

## POTENSI LIMBAH KULIT JERUK NIPIS (*Citrus auronfolia*) SEBAGAI INHIBITOR TIROSINASE

Siti Hindun<sup>1</sup>, Taofik Rusdiana<sup>1</sup>, Marline Abdasah<sup>1</sup>, Reti Hindritiani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Jawa Barat, Indonesia

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

### ABSTRAK

Hiperpigmentasi merupakan kelainan kulit wajah yang umum terjadi, terutama karena adanya peningkatan melanogenesis, dengan gambaran berupa warna kulit menjadi hitam atau coklat kehitaman. Kelainan ini terdapat pada beberapa macam penyakit kulit diantaranya melasma, *melanoderma* paska inflamasi, *lentigo solaris* dan *freckles*. Salah satu prinsip penanganan hiperpigmentasi yaitu menghambat sintesis melanin yang dapat dilakukan dengan menggunakan agen depigmentasi yang mekanisme kerjanya menghambat aktivitas enzim tirosinase. Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi kulit jeruk nipis sebagai inhibitor tirosinase. Kulit jeruk nipis diekstraksi dengan etanol 96 %, identifikasi flavonoid, menghitung flavonoid total, kemudian diuji inhibisi tirosinase menggunakan instrumen *microplate reader* (ELISA). Hasil penelitian ekstrak kulit jeruk mengandung flavonoid, dengan total flavonoid totalnya 0,667 % b/b dan *inhibition concentration* (IC)<sub>50</sub> 42,11 mg/mL, Kulit jeruk berpotensi sebagai inhibisi tirosinase.

**Kata kunci:** *Citrus auronfolia*, Hiperpigmentasi, IC<sub>50</sub>, Tirosinase

## POTENCY OF LEMON PEEL (*Citrus auronfolia*) WASTE AS TIROSINASE INHIBITOR

### ABSTRACT

Hyperpigmentation is a common skin disorder, mainly due to an increase in melanogenesis, with the appearance of skin color to black or dark brown. The disorder is present in several skin diseases such as melasma, post-inflammatory melanoderma, solaris lentigo and freckles. One of the principles of hyperpigmentation is to inhibit melanin synthesis that can be done by using depigmentation agent whose mechanism of action inhibits the activity of tyrosinase enzymes. This study aims to test the potential of lime peel as a tyrosinase inhibitor. Lemon peel was extracted with 96% ethanol, flavonoid identification, total flavonoid count, then tested inhibition of tyrosinase using microplate reader (ELISA) instrument. The results of citrus skin extract studies contain flavonoid, with total flavonoid total of 0.667% w / w and inhibition concentration (IC)<sub>50</sub> 42.11 mg / mL, orange peel potency as inhibition of tyrosinase.

**Kata Kunci:** *Citrus auronfolia*, Hyperpigmentation, IC<sub>50</sub>, Tirosinase

### Pendahuluan

Melanin merupakan zat yang memberikan warna coklat atau coklat kehitaman pada kulit, berperan sebagai pelindung kulit terhadap paparan radiasi ultra violet (UV).<sup>1</sup> Proses pembentukan senyawa melanin (melanogenesis) terjadi dengan bantuan biokatalis terutama enzim tirosinase. Enzim

tirosinase mengkatalisis dua reaksi utama dalam biosintesis melanin, yaitu hidroksilasi L-tirosin menjadi L-dopa dan oksidasi L-dopa menjadi dopakuinon. Senyawa dopakuinon mempunyai kereaktifan yang sangat tinggi dan dapat dipolimerisasi secara spontan membentuk

melanin.<sup>2</sup> Pembentukan melanin dapat meningkat bila aktivitas enzim tirosinase meningkat yang terutama karena adanya pajanan sinar UV. Peningkatan sintesis melanin menyebabkan hiperpigmentasi.<sup>3</sup>

Pengobatan hiperpigmentasi yang telah banyak dikembangkan sebagai agen depigmentasi yaitu menginhibisi enzim tirosinase.<sup>4</sup> Agen depigmentasi yang sering digunakan yaitu hidrokuinon, namun penggunaan jangka panjang dapat menimbulkan iritasi, *rebound phenomenon* dan okronosis. *Kojic acid* menimbulkan alergi dan memiliki sifat mutagen.<sup>5</sup> Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dicari agen-agen depigmentasi kulit lain yang bersifat alami dengan efek samping kecil.<sup>5</sup> Indonesia telah dikenal sebagai negara pemilik kekayaan alam yang berlimpah. Kekayaan alam saat ini telah dikembangkan dalam upaya pemanfaatan tanaman sebagai obat dan kosmetik. Salah satu tanaman yang dapat dikembangkan sebagai obat dan kosmetik adalah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

