

Potensi limbah kulit buah Nyirih *Xylocarpus granatum* sebagai inhibitor tirosinase

Potency of waste fruit peel of Xylocarpus granatum as a tyrosinase inhibitor

Mohamad Gazali¹, Neviaty P. Zamani^{2*}, Irmanida Batubara^{3,4}

¹Sekolah Pascasarjana Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Gedung Marine Center, Kampus IPB Darmaga Kota Bogor kodepos 16680.

²Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Kota Bogor kode pos 16680.

³Pusat Studi Biofarmaka, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor, Kota Bogor kode pos 16151.

⁴Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kota Bogor kodepos 16680. *Email Korespondensi : np_zamani@yahoo.com.

Abstract. *The aim of the present study was to analyse the peel waste of Xylocarpus granatum fruits as potential source of tyrosinase inhibitors. Dried peel samples were ground to yield a powder (simplicia). Subsequently, they were extracted with organic solvents of distinct polarity levels, namely n-hexane (non-polar), chloroform (semi-polar) and methanol (polar) by use of the single-maceration method. Inhibitory effects on tyrosinase activity (monophenolase) and DOPA auto-oxidation (diphenolase) were determined in bioassays. Assays with the methanol extract revealed IC₅₀ values of 784.87 µg mL⁻¹ (monophenolase) and of 1176.66 µg mL⁻¹ (diphenolase), respectively. In contrast, n-hexane and chloroform extracts showed no activity. These results indicate that the methanolic fruit peel extract contained tyrosinase-inhibiting compounds, such as flavonoids, tannins and saponins, whereas the n-hexane and chloroform extracts yielded alkaloids, steroids and triterpenoids without tyrosinase-inhibiting activity. The phenolic compounds had a strong effect on the tyrosinase enzymes, inhibiting monophenolases by 97% and diphenolases by 96%, with a positive correlation between the total phenolic content and the inhibition rate in both activities.*

Keywords : *Active compound; Tyrosinase inhibitor; Xylocarpus granatum*

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kulit buah *Xylocarpus granatum* sebagai sumber potensial inhibitor tirosinase. Sampel kering digiling untuk menghasilkan (serbuk) simplisia. Berikutnya, simplisia diekstraksi dengan pelarut organik dengan tingkat kepolaran yaitu *n*-heksana (non polar), kloroform (semi polar) dan metanol (polar) dengan menggunakan metode maserasi tunggal. Pengaruh inhibisi didalam aktivitas tirosinase (monofenolase) dan auto-oksidasi DOPA (difenolase) ditentukan di dalam uji. Uji ekstrak metanol menunjukkan masing-masing nilai IC₅₀: 784,87 µg mL⁻¹ (monofenolase) dan nilai IC₅₀: 1176,66 µg mL⁻¹ (difenolase). Sebaliknya, ekstrak *n*-heksana dan kloroform menunjukkan tidak ada aktivitas. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol kulit buah *X. granatum* mengandung senyawa-senyawa yang menghambat aktivitas tirosinase seperti flavonoid, tanin dan saponin sedangkan ekstrak *n*-heksana dan kloroform menghasilkan senyawa alkaloid, steroid, dan triterpenoid tanpa penghambatan aktivitas tirosinase. Senyawa fenolik mempunyai pengaruh kuat dalam menginhibisi enzim tirosinase baik aktivitas monofenolase sebesar 97% dan aktivitas difenolase sebesar 96% dengan korelasi positif antara kandungan total fenol dan tingkat inhibisi pada kedua aktivitas.

Kata kunci : Senyawa aktif; Inhibitor tirosinase; *Xylocarpus granatum*

Pendahuluan

Inhibisi tirosinase merupakan salah satu strategi utama untuk mencegah hiperpigmentasi kulit (Nerya *et al.*, 2004). Berbagai upaya sudah dilakukan untuk menyelidiki inhibitor tirosinase yang aman dan efektif yang berasal dari senyawa alami dan sintetik (Ley dan Bertram, 2001; Um *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2006). Meskipun banyak informasi tentang inhibitor tirosinase namun hanya sedikit inhibitor yang dapat diterapkan karena keterbatasannya mengenai sitotoksitas, selektivitas, dan stabilitas (Seo *et al.*, 2003; Karioti *et al.*, 2007; Satooka dan Kubo, 2012). Oleh karena itu, penemuan inhibitor tirosinase yang berasal dari tumbuhan mangrove masih terus diselidiki oleh para ilmuwan karena bersifat alamiah dan sumberdaya yang cukup berlimpah untuk dijadikan bahan baku kosmetik. Penyelidikan inhibitor tirosinase yang berasal dari tumbuhan mangrove memberikan kontribusi besar dalam bisnis kosmetik untuk mencegah penyakit hiperpigmentasi (*melanogenesis*) yang disebabkan oleh radiasi ultraviolet yang berasal dari matahari.

