

UJI PENGHAMBATAN TIROSINASE DAN STABILITAS FISIK SEDIAAN KRIM PEMUTIH YANG MENGANDUNG EKSTRAK KULIT BATANG NANGKA (*Artocarpus heterophyllus*)

Ninin Kartika Juwita, Joshita Djajadisastra, Azizahwati
Universitas Indonesia FMIPA, Departemen Farmasi

ABSTRACT

*The cortex of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) contains some flavonoids which have activity as tyrosinase inhibitors. This compound can inhibit the oxidation of l-tyrosine and levodopa in the mechanism of melanogenesis. The extract of jackfruit cortex formulated into creams differentiated by the extract concentration of 1,5% and 2,0%. Physical stability test was conducted with storing the creams at three different temperatures, $7 \pm 2^\circ$, $27 \pm 2^\circ$, and $40 \pm 2^\circ\text{C}$ respectively. Centrifugal tests and cycling test was also performed on both cream. Tyrosinase inhibitory activity measurement was done by in vitro studies with measuring dopachrome. The result showed that both of formulations which stored at $40 \pm 2^\circ\text{C}$ and centrifugated at 3800 rpm for 5 hours were not stable. The result of tyrosinase inhibition activity measurement of creams containing extract of 1,5% and 2,0 % were 10,64% and 11,34%, respectively. Tyrosinase inhibition activity of creams decreased after two month stored. Tyrosinase inhibition activity of cream containing 1,5% extract decreased into 6,93%, and cream containing 2,0% extract decreased into 7,74%. The decreasing of tyrosinase inhibition activity is caused by the small amount of antioxidant is not enough to prevent oxidation of active ingredient.*

Keywords : tyrosinase inhibition activity, extract of jackfruit cortex(*Artocarpus heterophyllus*), cream, physical stability.

ABSTRAK

*Kulit batang nangka (*Artocarpus heterophyllus*) mengandung senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai penghambat tirosinase. Senyawa ini dapat menghambat reaksi oksidasi l-tirosin dan levodopa dalam mekanisme pembentukan melanin. Ekstrak kulit batang nangka diformulasi menjadi krim yang dibedakan kandungannya yaitu 1,5% dan 2,0%. Uji kestabilan fisik dilakukan dengan penyimpanan sediaan pada tiga suhu yang berbeda yaitu suhu $7 \pm 2^\circ\text{C}$; $27 \pm 2^\circ\text{C}$; $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Centrifugal test dan cycling test juga dilakukan terhadap kedua krim yang dibuat. Pengukuran aktivitas penghambatan tirosinase dilakukan dengan pengukuran dopakrom yang terbentuk secara in vitro. Hasil penelitian menunjukkan kedua krim yang mengandung ekstrak kulit batang nangka menunjukkan pemisahan fase pada penyimpanan di suhu $40 \pm 2^\circ\text{C}$ serta tidak tahan sentrifugasi*

pada 3800 rpm selama 5 jam. Hasil pengukuran aktivitas penghambatan tirosinase dari krim yang mengandung ekstrak kulit batang nangka 1,5% dan 2,0% berturut-turut yaitu 10,64 % dan 11,34 %. Aktivitas penghambatan tirosinase kedua krim menunjukkan penurunan setelah penyimpanan selama dua bulan. Krim dengan ekstrak kulit batang nangka 1,5% menurun aktivitasnya menjadi 6,93 %, sedangkan krim yang mengandung ekstrak kulit batang nangka 2,0% menurun aktivitasnya menjadi 7,74%. Penurunan aktivitas penghambatan tirosinase disebabkan kurangnya penggunaan antioksidan dalam krim untuk mencegah senyawa aktif teroksidasi.

Kata kunci : aktivitas penghambatan tirosinase, ekstrak kulit batang nangka (*Artocarpus heterophyllus*), krim, stabilitas fisik.

PENDAHULUAN

Hiperpigmentasi adalah gangguan pigmen wajah karena produksi melanin secara berlebihan atau distribusi melanin yang tidak merata. Pada kondisi ini, kulit dapat terlihat lebih gelap dan timbul noda hitam pada bagian-bagian tertentu dari wajah. Beberapa bahan pemutih seperti merkuri dan hidrokuinon telah banyak digunakan sebagai zat aktif dalam produk kosmetik. Sejak tahun 2008, BPOM melarang penggunaan sejumlah bahan pemutih dalam produk kosmetika, termasuk hidrokuinon dan merkuri karena bahan-bahan tersebut merupakan racun bagi melanosit.

Pada kulit terdapat enzim yang berperan dalam pembentukan melanin, yaitu tirosinase. Menurut Chang, Ding, dan Lin (2005), enzim ini mengkatalisis dua reaksi utama dalam biosintesis melanin, yaitu hidrosilasi L-tirosin menjadi L-dopa dan oksidasi L-dopa menjadi dopakuinon. Senyawa dopakuinon mempunyai kereaktifan yang sangat tinggi sehingga dapat mengalami polimerisasi secara spontan membentuk dopakrom yang kemudian menjadi melanin. Salah satu cara menghambat pembentukan melanin adalah dengan menghambat aktivitas tirosinase. Saat ini telah dikembangkan senyawa aktif

dalam tanaman yang dapat menghambat aktivitas tirosinase yang digunakan dalam sediaan skin whitening, seperti ekstrak licorice, mulberi, teh hijau, dan lain-lain (Djajadisastra, 2003). Biasanya ekstrak tanaman tersebut dalam sediaan skin whitening digunakan pada konsentrasi 1-10% (Gupta, 2001). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Arung, Kusuma, Iskandar, Yasutake, Shimizu, dan Kondo (2005), beberapa suku tanaman Indonesia memiliki potensi sebagai penghambat tirosinase, diantaranya suku Moraceae dengan marga *Artocarpus*, yaitu *A. heterophyllus* (nangka), *A. altilis* (sukun) dan *A. communis* (kluwih). *Artocarpus heterophyllus* memiliki aktivitas sebagai penghambat tirosinase yang paling besar diantara jenis *Artocarpus* lainnya dengan mengambil bagian kulit batangnya (Supriyanti, 2009). Senyawa bioaktif yang didapat dari ekstrak kulit batang nangka berupa senyawa polifenol yang berperan sebagai agen depigmentasi (Chang, 2009).

