

SKRINING AKTIVITAS ANTIOKSIDAN, ANTIAGING DAN PENGHAMBATAN TYROSINASE DARI EKSTRAK ETANOLIK DAN ETIL ASETAT DAGING BUAH DAN KULIT BUAH LANGSAT (*Lansium domesticum* Corr) SECARA *IN VITRO*

SCREENING OF ANTIOXIDANTS, ANTI-AGING AND TYROSINASE INHIBITORY ACTIVITIES OF ETHANOLIC AND ETHYL ACETATE EXTRACTS OF FRUIT FLESH AND FRUIT PEEL LANGSAT (*Lansium domesticum* Corr) *IN VITRO*

Syamsu Nur^{1,2}, Rumiya¹, Endang Lukitaningsih^{1*}

¹Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Jl. Sekip Utara, Yogyakarta, 55281

²Akademi Farmasi Kebangsaan Makassar, Jl. Perintis Kemerdekaan Km 13,7, Daya, Makassar

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan bioaktivitas dari daging buah dan kulit buah *L.domesticum* sebagai bahan aktif kosmetik. Proses penyiapan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96 % dan etil asetat, sehingga diperoleh ekstrak etanolik daging buah (BLE), ekstrak etanolik kulit buah (KLE), ekstrak etil asetat daging buah (BLEA) dan ekstrak etil asetat kulit buah (KLEA). Selanjutnya ditentukan golongan senyawa dengan kromatografi lapis tipis dan penentuan kandungan fenolik dan flavonoid total dengan metode kolorimetri. Aktivitas antioksidan diukur menggunakan pengujian peredaman radikal 1,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), β -carotene bleaching (BCB) dan Ferric reducing antioxidant power (FRAP). Efek penghambatan enzim pendegradasi kulit (antiaging) dilakukan dengan mengukur penghambatan enzim elastase dan kolagenase. Efek penghambatan tyrosinase juga diukur menggunakan mushroom tyrosinase. Berdasarkan profil kromatografi lapis tipis (KLT), menunjukkan bahwa daging buah dan kulit buah Lansat mengandung senyawa golongan fenolik, flavonoid, terpenoid dan steroid. Kandungan flavonoid total terbesar terdapat pada KLE ($4,76 \pm 0,26$ %b/b Ekuivalen Kuersetin atau EK) dan kandungan fenolik total terbesar terdapat pada BLEA ($6,4 \pm 0,15$ %b/b Ekuivalen Asam Galat atau EAG). Hasil aktivitas antioksidan pada masing-masing ekstrak dengan menggunakan DPPH: BLEA>KLE>BLE>KLEA; BCB: KLEA>BLEA>KLE>BLE; dan FRAP: BLEA>KLE> BLE>KLEA. KLE dan KLEA memberikan hasil yang baik dalam menurunkan aktivitas dari enzim elastase dan enzim kolagenase. Selain itu, pengujian anti tyrosinase menunjukkan bahwa BLE memiliki aktivitas anti-tyrosinase terbaik dibanding ekstrak lainnya. Berdasarkan dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak buah dan kulit buah langsung memiliki potensi sebagai bahan aktif kosmetik untuk anti aging dan anti tyrosinase.

Kata kunci: Ekstrak *L.domesticum*, antioksidan, antiaging, antityrosinase

ABSTRACT

This study aims to determine the bioactivity of *L.domesticum* as cosmetic ingredient. The extraction was prepared by maceration with ethanol 96 % and ethyl acetate to obtain ethanolic extract of fruit flesh (BLE), ethanolic extract of fruit peel (KLE), ethyl acetate extract of fruit flesh (KLE) and fruit peel (KLEA). Then, determination of compounds was conducted by thin layer chromatography (TLC) and analysed of total phenolic and flavonoid content with colorimetric method. The antioxidant capacity was measured using radical scavenging assay of 1,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), β -carotene bleaching assay (BCB) and ferric reducing antioxidant power assay (FRAP). The inhibitory effect of skin degradation enzymes (anti-aging) was carried out using elastase and collagenase assay. The tyrosinase inhibitory effect was determined using mushroom tyrosinase. Based on TLC result, extract of *L.domesticum* containing phenolic, flavonoids, terpenoids and steroids compounds. The largest of total flavonoid content was obtained in KLE ($4,76 \pm 0,26$ %b/b EQ) and phenolic total content in BLEA ($6,4 \pm 0,15$ %b/b EG). Sequence of antioxidant activity measured using DPPH method was BLEA> KLE> BLE> KLEA; while using BCB method and FRAP method were respectively KLEA>BLEA> KLE> BLE; and BLEA> KLE> BLE> KLEA. KLE and KLEA extracts showed the most

