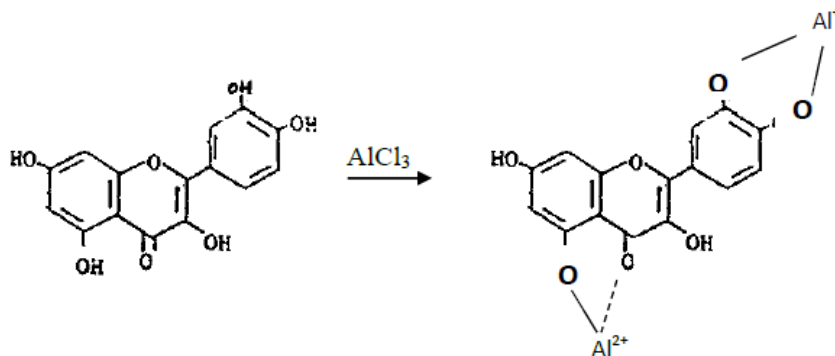
Kadar Flavonoid Total

Prinsip penetapan kadar flavonoid metode aluminium klorida berdasarkan pembentukan warna yang menggambarkan terjadinya pembentukan kompleks antara aluminium klorida dengan gugus keto pada

atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari golongan flavon dan flavonol. Senyawa yang digunakan sebagai standar pada penetapan kadar flavonoid ini adalah kuersetin, karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga. Proses pembentukan senyawa kompleks antara kuersetin dan aluminium klorida dapat dilihat pada Gambar 1.

Pada tahap penetapan kadar flavonoid, penambahan kalium asetat bertujuan untuk mendeteksi adanya gugus 7-hidroksil sedangkan perlakuan inkubasi selama 30 menit yang dilakukan sebelum pengukuran dimaksudkan agar reaksi berjalan sempurna, sehingga memberikan intensitas warna yang maksimal. Penetapan kadar flavonoid dari ekstrak metanol biji coklat didapatkan adalah sebesar 0,05 % b/b. Keberadaan dari senyawa flavonoid yang ada di dalam biji coklat tersebut dapat berpotensi untuk menghambat aktivitas enzim tirosinase.

Senyawa flavonoid merupakan salah satu dari kelompok senyawa polifenol, dimana dalam senyawa polifenol terdapat cincin fenol yang berikatan dengan gugus hidroksil. Ikatan gugus hidroksil-polifenol tersebut dapat menghambat aktivitas enzim tirosinase dan menghambat peroksidasi lipid.⁸



Gambar 1. Pembentukan senyawa kompleks kuersetin-aluminium klorida.

Tabel 2. Nilai IC₅₀ inhibitor enzim tirosinase dari ekstrak etanol biji coklat dan asam kojat.

Sampel	Reaksi	Inhibisi Tirosinase (µg mL ⁻¹)
Ekstrak biji coklat	Monofenolasi	352,05
	Difenolasi	836,20
Asam kojat	Monofenolasi	2,38
	Difenolasi	10,74

Keterangan: IC₅₀: konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas enzim tirosinase sebesar 50%

Aktivitas penghambatan enzim tirosinase oleh ekstrak biji coklat

Pengujian penghambatan enzim tirosinase oleh ekstrak etanol biji coklat dilakukan terhadap aktivitas monofenolase dan difenolase yaitu menggunakan L-tirosin dan L-DOPA sebagai substrat dalam pengujian. Pengujian ekstrak dibandingkan dengan asam kojat sebagai kontrol positif. Asam kojat merupakan hasil metabolit jamur yang bertindak sebagai *chelator* yang baik untuk logam transisi seperti Cu²⁺ dan Fe³⁺. Asam kojat merupakan inhibitor kompetitif dalam reaksi monofenolase dan inhibitor campuran pada reaksi difenolase.¹¹ Penggunaan asam kojat sebagai kontrol positif sangat disarankan sebagai pembanding kekuatan penghambatan tirosinase baik dengan bahan baru yang ditemukan ataupun dengan kekuatan penambahan bahan lain.⁵

