

EFEKTIVITAS KURKUMIN SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN INHIBITOR MELANIN PADA KULTUR SEL B16-F1

Sugiharto¹, Arbakariya Ariff², Syahida Ahmad², dan Muhajir Hamid²

¹Fakultas Sains dan Teknologi (FST), Universitas Airlangga – Indonesia

²Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences (FBBS), UPM, Malaysia

ABSTRACT

Melanin inhibitors have become increasingly important ingredients in medication and cosmetics for the prevention of hyperpigmentation. In the last few years, a huge number of natural herbal extracts have been tested as inhibitors of melanin synthesis and some of these effects are related to the antioxidant properties. The objectives of this study were to determine of curcumin properties as antioxidant activity and melanin inhibitors. In this study, our data indicated that antioxidant assay with DPPH showed IC_{50} was 16,05 $\mu\text{g/ml}$. In the absence of α -MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormone), melanin content assay in cell B16-F1 indicated that the highest activity of curcumin to reduce melanin content of 45,67% at 25 $\mu\text{g/ml}$. Meanwhile, in the presence of α -MSH at the same concentration indicated that the highest activity was 53,87%. Based on the data, curcumin has potential properties as antioxidant activity and melanin inhibitor.

Keywords: Curcumin, Antioxidant, Melanin inhibitor, Cell B16-F1, α -MSH

PENGANTAR

Masyarakat pengguna tanaman obat tradisional tidak hanya terbatas di Indonesia atau Asia Tenggara tetapi meluas hampir di seluruh dunia, termasuk India, Afrika, Cina, Jepang, Korea, dan Eropa. Tanaman kelompok Zingiberaceae, adalah tanaman yang banyak digunakan sebagai bumbu masakan ataupun sebagai tanaman obat (Hutapea dan Syamsuhidayat, 1991).

Sebagai tanaman obat, bahan aktif Zingiberaceae (kurkumin) juga berperan sebagai antioksidan untuk mengurangi dampak negatif radikal bebas yang diinduksi oleh $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CdCl_2 dan ME (Sugiharto, 2007; Sugiharto dan Darmanto, 2007), inhibitor tirosinase pada kultur sel B16-F1 (Sugiharto *et al.*, 2010), inhibitor apoptosis dalam kultur sel PC12 yang diinduksi AlCl_3 (Rui *et al.*, 2008), untuk pengobatan anti-diabetik dalam menurunkan kadar glukosa dan glukoprotein plasma tikus (Pari dan Murugan, 2007), dan untuk terapeutik penyakit jantung pada tikus yang hipertensi (Morimoto *et al.*, 2008), serta juga efektif pada beberapa pengobatan penyakit yang lain dengan toksistas rendah.

Menurut Kohli *et al.*, (2005), ekstrak kasar rhizoma *Curcuma longa* mengandung sekitar 70–76% kurkumin. Kurkumin dapat berperan antioksidan karena mengandung senyawa fenolik. Priyadarsini *et al.*, (2003) menyatakan bahwa atom H dari senyawa fenolik sangat potensial sebagai aktivitas antioksidan. Banyak senyawa fenolik diketahui potensial dalam aktivitas antioksidan serta beberapa di antaranya berperan untuk inhibitor melanogenesis (Barnes *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007).

Pada sel hewan, melanin dapat dijumpai di kulit, rambut, bulu, *choroid*, piameter dan otak. Pada sel mamalia, melanin terletak di dalam sel granula yang terspesialisasi berbentuk oval atau sferikal disebut melanosit/melanofor.

Melanosit menggunakan bahan dasar asam amino L-tirosin dan melalui proses biosintesis akan diubah menjadi melanin (Hadley 1992; Kim dan Uyama, 2005).