Ekstrak kulit batang nangka akan dibuat menjadi suatu sediaan kosmetik yang digunakan sebagai pemutih. Bentuk sediaan kosmetika pemutih yang sering digunakan adalah sediaan krim, terutama untuk kulit wajah. Bentuk sediaan krim ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan

bentuk sediaan lainnya yaitu penyebarannya yang merata dan mudah untuk dibersihkan, khususnya krim emulsi minyak dalam air (Ansel, 1989). Pertimbangan yang terpenting bagi sediaan krim dalam bidang farmasi dan kosmetik adalah stabilitas dari produk jadi (Martin, Swarbrick, dan Cammarata, 1993). Sediaan kosmetik yang stabil masih berada dalam batas yang dapat diterima selama periode penyimpanan dan penggunaan, yaitu sifat dan karakteristiknya sama dengan saat dibuat (Djajadisastra, 2003). Ekstrak kulit batang nangka diperkirakan dapat mempengaruhi kestabilan fisik krim sehingga perlu dilakukan uji kestabilan fisik krim.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji penghambatan tirosinase ekstrak kulit batang nangka dalam krim yang mengandung ekstrak kulit batang nangka 1,5 % dan 2,0 %, serta menguji stabilitas fisik krim yang mengandung ekstrak kulit batang nangka tersebut.

METODE

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis - 1601 (Shimadzu, Jepang), pH meter tipe 510 (Eutech Instrument, Singapura), mikroskop optik (Nikon model Eclipse E 200, Jepang), kameradigital (Canon Power Shot A470, Jepang), homogenizer (Omni-Multimix Inc., Malaysia), penetrometer (Herzoo, Jerman), sentrifugator (Kubota 5100, Jepang), oven (Mommert, Jerman), penangas air (Mommert, Hongkong), timbangan analitik tipe 210-LC (Adam, Amerika Serikat), mikropipet Eppendorf (Socorex, Switzerland) dan alat-alat gelas.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tirosinase dari jamur merang (Sigma, Amerika Serikat), ekstrak kulit batang nangka (Balitro, Indonesia), levodopa (Sigma, Amerika Serikat), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Indonesia), natrium hidroksida (Mallinckrodt, Swedia), etanol (Merck, Indonesia), asam askorbat (Brataco, Indonesia), asam stearat (Brataco, Indonesia), setil alkohol (Brataco, Indonesia), isopropil miristat (Cognis, Indonesia), trietanolamin (Brataco, Indonesia), gliseril monostearat (Cognis, Indonesia), metil paraben (Brataco, Indonesia), propil paraben (Brataco, Indonesia), butil hidroksi toluene (Brataco, Indonesia), dan propilen glikol (Brataco, Indonesia).

Cara Kerja

Formula dan Pembuatan Krim

Tabel 1. Formula krim

Bahan	Formula	
	A (%)	Formula B (%)
Ekstrak kulit batang nangka (A.heterophyllus)	1,5	2,0
Asam stearat	5,0	5,0
Setil alkohol	3,0	3,0
Isopropil miristat	3,0	3,0
Trietanolamin	0,2	0,2
Gliseril monostearat	2,0	2,0
Propilen glikol	15,0	15,0
Metil paraben	0,2	0,2
Propil paraben	0,1	0,1
BHT	0,1	0,1
Aquadest	ad 100	ad 100

Ekstrak jadi kulit batang nangka diperoleh dari proses maserasi dengan etanol 96%, kemudian diuapkan dengan vakum hingga didapatkan massa yang kental. Bahan – bahan yang larut dalam air (tri- etanol amin, metil paraben) dipanaskan pada suhu 70oC. Bahan-bahan yang larut dalam minyak (asam stearat, setil alkohol, isopropil miristat, propil paraben, butyl hidroksi toluen, dan gliseril monostearat) juga dipanaskan pada suhu 70oC, kemudian kedua fase tersebut diaduk dengan homogenizer pada kecepatan 2500rpm. Larutan ekstrak ditambahkan ke dalam campuran lalu diaduk kembali dengan homogenizer selama 10 menit hingga terbentuk krim. Krim yang dihasilkan kemudian disimpan dalam wadah tidak tembus cahaya.

Evaluasi Fisik Sediaan Krim

Evaluasi dari masing-masing sediaan dilakukan untuk pengamatan organoleptis, homogenitas, pengukuran pH, sifat aliran, konsistensi dan diameter globul.

Pengamatan Organoleptis

Pengamatan organoleptis dilakukan dengan memeriksa warna, bau dan ada atau tidaknya pemisahan fase pada krim yang dibuat.

Pengamatan homogenitas

Pengamatan homogenitas dilakukan dengan mengamati sebaran partikel krim yang dijepit dengan dua kaca objek. Dari sebaran tersebut dapat dilihat apakah krim yang dibuat homogen atau tidak.

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter yang terlebih da-

hulu dikalibrasi dengan larutan dapar standar pH 4 dan 7. Pengukuran ini untuk mengetahui cocok tidaknya krim jika diberikan pada kulit, krim yang terlalu asam atau terlalu basa akan menimbulkan iritasi pada kulit.

Penentuan sifat alir

Sifat alir ditentukan dengan mengukur viskositas dengan viskometer Brookfield dimana nomor spindel yang sesuai dipasang pada alat kemudian dicelupkan dalam beaker glass yang berisi krim. Kecepatan alat dipasang beragam yaitu 0,5; 1; 2; 2,5; 5; 10; 20 rpm dan kemudian dibalik menjadi 10; 5; 2,5; 2; 1 dan 0,5 rpm. Pembacaan skala dilakukan dengan mengamati jarum merah di posisi stabil pada setiap kecepatan. Sifat alir dapat diperoleh dengan membuat kurva shearing stress terhadap rate of shear. Pemeriksaan sifat alir dilakukan pada minggu ke-0 dan minggu ke-8 untuk sampel pada penyimpanan suhu kamar.

Penentuan konsistensi

Sediaan yang akan diperiksa dimasukkan ke dalam wadah khusus dan diletakkan pada meja penetrometer. Peralatan diatur hingga ujung kerucut menyentuh bayang permukaan krim yang dapat diperjelas dengan menghidupkan lampu. Batang pendorong dilepas dengan mendorong tombol start. Angka penetrasi dibaca lima detik setelah kerucut menembus sediaan. Dari pengukuran konsistensi dengan penetrometer akan diperoleh yield value. Pemeriksaan konsistensi dilakukan pada minggu ke-0 dan minggu ke-8 dengan penyimpanan pada suhu kamar.

Pengukuran diameter globul rata-rata

Pengukuran ini dilakukan dengan memfoto gambar krim menggunakan mikroskop optik pada perbesaran 40 kali sehingga dapat dihitung ukuran globul emulsi dan distribusi ukurannya.

