

# AKTIVITAS DEPIGMENTASI FRAKSI N-HEKSANA BUAH MALAKA (PHYLLANTHUS EMBLICA) PADA SEL MELANOSIT MOUSE MELANOMA B16

## *Depigmenting Activity of n-Hexane Fraction of Malaka Fruit (Phyllanthus Emblica) on Mouse Melanoma B16 Melanocyte Cells*

RETI HINDRITIANI

ENDANG SUTEDJA

SETIAWAN

MUCHTAN SUJATNO

Universitas Padjadjaran

email Korespondensi: r\_hindritiani@yahoo.com

### Abstrak

Senyawa penghambat sintesis melanin dapat digunakan sebagai zat depigmentasi untuk mengobati hiperpigmentasi kulit. Zat depigmentasi dari tanaman semakin sering digunakan, karena dapat menghambat sintesis melanin tanpa bersifat toksik terhadap melanosit. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas depigmentasi fraksi n-heksana buah malaka (*Phyllanthus emblica*) dengan mengukur penghambatan sintesis melanin pada sel melanosit mouse melanoma B 16 cell line. Penghambatan sintesis melanin diukur melalui jumlah melanin dan aktivitas tirosinase secara spektrofotometri. Selain itu, diukur pula sitotoksitasnya terhadap melanosit dengan metode 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Penelitian dilakukan di Department of Biochemistry and Diabetes Research Centre, Chonbuk National University Medical School, Korea Selatan pada bulan November-Desember 2009. Hasil penelitian menunjukkan jumlah melanin dan aktivitas tirosinase menurun bergantung konsentrasi fraksi n-heksana buah *P. emblica*, dengan IC50 berturut-turut 31,68 dan 77,92 µg/ml. Jumlah sel hidup menunjukkan penurunan dengan bertambahnya konsentrasi dengan LD50 pada konsentrasi 87,39 µg/ml.

**Kata kunci:** *Phyllanthus emblica*, bahan depigmentasi

### Abstract

*Inhibitor of melanin synthesis can be used as depigmenting agent to treat skin hyperpigmentation. Herbal depigmenting agents are increasingly utilized due to their character in inhibiting melanin synthesis without causing melanocyte toxicity. This study was aimed to examine depigmenting activity of n-hexane fraction of Phyllanthus emblica fruit by measuring its melanin synthesis inhibition on melanocyte mouse melanoma B16 cell line. Melanin synthesis inhibition was measured spectrophotometrically by counting the melanin and the activity of tyrosinase. The cytotoxicity of n-hexane fraction on melanocytes was measured by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. This study was conducted on November-December 2009 at Department of Biochemistry and Diabetes Research Centre, Chonbuk National University Medical School, South Korea. The result of this study indicated that melanin count and tyrosinase activity decreased in a dose-dependent manner of n-hexane fraction of P. emblica fruit (IC50 31.68 and 77.92 µg/ml, respectively). The viable cells decreased with increasing concentration of the n-hexane fraction of P. emblica fruit (LD50 87.39 µg/ml).*

**Key words:** *n-hexane fraction, Phyllanthus emblica, depigmenting agent*

### Pendahuluan

Peningkatan jumlah melanin di kulit menyebabkan hiperpigmentasi. Hiperpigmentasi lokal pada wajah yang paling sering dikeluhkan adalah melasma, freckles dan hiperpigmentasi pascainflamasi. Kelainan pigmentasi ini dapat menyebabkan stres dan menimbulkan gangguan psikososial pada pasien, sehingga harus ditangani dengan baik. Salah satu cara mengobati hiperpigmentasi yaitu dengan bahan depigmentasi yang cara kerjanya terutama menghambat sintesis melanin. Bahan depigmentasi klasik seperti hidrokinon masih merupakan obat yang paling sering digunakan, namun bersifat toksik terhadap melanosit. Berbagai penelitian untuk mencari produk baru bahan depigmentasi kulit yang efektif dan aman terus dikembangkan, terutama penggunaan ekstrak tanaman. Senyawa aktif yang diisolasi dari tanaman seperti arbutin, aloesin, flavonoid, licorice dan polifenol, dari berbagai penelitian dapat menghambat sintesis melanin sama dengan bahan depigmentasi klasik tanpa bersifat sitotoksik. Mekanisme kerja bahan depigmentasi terutama adalah menghambat tirosinase yang merupakan enzim penting dalam sintesis melanin. Bahan depigmentasi yang dikembangkan harus efektif menghambat enzim

tirosinase dan tidak toksik terhadap melanosit.