Correspondence author : Endang Lukitaningsih
Email : lukitaningsih_end@ugm.ac.id

potent to remaining activity of the enzyme elastase and collagenase. In addition, BLE extract has the highest tyrosinase inhibition than others. Based on these results it can be concluded that the extracts of the fruit flesh and fruit peel of *L. domesticum* can be used as a cosmetic active ingredient for anti-aging and anti-tyrosinase.

Key words: *L.domesticum* extract, antioxidants, antiaging, antityrosinase

PENDAHULUAN

Penuaan merupakan suatu proses yang sangat kompleks dimana beberapa teori juga menjelaskan bahwa manifestasi seluler proses terjadinya penuaan juga dipengaruhi oleh faktor *reactive oxygen species (ROS)* yang dihasilkan dalam sel. ROS adalah produk sampingan dari respirasi aerobik yang terlibat dalam beberapa modifikasi reaksi seluler seperti paparan logam berat, radiasi pengion maupun zat oksidan. Secara normal, ROS dapat dihilangkan oleh adanya antioksidan endogen seperti *superoksida dismutase (SOD)*, *katalase (CAT)*, *glutathione peroxidase (GPx)* dan *glutathione reduktase (GR)*. Akan tetapi oksidatif stres terjadi ketika keseimbangan antara oksidan dan antioksidan dalam tubuh berubah oleh karena peningkatan ROS dan penurunan antioksidan dari dalam tubuh maka akan dapat menyebabkan kerusakan sel dan juga akan mempengaruhi penuaan pada kulit (Jia *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016).

Pada kondisi normal, kulit pada dasarnya memproduksi enzim seperti elastase dan kolagenase. Faktor *reactive oxygen species (ROS)* ataupun paparan sinar UV yang berlebihan akan mempercepat proses aktivasi enzim *elastase* yang merupakan satu-satunya enzim yang mampu mendegradasi elastin. Elastin tersebut adalah suatu komponen utama dari serat elastis dari jaringan ikat dan tendon. Serat elastis pada kulit, bersama-sama dengan serat kolagen, membentuk jaringan bawah epidermis. Oleh karena adanya aktivasi dari enzim tersebut maka akan menyerang semua protein matriks jaringan ikat utama, termasuk elastin, kolagen, proteoglikan, dan keratin dimana hal ini akan memicu terjadinya pengkerutan pada kulit (Kim *et al.*, 2008; Wiedow *et al.*, 1990). Selain itu, pada paparan sinar UV juga akan menginduksi pembentukan melanin pada lapisan kulit. Hal ini dipengaruhi oleh adanya enzim tyrosinase yang bertanggung jawab pada inisiasi pigmentasi kulit (Lin *et al.*, 2008).

Dengan peningkatan efek insiden kerusakan suatu kulit oleh faktor pemicu terjadinya penuaan, maka perlu dilakukan strategi kemoprevensi dan pengembangan terapi. Salah satu cara pengembangan yang dilakukan adalah dengan memanfaatkan ekstrak bahan alam. Mekanisme ekstrak bahan alam dalam melindungi kulit terdapat beberapa cara seperti reduksi