Jeruk nipis adalah sejenis tanaman perdu yang banyak tumbuh dan dikembangkan di Indonesia. Selain daerah penyebarannya yang sangat luas, jeruk ini juga dapat berbuah terus-menerus sepanjang tahun. Jeruk nipis juga merupakan salah satu tanaman toga yang di gunakan oleh masyarakat, baik untuk bumbu masakan, obat-obatan, dan minuman segar. Pemanfaatan buah jeruk sebagai obat diantaranya sebagai penambah nafsu makan, penurun panas (antipireutik), diare, menguruskan badan, antiinflamasi, antibakteri dan antioksidan.<sup>6</sup> Kulit jeruknya telah diteliti berperan sebagai antioksidan  $IC_{50}$  54,458  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>7</sup>

Kulit jeruk nipis dapat diolah untuk mendapatkan kandungan pektin dan flavonoid. Flavonoid adalah zat metabolit sekunder pada jeruk nipis yang memiliki konsentrasi paling tinggi pada bagian kulitnya.<sup>8</sup> Flavonoid merupakan salah satu zat metabolit sekunder yang terdapat pada jeruk dan kulit jeruk yang berperan sebagai antioksidan, penghambat enzim tirosinase

dan juga bekerja pada bagian akhir dari jalur oksidatif melanogenesis.<sup>9,10,11</sup> Selain itu, beberapa jenis flavonoid seperti hesperidin, naringin, neohesperidin dan nobiletin telah terbukti *in vitro* dapat menghambat enzim tirosinase.<sup>12,13</sup>

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas bahan alam yang dapat digunakan sebagai inhibitor tirosinase khususnya kulit jeruk nipis.

## Metode

Uji efektivitas *in vitro* dilaksanakan di Pusat Studi Biofarmaka Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Institut Pertanian Bogor.

Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), etanol 96 % (brataco), DMSO (*dimetil sulfoksida*) (brataco), akuades, bufer fosfat pH 6.5, L-tirosin, L-DOPA, enzim tirosinase (Sigma 333 unit/ml dalam bufer fosfat).

Jeruk nipis diperoleh dari daerah Lembang Bandung Jawa Barat, kemudian dilakukan determinasi di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung.

Instrumen yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis, *multiplate well reader* (ELISA), *multiwell plates*, *eppendorf microcentrifuge tube*, oven, tanur listrik, vorteks, sonikator, inkubator, eksikator, corong buchner, hot plate, nyala bunsen, neraca analitik, rotavapor putar, tabung reaksi, penjepit kayu, gelas erlenmayer, gelas piala, pipet volumetrik, pipet mikro, pipet dot.

Kulit jeruk nipis yang telah dikumpulkan disortir dan dibersihkan kemudian di keringkan dengan cara diangin-anginkan. Sampel yang telah kering diserbuk dengan menggunakan *blender*, serbuk yang dihasilkan diayak menggunakan ayakan mesh 60 hingga diperoleh serbuk yang halus dan seragam. Hasilnya dimasukkan kedalam wadah tertutup.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi menggunakan

pelarut etanol 96 %. Serbuk simplisia kulit jeruk nipis ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dimasukan kedalam maserator yang bagian dasarnya telah dilapisi kapas, kemudian dimasukan pelarut etanol 96 % kedalam maserator hingga simplisia tersebut terendam seluruhnya. Diamkan selama 3 x 24 jam, dan setiap 24 jam pelarut diganti dengan pelarut yang baru hingga filtrat yang dihasilkan jernih. Hasil ekstraksi yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan alat *vacuum rotary evaporator* dilanjutkan dengan *water bath*.<sup>14</sup>

Sampel dalam tabung reaksi dicampur dengan serbuk magnesium dan ditetesi asam klorida 2 N. Campuran tersebut dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit lalu disaring. Filtrat ditambahkan amil alkohol lalu dikocok kuat-kuat. Terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik dengan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid.