Uji Stabilitas

Uji stabilitas pada suhu 7 ± 2 oC, 27 ± 2 oC dan suhu 40 ± 2 oC

Setiap formula krim disimpan pada suhu 7 ± 2 oC, 27 ± 2 oC, dan suhu 40 ± 2 oC dan diukur parameter kestabilannya yaitu bau, warna, pH, dan diameter globul dievaluasi selama 8 minggu dengan pengamatan setiap 2 minggu.

Cycling test

Sampel disimpan pada suhu 7 ± 2 oC selama 24 jam lalu dipindahkan ke dalam oven bersuhu 40 ± 2 oC selama 24 jam, waktu selama penyimpanan dua suhu tersebut dianggap satu siklus. Uji stabilitas dilakukan sebanyak 6 siklus, kemudian diamati ada tidaknya pemisahan fase, invers fase dan pembentukan kristal.

Centrifugal test / uji mekanik

Sampel krim dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dimasukkan ke dalam sentrifugator pada kecepatan 3800 rpm selama 5 jam. Krim yang sudah disentrifugasi lalu diamati adanya pemisahan antara fase minyak dengan fase air.

Uji konsistensi dan uji sifat laju alir

Uji konsistensi dan uji sifat laju alir dilakukan setelah krim disimpan selama 8 minggu pada suhu kamar.

Uji Penghambatan Tirosinase secara In Vitro (Arung, Shimizu, dan Kon-do,2006)

Pembuatan larutan L-DOPA 2,5 mM

L-DOPA ditimbang seksama sebanyak 12,4 mg, kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat (pH = 6,8) dalam labu ukur sampai 25,0 mL. Pada saat preparasi hingga uji penghambatan tirosinase dilakukan, larutan ini dihindarkan dari cahaya.

Pembuatan dapar fosfat 50 mM dengan pH 6,8

Untuk menyiapkan 200 mL dapar fosfat 50 mM, kalium dihidrogen fosfat ditimbang seksama sebanyak 1,36 gram, kemudian dilarutkan dengan aquadest 100 mL. Larutan tersebut ditambahkan larutan NaOH 0,2 N sebanyak 11 mL dan ditambahkan aquadest hingga hampir mencapai 200 mL. pH larutan diukur dan ditetaskan NaOH hingga pH mencapai 6,8.

Pembuatan larutan tirosinase

Tirosinase ditimbang seksama sebanyak 1,16 mg kemudian dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,8 dalam labu ukur sampai 10,0 mL. Tirosinase yang terlarut memiliki aktivitas 496 unit/mL. Setelah preparasi hingga uji penghambatan tirosinase, larutan ini disimpan dalam suhu rendah ($2-8$ oC).

Pengukuran panjang gelombang maksimum

Untuk menentukan panjang gelombang maksimum, 2,4 mL larutan dapar fosfat 50 mM (pH 6,8) dan 666 μ L larutan L-DOPA (2,5 mM) dipipet ke dalam tabung reaksi. Inkubasi pada suhu kamar selama

10 menit. Kemudian ditambahkan 184 µL larutan tirosinase (496 unit/mL) ke dalam tabung reaksi tersebut. Inkubasi kembali pada suhu kamar selama 25 menit agar reaksi berjalan. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 200 – 800 nm.

Penentuan tipe penghambatan tirosinase oleh ekstrak kulit batang nangka

Bahan	Tabung (µl)			
	1	2	3	4
Larutan dapar fosfat	2700	2500	2400	2300
L-DOPA	366 (0,1mM)	566 (0,5mM)	666 (0,7mM)	766 (1mM)
Tirosinase	184	184	184	184

Larutan dapar fosfat dan L-DOPA dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan larutan tirosinase ke dalam tabung reaksi, inkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis

Tipe penghambatan tirosinase oleh ekstrak kulit batang nangka ditentukan dengan membandingkan kurva Lineweaver-Burk L-DOPA dengan dan tanpa inhibitor.

a. Tanpa penghambat

Disiapkan larutan L – DOPA, larutan dapar fosfat 50 mM (pH 6,8), larutan tirosinase (496 unit/mL), dan 4 tabung reaksi. Masing – masing tabung reaksi terdiri dari:

Bahan	Tabung (µl)			
	1	2	3	4
Larutan dapar fosfat	2700	2500	2400	2300
L-DOPA	366 (0,1mM)	566 (0,5mM)	666 (0,7mM)	766 (1mM)
Tirosinase	184	184	184	184

pada panjang gelombang 478,5 nm.

b. Dengan penghambat

Disiapkan larutan L-DOPA, larutan dapar fosfat 50 mM (pH 6,8), larutan tirosinase (496 unit/mL), larutan ekstrak 1000 ppm, dan 4 tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi terdiri dari :

Bahan	Tabung (µl)			
	1	2	3	4
Larutan dapar fosfat	2500	2300	2200	2100
L-DOPA	366 (0,1mM)	566 (0,5mM)	666 (0,7mM)	766 (1mM)
Ekstrak penghambat	200	200	200	200
Tirosinase	184	184	184	184

Larutan dapar fosfat, L-DOPA, dan ekstrak penghambat dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan laru-

tan tirosinase ke dalam tabung reaksi, inkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Uji penghambatan tirosinase (IC50) dari ekstrak kulit batang nangka

Ekstrak ditimbang secara seksama, kemudian dilarutkan dalam propilen glikol (1:10) kemudian dibuat konsentrasi 15

ppm, 30 ppm, 45 ppm, dan 60 ppm dengan aquadest. Disiapkan larutan L-DOPA (0,7 mM), larutan dapar fosfat 50 mM (pH 6,8), larutan tirosinase (496 unit/mL), dan tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi terdiri dari :

Bahan	Tabung (µl)			
	A	B	C	D
Larutan dapar fosfat	2400	2584	2200	2384
L-DOPA (0,7 mM)	666	666	666	666
Ekstrak penghambat	-	-	200	200
Tirosinase	184	-	184	-

Tabung A, larutan dapar fosfat dan L-DOPA dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan larutan tirosinase ke dalam tabung reaksi, inkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Tabung B, larutan dapar fosfat dan L-DOPA dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian inkubasi pada suhu kamar selama 35 menit. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Tabung C, larutan dapar fosfat, L-DOPA, dan ekstrak penghambat dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan larutan tirosinase ke dalam tabung reaksi, inkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Tabung D, larutan dapar fosfat, L-DOPA, dan ekstrak penghambat dipipet ke dalam

tabung reaksi, kemudian inkubasi pada suhu kamar selama 35 menit.

Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm. Dihitung persen penghambatannya dan dibuat kurva % inhibisi vs konsentrasi ekstrak. Persamaan linear dicari dan dihitung IC50 nya.