Melanogenesis difasilitasi oleh suatu jalur kompleks yang terjadi pada melanosoma intraseluler di dalam melanosit dan dirangsang oleh radiasi ultraviolet dan MSH (*α -melanocyte stimulating hormone*) (Costin dan Hearing, 2007; Vachtenheim dan Borovansky, 2009). Proses melanogenesis menghasilkan sintesis pigmen-pigmen melanin yang memainkan peranan protektif dalam melawan fotokarsinogenesis kulit (Beissert, 2002). Hiperpigmentasi tidak hanya menjadi masalah estetika tetapi juga masalah dermatologi (Lin *et al.*, 2008). Salah satu agen penyebab utama hiperpigmentasi adalah radiasi ultraviolet (Gilchrest *et al.*, 1996). Enzim kunci yang berperan dalam biosintesis melanin adalah tirosinase yang diketahui sensitif terhadap radiasi ultraviolet di dalam keberadaan oksigen (Ha *et al.*, 2007). Tirosinase (EC 1.14.18.1) merupakan enzim yang mengandung tembaga mengatalisasi dua reaksi yang berbeda dengan menggunakan oksigen molekuler, *orto* hidroksilasi tirosinase (*mono*-fenol) pada 3,4-dihidrofenilalanin atau DOPA (*o*-fenol) yang ditetapkan sebagai aktivitas monofenolase dan oksidasi DOPA menjadi dopakuinon (*o*-kuinon) ditetapkan sebagai aktivitas difenolase (Khan *et al.*, 2006; Solano *et al.*, 2006; Ebanks *et al.*, 2009; Chang, 2009). Dopakuinon (*o*-kuinon) sangat reaktif dan cenderung berpolimerasi secara spontan untuk membentuk pigmen cokelat (melanin) yang menentukan warna kulit mamalia dan rambut (Seo *et al.*, 2003).