reaktivitas dari ROS, menghambat proses oksidasi, menyerap sinar UV, menekan aktivitas enzim, mereduksi pembentukan kerutan pada kulit serta melindungi kulit dari aging. Mekanisme ini terjadi karena dugaan adanya senyawa fenolik, flavonoid dan triterpenoid yang bertanggung jawab dalam melindungi kulit. Fenolik maupun flavonoid memiliki cincin fenol dengan adanya substituen hidroksil yang mampu menghambat ROS, mereduksi ion logam, memodulasi fosforilasi protein yang berhubungan penghambatan aktivitas enzim dan penghambatan peroksidasi lipid (Karim *et al.*, 2014; Pouillot *et al.*, 2011). Salah satu bahan alam yang dapat dikembangkan adalah buah langsung (*Lansium domesticum* Varr). *L.domesticum* dilaporkan mengandung senyawa triterpenoid glikosida, tetranortepenoid, onoceranoid seperti lansic acid, golongan flavonoid maupun fenolik (Klungsupya *et al.*, 2015).

Beberapa penelitian telah melaporkan aktivitas antioksidan dari *L.domesticum* maupun aktivitas penghambatan enzim tyrosinase (Klungsupya *et al.*, 2015; Tilaar *et al.*, 2008). Namun masih minimnya informasi terkait aktivitas biologik dari ekstrak daging buah maupun kulit buah khususnya dalam menghambat aktivitas enzim elastase dan kolagenase terkait aging pada kulit. Namun data tersebut dapat mendukung pengembangan ekstrak buah dan kulit buah langsung sebagai bahan aktif kosmetik dalam pencegahan dan pengembangan terapi aging pada kulit.

METODOLOGI

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah bahan dengan derajat pro analisis yang diperoleh dari supplier radikal seperti 1,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, p.a., sigma-aldrich), *Kojic Acid* (p.a., sigma-aldrich), *Mushroom Tyrosinase* (p.a sigma-aldrich), *L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine methyl ester hydrochloride* (L-DOPA, p.a., sigma-aldrich), Besi (II) sulfat (p.a., sigma-aldrich), Besi (III) sulfat (p.a., sigma-aldrich), Tween 20 (p.a., sigma-aldrich), *2,4,6-tripyridyl-s-triazine* (TPTZ, p.a., sigma-aldrich), *linoleic acid*, serbuk β -karoten (p.a., sigma-aldrich), asam sitrat (p.a., Merck, Germany), *butylated hydroxytoluene* (p.a., sigma-aldrich), *Quercetine* (p.a., sigma-aldrich), *Phosphate Buffer Saline* (PBS, 10X),

dimethylsulfoxide (DMSO, p.a., Merck., Germany); *ethanol* (p.a., JT-Baker), *ethyl acetate* (p.a., JT-Baker), *methanol* (p.a., JT-Baker); *n-hexane* (p.a., Merck., Germany), toluen (p.a., Merck., Germany), *chloroform* (p.a., Merck., Germany), *hydrochloric acid* (p.a., Merck., Germany); enzim elastase (Enzo Life Science, USA), enzim collagenase (Enzo Life Science, USA).

Penyiapan Sampel

Buah segar *L.domesticum* diperoleh dari perkebunan buah langsung di Sulawesi Selatan. Setelah dicuci, daging buah dan kulit buah dipisahkan dan kulit buah dikeringkan pada suhu 50° C di oven selama 1 – 2 hari hingga beratnya konstan dan diserbukkan dengan mesin penggiling. Sedangkan daging buah digunakan dengan segar dan dihaluskan dengan grinder buah. Sampel yang telah dihaluskan masing-masing diekstraksi dengan etanol 96 % dan etil asetat dengan metode maserasi. Setiap 100 gram sampel diekstraksi dengan 300 mL etanol 96% dan didiamkan selama 1 x 24 jam pada suhu ruang. Selanjutnya disaring dan residu dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 95 %. Tahap ini dilakukan sebanyak 2 kali untuk memperoleh hasil ekstraksi yang maksimal. Selanjutnya residu hasil maserasi dengan etanol 96 % dimaserasi kembali dengan etil asetat dan dilakukan dengan cara yang sama dengan etanol 96 %. Masing-masing ekstrak cair yang diperoleh selanjutnya dievaporasi pada suhu 50° C hingga diperoleh ekstrak kental.