Uji penghambatan tirosinase dari sediaan krim ekstrak kulit batang nangka

Sampel krim diambil sebanyak 0,3 g kemudian diekstraksi dengan penambahan 10 mL etanol. Sampel krim disentrifugasi untuk memisahkan filtrat dengan basis krim. Larutan filtrat ditampung untuk diuji aktivitasnya sebagai inhibitor tirosinase. Disiapkan 4 buah tabung reaksi, larutan dapar fosfat 50 mM (pH 6,8), larutan L-Dopa 0,7 mM, dan larutan tirosinase (496 unit/mL). Masing-masing tabung reaksi diisi dengan bahan tersebut dengan jumlah seperti berikut :

Bahan	Tabung (μ l)			
	A	B	C	D
Larutan dapar fosfat	2200	2384	2200	2384
L-DOPA (0,7 mM)	666	666	666	666
Ekstrak penghambat				
200 (blank negatif)				
200 (blank negatif)	200	200		
Tirosinase	184	-	184	-

~~Tabung A, larutan dapar fosfat, larutan L-Dopa, dan ekstrak krim (blank negatif) dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian ditambahkan larutan tirosinase, diinkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV- Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.~~

Tabung B, larutan dapar fosfat, larutan L-Dopa, dan ekstrak krim (blank negatif) dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian inkubasi pada suhu kamar selama 35 menit. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV- Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

Tabung C, larutan dapar fosfat, larutan L-Dopa, dan ekstrak krim dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian ditambahkan larutan tirosinase, diinkubasi kembali selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV- Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.

~~Tabung D, larutan dapar fosfat, larutan L-Dopa, dan ekstrak krim dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian inkubasi pada suhu kamar selama 35 menit. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV- Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.~~

Nilai aktivitas penghambatan enzim tirosinase diperoleh dengan menghitung penghambatan dopakrom yang terbentuk menggunakan rumus persamaan (2.5). Untuk mengetahui pengaruh kestabilan fisik dengan aktivitas ekstrak, maka uji penghambatan tirosinase dari sediaan krim yang mengandung ekstrak kulit batang nangka dilakukan secara duplo pada minggu ke - 0 dan minggu ke - 8.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Evaluasi Krim

Hasil dari evaluasi semua krim pada awal penyimpanan (minggu ke-0) didapatkan krim yang lembut, mudah dioleskan, membentuk konsistensi setengah padat dan mudah menyebar di kulit.

Keterangan : A = krim ekstrak kulit batang angka 1,5 %

B = krim ekstrak kulit batang angka 2,0 %

Gambar 1. Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada minggu ke – 0

Warna krim yang dihasilkan sesuai dengan ekstrak yang ditambahkan yaitu formula A mengandung ekstrak kulit batang angka 1,5% berwarna krem muda dan formula B yang mengandung ekstrak kulit batang angka 2% berwarna krem agak tua. Berdasarkan hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa semua krim homogen semua partikel dalam kaca objek terdispersi secara merata. Kedua formula krim memiliki bau khas ekstrak yang harum dan tidak menimbulkan bau yang tengik.

pH yang terukur dari kedua formula yaitu formula A 6,48 dan formula B 6,35. Kedua krim menunjukkan pH ke arah asam, hal ini disebabkan oleh kandungan ekstrak kulit batang angka berupa senyawa-senyawa polifenol yang bersifat asam lemah. Konsistensi yang dimiliki kedua krim yaitu formula A 380×10^{-1} mm dan formula B 409×10^{-1} mm. Angka penetrasi tersebut memenuhi kriteria sediaan krim sehingga terasa mudah dioleskan dan disebarkan di kulit.

Sifat laju alir dari kedua krim yaitu pseudoplastis tiksotropik dimana krim memiliki konsistensi lebih rendah pada setiap gaya per satuan luas (rate of shear) sehingga menandakan adanya pemecahan struktur yang tidak terbentuk kembali dengan segera jika stress tersebut dihilangkan atau dikurangi. Hal ini merupakan sifat yang diperlukan pada krim dimana konsistensinya tinggi tetapi dapat dengan mudah dioleskan.

Hasil pengukuran diameter globul rata-rata yaitu formula A sebesar 0,176 μm dan formula B sebesar 0,180 μm . Hasil tersebut memenuhi persyaratan ukuran diameter globul karena berada dalam kisaran 0,1-10 μm (Martin, Swarbick, dan Cammarata, 1993).

Hasil Uji Stabilitas

Penyimpanan krim pada suhu $7 \pm 20\text{ C}$,

$27 \pm 20\text{ C}$ dan suhu $40 \pm 20\text{ C}$

Pada penyimpanan dalam suhu $7 \pm 20\text{ C}$ dan $27 \pm 20\text{ C}$ dari minggu awal (minggu ke-0) sampai minggu terakhir (minggu ke-8) tidak terlihat adanya pemisahan fase minyak dan fase air. Pemisahan fase terjadi pada krim yang disimpan pada suhu $40 \pm 20\text{ C}$ sejak minggu ke-6. Hal ini disebabkan formulasi krim tidak tahan terhadap suhu yang tinggi. Krim yang disimpan pada suhu $7 \pm 20\text{ C}$ mengalami perubahan warna menjadi lebih muda, sedangkan krim yang disimpan pada suhu $27 \pm 20\text{ C}$ mengalami perubahan warna menjadi agak gelap, dan pada penyimpanan suhu $40 \pm 20\text{ C}$ mengalami perubahan warna yang cukup signifikan menjadi lebih gelap dan tuakarena oksidasi senyawa polifenol pada suhu tinggi akan membentuk senyawa kuinon yang berwarna lebih pekat.

Keterangan : A = krim ekstrak kulit batang angka 1,5 %

B = krim ekstrak kulit batang angka 2,0 %

Gambar 2. Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada suhu $7 \pm 20\text{ C}$ selama penyimpanan 8 minggu

Keterangan : A = krim ekstrak kulit batang angka 1,5 %

B = krim ekstrak kulit batang angka 2,0 %

Gambar 3. Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada suhu 27 ± 2 o C selama penyimpanan 8 minggu

Keterangan : A = krim ekstrak kulit batang angka 1,5 %

B = krim ekstrak kulit batang angka 2,0 %

Gambar 4. Foto hasil pengamatan organoleptis krim pada suhu 40 ± 2 oC selama penyimpanan 8 minggu

Hasil pengukuran pH pada ketiga suhu menghasilkan krim dengan pH menga-
rah kepada pH asam. Hal ini disebab-
kan terjadinya reaksi oksidasi senyawa
polifenol menjadi senyawa kuinon yang
sifatnya asam. Berdasarkan reaksi yang
terjadi, saat pembentukan senyawa
kuinon terlepas ion H⁺ (proton) sehingga
menyebabkan pH menjadi turun (Yong
& Lee, 2003). Pada suhu 40±2o C, pada

kedua krim terjadi penurunan pH yang
sangat signifikan dibanding kondisi peny-
impanan suhu lainnya. Hal ini disebab-
kan faktor suhu yang mempercepat reaksi
oksidasi. Selain itu, pada suhu 40±2o C,
krim B mengalami penurunan pH yang
lebih besar dibandingkan dengan krim A.
Hal ini kemungkinan disebabkan jumlah
ekstrak yang lebih banyak pada krim B
yang mengalami reaksi oksidasi.