Pelaksanaan pengujian inhibitor tirosinase dengan melihat serapan dari substrat L-DOPA dan L-tirosin menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 478,5 nm. Panjang gelombang tersebut menunjukkan puncak dari serapan tertinggi, artinya terjadi pembentukan dopakrom yang paling banyak.³

Pengujian aktivitas inhibitor tirosinase dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya daya penghambatan senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak kasar etanol pada biji coklat (*Theobroma Cacao Linn*). Aktivitas penghambatan enzim tirosinase ditunjuk-

kan dengan nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi yang dapat menghambat 50% enzim tirosinase. Data hasil dari uji aktivitas inhibitor tirosinase pada ekstrak etanol biji coklat yang ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ tersaji pada Tabel 2.

Nilai IC₅₀ diperoleh dari persamaan kurva hubungan antara % inhibisi (sebagai sumbu y) dan konsentrasi ekstrak (sebagai sumbu x). Berdasarkan hasil diatas menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ untuk ekstrak etanol biji coklat sangat tinggi jika dibandingkan dengan hasil dari pengujian asam kojat baik dari reaksi monofenolasi dan difenolasi. Nilai IC₅₀ tersebut menunjukkan bahwa aktivitas inhibitor tirosinase ekstrak biji coklat tidak lebih baik dari asam kojat, hal ini dikarenakan nilai IC₅₀ asam kojat lebih kecil. Aktivitas inhibisi terbaik dari ekstrak biji coklat berasal dari reaksi monofenolasi, hal ini dikarenakan nilai IC₅₀ reaksi difenolasi lebih besar daripada reaksi monofenolasi.

Ekstrak akar *R. mucronata* memiliki aktivitas inhibitor tirosinase lebih baik daripada daun dan batang dari segi monofenolase. Hal ini dikarenakan nilai IC₅₀ ekstrak akar *R.mucronata* lebih kecil daripada ekstrak daun dan batang *R. Mucronata*.¹² Nilai IC₅₀ penting untuk mengetahui seberapa besar potensi inhibitor dalam menginhibisi reaksi enzimatis.¹³

Penelitian ini digunakan asam kojat sebagai kontrol positif, hal ini dikarenakan asam kojat memiliki tingkat kestabilan yang tinggi. Asam kojat adalah salah satu

jenis pemutih yang banyak digunakan dalam kosmetik. Akan tetapi penggunaan asam kojat secara berlebih dapat menyebabkan alergi pada kulit manusia. Asam kojat juga memiliki efek inhibisi serta kestabilan yang tinggi dibandingkan dengan bahan lainnya.¹⁴

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji coklat tersebut sangat berpotensi digunakan untuk produk pemutih (*skin lightening*) karena memiliki kemampuan sebagai inhibitor tirosinase dengan nilai IC_{50} dari reaksi monofenolasi dan difenolasi yaitu $352,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ dan $836,20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nilai tersebut lebih besar jika dibandingkan dengan nilai IC_{50} dari asam kojat baik monofenolasi dan difenolasi. Nilai IC_{50} asam kojat untuk monofenolasi sebesar $2,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ dan difenolasi $10,74 \mu\text{g mL}^{-1}$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa asam kojat lebih baik dalam menghambat tirosinase dibandingkan dengan ekstrak biji coklat. Semakin kecil nilai IC_{50} , maka kemampuan untuk menghambat tirosinase semakin bagus.