Identifikasi golongan senyawa menggunakan KLT

Masing-masing ekstrak dilarutkan pada pelarutnya masing-masing dengan konsentrasi 100 mg/mL dan ditotolkan 10-20 µL pada plat silika gel F254 dan dielusi dengan sistem solven yaitu sistem 1: *n-hexane:ethyl acetic* (3:1) untuk kulit buah dan sistem 2: *hexane:butanol;acetate acid* (5:2:1). Setelah pengembangan, plate dikeringkan dan dilihat pemisahannya dibawah UV 366 dan 254 dan selanjutnya disemprot dengan reagen AlCl₃, Anisaldehyd, serum sulfat dan DPPH.

Total Flavonoid dan Phenolic Content

Penentuan Fenolik Total

Penentuan fenolik total dilakukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu yang dimodifikasi (Singleton *et al.*, 1999). Dipipet 100 µL masing-masing larutan ekstrak sampel (2 mg/mL) dalam etanol dan ditambahkan 500 µL reagen folin ciocalteu dan 2 mL larutan natrium karbonat 7,5 %, didiamkan selama 3 menit.

Selanjutnya campuran dicukupkan volumenya sampai 5 mL dengan aquadest. Diinkubasi selama 1 jam dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 778 nm.

Penentuan Flavonoid Total

Penentuan kadar flavonoid total dilakukan berdasarkan metode kolorimetri menggunakan aluminium klorida (AlCl₃) yang dimodifikasi (Hossain and Shah, 2011). Masing-masing sampel dan larutan standar (Kuersetin) dipipet sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan 1,5 mL metanol. Selanjutnya ditambahkan 100 µL larutan aluminium klorida (AlCl₃ 10 %) dan 100 µL natrium asetat (1 M) selanjutnya dicukupkan dengan aquades. Campuran diinkubasi selama 30 menit. Diukur absorbansinya sebanyak tiga replikasi dengan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 437 nm.

Penentuan Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan tiga pengujian yang berbeda antara lain: 1,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and β-carotene bleaching assay (BCB) yang diadopsi dari (Karim *et al.*, 2014) dengan sedikit modifikasi.

Pengujian DPPH,

Secara ringkas disiapkan larutan DPPH 0,2 mM dan dibuat seri konsentrasi sampel 1-10 mg/mL. Dalam plate 96 well, dimasukkan 100 µL larutan sampel dan ditambahkan 100 µL larutan DPPH. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 520 nm setelah inkubasi selama 30 C pada suhu ruang. Efek penghambatan dihitung berdasarkan persentase pemudaran warna larutan DPPH menjadi kekuningan oleh sampel terhadap kontrol (hanya larutan DPPH). Nilai IC₅₀ direpresentasikan berdasarkan konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi 50 % DPPH yang mana nilainya diperoleh dari grafik regresi linier.

Pengujian Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP),

Disiapkan larutan ferric chlorida (3 mM dalam 5 mM asam sitrat) dan larutan TPTZ (1 mM dalam 0,05 M asam klorida). 30 µL larutan sampel ditambahkan dengan 30 µL larutan FeCl₃ dan 240 µL larutan TPTZ dalam microplate 96 well. Diukur serapannya pada panjang gelombang 615 nm yang diamati selama 15-30 menit. Data absorbansi dihitung terhadap seri konsentrasi ferrous sulfat

(FeSO₄·7H₂O) dan dicatat sebagai equivalent dengan μM Fe²⁺. Nilai IC₅₀ pada FRAP dihitung berdasarkan konsentrasi sampel yang dapat mereduksi 0,5 mol dari Fe³⁺ menjadi Fe²⁺.