Pigmentasi kulit normal terdiri dari dua tahap, yaitu sintesis melanin dan transfer melanin dari dendrit melanosit ke keratinosit epidermal di sekitar melanosit. Melanin disintesis di dalam melanosom yaitu organela khusus pada melanosit yang terletak di lapisan basal epidermis. Sintesis melanin diawali dengan oksidasi asam amino L-tirosin menjadi L-DOPA (3,4 dihydroxyphenylalanine) yang kemudian akan dioksidasi menjadi DOPAquinone. Kedua reaksi ini dikatalisis oleh enzim tirosinase. DOPAquinone akan diubah menjadi DOPACHrome, dan selanjutnya menjadi 5,6-dihydroxyindole (DHI) atau 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) yang akan membentuk eumelanin yang berwarna coklat kehitaman. Di dalam proses tersebut, tirosinase berperan mengubah 5,6-dihydroxyindole (DHI) menjadi indole-5-6-quinone. Apabila tersedia cukup glutathione atau cysteine, DOPAquinone akan membentuk cyteinylDOPA yang akan membentuk feomelanin yang berwarna kuning kemerahan. Tirosinase merupakan enzim utama dalam sintesis melanin karena mempunyai kemampuan mengkatalisis tiga reaksi yang berbeda dalam satu jalur biokimia sintesis melanin.

Transkripsi gen-gen yang berperan dalam sintesis melanin diperantarai berbagai jalur sinyal, terutama jalur cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/cAMP-dependent protein kinase (PKA). Konsentrasi cAMP intraseluler yang tinggi akan mengaktifasi transkripsi gen-gen spesifik melalui cAMP-dependent protein kinase (PKA), dan selanjutnya menginduksi transkripsi Microphthalmia-associated transcription factor (MITF), yang merupakan faktor transkripsi utama tirosinase.<sup>4,6</sup> Konsentrasi cAMP dapat ditingkatkan oleh bahan-bahan seperti choleraagen atau isobutylmethylxanthine (IBMX) yang akan menginduksi sinyal sehingga terjadi sintesis melanin.

Buah malaka atau *Phyllanthus emblica* (*P. emblica*) tergolong tanaman tropis yang banyak tumbuh tersebar di Cina, India, dan Indonesia. Buahnya berwarna hijau laut dan rasanya asam sepat, kadang-kadang dimakan mentah atau sebagai manisan. Buah ini sering digunakan sebagai obat tradisional untuk sariawan, gusi berdarah, batuk, flu, TBC, dan gangguan kekebalan tubuh, serta mempunyai efek antioksidan. Peneliti sebelumnya telah menguji efek ekstrak etanol buah *P. Emblica* terhadap sintesis melanin dengan mengukur jumlah melanin pada kultur melanosit manusia dan mengukur aktivitas tirosinase tanpa sel, yaitu dengan menggunakan mushroom tyrosinase. Pada penelitian tersebut didapatkan penurunan jumlah melanin dan aktivitas tirosinase pada konsentrasi 50 g/ml. Belum diketahui bagaimana efek berbagai konsentrasi fraksi n-heksana buah *P. emblica* terhadap jumlah melanin, aktivitas tirosinase, dan sitotoksitasnya pada sel melanosit.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas depigmentasi fraksi n-heksana buah *P. emblica* terhadap sintesis melanin dengan mengukur jumlah melanin, aktivitas tirosinase, dan sekaligus sitotoksitasnya pada kultur sel melanosit mouse melanoma B 16 cell line. Penurunan sintesis melanin dinilai setelah sel terlebih dahulu diinduksi menggunakan aktivator sintesis melanin, yaitu dengan menambahkan IBMX yang dapat meningkatkan kadar cAMP intraseluler, sehingga terjadi sintesis melanin pada jalur c-AMP.

## Metode

Buah *P. Emblica* diambil dari hutan di daerah Kampung Cikundul, Desa Cijagang, Kecamatan Cicalong Kulon, Cianjur. Identifikasi tanaman dilakukan di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Unpad. 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 g/ml. Induksi sintesis melanin dilakukan dengan IBMX (Sigma).