Pada manusia, kelebihan produksi melanin diakibatkan terpapar sinar UV, α -Melanosit Stimulating Hormone (α -MSH), Agouti Signal Protein (ASP) dan peningkatan metabolisme enzim tirosinase (Sulaimon dan Kitchell, 2003). Tirosinase adalah enzim yang dapat mengkatalisis sintesis melanin di dalam melanosit. Enzim tirosinase menggunakan molekul oksigen untuk mengkatalisis reaksi hidrosilasi tirosin dan oksidasi 3,4-dihydroxyphenylalanine/L-DOPA menjadi o-dopaquinone. Oksidasi DOPA menghasilkan reaksi antara *free-radical-coupling pathway*. Jika reaksi radikal bebas ini masuk dalam sintesis melanin, maka akan menghasilkan hidrogen peroksida/ H_2O_2 , hidroksil radikal/ OH^\cdot dan reaktif oksigen spesies/ROS (Kim dan Uyama, 2005; Khan, 2007).

Hiperpigmentasi terjadi ketika terlalu banyak produksi melanin dan terdeposit di kulit. Hiperpigmentasi merupakan salah satu problem wanita di dunia, meski bukan merupakan penyakit berbahaya. Hiperpigmentasi dapat dihambat dengan beberapa cara, seperti menghambat tirosinase, sintesis melanin serta aktivitas melanosit dan lain-lain. Paparan sinar UV dan stress oksidatif dapat terkait dengan kelainan kulit sebab akan menginduksi peningkatan ROS dan radikal bebas lain. ROS dapat meningkatkan sintesis

melanin dan proliferasi melanosit. Zat antioksidan dapat berperan sebagai ROS *scavenger* sehingga mengurangi hiperpigmentasi (Momtaz *et al.*, 2008).

Pada beberapa tahun terakhir ini, telah banyak ekstrak tanaman yang diujikan sebagai *whitening agent* atau inhibitor sintesis melanin karena memiliki zat aktif seperti fenolik, flavonoid dan zat derivatif lainnya. Biasanya pengaruh ini terkait sebagai zat antioksidan dan aktivitas *scavenger* (Gupta *et al.*, 2006; Khan, 2007). Berdasarkan latar belakang di atas, maka kami ingin mengetahui efektivitas kurkumin sebagai antioksidan dan inhibitor melanin pada kultur sel B16-F1.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Sel B16-F1 dari *American Type Culture Collection/ATCC* (USA). FBS, DMEM, *penicillin-streptomycin*, asam kojic, kurkumin, melanin sintesis, *trypsin-EDTA*, *melanocyte stimulating hormone/α-MSH*, *1,1-diphenyl-2-picryl hydrazil/DPPH* produksi Sigma (USA).

Kultur Sel B16-F1

Sel B16-F1 dikultur dengan media DMEM dengan penambahan 10% FBS dan 1% *penicillin-streptomycin* serta diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37° C. Sel ini akan menghasilkan melanin yang ditandai dengan warna sel menjadi coklat/hitam (*ATCC product information sheet*). Sel akan di-*detached* dari *culture flask* dengan 0,025% *trypsin-EDTA*. Sel kemudian di-subkultur kembali pada *well plates*. Semua percobaan dilakukan dengan tiga kali replikasi. Selama periode subkultur, medium diganti setiap 2–3 hari.

Uji Antioksidan – DPPH

DPPH radical scavenging diuji dengan menggunakan sedikit modifikasi (Lee *et al.*, 2009). 100 µl serial senyawa kurkumin pada berbagai konsentrasi (dengan larutan etanol sebagai kontrol), diletakkan dalam 96 *well plate*. Kemudian ditambahkan 5 µl DPPH dengan konsentrasi 2,5 mM dan diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap. Persentase aktivitas *scavenger* diukur pada λ = 517 nm di *microplate reader* dan dihitung dengan rumus:

$$\frac{(\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel})}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Estimasi Kandungan Melanin

Estimasi kandungan melanin menggunakan indeks melanogenesis (Nagata *et al.*, 2004) dengan cara menumbuhkan sel B16 (1×10⁵) dalam 12 *well plate*

dan diinkubasi selama 24 jam. Kemudian ditambahkan kurkumin pada berbagai konsentrasi. Setelah itu, sel dicuci 2x menggunakan PBS dan selanjutnya dilarutkan dalam 1N NaOH dan diinkubasi semalam. Sampel diukur dalam *microplate reader* pada λ = 405 nm, dibandingkan dengan kurva standar melanin sintesis.