Keterangan : A = krim ekstrak kulit batang angka 1,5 %
B = krim ekstrak kulit batang angka 2,0 %

Gambar 5. Hasil pengukuran pH tiap sediaan pada penyimpanan 7±2o C, 27±2o C,
dan suhu 40±2o C

Krim merupakan suatu sistem yang mem-
punyai energi bebas permukaan pada
partikel terdispersinya. Partikel tersebut
berenergi tinggi dan cenderung untuk
mengelompokkan diri kembali sedem-
ikian rupa untuk mengurangi permu-
kaan total dan memperkecil energi bebas
permukaannya (Martin, Swarbick, Cam-
marata, 1993). Hal ini disebabkan karena
kecenderungan suatu benda untuk menuju
ke bentuk dan keadaan yang stabil. Pen-
gadukan pada saat pembuatan krim se-
benarnya merupakan suatu transfer en-
ergi kepada krim dan krim tersebut akan
mempunyai kecenderungan untuk men-

gelompokkan diri agar mencapai tingkat
energi terendah (ground state). Oleh ka-
rena itu ukuran globul pada krim selalu
bertambah setiap minggunya. Selain itu
pada suhu 40 ± 2o C tidak terjadi
peningkatan diameter globul tetapi terja-
di juga perubahan menjadi bentuk globul
yang tidak teratur dan tidak berbentuk
droplet lagi. Hal ini disebabkan faktor
suhu meningkatkan kecepatan globul un-
tuk bergabung menjadi globul yang lebih
besar, sehingga memicu terjadinya koa-
lesens. Pada minggu ke-6 sudah terjadi
pemisahan fase, lapisan atas adalah fase
minyak dan lapisan bawah adalah fase air.

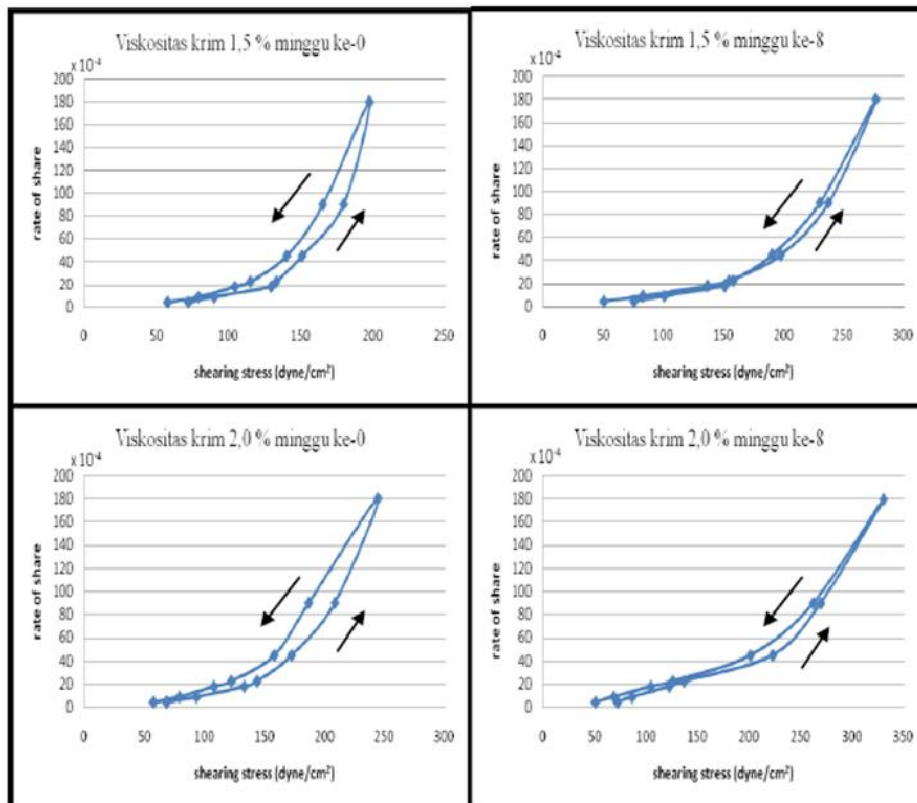
Keterangan : A = krim ekstrak kulit batang angka 1,5 %
B = krim ekstrak kulit batang angka 2,0 %

Gambar 6. Hasil pengukuran diameter globul tiap sediaan pada penyimpanan $7\pm 2^{\circ}\text{C}$, $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, dan suhu $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ tiap 2 minggu selama 8 minggu

Hasil pengukuran viskositas masing-masing krim pada minggu awal (minggu ke -0) dan setelah penyimpanan selama 8 minggu pada suhu kamar dapat dilihat pada Gambar 7. menunjukkan tidak terjadinya perubahan sifat aliran karena tetap bersifat pseudoplastis tiksotropik walaupun terjadi kenaikan viskositas, contohnya viskositas krim A 160000 cps menjadi 168000 cps setelah penyimpanan 8 minggu pada kecepatan 0,5 rpm. Hal ini dapat disebabkan adanya peristiwa tiksotropik saat krim tersebut baru dibuat pada minggu ke-0. Pada proses pembuatan, krim tersebut mengalami pengadukan sehingga saat baru terbentuk krim tersebut memiliki viskositas yang lebih rendah dibandingkan dengan viskositas krim yang telah didiamkan selama 8 minggu, dimana krim tersebut menjadi lebih kental karena krim telah kembali pada struktur yang seharusnya.