Ekstraksi dan fraksinasi buah *P. emblica* dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas MIPA Universitas Padjadjaran. Buah dipotong-potong sekecil mungkin dan dikeringkan pada suhu ruangan selama 12-24 jam. Dilakukan teknik maserasi sederhana, yaitu bahan direndam dengan metanol sampai seluruh bahan terendam. Setelah 7 hari dilakukan penyaringan, dan maserat ditampung. Setelah itu dilakukan maserasi

kedua dengan cara yang sama. Dilakukan pemekatan maserat dengan evaporator pada suhu 40-45°C sampai seluruh pelarut metanol menguap, dan diperoleh ekstrak pekat metanol. Ekstrak pekat metanol diencerkan dengan sejumlah air, kemudian ditambahkan n-heksana sebanyak dua kali jumlah bahan. Campuran ditempatkan dalam corong pisah selama 3 hari. Dilakukan 3 kali penggantian pelarut n-heksana, kemudian dievaporasi. Dari hasil evaporasi diperoleh fraksi n-heksana dan fraksi air.

Pengujian sintesis melanin dilakukan di Departement of Biochemistry and Diabetes Research Center, Chonbuk National University Medical School, Korea Selatan. Sampel uji diberi pelarut dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma) dan dibuat konsentrasi 12,5, 25, 50, dan 100 g/ml.

Aktivitas tirosinase diukur menggunakan metode yang diadopsi berdasarkan Lv dkk.<sup>8</sup> Sel dengan pertumbuhan 40% memenuhi cawan kultur diberi IBMX, kemudian diinkubasi selama 72 jam. Sel dicuci dua kali dengan PBS dan dilisiskan dengan menambahkan 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 dilakukan sentrifugasi 12.000 rpm, 4°C selama 10 menit. Sebagian supernatan disimpan pada suhu 4°C untuk uji protein dan sebagian lagi dilanjutkan untuk uji aktivitas tirosinase dengan diberi larutan L-DOPA segar (L-DOPA 0,1% dalam sodium phosphate 0.1M, pH6,8) dan diinkubasi pada suhu 37°C. Perubahan serapan diukur pada menit ke 10, 20, 30 dan 60 dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 475 nm (Spectra MAX PLUS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Hasil pemeriksaan dihitung sebagai persentase terhadap kontrol, yaitu sel yang hanya diberi perlakuan dengan IBMX.

Pengukuran jumlah melanin dilakukan dengan metode yang diadopsi dari Lv dkk. Sel dengan pertumbuhan 80% memenuhi cawan kultur, dicuci dua kali dengan phosphate-buffered saline (PBS), kemudian dilepaskan dari dasar cawan dengan tripsin 0,25%. Dulbecco's modified eagle's medium ditambahkan ke dalam sel tersebut, dilakukan resuspensi menggunakan pipet, kemudian dimasukkan ke dalam 6 well-plate, dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan kelembaban udara 95% dan tekanan 5% CO<sup>2</sup> 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, yaitu medium dibuang dan dicuci dua kali dengan PBS dan dilisiskan dengan larutan 20 mM Tris-0,1% Triton X-100 (pH 7,5). Larutan sebagian disimpan pada suhu 4°C untuk uji protein, dan sebagian dilanjutkan untuk pengukuran jumlah melanin dengan dilakukan presipitasi menggunakan trichloroacetic acid (TCA) 20% dan 10%. Sel dikeringkan dengan diberi berturut-turut ethyl alcohol:diethyl ether (3:1) dan diethyl ether, dibiarkan dalam udara terbuka selama 30 menit, selanjutnya dilarutkan dalam KOH 0,85 M dan dipanaskan dalam penangas selama 15 menit. Setelah dingin, serapan larutan diukur dengan spektrofotometer (Beckman, DU 5.30) pada panjang gelombang 440nm. Hasil pemeriksaan dihitung sebagai persentase terhadap kontrol, yaitu sel yang hanya diberi perlakuan dengan IBMX.

Uji protein dilakukan dengan metode yang diadopsi berdasarkan LV dkk. Pada pengujian menggunakan sel, maka harus dilakukan konfirmasi dengan pemeriksaan uji protein yang menggambarkan jumlah sel, karena ada kemungkinan jumlah sel di setiap well pada saat persiapan sel tidak merata. Hasil serapan aktivitas tirosinase maupun jumlah melanin harus dibagi dengan jumlah sel, sehingga didapat hasil akurat aktivitas tirosinase dan jumlah melanin setiap sel, untuk meyakinkan bahwa penurunan aktivitas tirosinase dan jumlah melanin bukan disebabkan karena sedikitnya jumlah sel, tetapi karena aktivitas bahan uji. Teknis uji protein adalah, supernatan dari larutan sel yang telah disentrifugasi pada 13.000 rpm, 4°C selama 20 menit, atau supernatan yang sudah disisihkan dari uji aktivitas tirosinase diambil dan diberi protein assay buffer (Dye Reagent Concentrate). Serapan diukur dengan spektrofotometer (Beckman, DU 5.30) pada 595 nm.