Pengujian β -carotene bleaching assay (BCB),

Dua miligram dari serbuk β -carotene yang dilarutkan dalam 0,2 mL kloroform dan diikuti dengan penambahan 0,2 mL asam linoleat, 2 mL tween 20 dan dicukupkan hingga 100 mL aquabidestillata. Campuran vorteks hingga diperoleh larutan yang transparan. 180 μL larutan BCB ditambahkan dalam 20 μL larutan sampel dalam microplate 96 well dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm setelah inkubasi selama 20 menit pada suhu 50 C. Pengukuran dimonitoring selama 2 jam dengan interval 30 menit. Aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan perbedaan degradasi sampel dan kontrol (hanya larutan β -karoten). Nilai IC₅₀ ditentukan berdasarkan kemampuan dari sampel untuk melindungi β -karoten dari degradasi.

Penghambatan elastase dan kolagenase

Pengujian elastase dilakukan dengan mengikuti manual produk dari Drug Discovery Kit Enzo Life Science (Manual, Neutrophil Elastase Colorimetric). Untuk pengujian penghambatan elastase, 20 μL larutan sampel diencerkan dengan 65 μL larutan buffer (10 mM HEPES, 50 mM NaCl dan 0,05 % Tween 20 dalam DMSO) dalam mikroplate 96 well. Elastatinal (100 μM) digunakan sebagai kontrol inhibitor, 95 μL larutan buffer sebagai blanko, dan 85 μL larutan buffer sebagai kontrol negatif. Enzim Neutrophil elastase (2,2 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$) ditambahkan ke dalam larutan sampel, larutan kontrol negatif dan inhibitor kontrol sebanyak 10 μL (blanko tidak ditambahkan enzim). Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37° C dan selanjutnya ditambahkan 5 μL substrat (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA, 100 μM) pada setiap well dan diukur serapan pada panjang gelombang 405 nm yang diamati selama 10 menit pada setiap interval 1 menit.

Untuk pengujian penghambatan kolagenase (Manual, MMP-1 Colorimetric Drug Discovery Kit), 20 μL larutan sampel dan ditambahkan 50 μL larutan buffer (50 mM HEPES, 10 mM CaCl₂, 0,05 % Brij-35 dan 1 mM DTNB dalam DMSO) ke dalam mikroplate 96 well. NNGH (N-Isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl) glycyhydroxamic acid; 1.3 μM) digunakan sebagai inhibitor kontrol untuk digunakan sebagai pembanding. 90 μL larutan buffer sebagai blanko dan 70 μL larutan buffer sebagai kontrol negatif. 20 μL enzim MMP-1 (153 mU/ μL) ditambahkan pada well yang berisi sampel, inhibitor kontrol dan kontrol negatif

(blanko tidak ditambahkan enzim). Diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37° C, selanjutnya setiap well ditambahkan dengan 10 μL substrat (thiopeptide, Ac-PLG-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]-LG-OC₂H₅; 100 μM) dan diukur serapannya pada panjang gelombang 410 nm. Pengamatan dilakukan selama 10 menit dengan interval 1 menit.

Penghambatan Enzim Tirosinase

Pengujian aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase dilakukan dengan metode (Wong *et al.*, 2010) dimana menggunakan L-DOPA sebagai substrak dan asam kojik sebagai kontrol positif. Masing-masing sampel diambil 40 μL dengan konsentrasi tertentu dan ditambahkan 80 μL buffer fosfat (0.1 M, pH 6.8), 40 μL enzim tyrosinase (1000 units/mL), dan 40 μL of L-DOPA (2.5 mM), selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 515 nm. Dilakukan pula pengukuran terhadap blanko dan kontrol positif asam kojik. Aktivitas penghambatan enzim tirosinase diekspresikan sebagai harga IC₅₀.