Pemeriksaan konsistensi kedua formula krim dilakukan dengan menggunakan penetrometer. Pemeriksaan konsistensi

dilakukan pada minggu ke-0 dan minggu ke-8 pada penyimpanan suhu kamar. Hasil penetrasi pada minggu ke-0 yaitu formula A 380×10^{-1} mm dan formula B 409×10^{-1} mm, sedangkan hasil penetrasi setelah penyimpanan 8 minggu yaitu formula A 378×10^{-1} mm dan formula B 405×10^{-1} mm. Pemeriksaan ini bertujuan untuk memeriksa konsistensi sediaan sehingga dapat diketahui apakah sediaan yang dihasilkan termasuk semipadat yang mudah diaplikasikan kepada kulit atau tidak. Dari hasil pemeriksaan konsistensi kedua krim menunjukkan bahwa masing-masing sediaan mengalami penurunan angka kedalaman penetrasi kerucut yang menunjukkan adanya peningkatan konsistensi pada minggu ke-8 jika dibandingkan dengan minggu ke-0. Hal ini berhubungan dengan peristiwa tiksotropik yang tampak pada peningkatan viskositas pada minggu ke-8. Dengan bertambahnya viskositas, konsistensi krim juga meningkat sehingga angka kedalaman penetrasi kerucut dari penetrometer berkurang.



Keterangan : Krim A = krim 1,5 % Krim
B = krim 2,0 %

Gambar 7. Kurva viskositas krim A dan krim B pada minggu ke-0 dan ke-8

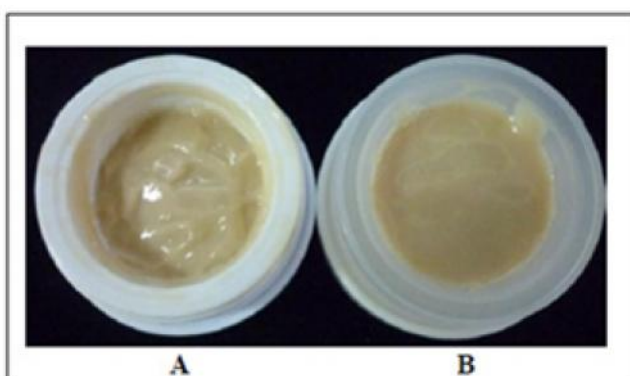
Pengamatan cycling test

Kedua formula yang diuji menunjukkan hasil yang stabil karena tidak menunjukkan adanya pemisahan fase antara fase minyak dan fase air. Pengamatan cycling test ini dilakukan setelah 6 siklus antara suhu 7 ± 2 °C dan suhu 40 ± 2 °C. Hasil pengamatan cycling test dapat dilihat pada Gambar 8 dan Tabel 1. Cycling test dilakukan untuk menguji produk terhadap kemungkinan mengalami kristalisasi atau berawan sebagai indikator kestabilan emulsi.

Uji ini dilakukan dengan menyimpan masing-masing sediaan pada suhu 7 ± 2 °C selama 24 jam kemudian dipindahkan ke dalam oven pada suhu 40 ± 2 °C selama 24 jam. Perlakuan ini disebut satu siklus, siklus ini dilakukan sebanyak 6 kali untuk memperjelas perubahan yang terjadi. Setelah sediaan didinginkan akan terjadi pelepasan air pada sediaan, namun jika film pengemulsi dapat bekerja kembali di bawah tekanan yang diinduksi oleh kristal es sebelum koalesens terjadi maka sistem emulsi tersebut akan stabil pada sediaan krim.

Tabel 1. Hasil pengamatan cycling test

Formula	Awal siklus	Akhir siklus
A	Stabil	Stabil (tidak terjadi pemisahan fase)
B	Stabil	Stabil (tidak terjadi pemisahan fase)



Gambar 8. Pengamatan cycling test

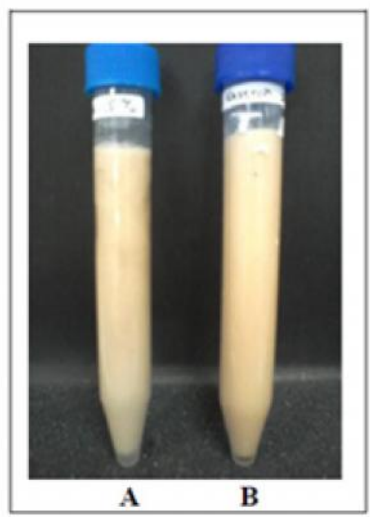
Pengamatan uji mekanik

Uji mekanik atau uji sentrifugasi merupakan salah satu indikator kestabilan fisik sediaan semipadat. Walaupun emulsi akan stabil pada pengocokan, viskositasnya tidak kembali seperti semula. Hukum Stokes menunjukkan bahwa pembentukan krim merupakan suatu fungsi gravitasi dan kenaikan gravitasi dapat mempercepat pemisahan fase. Efek gaya sentrifugal yang diberikan oleh sentrifugator dengan kecepatan 3800 rpm selama 5 jam dianggap setara dengan efek gaya gravitasi yang akan diterima krim dalam penyimpanan selama setahun.

Pada kedua krim tampak adanya sedikit pemisahan antara fase air dan fase minyak setelah dilakukan uji mekanik menggunakan alat sentrifugator dengan kecepatan 3800 rpm selama 5 jam. Hal ini berarti kedua formula krim tidak tahan terhadap efek gravitasi selama satu tahun. Hal ini disebabkan penggunaan emulgator yang kurang untuk menjaga krim agar tahan terhadap perlakuan yang diberikan (berupa gaya sentrifugal yang setara dengan gaya gravitasi selama setahun). Hasil pengamatan uji mekanik dapat dilihat pada Gambar 4.9 dan Tabel 4.2.

Tabel 2. Hasil pengamatan uji mekanik

Formula	Hasil
A	Terjadi pemisahan fase
B	Terjadi pemisahan fase



Keterangan : A = krim ekstrak kulit batang angka 1,5 %
 B = krim ekstrak kulit batang angka 2,0 %

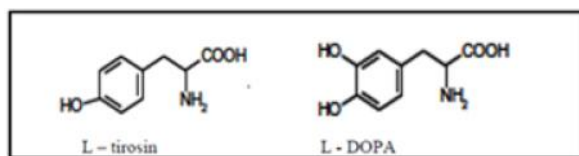
Gambar 9. Foto hasil pengamatan setelah uji mekanik

Hasil Uji Penghambatan Tirosinase

Tirosinase adalah monooksigenase yang mengandung Cu dimana enzim ini berperan sebagai katalisator pada reaksi o-hidroksilasi monofenol menjadi bentuk difenol (monofenolase) dan oksidasi difenol menjadi o-quinon (difenolase). Tirosinase memainkan peranan penting dalam pembentukan melanin selama proses melanogenesis karena tirosinase mampu menghidroksilasi L-tirosin (monofenol) menjadi L-DOPA (difenol) dan mengoksidasi L-DOPA menjadi dopaquinon (senyawa kuinon). Dopaquinon yang terbentuk akan bereaksi spontan membentuk dopakrom. Dalam pelaksan-

aan reaksi enzimatik, pemilihan substrat menjadi hal yang sangat penting karena dapat mempengaruhi hasil pengukuran.