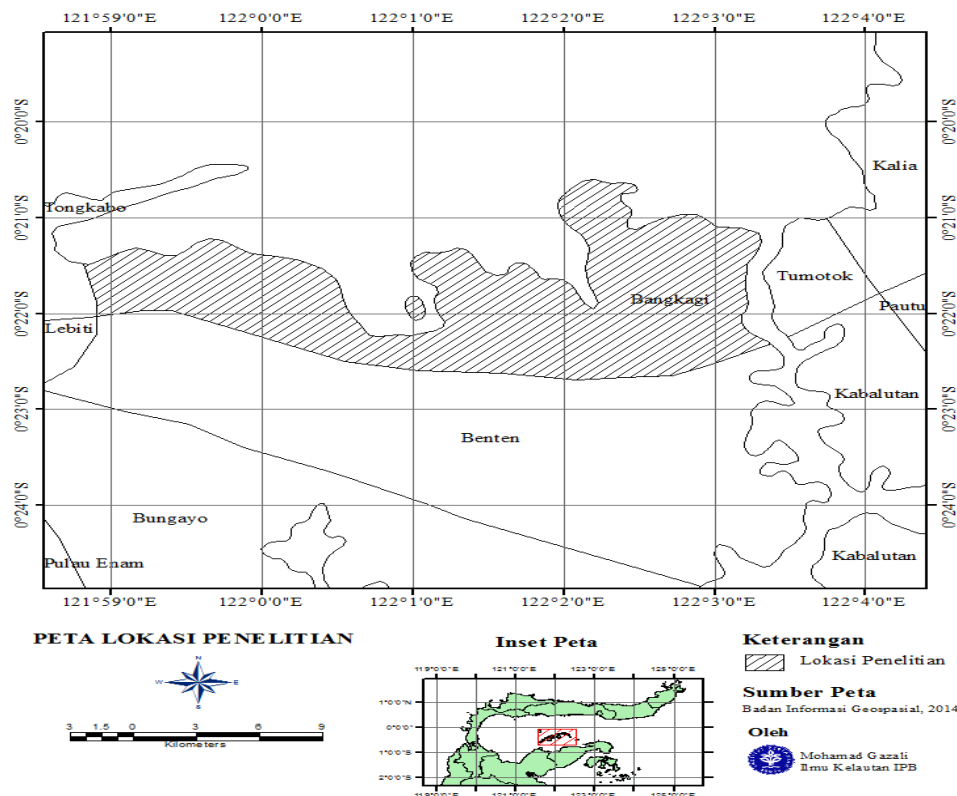
Saat ini, inhibitor tirosinase menarik banyak perhatian karena dapat mencegah melanogenesis akibat terpapar langsung dengan radiasi ultraviolet sinar matahari. Inhibitor tirosinase sudah menjadi sangat penting dalam medikasi (Seo *et al.*, 2003) dan kosmetik (Maeda dan Fukuda, 1991) untuk mencegah hiperpigmentasi kulit melalui penghambatan oksidasi enzimatik. Banyak inhibitor tirosinase yang sudah dimanfaatkan sebagai bahan kosmetik oleh industri kosmetik karena dapat memutihkan kulit diantaranya hidrokuinon (Briganti *et al.*, 2003; Solano *et al.*, 2006; Picardo dan Carrera, 2007), asam azelaic (Grimes, 1995), merkuri (Karioti *et al.*, 2007) dan asam kojat (Shiino *et al.*, 2003; Badreshia-Bansal dan Draelos, 2007). Namun demikian, beberapa senyawa tersebut memiliki efek samping berbahaya terkait karsinogenesis dan mutagenesis (Lin *et al.*, 2008) seperti asam kojat yang memiliki efek inhibisi dan kestabilan yang paling besar dalam mencegah hiperpigmentasi kulit. Menurut Chusiri *et al.*, (2010) bahwa asam kojat pada konsentrasi tinggi bersifat hepatokarsinogenik. Pemakaian asam kojat pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan erythema dan dermatitis kontak alergi (Serra-Baldrich *et al.*, 1998; Badreshia-Bansal dan Draelos, 2007). Oleh karena itu, eksplorasi dan penemuan inhibitor tirosinase yang aman, sumberdayanya mendukung dan daya inhibisinya kuat sangat dituntut oleh industri kosmetik.

Eksplorasi senyawa bioaktif yang potensial sebagai inhibitor tirosinase yang berasal dari sumber-sumber alami (*natural product*) seperti tumbuhan mangrove masih perlu dilakukan. Penelitian ini fokus pada tumbuhan *Xylocarpus granatum* sebagai inhibitor tirosinase. Riani *et al.*, (2013) menyatakan bahwa biji buah *X. granatum* sudah dimanfaatkan secara tradisional oleh wanita pesisir sebagai bedak tradisional untuk perawatan kulit (*skin care*). Kecenderungan masyarakat pesisir memanfaatkan biji buah *X. granatum* dengan mengupas kulit buah untuk mengambil biji sedangkan kulit buahnya belum dimanfaatkan. Secara ilmiah, kulit buah *X. granatum* mengandung senyawa bioaktif yang bermanfaat dan bernilai ekonomis. Berdasarkan uji fitokimia simplisia kulit buah *X. granatum* menandakan bahwa kulit buah *X. granatum* mengandung flavonoid, tanin, saponin, hidrokuinon dan steroid. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi kulit buah *X. granatum* sebagai inhibitor tirosinase.

Bahan dan Metode

Koleksi sampel

Pengambilan sampel tumbuhan *X. granatum* dilakukan pada bulan Juni 2013 di Desa Bangkagi Kecamatan Togean Kabupaten Tojo Una-una Provinsi Sulawesi Tengah (Gambar 1). Sampel tersebut diidentifikasi di Herbarium Bogoriensis bidang Botani Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong Jawa Barat dan dianalisis di Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Institut Pertanian Bogor.



Gambar 1. Lokasi sampling *X. granatum* di Desa Bangkagi Kecamatan Togean Kabupaten Tojo Una-una Provinsi Sulawesi Tengah, Indonesia.