Analisis Statistik

Data hasil penelitian direpresentasikan sebagai mean \pm standar deviasi (SD) yang ditentukan dari hasil tiga replikasi disetiap pengujian. Perbandingan dibuat dengan menggunakan analisis *two sample T-test*. Hasil berbeda signifikan ketika p-value kurang dari 0,05 (p<0.05).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil golongan senyawa menggunakan KLT

Ekstrak daging buah dan kulit buah langsung telah diidentifikasi komponen senyawa dengan menggunakan KLT dan divisualisasikan noda senyawa di bawah sinar UV 366 nm serta pereaksi semprot AlCl₃ spesifik untuk golongan senyawa flavonoid, Serum Sulfat spesifik untuk senyawa organik, Anisaldehyd spesifik untuk senyawa steroid maupun terpenoid dan DPPH untuk mengetahui profil kapasitas antioksidan dari ekstrak. Gambar 1 menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah langsung (BLE) dideteksi adanya golongan senyawa flavonoid yang ditunjukkan adanya spot yang berwarna kuning, sedangkan ekstrak etil asetat buah langsung (BLEA) dideteksi adanya spot yang berwarna kuning setelah penyemprotan reagen AlCl₃ yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid dan merah muda setelah penyemprotan dengan reagent anisaldehyd menunjukkan adanya senyawa steroid/terpenoid. Hal yang sama diperoleh pada profil KLT dari ekstrak etanol kulit langsung (KLE) dan ekstrak etil asetat kulit langsung (KLEA) masing-masing adanya

spot yang menunjukkan golongan senyawa flavonoid dan steroid/terpenoid. Hal ini sesuai dengan beberapa literatur yang menjelaskan bahwa *L.domesticum* memiliki kandungan senyawa flavonoid dan steroid/terpenoid (Klungsupya *et al.*, 2015; Nishizawa *et al.*, 1982, 1989; Tanaka *et al.*, 2002).

Penentuan Kandungan Flavonoid dan Fenolik Total

Kandungan flavonoid total dari ekstrak daging buah dan kulit buah *L.domesticum* ditentukan berdasarkan metode kolorimetri dengan $AlCl_3$ yang dibandingkan dengan standar kuarsetin yang direpresentasikan sebagai %b/b ekuivalen kuarsetin (% b/b EQ). Sedangkan penentuan kandungan fenolik total dilakukan menggunakan metode kolorimetrik dengan pereaksi follin-ciocalteu dimana hasilnya dilaporkan sebagai % b/b ekuivalen asam galat (%b/b EAG). Hasil penelitian diperoleh data kandungan flavonoid total yaitu BLE (0,55±0,01%), BLEA (0,756±0,02%), KLE (4,76±0,26%), KLEA (1,88±0,02%) dan kandungan fenolik total dalam %b/b EAG diperoleh BLE (3,69±0,026%), BLEA (6,4±0,15%), KLE (2,65±0,056%), dan KLEA (2,44±0,047%).

Penentuan Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan telah dianalisis dengan menggunakan tiga pengujian yaitu pengujian peredaman radikal DPPH, reduksi besi (FRAP), dan penghambatan degradasi beta karoten (tabel 1). Pada pengujian peredaman radikal DPPH, larutan sampel masing-masing diujikan pada seri konsentrasi 1-10 mg/mL. Nilai konsentrasi penghambatan untuk mereduksi radikal DPPH 50% (IC_{50}) ditentukan dengan memplot kurva regresi linier antara aktivitas peredaman radikal DPPH (%) dengan rasio konsentrasi sampel. Hasil menunjukkan bahwa BLEA memberikan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dengan nilai IC_{50} 4,09 mg/mL dan diikuti oleh KLE (6,53 mg/mL), BLE (6,61 mg/mL), dan KLEA (7,91 mg/mL). Namun jika dibandingkan dengan pembanding kuarsetin (37,8 µg/mL) dan vitamin C (59 µg/mL) menunjukkan bahwa larutan sampel (BLEA) memberikan aktivitas antioksidan yang masih rendah. Hal ini dikarenakan kuarsetin merupakan senyawa murni golongan flavonoid yang secara cepat mampu meredam radikal DPPH jika dibandingkan dengan larutan sampel yang masih berupa ekstrak kasar.