Sitotoksitas dinilai dengan mengukur jumlah sel hidup menggunakan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Sel dengan pertumbuhan 80% memenuhi cawan kultur dicuci dua kali dengan PBS, dilepaskan dari dasar cawan dengan tripsin, ditambahkan DMEM, resuspensi menggunakan pipet, dan dimasukkan ke dalam 96 well- plate. Sel diberi perlakuan dengan menambahkan pelarut DMSO saja sebagai kontrol dan sel lainnya diberi bahan uji dengan berbagai konsentrasi, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Medium diaspirasi, dan sel diberi larutan MTT (5mg/ml dalam PBS), tutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Larutan MTT diaspirasi kembali, 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.

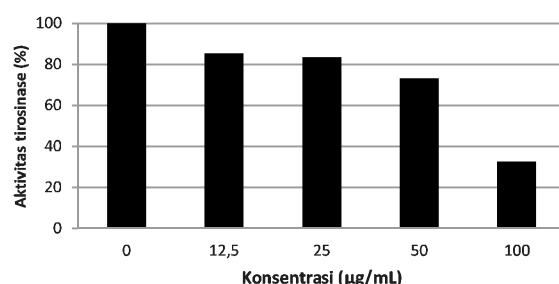
**Analisis Data**

Perbedaan rerata tiap variabel antara berbagai kelompok perlakuan diuji dengan analisis varian dua arah (two way anova) dan dilanjutkan uji Duncan utk mengetahui secara spesifik perlakuan yang menunjukkan perbedaan yang nyata. Seluruh perhitungan statistika dikerjakan dengan menggunakan piranti lunak SPSS versi 15.0.

**Hasil dan Pembahasan**

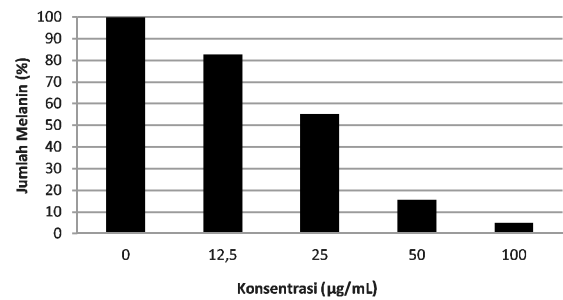
Aktivitas tirosinase pada kultur sel melanosit menurun bergantung dosis pada perlakuan dengan fraksi n-heksana buah P. emblica dengan nilai inhibition concentration 50% (IC50) pada konsentrasi 77,92 g/ml (Gambar 1).

**Gambar 1. Aktivitas Tirosinase pada Perlakuan dengan Berbagai Konsentrasi Fraksi N-Heksana Buah P. emblica**



Jumlah melanin juga menurun bergantung dosis pada perlakuan dengan berbagai konsentrasi fraksi n-heksana buah P. emblica dengan IC50 pada konsentrasi 31,68 g/ml (Gambar 2).

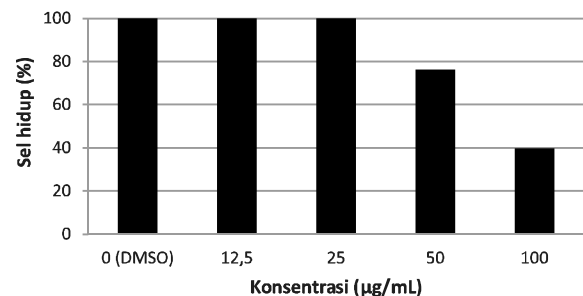
**Gambar 2. Jumlah Melanin pada Perlakuan dengan Berbagai Konsentrasi Fraksi N-Heksana Buah P. emblica**



Pada perlakuan dengan fraksi n-heksana ini diperoleh korelasi yang cukup tinggi antara penurunan aktivitas tirosinase dan penurunan jumlah melanin dengan r=0,79. Hal ini menunjukkan pola yang searah, yaitu bila aktivitas tirosinase turun maka produk akhirnya yaitu melanin akan turun.

Jumlah sel hidup dengan perlakuan fraksi n-heksana buah P. emblica tampak pada Gambar 3, berupa persentase sel hidup pada berbagai konsentrasi perlakuan dibandingkan dengan sel yang hanya diberi pelarut DMSO sebagai kontrol. Tampak jumlah sel hidup mulai menurun pada konsentrasi 50 g/ml, dengan lethal dose 50% (LD50) pada konsentrasi 87,39 g/ml.