Penentuan kadar flavonoid dilakukan dengan spektrofotometri menggunakan reagen alumunim klorida. Sebanyak 2 mL larutan ekstrak dengan konsentrasi 50 µg/mL, di tambahkan dengan 2 mL alumunium klorida 2% yang telah dilarutkan dengan etanol, kemudian divorteks selama 20 menit, inkubasi campuran larutan selama 24 menit. Ukur absorbansi pada 415 nm. Buat perhitungan rata-rata 3 kali pengukuran dan kandungan flavonoid dinyatakan dengan kesetaraan perbandingan baku.<sup>14</sup>

Ekstrak kulit jeruk nipis dilarutkan di dalam DMSO (dimetil sulfoksida) pada konsentrasi akhir 20 µg/ml. Larutan ekstrak tersebut kemudian didilusi pada 600 µg/ml didalam 50 mM buffer fosfat (pH 6,5). Ekstrak tersebut diuji pada tingkat konsentrasi 5, 10, 20, 30, 40 dan 50 mg/mL. Asam kojik sebagai kontrol positif di uji pada konsentrasi 0,1563; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 dan 5 mg/mL. Didalam pelat tetes 96 sumur. Sebanyak 70 µl dari masing-masing ekstrak pengenceran ini ditambahkan dengan 30 µl enzim tirosinase (Sigma 333 unit /ml dalam buffer fosfat pH

6,5), setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 110 µl substrat (2 mM L-tirosin atau 12 mM L-DOPA) dalam sumur multi-well plate yang sudah ditentukan, larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Larutan tersebut diukur dengan menggunakan *multi well plate reader* (ELISA) pada panjang gelombang 492 nm, hal ini bertujuan untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambatan 50 % (IC<sub>50</sub>).<sup>15</sup>

Penentuan persentase inhibisi ditentukan dengan cara membandingkan absorbansi sampel tanpa penambahan ekstrak dan sampel dengan penambahan ekstrak. Pengukuran persentase aktivitas inhibisi dapat dirumuskan<sup>4</sup>:

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

Keterangan:

A: absorbansi blanko (tanpa sampel)

B: absorbansi sampel (penambahan sampel)

Nilai IC<sub>50</sub> diperoleh dari persamaan regresi linier antara % inhibisi (sumbu y) dan konsentrasi ekstrak (sumbu x), persamaan regresi linier dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$Y=a+bx$$

Keterangan:

Y : variabel dependen

X : variabel independen

A : konstanta

B : koefisien regresi

## Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi yang dilakukan yaitu ekstraksi dingin dengan cara maserasi, metode ini merupakan metode yang mudah, murah dan efektif untuk menghindari kerusakan zat aktif yang termolabil. Pelarut ekstraksi yang digunakan yaitu etanol 96 % karena pelarut ini merupakan pelarut universal yang dapat menarik hampir seluruh metabolit sekunder, baik yang bersifat polar, semi polar maupun non polar, juga memiliki kandungan air yang

kecil sehingga mempercepat proses evaporasi dan *waterbath* serta terhindar dari tumbuhnya jamur.

Sampel dalam tabung reaksi setelah dicampur dengan serbuk magnesium dan ditetesi asam klorida 2 N. kemudian campuran tersebut dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit lalu disaring. Filtrat ditambahkan amil alkohol lalu dikocok kuat-kuat, hasilnya terbentuknya warna kuning hingga merah hal tersebut menunjukkan ekstrak kulit jeruk mengandung flavonoid. Dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Flavonoid

Selanjutnya ekstrak kulit jeruk nipis dihitung flavonoid total dengan cara memasukan nilai absorbansi pada kurva standar kuersetin dengan persamaan kurva yaitu  $y = 0,0706x - 0,0465$  sehingga hasil dari besar flavonoid pada ekstrak kulit jeruk nipis yaitu sebesar 0,667 % b/b mg/kg. kandungan flavonoid pada sampel tersebut kecil, karena kemungkinan proses preparasi sampel mengalami pemanasan, sehingga kadar dari senyawa flavonoid berkurang. Menurut Lusivera tahun 2002 mengatakan proses pemanasan ini dapat mengakibatkan penurunan kadar total flavonoid sebesar 15 – 78 %.