Pada pengujian reduksi besi (*Ferri reduction antioxidant power*) larutan sampel mampu memberikan aktivitas antioksidan

berdasarkan dengan mekanisme reaksi fenton oleh pengkkelat ion logam seperti Fe^{2+} dan Cu^{2+} yang bertanggung jawab untuk mengubah hidrogen peroksida menjadi radikal hidroksi yang terjadi pada kulit (Lin *et al.*, 2008). Pada pengujian ini larutan sampel (5 - 1000 µg/mL) diukur serapannya pada panjang gelombang 615 nm setelah inkubasi 15-30 menit dan FRAP sampel ditentukan berdasarkan persamaan kurva baku menggunakan $FeSO_4$ yang ekuivalen dengan µM Fe^{2+} . Nilai IC_{50} pada pengujian ini ditentukan berdasarkan kemampuan sampel dalam mereduksi 0,5 mol Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Hasil menunjukkan bahwa BLEA dengan nilai IC_{50} 23,67 µg/mL dimana nilai FRAP tersebut memberikan aktivitas antioksidan yang signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan KLE (137,1 µg/mL), BLE (205,8 µg/mL) dan KLEA (235,1 µg/mL) namun, masih memberikan aktivitas antioksidan yang baik. Selain itu, aktivitas antioksidan dari BLEA memberikan hasil yang hampir sama dengan pembanding vitamin C (24,47 µg/mL) tetapi tidak pada kuarsetin (16,76 µg/mL). Berdasarkan pada kandungan senyawa ekstrak etil asetat buah langsung (BLEA) terdapat senyawa golongan flavonoid ataupun fenolik dimana memberikan kontribusi pada mekanisme pengkkelatan ion logam dan mengurangi kemungkinan pembentukan radikal hidroksil yang berasal dari anion radikal superoksida (Kulisic *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2008).

Pada pengujian *β-caroten bleaching* (BCB), ditujukan untuk mengetahui kapasitas antioksidan dari suatu sampel dengan mekanisme penghambatan laju degradasi beta karoten selama proses oksidasi yang terjadi ketika asam linoleat berubah menjadi hidroperoksida setelah inkubasi selama 20 menit pada suhu tinggi 50°C. Aktivitas antioksidan sampel ditentukan dengan mengamati laju degradasi larutan sampel (25-1000 µg/mL) dengan kontrol (hanya larutan beta karoten) selama 120 menit dan selanjutnya ditentukan inhibitor konsentrasi (IC_{50}) dengan memplot persamaan regresi linier aktivitas antioksidan (%AA) terhadap konsentrasi larutan sampel. Hasil menunjukkan bahwa KLEA signifikan memberikan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dengan nilai IC_{50} 147,29 µg/mL dan diikuti oleh BLEA (308,38 µg/mL), KLE (488,72 µg/mL), dan BLE (501,64 µg/mL). Dari keempat ekstrak *L.domesticum* yang diuji menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat kulit buah langsung (KLEA) memiliki aktivitas yang baik dalam menghambat laju degradasi beta karoten. Hal ini dipengaruhi karena KLEA terdapat golongan senyawa terpenoid dan flavonoid dimana senyawa tersebut mampu melindungi terjadinya proses oksidasi pada lemak (Graßmann,

2005; Karim *et al.*, 2014). Namun hasil aktivitas dari KLEA masih 4 kali lebih rendah jika dibandingkan dengan pembanding BHT (IC₅₀ 38 µg/mL) dan aktivitas yang hampir sama dengan kuersetin (IC₅₀ 135 µg/mL). Ekstrak tanaman dengan kandungan senyawa yang mampu melindungi proses oksidasi lemak dapat digunakan untuk melindungi kulit khususnya lapisan stratum korneum dari serangan radikal peroksid lemak (Fremont *et al.*, 1999).