**Gambar 3. Jumlah Sel Hidup pada Perlakuan dengan Berbagai Konsentrasi Fraksi N-Heksana Buah P. emblica**



Target utama zat depigmentasi adalah menghambat tirosinase. Media kultur sel melanosit digunakan untuk berbagai pengujian sintesis melanin, dan mouse melanoma B-16 cell line merupakan bahan yang sangat baik untuk uji efek hambatan sintesis melanin in vitro. Efek supresi dikatakan ada apabila didapatkan hambatan bergantung dosis. Hasil penelitian ini menunjukkan aktivitas tirosinase menurun bergantung dosis pada perlakuan dengan berbagai konsentrasi fraksi n-heksana buah P. emblica dengan nilai IC50 pada 77,92 g/ml (Gambar 1). Nilai IC50 ini lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak metanol buah P. emblica yang menurunkan aktivitas tirosinase dengan IC50 pada konsentrasi 73,08 g/ml dari hasil penelitian Hindritiani dkk. Chaudhuri dkk. pada penelitiannya menyimpulkan bahwa ekstrak etanol buah P. emblica menghambat aktivitas tirosinase. Uji hambatan aktivitas tirosinase pada penelitian ini uji aktivitas tirosinase dilakukan pada sel, dan enzim tirosinase berasal dari sel itu sendiri.

Tirosinase merupakan enzim utama dalam sintesis melanin karena mampu mengkatalisis tiga reaksi yang berbeda dalam satu jalur biokimia biosintesis melanin, yaitu mengubah L-tirosin menjadi DOPA, mengubah DOPA menjadi DOPAquinone, dan mengubah DHI menjadi indole-5-6-quinone, dengan hasil akhir berupa melanin yang berwarna hitam. Apabila aktivitas tirosinase tinggi, maka produksi melanin juga meningkat. Hasil penelitian ini, jumlah melanin juga menurun bergantung dosis pada perlakuan dengan berbagai konsentrasi fraksi n-heksana buah *P. emblica* dengan IC50 pada konsentrasi 31,68 g/ml (Gambar 2). Penelitian oleh Hindritiani dkk., ekstrak metanol buah *P. emblica* menurunkan jumlah melanin bergantung dosis dengan IC50 42,85 g/ml. Chaudhuri dkk. mengukur penurunan jumlah melanin oleh ekstrak etanol buah *P. emblica* pada konsentrasi 50 g/ml pada kultur melanosit manusia, dan mendapatkan bahwa pada konsentrasi tersebut buah *P. emblica* menghambat produksi melanin sebesar 41-47% pada inkubasi hari ke 11. Pada penelitian ini didapatkan korelasi cukup tinggi antara penurunan aktivitas tirosinase dan penurunan jumlah melanin dengan  $r=0,79$ , yang menunjukkan pola searah yaitu bila aktivitas tirosinase turun maka produk akhirnya yaitu melanin akan turun pula.

Berbagai jalur sinyal berperan dalam transkripsi gen-gen yang diperlukan dalam sintesis melanin. Jalur sinyal dalam regulasi sintesis melanin tersebut adalah jalur cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/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. Pada jalur ini, cAMP intraseluler akan mengaktifasi transkripsi gen-gen spesifik melalui cAMP-dependent protein kinase (PKA). cAMP mengaktifasi PKA dengan cara mengikat subunit regulator PKA yang akan mengakibatkan subunit katalitik PKA terlepas dan teraktivasi. Subunit katalitik PKA kemudian translokasi ke nukleus dan akan memfosforilasi cAMP response-element binding protein (CREB) yang akan menginduksi transkripsi Microphthalmia-associated transcription factor (MITF). Protein Mitf adalah faktor transkripsi utama enzim tirosinase yang merupakan enzim utama sintesis melanin. Sintesis melanin pada penelitian ini diinduksi oleh IBMX yang bekerja menghambat enzim fosfodiesterase, yaitu enzim yang akan mendegradasi cAMP menjadi AMP, sehingga kadar cAMP intraseluler meningkat. Berdasarkan hal tersebut, maka hambatan sintesis melanin oleh fraksi n-heksana buah *P. emblica* terjadi melalui jalur cAMP, walaupun masih harus dibuktikan lebih lanjut mekanismenya di tingkat molekuler.