Preparasi dan ekstraksi sampel

Preparasi sampel ekstrak kulit buah *X. granatum* dilakukan dengan cara mengeringkan dan menggiling sampel kulit buah *X. granatum* kemudian dibuat simplisia (serbuk) dan dikeringkan. Sampel kering berupa serbuk kemudian ditentukan kadar air dan kadar abu, lalu dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi tunggal yang mengacu pada Quinn, (1988) dalam Darusman *et al.*, (1995). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pelarut non polar (*n*-heksana), semi polar (kloroform) dan polar (metanol). Ekstraksi dilakukan sebanyak 2 ulangan (duplo) dengan bobot sampel 25 g setiap ulangannya. Ekstrak tersebut diperoleh dengan menyaring simplisia sampel dengan menggunakan kertas saring Whatman No. 2 dan selanjutnya dipekatkan dengan penguap putar (*rotary evaporator*) pada suhu 30 °C kemudian rendemen tiap ekstrak dihitung (Batubara *et al.*, 2010).

Penentuan kadar air dan kadar abu

Penentuan kadar air dan kadar abu mengacu pada metode AOAC (1995).

Uji fitokimia

Uji fitokimia merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui kandungan senyawa spesifik seperti alkaloid, triterpenoid, steroid, saponin, flavonoid, hidrokuinon, tanin dan fenol secara kualitatif dengan metode Harborne (1984).

Analisis kuantitatif kandungan total fenolik

Pengukuran kandungan total fenolik dilakukan berdasarkan metode Andarwulan *et al.*, (1999) yang dimodifikasi. Pembuatan standar asam galat dilakukan dengan melarutkan 5 mg asam galat ke dalam aquades menggunakan labu takar 25 mL. Kemudian dari larutan tersebut, dibuat standar dengan konsentrasi 0,5, 1, 5, 10, 15, 25 ppm. Pengujian kandungan fenolik total dilakukan dengan melarutkan 20 mg ekstrak dengan aquades dalam labu takar 25 mL dan dihomogenisasi dengan *shaker*. Selanjutnya, larutan tersebut diambil sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan dengan pereaksi Follin Ciocalteu 50% sebanyak 1 mL kemudian didiamkan selama 5 menit dan ditambahkan mL Na₂CO₃ 5%. Larutan tersebut kemudian dihomogenisasi tanpa cahaya selama 1 jam kemudian nilai absorbansnya diukur pada panjang gelombang 725 nm menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis.

Uji aktivitas inhibisi tirosinase

Uji ini ditunjukkan dengan menggunakan metode-metode seperti yang dijelaskan dahulu (Curto *et al.*, 1999; Nerya *et al.*, 2003). Ekstrak kulit buah *X. granatum* dilarutkan dengan DMSO pada konsentrasi akhir 20 mg mL⁻¹. Larutan ekstrak tersebut didilusi pada 600 mg mL⁻¹ dalam 50 mM buffer fosfat (pH 6.5). Ekstrak tersebut diuji pada tingkat konsentrasi dari 7,8 menjadi 2000 mg mL⁻¹. Asam kojat digunakan sebagai kontrol positif yang juga diuji pada konsentrasi 7,8 menjadi 500 mg mL⁻¹. Pada 96-well micro plate, 70 µL tiap dilusi ekstrak ditambahkan dengan 30 µL enzim tirosinase (Sigma 333 unit mL⁻¹ dalam buffer fosfat) secara triplo. Setelah inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit, 110 µL substrat (2 mM L-tirosin atau 12 mM L-DOPA) ditambahkan pada setiap lubang 96-well micro plate. Inkubasi dilakukan selama 30 menit pada suhu kamar. Densitas optikal lubang 96-well micro plate diukur pada panjang gelombang 492 nm dengan menggunakan multi-well plate reader (ELISA).

Hasil dan Pembahasan

Analisis fitokimia

Analisis fitokimia merupakan salah satu cara untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder pada suatu sampel (Harborne, 1984). Analisis ini sangat berguna untuk menentukan golongan utama senyawa aktif dari ekstrak kulit buah *X. granatum* yang memiliki potensi sebagai inhibitor enzim tirosinase. Uji yang dilakukan meliputi uji alkaloid, saponin, flavonoid, triterpenoid, steroid, dan tanin. Berdasarkan uji fitokimia pada simplisia kulit buah *X. granatum* mengandung flavonoid, tanin, saponin, hidrokuinon, dan steroid. Adapun hasil pengujian fitokimia ekstrak kasar kulit buah *X. granatum* ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisis fitokimia ekstrak kasar kulit buah *X. granatum*

Pelarut	Flavonoid	tanin	saponin	alkaloid	triterpenoid	steroid	hidrokuinon
<i>n</i> -heksana	-	-	-	+	-	-	-
kloroform	-	-	-	-	+	+	-
Metanol	+++	++	+++	-	-	-	+
Simplisia	++	++	+++	-	-	+	+

Keterangan : +: hasil uji positif lemah, ++: hasil uji positif, dan +++: hasil uji positif kuat.