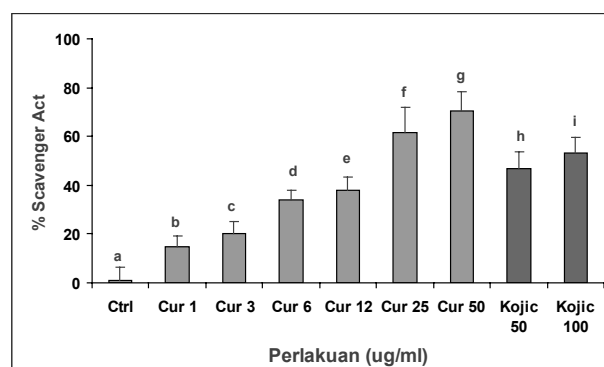
Pengaruh α-MSH pada Melanogenesis Sel B16-F1

Estimasi bahwa α-MSH dapat meningkatkan melanogenesis dalam kultur sel B16-F1 diuji dengan metode Lim *et al.*, (2009). Sel B16-F1 (1×10⁵) ditumbuhkan dalam 12 *well plate* dan ditambahkan 5 µM α-MSH kemudian di inkubasikan 24 jam. Setelah itu ditambahkan kurkumin dengan berbagai konsentrasi, dan setelah dicuci 2x menggunakan PBS, sampel dilarutkan dalam 1N NaOH dan diinkubasi semalam. Sampel diukur dalam *microplate reader* pada λ = 405 nm, dibandingkan dengan kurva standar melanin sintesis.

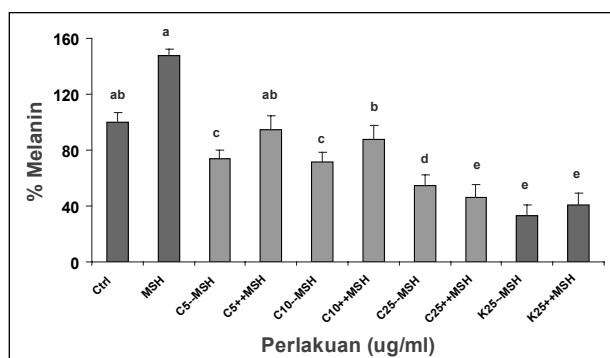
HASIL

Pengujian aktivitas antioksidan kurkumin dengan metode *DPPH radical scavenging assay* menunjukkan bahwa IC₅₀ kurkumin pada konsentrasi 16,05 µg/ml. Sebagai kontrol positif digunakan asam kojic dan didapatkan data bahwa aktivitas *scavenger* pada konsentrasi 50 µg/ml sebesar 46,8% dan pada 100 µg/ml sebesar 53,3%.

Sedangkan penelitian kandungan melanin pada kultur sel B16 didapatkan data bahwa penambahan α-MSH dapat meningkatkan persentase kandungan melanin 147,97% dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas terbaik kurkumin didapatkan pada konsentrasi 25 µg/ml sebab mengurangi kandungan melanin pada kultur sel B16 sebesar 45,67% (tanpa α-MSH) dan 53,87% (pada penambahan α-MSH).



Gambar 1. Aktivitas *scavenger* kurkumin Huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).



Gambar 2. Perbandingan kandungan melanin pada perlakuan kurkumin (tanpa α -MSH atau penambahan α -MSH), menunjukkan pengurangan kandungan melanin pada sel B16-F1. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Sementara pada perlakuan asam kojic sebagai kontrol positif pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ dapat mengurangi kandungan melanin sebesar 66,76% (tanpa α -MSH) dan 59,03% (pada penambahan α -MSH).

PEMBAHASAN

Berdasarkan data penelitian kami di atas, baik kurkumin dan asam kojic dapat berperan sebagai zat antioksidan. Hal ini diketahui dari nilai IC_{50} pada perlakuan kurkumin dikonsentrasi 16,05 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan untuk asam kojic sekitar konsentrasi 50–100 $\mu\text{g/ml}$.

Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa kurkumin sangat potensial untuk zat antioksidan. Hal ini disebabkan kurkumin mengandung senyawa fenolik sebagai bahan aktifnya. Priyadarsini *et al.*, (2003) menyatakan bahwa atom H dari senyawa fenolik sangat potensial sebagai aktivitas antioksidan. Asam kojic digunakan sebagai pembanding dalam penelitian zat antioksidan karena asam kojic juga telah terbukti sebagai anti melanogenesis.