Zat depigmentasi yang baik harus efektif menghambat sintesis melanin dan tidak sitotoksik. Pada penelitian ini, jumlah sel hidup mulai menurun pada konsentrasi 50 g/ml, dengan LD50 pada konsentrasi 87,39 g/ml. Hindritiani dkk mendapatkan ekstrak metanol buah *P. emblica* relatif tidak sitotoksik,

jumlah sel hidup masih lebih dari 90% pada konsentrasi 50 maupun 100g/ml, dengan nilai LD50 pada 239,21 g/ml. Penelitian tersebut juga menggunakan MTT assay. Chaudhuri dkk. pada penelitiannya menyimpulkan bahwa ekstrak etanol *P. emblica* tidak sitotoksik dengan menilai jumlah sel secara visual pada cawan.

Chaudhuri dkk. dari penelitiannya menduga bahwa bahan aktif buah *P. emblica* yang mempunyai kemampuan menghambat sintesis melanin adalah hydrolyzable tannin. Kandungan utama buah *P. emblica* adalah asam galat dan asam elagat yang merupakan komponen tanin. Dari penelitian menggunakan tanaman lain, diketahui bahwa asam galat dari ekstrak daun *Eucalyptus globulus* dapat menghambat sintesis melanin, demikian pula asam elagat yang terkandung dalam ekstrak Pomegranat dapat menghambat enzim tirosinase. Tanin merupakan senyawa fenol yang larut dalam air atau bersifat polar, sehingga diharapkan akan terfraksi dalam fraksi yang lebih polar seperti fraksi n-heksana. Meskipun demikian, kandungan senyawa bahan aktif pada fraksi ini masih belum diketahui dan harus dibuktikan dengan isolasi bahan aktif. Kumaran dan Karunakaran mendapatkan bahwa di dalam fraksi n-heksana didapatkan asam galat walaupun tidak setinggi fraksi etil asetat. Pada penelitian ini bahan yang digunakan adalah fraksi n-heksana. Kemampuan fraksi ini dalam menghambat tirosinase kemungkinan karena adanya asam galat dan asam elagat yang terkandung di dalamnya.

## Simpulan

Fraksi n-heksana buah *P. emblica* mempunyai aktivitas depigmentasi melalui penurunan sintesis melanin dengan menghambat aktivitas tirosinase. Perlu dipertimbangkan kecenderungan sitotoksiknya dengan bertambahnya konsentrasi.

## Daftar Pustaka

- 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; 2009. hlm. 98-108.
- 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;13:20-4.
- Nakayama H, Ebihara T, Satoh N, Jinnai T. *Depigmentation agents*. Dalam: *Elsner P, Maibach HI, penyunting. Cosmeceuticals, drugs vs cosmetics*. Edisi ke-1. New York: Marcel Dekker; 2000. hlm. 123-43.4.
- Park HY, Yaar 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.
- Korner A, Pawelek J. *Mammalian tirosinase catalyses three reactions in the biosynthesis of melanin*. *American Association for the Advancement of Science, New Series*. 1982;217:1162-65.
- Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. *Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network*. *Annu Rev Genet*. 2004;38:365-411.
- Beavo JA, Rogers NL, Crofford OB, Hardman JG, Sutherland EW, Newman EV. *Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity*. *Mol Pharmacol*. 1970;6:597-603.

- 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;20:763-67.
- Dharmananda S. *Emblic Myrobalans: amla, key herb of ayurvedic medicine*. 2003 (diunduh 16 April 2009). Tersedia dari: <http://www.itmonline.org/arts/amla.htm>.
- Liu X, Cui C, Zhao M, Wang J, Luo W, Yang B. *Identification of phenolic in the fruit of emblica (Phyllanthus emblica L.) and their antioxidant activities*. Food Chem. 2008;109:909-15.
- Chaudhuri R, Lascau Z, Puccetti G. *Inhibitory effect of Phyllanthus emblica tannins on melanin synthesis*. Cosm & Toil. 2007;122:73-80.
- 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.
- Bologna JL, Orlow SJ. *Melanocyte biology*. Dalam: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, penyunting. *Dermatology*. Edisi ke-2. Spain: Mosby Elsevier; 2008. hlm. 901-11.
- Carbo AA, Augur C, Barragan LAP, Torres EF, Aquilar CN. *Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins*. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;78:189-199.
- 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;69:747-53.
- 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;12:2368-73.
- Kumaran A, Karunakaran RJ. *Nitric oxide radical scavenging active components from Phyllanthus emblica L*. Plant Foods for Human Nutrition. 2006;61:1-5.