Kandungan fitokimia ekstrak kasar seperti pada Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak kasar *n*-heksana mengandung komponen alkaloid non polar. Ekstrak kloroform mengandung komponen triterpenoid dan steroid semi polar. Sementara, ekstrak metanol mengandung komponen flavonoid, saponin dan tanin. Intensitas endapan uji flavonoid dan saponin ekstrak metanol lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak lain komponen-komponen polar karena komponen-komponen polar dari sampel banyak terlarut dalam metanol. Senyawa flavonoid dan tanin pada sampel mengindikasikan aktivitas sampel sebagai inhibitor tirosinase.

Aktivitas inhibisi tirosinase ekstrak kasar

Uji aktivitas inhibitor tirosinase dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya daya inhibisi senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak kasar metanol, kloroform, dan *n*-heksana dari kulit buah spesies *X. granatum*. Aktivitas inhibisi tirosinase ditunjukkan dengan nilai IC₅₀. Data hasil pengujian aktivitas inhibitor tirosinase pada ekstrak kasar dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai IC₅₀ inhibitor tirosinase (monofenolase dan difenolase) pada ekstrak kasar kulit buah *X. granatum*

Ekstrak	Aktivitas inhibisi tirosinase	
	monofenolase (µg mL ⁻¹)	difenolase (µg mL ⁻¹)
Metanol	784,87	1176,66
Kloroform	~*	~*
<i>n</i> -heksana	~*	~*
Asam Kojat	46,64	204,08

Keterangan : IC₅₀ : konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas enzim tirosinase sebesar 50%; ~* : tidak mencapai inhibisi 50% sampai konsentrasi maksimum 2000 µg mL⁻¹.

Menurut Kim *et al.*, (2004) bahwa nilai IC₅₀ penting diketahui seberapa besar potensi inhibitor dalam menghambat reaksi enzimatis. Ekstrak kasar berbagai pelarut kulit buah *X. granatum* diuji aktivitas inhibitor tirosinase menggunakan instrumen microplate reader (ELISA). Hasil akhir pengujian ini berupa IC₅₀ yaitu

konsentrasi yang dapat menghambat 50% enzim tirosinase (untuk uji inhibitor tirosinase). Berdasarkan hasil penelitian bahwa pelarut terbaik yaitu metanol. Dengan ditemukan pelarut yang cocok untuk mengekstraksi senyawa bioaktif maka akan memberikan nilai IC_{50} lebih kecil yang berarti aktivitas inhibisi lebih tinggi. Pada Tabel 2 menunjukkan bahwa ekstrak metanol kulit buah *X. granatum* memiliki potensi cukup baik dalam menghambat enzim tirosinase dengan nilai IC_{50} 784,87 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (monofenolase) dan 1176,66 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (difenolase). Nilai IC_{50} asam kojat sebagai positif kontrol adalah 46,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (monofenolase) dan 204,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (difenolase). Zamani *et al.*, (In Press) melaporkan bahwa ekstrak metanol biji buah *X. granatum* berpotensi sebagai inhibitor tirosinase dan antioksidan dengan IC_{50} (monofenolase) 323,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dan IC_{50} (difenolase) sebesar 1926,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Aktivitas antioksidan diuji dengan metode DPPH menunjukkan nilai IC_{50} 10,61 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pada konsentrasi 100 ppm. Dari kedua ekstrak metanol memperlihatkan daya inhibisi tirosinase yang berbeda-beda. Perbedaan daya inhibisi ini diduga karena adanya perbedaan jenis senyawa bioaktif yang terkandung atau jumlah senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai inhibitor tirosinase yang dapat terekstrak oleh pelarut metanol. Hasil uji antioksidan pada ekstrak etanol kulit buah dengan metode DPPH memperoleh nilai IC_{50} sebesar 19,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Namun, pada uji antioksidan tersebut tidak ditindaklanjuti disebabkan oleh keterbatasan sampel yang diperoleh sehingga hanya dijadikan sebagai data pendukung. Walaupun demikian, kulit buah *X. granatum* juga memiliki potensi sebagai inhibitor tirosinase dan agen antioksidan sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku kosmetik.