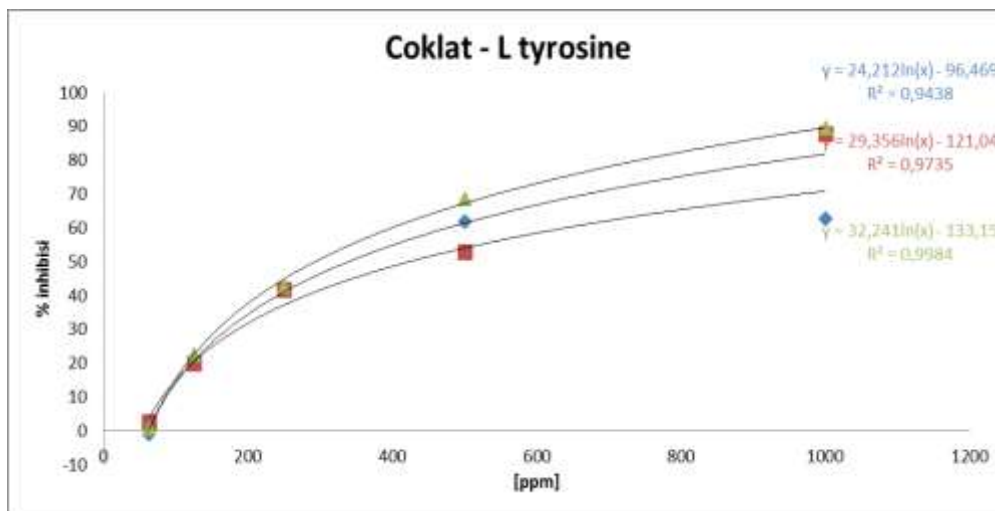
Asam kojat tergolong dalam penangkal radikal bebas yang sangat aktif. Hal ini dikarenakan asam kojat mudah teroksidasi dengan mendonorkan atom hidrogennya dan membentuk radikal bebas askorbil yang relatif stabil. Radikal substrat akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi pada tahap propagasi. Radikal peroksi lebih lanjut akan menyerang substrat menghasilkan hidroperoksida dan radikal substrat baru.¹⁶

Ekstrak yang memiliki aktivitas inhibitor tirosinase akan menurunkan intensitas warna coklat sedangkan ekstrak yang tidak memiliki aktivitas inhibitor dan kontrol (tidak ditambahkan ekstrak) memiliki warna coklat keunguan.³ Warna coklat keunguan merupakan warna dari dopakrom yang terbentuk sehingga dapat diukur penghambatannya. Apabila jumlah dopakrom yang terbentuk berjumlah banyak maka penghambatan enzim tirosinase tidak terjadi, sebaliknya apabila

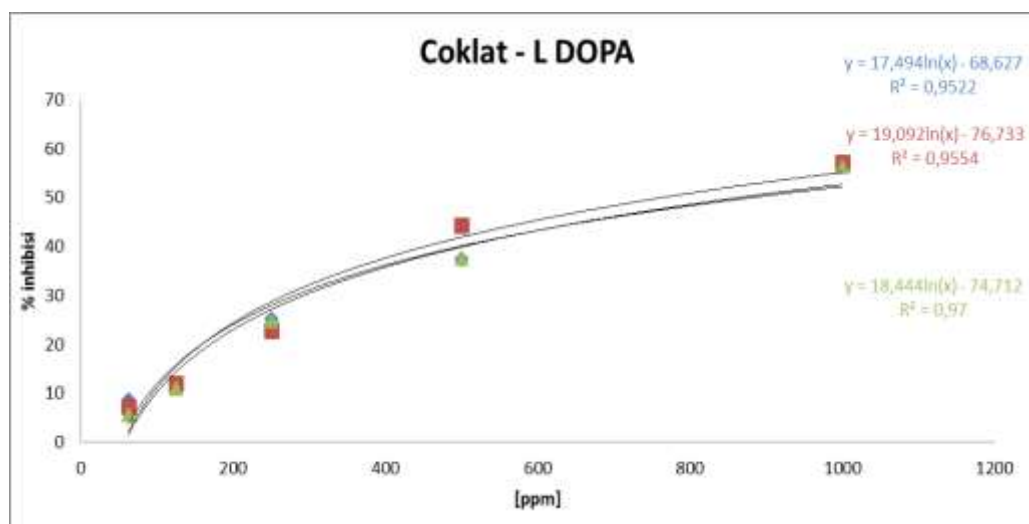
dopakrom tidak terbentuk maka penghambatan terhadap enzim tirosinase terjadi maksimal. Ekstrak yang tidak memberikan nilai IC_{50} pada monofenolase dan difenolase hingga $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ dapat diartikan bahwa senyawa ekstrak tersebut tidak memiliki potensi inhibitor tirosinase.¹²