Enzim tirosinase merupakan suatu glikoprotein yang terletak pada membran melanosom, dan dapat juga berdomain didalam melanosom, transmembran, dan di dalam sitoplasma sel melanosit yang

Dari Persamaan tersebut diperoleh  $IC_{50}$  kulit jeruk nipis yaitu 42,11 mg/mL. Nilai  $IC_{50}$  menentukan tinggi rendahnya ekstrak kulit jeruk nipis sebagai inhibitor tirosinase untuk penghambat pembentukan melanin. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka

berperan dalam mengkatalisis konversi L-tirosin menjadi L-DOPA dan oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon dan oksidasi 5,6 Dihidrosiindol menjadi Indol-6,6 Kuinon selanjutnya membentuk melanin. Enzim tirosinase berperan dalam reaksi pigmentasi kulit atau perubahan warna kulit menjadi lebih coklat. Senyawa yang dapat menghambat proses pembentukan melanin yaitu inhibitor tirosinase, mekanisme kerjanya mereduksi bahan yang dapat menyebabkan oksidasi dopakuinon dan bekerja secara kompetitif dan non kompetitif dengan subbstrat tirosinase yaitu L-tirosin dan L-DOPA serta secara spesifik akan berikatan kovalen dengan enzim tirosinase sehingga enzim menjadi tidak aktif selama reaksi katalik berlangsung.<sup>3</sup> Inhibitor tirosinase banyak digunakan dalam prodak kosmetik dan farmasi sebagai penghambat produksi melanin berlebih pada lapisan epidermis dan membuat kulit tampak lebih cerah.<sup>16</sup>

Pengujian aktivitas tirosinase dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya inhibisi senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak kulit jeruk nipis. Aktivitas inhibisi tirosinase ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi yang dibutuhkan dalam menghambat 50 % aktivitas tirosin-tirosinase menggunakan instrumen *microplate reader* (ELISA).

Pengujian dilakukan dengan cara pengenceran ekstrak pada konsentrasi 5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg dan 50 mg. Hasil pengujiannya dapat dilihat Tabel 1.

Setelah penentuan persentase inhibisi, selanjutnya penentuan nilai  $IC_{50}$ . Penentuan  $IC_{50}$  dengan cara dibuat kurva hubungan konsentrasi inhibitor yaitu sampel (ekstrak kulit jeruk nipis) masukan kedalam persamaan  $y=85,929\ln(x)-271,4$ , seperti yang terdapat pada gambar 2.

semakin berpotensi senyawa tersebut sebagai inhibitor tirosinase. Tirosinase merupakan enzim mono-oksigenase yang berperan sebagai katalisator pada reaksi hidrosilaksi monofenol menjadi bentuk difenol (monofenolase) dan oksidasi

difenol menjadi kuinon (difenolase). Tirosinase memiliki peranan penting dalam pembentukan melanin selama proses melanogenesis karena kemampuannya menghidroksilasi L-tirosin (monofenol) menjadi L-dopa (difenol) dan mengoksidasi L-dopa menjadi dopakuinon (senyawa kuinon). Dopakuinon yang terbentuk akan bereaksi secara spontan membentuk dopakrom. Peran tirosinase dalam proses melanogenesis terjadi karena tirosinase memiliki gugus tembaga (Cu) yang merupakan *active site* yang dapat berkaitan dengan substrat pada proses pembentukan melanin.<sup>16</sup>  $IC_{50}$  yang diperoleh sebesar 42,11 mg/ml menunjukkan bahwa ekstrak

kulit jeruk berpotensi sebagai inhibitor tirosinase.

#### Kesimpulan

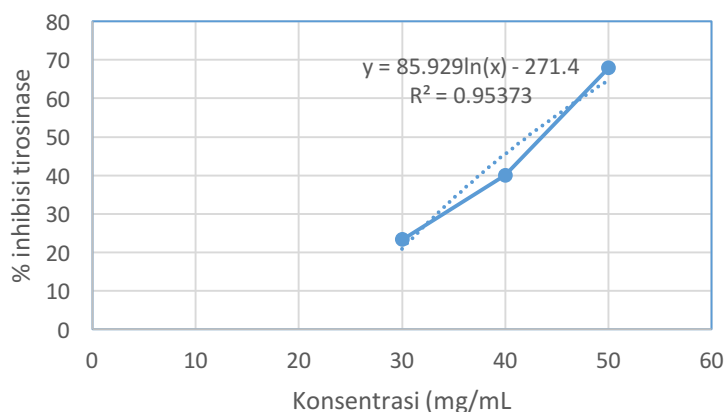
Kulit jeruk nipis memiliki kandungan flavonoid, total flavonoid 0,667 % b/b, dan  $IC_{50}$  42,11 mg/mL, berpotensi sebagai pencerah kulit.