Ekstrak *n*-heksana dan kloroform kulit buah *X. granatum* tidak memiliki potensi dalam menghambat kerja enzim tirosinase karena ekstrak tersebut memiliki sifat sebagai aktivator kerja enzim tirosinase. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa alkaloid, steroid dan triterpenoid yang ada pada kulit buah *X. granatum* tidak aktif sebagai inhibitor tirosinase. Jadi, komponen senyawa yang berpotensi untuk menghambat kerja enzim tirosinase adalah senyawa yang larut dalam pelarut polar. Hal ini sesuai dengan hasil uji aktivitas inhibitor tirosinase yang telah dilakukan oleh Supriyanti (2009) bahwa komponen yang larut dalam pelarut metanol (polar) atau yang diekstraksi dengan pelarut polar memiliki kemampuan yang cukup bagus dalam menghambat enzim tirosinase. Menurut Uddin *et al.*, (2004) bahwa metanol merupakan suatu pelarut polar kuat yang dipertimbangkan pada kebanyakan ekstrak metabolit sekunder tumbuhan. Hasil penelitian ini menduga bahwa senyawa yang aktif untuk menghambat aktivitas tirosinase adalah golongan flavonoid, tanin dan saponin.

Hubungan korelasi antara kandungan total fenol dan aktivitas inhibisi tirosinase

Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa kandungan total fenol memiliki hubungan yang sangat kuat terhadap aktivitas inhibisi tirosinase (monofenolase dan difenolase). Hubungan antara kandungan fenolik total (x) dengan IC_{50} ekstrak kulit buah *X. granatum* mempunyai koefisien korelasi $R^2 = 0,97$ ($y = -277,83x + 6668,8$) pada aktivitas monofenolase dan nilai koefisien korelasi $R^2 = 0,96$ ($y = -53,42x + 2319,2$) (Gambar 2). Hasil ini menunjukkan bahwa 97% pada aktivitas monofenolase dan 96% pada aktivitas difenolase merupakan hasil kontribusi kelompok senyawa fenolik seperti flavonoid, tanin dan saponin. Sisanya sebesar 3 atau 4% ditentukan oleh variabel lain yang tidak diketahui. Kemungkinan besar 3% atau 4% tersebut merupakan sumbangan dari senyawa lain yang bukan termasuk dalam golongan senyawa fenolik namun memiliki aktivitas inhibisi tirosinase.



Gambar 2. Hubungan antara kandungan total fenol dengan nilai IC_{50} monofenolase ($y = -277,83x + 6668,8$ dengan $R^2 = 0,97$) dan IC_{50} difenolase ($y = -53,42x + 2319,2$ dengan $R^2 = 0,96$)

Kandungan total fenol diduga akan memberikan efek inhibisi enzim tirosinase yang cukup besar, hal ini berdasarkan penelitian Zamani *et al.*, (In Press) bahwa biji *X. granatum* mengandung flavonoid, tanin dan saponin yang mencegah resiko hiperpigmentasi kulit akibat terpapar radiasi ultraviolet dari sinar matahari. dan menyatakan bahwa senyawa fenolik dengan gugus fungsi hidroksil (-OH) (Park *et al.*, 2013) dan asam karboksilat (COOH) (Ha *et al.*, 2012) yang secara struktural memiliki kemiripan dengan substrat tirosinase yaitu L-tirosin atau L-DOPA. Senyawa tersebut memiliki satu atau lebih gugus fungsi asam yang mengindikasikan bahwa gugus fungsi tersebut memainkan peranan penting di dalam pengikatan sisi aktif enzim tirosinase.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi nilai kandungan total fenolik maka semakin rendah nilai IC₅₀ yang diperlukan untuk menghambat kerja enzim tirosinase. Oleh karena itu, ekstrak metanol kulit buah *X. granatum* memiliki potensi sebagai inhibitor tirosinase. Senyawa aktif yang memiliki peranan penting dalam aktivitas inhibisi enzim tirosinase adalah flavonoid, tanin dan saponin.