Pengukuran IC_{50} dilakukan dengan memberikan variasi konsentrasi ekstrak etanol biji coklat yang digunakan dari 62,5 – 1000 ppm. Kemudian diukur serapannya dan dihitung % penghambatannya. Plot ke dalam kurva antara konsentrasi ekstrak dengan % inhibisi. Berdasarkan persamaan linear yang didapat dari kurva tersebut, dapat dihitung IC_{50} yaitu konsentrasi ekstrak yang mempunyai aktivitas penghambatan terhadap tirosinase sebesar 50 %. Pada hasil penelitian ini digunakan perhitungan dengan 3 (tiga) kali ulangan. Berikut ini adalah hubungan antara persen inhibisi dan konsentrasi ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pada ekstrak etanol biji coklat untuk reaksi monofenolase dapat ditunjukkan seperti pada Gambar 2.

Hasil pengukuran IC_{50} dari ekstrak biji coklat dari reaksi monofenolase adalah $352,05 \mu\text{g mL}^{-1}$. Hasil dari IC_{50} tersebut didapat dari nilai rata-rata dari IC_{50} tiga kali ulangan. Nilai tersebut didapat dari persamaan linear $y = a + bx$ yang terdapat pada masing-masing perhitungan. Persamaan linear untuk hasil ulangan pertama adalah $y = 24,212 \ln(x) - 96,469$ dengan nilai $R^2 = 0,9438$, untuk persamaan linear pada ulangan kedua adalah $y = 29,356 \ln(x) - 121,04$ dengan nilai $R^2 = 0,9735$, sedangkan pada persamaan linear ulangan ketiga adalah $y = 32,241 \ln(x) - 133,15$ dengan nilai $R^2 = 0,9984$. Dari ketiga persamaan tersebut didapatkan nilai R^2 mendekati 1 yang artinya data tersebut tersebar normal. Berikut ini adalah hubungan antara persen inhibisi dan konsentrasi ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pada ekstrak etanol biji coklat untuk reaksi difenolase dapat ditunjukkan seperti pada Gambar 3.



Gambar 2. Hubungan antara inhibisi monofenolase (%) dengan konsentrasi (ppm).



Gambar 3. Hubungan antara inhibisi difenolase (%) dengan konsentrasi (ppm).

Hasil pengukuran IC_{50} dari ekstrak biji coklat dari reaksi difenolase adalah $836,20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Hasil dari IC_{50} tersebut didapat dari nilai rata-rata dari IC_{50} tiga kali ulangan. Nilai tersebut didapat dari persamaan linear $y = a + bx$ yang terdapat pada masing-masing perhitungan. Persamaan linear untuk hasil ulangan pertama adalah $y = 17,494 \ln(x) - 68,627$ dengan nilai $R^2 = 0,9522$, untuk persamaan linear pada ulangan kedua adalah $y = 19,092 \ln(x) - 76,733$ dengan nilai $R^2 = 0,9554$, sedangkan pada persamaan linear ulangan ketiga adalah $y = 18,444 \ln(x) -$

$74,712$ dengan nilai $R^2 = 0,97$. Dari ketiga persamaan tersebut didapatkan nilai R^2 mendekati 1 yang artinya data tersebut tersebar normal.