#### Saran

Ekstrak kulit jeruk nipis perlu dilakukan proses pemurnian lebih lanjut agar diperoleh senyawa yang lebih aktif sebagai inhibitor tirosinase, dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktifitas penghambatan tirosinase ekstrak kulit jeruk nipis dengan substrat selain tirosinase.

**Tabel 1** Aktivitas penghambatan enzim tirosinase (%)

Sampel	Konsentrasi (mg/g)	% Inhibisi tirosinase
Ekstrak kulit jeruk nipis	50	67,9
	40	40,0
	30	23,3
	20	19,1
	10	17,1
	5	15,6



Gambar 2. Kurva hubungan antara konsentrasi (mg/mL) Ekstrak kulit jeruk terhadap persentase inhibisi

#### Daftar Pustaka

1. Hoogduijn MJ, Cemeli E, and Ross K. Melanin Protects Melanocytes And Keratinocytes Against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced DNA Strand Breaks Through Its Ability To Bind Ca<sup>2+</sup>. *Exp Cell Res.* 2004; 294:60-67.
2. Costin, G. E., and Hearing, V. J. Human Skin Pigmentation:

- Melanocytes Modulated Skin Color in Response to Stress. *FASEB Journal*. 2007; 21(4):976-94.
3. Chang, T.S. An updated review of tyrosinase inhibitor. *International Journal of molecular Science*. 2009;10(6): 2440-2475.
  4. Yang, Chao-Hsun, Chang, N.F, Chen, Y.S., Lee, S.M, Lin, P.J, and Lin C.C. Comparative Study On The Photostability Of Arbutin And Deoxyarbutin: Sensitivity To Ultraviolet Radiation And Enhanced Photostability By The Water-Soluble Sunscreen, Benzophenone-4. *Biosci Biotech Biochem*. 2013; 77(5): 1127-1130.
  5. Baumann, L., Saghari, S. 2009a. Photoaging. In: Baumann, L., Saghari, S., Weisberg, E., editors. *Cosmetic Dermatology*. 2nd edition. New York: McGraw Hill. p 34-40.
  6. Haryanto, S. Sehat dan Bugar Secara Alami. 2006. Jakarta: Penebar Plus. Hal 60.
  7. Khasanah. 2014. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanolik kulit buah Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Semarang: Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.
  8. Okwu. Citrus fruits: A rich source of phytochemicals and their roles in human health. *Int J Chem Sci*. 2008;6(2):451-471.
  9. Dweck, A. 2008. Natural Ingredients Used in Cosmeceuticals. In: Walters, K.A., Roberts, M.S., editors. *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development*. New York: Informa Healthcare. p 306-312.
  10. Baumann L. Allemann IB, Depigmentation agent. 2009b. In: Baumann L., *Cosmetic dermatology: principles and practice*, penyunting, Edisi ke-2, New York: Mc Graw Hill.
  11. Abirami, A. 2014. *In vitro* antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. Bioresource Technology Lab. School of Life Sciences. Department of Environmental Sciences. Bharathiar University. Coimbatore 641 046. Tamil Nadu. India.
  12. Itoh, K., Hirata, N., Masuda, M., Naruto, S., Murata, K., Wakabayashi, K., Matsuda, H. Inhibitory effects of Citrus hassaku extract and its flavanone glycosides on melanogenesis. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(3):410-415.
  13. Sasaki K & Yoshizaki F. Nobiletin as a tyrosinase inhibitor from the peel of citrus fruit. *Biol Pharm Bull*. 2002;25:806-808.
  14. Voight, R. 1994. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi. Edisi V: Diterjemahkan oleh Dr. Soendani Noerono. Yogyakarta :Gadjah Mada University press.
  15. Batubara. Potency of Indonesia medical plants as tyrosinase inhibitors and antioxidant agent. *Journal of Biologi Sciences*. 2010;10: 138-144.
  16. Arung. Screening of Indonesian plant for tyrosinase inhibitor activity. *Journal Wood Science*. 2006;51:520-525.