Dalam reaksi enzimatik terdapat 2 substrat yang berperan, yaitu L-tirosin dan L-DOPA. Pada pelaksanaan substrat yang dipilih adalah L-DOPA karena produk dopakrom dapat diukur dengan spektrofotometri UV - Vis pada panjang 478,5 nm, sedangkan jika substrat L-tirosin yang dipilih maka produk yang terbentuk adalah L-DOPA dan dopakrom. L-DOPA tidak dapat diukur serapannya dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 478,5 nm.



Gambar 10. Struktur substrat dari tirosinase 4.3.1

Pengukuran panjang gelombang maksimum

Metode yang digunakan dalam uji penghambatan tirosinase mengacu pada metode yang digunakan oleh peneliti sebelumnya (Arung, Shimizu, dan Kondo, 2006) dengan beberapa modifikasi. Jumlah semua reagen (dapar fosfat 50 mM, L-DOPA, dan tirosinase) menjadi dua kali lipat volume awal, karena volume yang terlalu kecil. Metode ini digunakan untuk

pengukuran panjang gelombang maksimum. Berdasarkan hasil pengukuran, telah didapatkan panjang gelombang maksimum yaitu pada panjang gelombang 478,5 nm. Pada panjang gelombang ini didapatkan puncak serapan yang tinggi, artinya terjadi pembentukan dopakrom yang paling banyak. Hasil pengukuran ini dilakukan sebanyak 3 (tiga) kali. Panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Gambar 11.

Gambar 11. Penentuan panjang gelombang maksimum serapan dopakrom

Penentuan tipe penghambatan tirosinase oleh ekstrak kulit batang nangka

Berdasarkan kurva Lineweaver-Burk yang terbentuk pada Gambar 12 dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit batang nangka merupakan penghambat kompetitif dari tirosinase. Mekanisme penghambatan terjadi karena senyawa aktif dari ekstrak kulit batang nangka berupa artocarpetin, norartocarpetin, dihydromorin, dan streppogenin memiliki struktur yang mirip dengan L-DOPA sebagai substrat dan akan berkompetisi

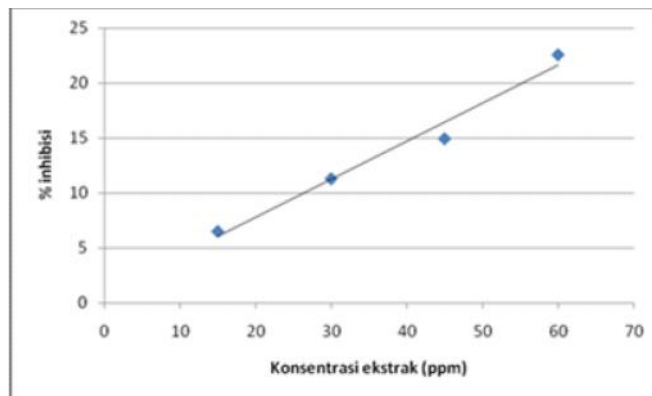
untuk berikatan dengan active site tirosinase, dalam hal ini bagian atom Cu-nya. Produk yang dihasilkan dari reaksi dengan substrat adalah dopakrom yang berwarna jingga tua sampai merah sedangkan produk yang dihasilkan dari penggunaan penghambat tidak berwarna, sehingga persen penghambatan tirosinase dapat dihitung dengan cara mengurangi serapan yang terbentuk tanpa penghambat dengan serapan yang terbentuk dengan penambahan penghambat.

Gambar 12. Kurva Lineweaver-Burk tanpa dan dengan penghambat

Pengukuran aktivitas penghambatan tirosinase (IC50) dari ekstrak kulit batang nangka

Pengukuran IC50 dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi ekstrak kulit batang nangka yang digunakan dari 15 - 60 ppm. Kemudian diukur serapannya dan dihitung % penghambatannya. Plot ke dalam kurva antara konsentrasi ekstrak vs % inhibisi. Dari persamaan linear yang didapat dari kurva tersebut, dapat dihitung IC50, yaitu konsentrasi ekstrak yang mempunyai aktivitas penghambatan terhadap tirosinase sebesar 50

%. Hasil pengukuran IC50 dari ekstrak kulit batang nangka adalah 142,37 ppm. Dari nilai IC50, ekstrak kulit batang nangka memiliki aktivitas penghambatan tirosinase yang cukup tinggi, artinya IC50 didapatkan pada konsentrasi ekstrak 100 ppm (Moon, Yim, Song, Lee, dan Hyun, 2010). Besarnya nilai IC50 sangat bergantung pada metode ekstraksi dan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi. Kurva konsentrasi ekstrak (ppm) vs % inhibisi dapat dilihat pada Gambar 13. Dari kurva tersebut didapatkan persamaan linier $y = 0,345x + 0,88$, dengan nilai $R^2 = 0,975$.



Gambar 13. Kurva konsentrasi ekstrak (ppm) vs % inhibisi

Pengukuran aktivitas penghambatan tirosinase dari krim ekstrak kulit batang nangka

Untuk menghindari pengaruh bahan eksipien yang digunakan dalam formulasi krim pada uji aktivitas, maka digunakan krim blanko negatif dengan kandungan bahan eksipien yang sama dengan krim yang mengandung ekstrak. Oleh karena itu, kuvet A dan B ditambahkan filtrat dari krim blanko negatif dengan jumlah yang sama dengan penambahan filtrat dari krim yang mengandung ekstrak, yaitu 200 µL. Hal ini dilakukan karena di dalam krim mengandung BHT sebagai antioksidan sediaan. Eksipien ini dapat bereaksi

menghambat aktivitas tirosinase sehingga akan membuat hasil uji menjadi lebih besar dari seharusnya.

Posisi fenol dari senyawa aktif ekstrak berikatan dengan atom Cu pada active site tirosinase menyebabkan tidak terjadi reaksi oksidasi yang dikatalisis tirosinase sehingga pembentukan senyawa dopakuinon dan dopakrom menjadi berkurang. Menurut literatur active site yang akan berikatan dengan Cu pada tirosinase yaitu pada posisi difenol (Kubo & Kinoshita, 1999).

Reaksi pembentukan ikatan kelat senyawa aktif dengan sisi aktif Cu dari tirosinase dapat dilihat pada Gambar 14.