Ucapan Terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bakrie Center Foundation yang memberikan beasiswa program pascasarjana dan Pusat Studi Biofarmaka LPPM-IPB yang memfasilitasi dan membimbing penulis dalam melakukan penelitian eksperimental serta Herbarium Bogoriense Pusat Penelitian Biologi-LIPI yang sudah mengidentifikasi spesimen *X. granatum*. Tak lupa pula ucapan terima kasih kepada Bapak Drs. Edy Djauhari Purwakusumah, M.Si selaku Ketua Tim Ekspedisi yang mendukung penulis dalam pengambilan sampel di Kepulauan Togean Provinsi Sulawesi Tengah. Penelitian ini dibiayai oleh Bakrie Center Foundation dan Dana DIPA dari Direktorat Pendidikan Tinggi Departemen pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia (Penelitian unggulan sesuai mandat pusat No: 2013.089.521219).

Daftar Pustaka

- Andarwulan, S., Fardiaz, P. Apriyanto, Haryadi, N.K. Shetty. 1999. Mobilization of primary metabolites and phenolics during natural fermentation in seeds of *Pangium edule* Reinw. *Process Biochemistry*, 35: 197-204.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of Chemist. Association of Official, Agricultural Chemists, Washington DC
- Batubara, I., L.K. Darusman, T. Mitsunaga, M. Rahminiwati, E. Djauhari. 2010. Potency of Indonesia medicinal plants as tyrosinase inhibitors and antioxidant agent. *Journal of Biological Sciences*, 10(2): 138-144.
- Badreshia-Bansal, S., Z. Draelos. 2007. Insight into skin lightening cosmeceuticals for women of color. *Journal of Drugs in Dermatology*, 6: 32-39.
- Beissert, S. 2002. Use of mutant mice in photoimmunological and photocarcinogenetic investigation. *Methods*, 28: 130-137.
- Briganti, S., E. Camera, M. Picardo. 2003. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cellular Research*, 16: 101-110.
- Chang, T.S. 2009. An Updated Review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 2440-2475.
- Curto, E.V., C. Kwong, H. Hermersdosfer, H. Glatt, C. Santis, V. Virador, V.J. Hearing, T.P. Dooley. 1999. Inhibitor of mammalian melanocyte tyrosinase : In vitro comparison of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitor. *Biochemical Pharmacology*, 57: 663-672.
- Costin, G.E., V.J. Hearing. 2007. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB Journal*, 21: 976-994.
- Chusiri, Y., R. Wongpoomchai, A. Kakehashi, M. Wei, H. Wanibuchi, U. Vinitketkumnuan, S. Fukushima. 2011. Non-genotoxic mode of action and possible threshold for hepatocarcinogenicity of Kojic acid in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 471-476.
- Darusman, L.K., D. Sajuthi, K. Sutriah, D. Pamungkas. 1995. Ekstraksi komponen bioaktif sebagai bahan obat dari karang-karangan, bunga karang dan ganggang laut di perairan Pulau Pari Kepulauan Seribu. *Buletin kimia, Institut Pertanian Bogor*. Bogor.
- Ebanks, J.P., R.R. Wickett, R.E. Boissy. 2009. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 4066-4087.
- Maeda, F., K. Fukuda. 1991. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *Journal of the Society of Cosmetic Chemist*, 42: 361-368.