Sintesis melanin dapat dihambat dengan beberapa cara, antara lain dengan menghindari paparan sinar UV, menghambat kerja enzim tirosinase, metabolisme serta proliferasi melanosit (Kim dan Uyama, 2005). Momtaz *et al.* (2008), menyatakan sintesis melanin mengakibatkan terjadinya mekanisme radikal bebas dan hal ini dapat dihambat oleh zat antioksidan untuk memecah reaksi ini. Sugiharto *et al.*, (2010) menyatakan bahwa kurkumin pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ dapat menghambat enzim tirosinase sebesar 36,17%.

α -MSH dapat memacu sintesis melanin sebab dapat berikatan dengan MSH-r/MCR-1 dan akan meningkatkan proliferasi serta formasi sel melanosit (Sulaimon dan Kitchell, 2003), meningkatkan rasio *eumelanin* dan *pheomelanin*,

serta proliferasi di kultur sel *human melanocytes* (Fitzgerald *et al.*, 2006), meningkatkan konsentrasi c-AMP pada kultur sel B16 (Choi *et al.*, 2008). Melanosoma yang diproduksi tersebut bermigrasi melalui *dendritic processes* sehingga menyebabkan kulit bertambah gelap (Hadley, 1992).

Pada penelitian kami, penambahan α -MSH dapat meningkatkan persentase kandungan melanin sebesar 147,97% dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas terbaik kurkumin sebagai inhibitor sintesis melanin pada kultur sel B16-F1 didapatkan pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ sebab mengurangi kandungan melanin sebesar 45,67%–53,87%. Sedangkan pada perlakuan asam kojic sebagai kontrol positif pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ dapat mengurangi kandungan melanin sebesar 66,76%–59,03%.

Berdasarkan data penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa kurkumin mempunyai aktivitas sebagai zat anti oksidan dan inhibitor sintesis melanin pada kultur sel B16-F1.

KEPUSTAKAAN

- Barnes, S., D'Alessandro, T., Marion, C.K., Rakesh, P.P., Brenda, J.B., dan Victor, M.D. 2004. *The Importance of In Vivo Metabolism of Polyphenols And Their Biological Actions*, Phytochemicals, Mechanisms of Action, CRC Press, 51–59.
- Choi, M.Y., Song, H.S., Hyun, S.H., dan Sang, S.S. 2008. Whitening Activity of Luteolin Related To The Inhibition of c-AMP Pathway In MSH Stimulated B16 Melanoma Cells, *Arch. Pharm. Res.* 31(9): 1166–1171.
- Fitzgerald, L.M., Jayne, L., Terence, D., dan Stuart, M.H. 2006. Effects of Melanotan-1, [Nle4, D-Phe7]- α -MSH, on Melanin Synthesis in Humans With MC1R Variant Alleles, *Peptides* 27: 388–394.
- Gupta, A.K., Melissa, D.G., Keyvan, N., dan Susan, T. 2006. The Treatment of Melasma: A Review of Clinical Trials, *J. Am. Acad. Dermatology.* 55(6):1048–1065.
- Hadley, M.E. 1992. *Endocrinology 3rd Edition*, Prentice-Hall, New Jersey, 179–207.
- Han, X., Shen, T., dan Lou, H. 2007. Review: Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, *Int. J. Mol. Sci.*, 8: 950–988
- Hutapea, J., dan Syamsuhidayat, S. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Badan Penelitian Pengembangan Kesehatan, Depkes RI, Jakarta, 516–517; 590–591.
- Khan, M.T.H. 2007. Heterocyclic Compounds Against The Enzyme Tyrosinase Essential For Melanin Production: Biochemical Features of Inhibition, *Top. Heterocycl. Chem.* 9: 119–138.
- Kim, Y.J., dan Uyama, H. 2005. Tyrosinase Inhibitors From Natural And Synthetic Sources: Structure, Inhibition Mechanism And Perspective For The Future, *Cell Mol. Life Sci.* 62: 1707–1723.