Gambar 14. Reaksi pembentukan ikatan kelat senyawa aktif dengan sisi aktif Cu dari tirosinase

Dalam pengukuran digunakan pula krim blanko positif yang mengandung vitamin C dengan konsentrasi 1 %. Vitamin C saat ini digunakan sebagai zat aktif dalam sediaan kosmetika pemutih di pasaran yang memiliki mekanisme kerja sebagai penghambat tirosinase. Penggunaan krim blanko positif bertujuan untuk membandingkan besarnya aktivitas penghambatan

tirosinase dengan krim yang mengandung ekstrak kulit batang nangka.

Setelah dilakukan pengukuran serapan dopakrom pada tiap sampel krim, maka diperoleh hasil persen aktivitas penghambatan tirosinase dari masing – masing krim. Besarnya nilai persen penghambatan tirosinase dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 3. Nilai persen penghambatan tirosinase krim ekstrak kulit batang angka pada minggu ke-0 dan minggu ke-8 dengan spektrofotometer UV-Vis

Larutan Sampel	Rata – rata (%) penghambatan tirosinase	
	Minggu ke-0	Minggu ke-8
Krim A	10,64	6,93
Krim B	11,34	7,74

Dari Tabel 3 didapatkan bahwa persen penghambatan tirosinase krim A yang mengandung ekstrak kulit batang angka 1,5 % adalah 10,64 %, sedangkan krim B yang mengandung ekstrak kulit batang angka 2,0 % adalah 11,34 %. Besarnya nilai persen penghambatan bergantung pada konsentrasi ekstrak yang digunakan. Krim B yang mengandung ekstrak kulit batang angka lebih banyak memiliki nilai persen penghambatan tirosinase yang lebih besar dibanding dengan krim A. Krim blanko positif memiliki nilai persen penghambatan tirosinase sebesar 9,72 %. Besarnya nilai persen penghambatan tirosinase krim blanko positif masih lebih kecil nilainya dibandingkan dengan krim yang mengandung ekstrak sehingga dapat dikatakan krim yang mengandung ekstrak kulit batang angka memiliki aktivitas penghambatan tirosinase.

Selain itu, untuk mengetahui pengaruh kestabilan ekstrak kulit batang angka dalam krim dengan aktivitas penghambatan

tirosinase, maka uji penghambatan tirosinase dilakukan pada minggu ke – 8. Setelah penyimpanan 8 minggu, nilai persen penghambatan tirosinase dari kedua krim mengalami penurunan. Nilai persen penghambatan tirosinase dari krim A menurun menjadi 6,93 %, sedangkan krim B menurun menjadi 7,74 %.

Penurunan ini disebabkan krim tidak stabil selama penyimpanan. Berkurangnya konsentrasi senyawa aktif dalam krim ekstrak kulit batang angka terjadi karena reaksi oksidasi dengan suhu dan udara. Penggunaan antioksidan di dalam krim tidak cukup banyak untuk melindungi senyawa aktif, sehingga senyawa aktif mengalami oksidasi. Hasil oksidasi tersebut menghasilkan senyawa bentuk kuinon yang tidak dapat berikatan dengan active site tirosinase. Jumlah senyawa aktif yang berikatan dengan tirosinase berkurang sehingga aktivitas menghambat kerja tirosinase menurun.

KESIMPULAN

Ekstrak kulit batang nangka memiliki aktifitas sebagai inhibitor tirosinase dengan nilai IC50 sebesar 142,37 ppm. Sediaan krim yang mengandung ekstrak kulit batang nangka 1,5 % dan 2 % memiliki aktivitas penghambatan tirosinase berturut – turut sebesar 10,64 % (28,29 ppm) dan 11,34% (30,31 ppm). Setelah penyimpanan 2 bulan, krim yang mengandung ekstrak kulit batang nangka 1,5 % dan 2 % mengalami penurunan aktivitas penghambatan tirosinase berturut-turut menjadi 6,93 % (17,53 ppm) dan 7,74 % (19,88 ppm). Berdasarkan uji kestabilan fisik, krim menunjukkan pemisahan fase pada penyimpanan suhu 40±2o C serta dari uji mekanik menunjukkan bahwa masa penyimpanan kedua krim tidak mencapai satu tahun.

DAFTAR ACUAN

- Ansel HC. 1989. *Pengantar bentuk Sediaan Farmasi*, edisi keempat. Terj. Dari *Introduction to Pharmaceutical Dosage Form*, oleh Farida Ibrahim. UI Press. Jakarta.
- Arung ET, IW Kusuma, YM Iskandar, S Yasutake, K Shimizu, R Kondo. 2005. Screening of Indonesian Plants for Tyrosinase Inhibitory Activity. *The Japan Wood Research Society*, 51: 520-525.
- Arung ET, K Shimizu, R Kondo. 2006. Inhibitory Effect of Artocarpanone from *Artocarpus heterophyllus* on Melanin Biosynthesis. *J.Biol. Pharm. Bull.*
- Chang TS, HY Ding, HC Lin. 2005. Identifying 6,7,4'-Trihydroxyisoflavone as a potent Tyrosinase Inhibitor. *Biosci Biotechno Biochem.* 69(10).
- Chang TS. 2009. *An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors*. Department of Biological Science and Technology. National University Tainan Taiwan
- Djajadisastra J. 2003. *Pemutih yang Tepat dan Aman bagi Wanita Indonesia* disampaikan pada Pharmacy Beauty & Health. 12 September 2003.
- Djajadisastra J. 2003. Cosmetic Stability. Disampaikan pada "Seminar Setengah Hari HIKI" Rabu, 18 Nopember 2003, Hotel Menara Peninsula. Slipi, Jakarta.
- Gupta S. 2001. *Formulation of Plant-based Skin Whitening Cosmetics*. Household & Personal Products Industry.
- Kubo I, Kinst-Hori, Ikuyo. 1999. Flavonols from Saffron Flower: Tyrosinase Inhibitory Activity and Inhibition Mechanism. *J. Agric. Food Chem* 47:4121-4125
- Martin A, Swarbick J, Cammarata A. 1993. Farmasi Fisik, edisi ketiga. Terj dari *Physical Pharmacy*, oleh Joshita. UI Press. Jakarta.
- Supriyanti FMT. 2009. Pemanfaatan senyawa bioaktif dari ekstrak kulit batang *Artocarpus sp* sebagai inhibitor tirosinase pada pigmentasi kulit., Laporan Penelitian Proyek Pembinaan & Peningkatan Mutu Tenaga Kependidikan, FPMIPA UPI Bandung.
- Yasutake S, K Shimizu. 2004. Screening of Indonesian plants for Tyrosinase Inhibitory Activity. *The Japan Wood Research Society*, 51.
- Yong DP, Lee JR. 2003. A new continuous Spectrophotometric Assay Method for DOPA Oxidase Activity of Tyrosinase. *Journal of Protein Chemistry.* 22.