- Gilchrest, B.A., H.Y. Park, M.S. Eller, M. Yaar. 1996. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochemistry and Photobiology*, 63(1): 1-10.
- Grimes, P. 1995. Melasma: Etiologic and therapeutic considerations. *Archive of Dermatology*, 131 : 1453- 1457.
- Ha, Y.M., Y.J. Park, J.A. Kim, D. Park, J.Y. Park, H.J. Lee, J.Y. Lee, H.R. Moon, H.Y. Chung. 2012. Design and synthesis of 5-(substituted benzylidene) thiazolidine-2,4-dione derivatives as novel tyrosinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 49: 245-252.
- Harborne, J.B. 1984. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. 2nd Edition. Chapman and Hall Ltd. New York.
- Khan, K.M., G.M. Maharvi, M.T.H. Khan, A.J. Shaikh, S. Perveen, S. Begum, M. Iqbal, Choudhary. 2006. Tetraketones : A new class of tyrosinase inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14, 344-351.
- Kim, Y.J., K.J. Kyung, J.H. Lee, H.Y. Chung. 2004. 4-4'-Dihydroxybiphenyl as a New Potent Tyrosinase Inhibitor. *Journal of Biology Pharmacology Bulletin*, 28 (2): 323-327.
- Korioti, A., A. Protopappa, N. Megolaus, H. Skaltsa. 2007. Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 2708-2714.
- Ley, J.P., H.J. Bertram. 2001. Hydroxy- or Methoxy-Substituted Benzaldoximes and Benzaldehyde-O-alkyloximes as Tyrosinase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9: 1879-1885.
- Lin, J.W., H.M. Chiang, Y.C. Lin, K.C. Wen. 2008. Natural products with skin-whitening effects. *Journal Food and Drugs Analysis*, (16)2: 1-10.
- Maeda, K., M. Fukuda. 1991. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *Journal of Society Cosmetic Chemist*, 42: 361-368.
- Nerya, O., J. Vaya, R. Musa, S. Izrael, R. Ben-Arie, S. Tamir. 2003. Glabrene and isoquiritigenin as tyrosinase inhibitor from liquorice roots. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 15: 1201 – 1207.
- Nerya, O., R. Musa, S. Khatib, S. Tamir, J. Vaya. 2004. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*, 65: 1389-1395.
- Park, J.W., Y.M. Ha, K.M. Moon, S.R. Kim, H.O. Jeong, Y.J. Park, H.J. Lee, J.Y. Park, Y.M. Song, P.Chun, Y.J. Byun, H.R. Moon, H.Y. Chung. 2013. De novo tyrosinase inhibitor: 4-(6,7-Dihydro-5H-indeno[5,6-d]thiazol-2-yl)benzene-1,3-diol (MHY1556). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23: 4172-4176.
- Park, K.H., Y.D. Park, J.M. Han, K.R. Im, B.W. Lee, I.Y. Jeong, T.S. Jeong, W.S. Le. 2006. Anti-atheroclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16: 5580-5583.
- Picardo, M., M. Carrera. 2007. New and experimental treatments of cloasma and other hypermelanoses. *Dermatology Clinic*, 25: 353-362.
- Riani, E., N.P. Zamani, Sulistiani. 2013. Potensi Sumberdaya Mangrove Sebagai Sumber Bahan Baku Biofarmaka Baru Untuk Penyakit Non Infeksius Manusia (Laporan Penelitian Mandat Pusat). Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional.
- Satooka, Kubo. 2012. Resveratrol as akcattype inhibitor for tyrosinase: Potentiated melanogenesis inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20: 1090-1099.
- Seo, S.Y., V.K. Sharma, N. Sharma. 2003. Mushroom tyrosinase : recent prospects. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 51(10): 2837-2853
- Serra-Baldrich, E., M.J. Tribo, J.G. Camarasa. 1998. Allergic contact dermatitis from kojic acid. *Contact Dermatitis*, 39: 86.
- Shiino, M., Y. Watanabe, K. Umezawa. 2003. Synthesis and tyrosinase inhibitory activity of novel N-hydroxybenzyl-N-nitrosohydroxylamines. *Bioorganic Chemistry*, 31 : 129-135.
- Solano, F., S. Briganti, M. Picardo, G. Ghanem. 2006. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cellular Research*, 19 : 550-571.
- Supriyanti, F.M.T. 2009. Pemanfaatan senyawa bioaktif dari ekstrak kulit batang *Artocarpus* sp sebagai inhibitor tirosinase pada pigmentasi kulit. *Jurnal Pengajaran MIPA* 13: 105-115.
- Uddin, S.J., J.A. Shilpi, A. Delazar, L. Nahar, S.D. Sarker. 2004. Free radical scavenging activity of some Bangladeshi plant extracts. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 4 (3): 187-195.
- Um, S. J., M.S. Park, S.H. Park, H.S. Han, Y.J. Kwon, H.S. Sin. 2003. Synthesis of new glycyrrhetic acid (GA) derivatives and their effects on tyrosinase activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11: 5345-5352.
- Vachtenheim, J., J. Borovansky. 2009. Transcription physiology of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Experimental Dermatology*, 19: 617-627.

Zamani, N.P., M. Gazali, I. Batubara. (In press). Potency of tyrosinase inhibitor and antioxidant agent from *Xylocarpus granatum* fruit seed. International of Biological Science.