Besarnya nilai IC_{50} sangat bergantung pada metode ekstraksi dan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi serta substrat yang digunakan saat reaksi aktivitas inhibitor tirosinase.¹⁵ Pelaksanaan reaksi enzimatik, pemilihan substrat menjadi hal yang sangat penting karena dapat memengaruhi hasil pengukuran.

KESIMPULAN

Terdapat aktivitas inhibitor tirosinase pada ekstrak etanol biji coklat (*Theobroma Cacao Linn*) sehingga ekstrak etanol biji coklat ini merupakan bahan alam (*natural product*) yang berpotensi untuk digunakan dalam formulasi krim pemutih (*skin lightening*) dalam bidang kefarmasian.

SARAN

Penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan identifikasi kandungan senyawa bioaktif dari biji coklat secara kualitatif dan kuantitatif, serta peningkatan konsentrasi penambahan ekstrak biji coklat dalam formulasi krim.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Indonesia dan semua pihak yang terlibat dalam penyelesaian penelitian ini sehingga dapat berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Zoe Draelos, Dahl A, Yatskayer M., Chen N, Krol Y, and Oresajo C. Dyspigmentation, skin physiology, and a novel approach to skin lightening. *Journal of Dermatology*. 2013;12: 247-53.
2. Chan YY, Kim KH, Cheah SH. Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *J Ethnopharm*. 2011;137(3):1183-88.
3. Juwita NK, Djajadisastra J. Uji Penghambatan tirosinase dan stabilitas fisik sediaan krim pemutih yang mengandung ekstrak kulit batang nangka (*Artocarpus heterophyllus*). *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*. 2014 Sep 30;8(2):105-25.
4. Chang Te-Sheng. Natural melanogenesis inhibitor acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials*. 2012;5(9):1661-1685.
5. Charissa M, Djajadisastra J, Elya B. Uji aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase serta uji manfaat gel ekstrak kulit batang taya (*Nauclea subdita*) terhadap Kulit. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 2016 Aug 31;6(2):98-107.
6. Fawole A, Makunga NP, and Opara UL. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complement & Altern Med*. 2012; 12(1):200-11.
7. Karim AA, Azlan A, Ismail A, Hashim P, Gani ASS, et al. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *Complementary and Alternative Medicine*. 2014;14(381):1-13.
8. Bahrum Z, Akim AM, Hin TYY, Hamid RA, Kasran R. *Theobroma cacao*: Review of the extraction, isolation, and bioassay of its potential anti-cancer compounds. *Tropical Life Sciences Research*. 2016. 27(1):21-42.
9. [Kemenperin] Kementerian Perindustrian. Pemerintah genjot produksi kakao. 2016. Diakses pada tanggal 1 April 2017. <http://www.kemenperin.go.id/artikel/7474/Pemerintah-Genjot-Produksi-Kakao>.
10. Atanassova M, Georgieva S, Ivancheva K. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology & Metallurgy*. 2011 Mar 1;46(1):81-8.
11. Saghale L, Pourfarzam M, Fassihi A, Sartippour B. Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. *J Pharm Sci*. 2013;8(4):233-42.
12. Nurrefiyanti ALL. Potensi ekstrak *Rhizophora* sp. Sebagai inhibitor tirosinase. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 2010.
13. Neeley E, Fritch G, Fuller A, Wolfe J, Wright J, Flurkey W. Variations in IC50 values with purity of mushroom tyrosinase. *International journal of molecular sciences*. 2009 Sep 2; 10(9):3811-23.
14. Kamakshi R. Fairness via formulations: A review of cosmetic skin-lightening ingredients. *J Cosmet Sci*. 2012;63(1):43-54.
15. Yoon NY, Eom TK, Kim MM, Kim SK. Inhibitory effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on mushroom tyrosinase activity and melanin formation

- in mouse B16F10 melanoma cells. *J Agric Food Chem.* 2009;57(10):4124-29.
16. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry.* 2012 Feb 15;130(4):1036-43.