- Kohli, K., Ali, J., Ansari, M.J., dan Raheman, Z. 2005. Curcumin: A Natural Anti Inflammatory Agent, *Indian J. Pharmacol.*, 37: 141–147.
- Lee, K.H., Farida, H., Syahida, A., Faridah, A., Khozirah, S., Israf, D.A., dan Lajis, N.H. 2009. Synthesis And Biological Evaluation of Curcumin-like Diarylpentanoid Analogues for Anti Inflammatory, Anti Oxidant and Anti Tyrosinase Activities, *European J. of Medicinal Chemistry* 30: 1–6.
- Lim, Y.J., Lee, E.H., Kang, T.H., Ha, S.K., Oh, M.S., Kim, S.M., Yoon, T.J., Kang, C., Park, J.H., dan Kim, S.Y. 2009. Inhibitory Effects of Arbutin On Melanin Biosynthesis of α -Melanocyte Stimulating Hormone-Induced Hyperpigmentation In Cultured Brownish Guinea Pig Skin Tissues, *Arch Pharm Res* 32(3): 367–373.
- Momtaz, S., Mapunya, B.M., Houghton, P.J., Edgerly, C., Hussein, A., Naidoo, S. dan Lall, N. 2008. Tyrosinase Inhibition by Extracts And Constituents of *Sideroxylon inerme* L. Stem Bark, Used In South Africa For Skin Lightening, *J. of Ethnopharmacology* 119: 507–512.
- Morimoto, T., Sunagawa, Y., Kawamura, T., Takaya, T., Wada, H., Atsushi Nagasawa, A., Komeda, M., Fujita, M., Shimatsu, A., Kita, T., dan Hasegawa, K. 2008. The Dietary Compound Curcumin Inhibits p300 Histone Acetyltransferase Activity And Prevents Heart Failure In Rats, *J. Clin. Invest.* 118: 868–878.
- Nagata, H., Takekoshi, S., Takeyama, R., Homma, T., dan Osamura, Y. 2004. Quercetin Enhances Melanogenesis By Increasing The Activity And Synthesis of Tyrosinase In Human Melanoma Cells And In Normal Human Melanocytes, *Pigment Cell Res.* 17: 66–73.
- Pari, L., dan Murugan, P. 2007. Changes In Glycoprotein Components In Streptozotocin Nicotinamide Induced Type 2 Diabetes: Influence of Tetrahydrocurcumin From *Curcuma longa*, *Plant Foods For Human Nutrition* 62: 25–29.
- Priyadarsini, K.I., Maity, D.K., Naik, G.H., Kumar, M.S., Unnikrishnan, M.K., Satav, J.G., dan Mohan, H. 2003. Role of Phenolic OH And Methylene Hydrogen On The Free Radical Reactions And Antioxidant Activity of Curcumin, *Free Radical Biology And Medicine*, 35(5): 475–484.
- Rui, P., Sheng, Q., Xiang, L., dan Jun, D. 2008. Curcumin Improves Learning And Memory Ability And Its Neuroprotective Mechanism In Mice, *Chin Med J.* 121(9): 832–839.
- Sugiharto, dan Darmanto, W. 2007. Ginger Rhizome As Antioxidant For The Management of Negative Impact of Free Radical 2-Methoxyethanol, *Presented on First Collaborative Conference USM–UNAIR*, Malaysia 13–14 June 2007.
- Sugiharto, 2007. Ginger Rhizome For The Management of Negative Impact of $Pb(NO_3)_2$ And $CdCl_2$: Examination of Erythrocytes Count And Hb Concentration, *Presented on International Conference And Workshop On Basic And Applied Science*, UNAIR–RUG–KNAW, Surabaya 6–8 August 2007.
- Sugiharto, Arbakariya, A., Syahida, A., dan Muhajir, H. 2010. Kojic Acid and Curcumin As Tyrosinase Inhibitor To Reduce Hyper Pigmentation In Cell B16-F1, *Seminar Nasional Biodiversitas* 3, Surabaya–Juli 2010.
- Sulaimon, S.S., dan Kitchell, B.E. 2003. Review Article The Biology of Melanocytes, *Vet. Dermatology* 14: 57–65.