Penentuan aktivitas dari masing-masing sampel berdasarkan beberapa pengujian menunjukkan adanya perbedaan kapasitas antioksidan pada metode pengujian yang berbeda. Keempat sampel ekstrak yang telah diuji menunjukkan aktivitas yang lemah dalam meredam radikal DPPH. Berbeda halnya pada pengujian FRAP dan BCB, menunjukkan bahwa adanya aktivitas antioksidan dalam mereduksi besi yang tergolong kuat khususnya pada BLEA dan moderat pada KLE sedangkan aktivitas antioksidan untuk mencegah degradasi beta karoten tergolong moderat khususnya pada KLEA. Adanya hasil yang berbeda antara pengujian DPPH dengan FRAP dan BCB disebabkan karena senyawa yang bertanggung jawab pada sampel ekstrak dengan pengujian FRAP dan BCB yang tergolong sebagai antioksidan sekunder dimana senyawa tersebut memiliki mekanisme dalam menstabilkan hidroperoksidase dengan menghambat peruraian hidroperoksida menjadi radikal bebas. Senyawa-senyawa yang dapat mengkelatkan logam juga termasuk antioksidan golongan ini. Antioksidan sekunder bekerja dengan mekanisme pengikatan ion logam, menangkap oksigen, mengubah hidrogen peroksida menjadi spesies non radikal, dan dengan deaktivasi oksigen singlet (Pokorny, 2003). Berbeda halnya dengan pengujian DPPH dimana senyawa yang bertanggung jawab memiliki mekanisme dalam penangkapan radikal bebas melalui pemutusan rantai reaksi radikal dengan jalan memberikan atau mendonorkan radikal hidrogen secara cepat (Vaya and Aviram, 2001)

Penghambatan Elastase dan Kolagenase

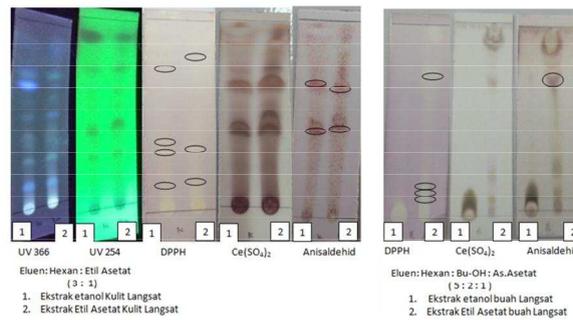
Pengujian penghambatan elastase dilakukan dengan menggunakan metode *Neutrophil Elastase Colorimetric Drug Discovery Kit* berdasarkan manual prosedur *Enzo Life Science*. Pada pengujian ini digunakan larutan sampel *L.domesticum* dengan konsentrasi 200, 100, dan 50 µg/mL serta kontrol positif vitamin C dengan konsentrasi yang sama. Dalam pengujian ini digunakan kontrol inhibitor elastatinal (BML-PI103-9090) dengan konsentrasi 100 µM (50

µg/mL), BML-P213-9090 sebagai substrat (2 mM), dan enzim neutrophil elastase (0,22 mU). Mekanisme penghambatan enzim elastase oleh sampel diamati dengan mengukur serapan pada 405 nm selama 10 menit dengan interval setiap 1 menit. Penurunan aktivitas enzim elastase ditentukan dengan memplot data serapan (mOD) terhadap waktu sehingga diperoleh nilai slope (velocity) dalam mOD/menit yang diperbandingkan dengan nilai slope kontrol (gambar 2).

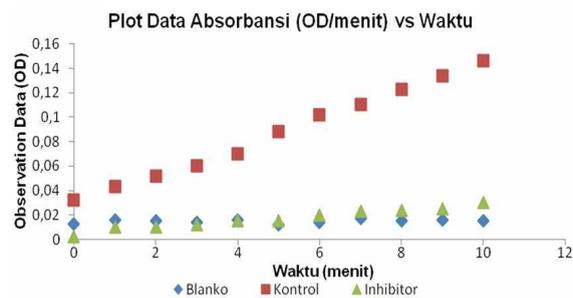
Persamaan regresi linier yang diperoleh dari plot data (mOD) terhadap waktu. Pada gambar 2 yang menunjukkan bahwa laju aktivitas elastase dari kontrol (tanpa inhibitor) terlihat semakin meningkat signifikan dengan bertambahnya waktu (menit) yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning pekat pada larutan kontrol akibat reaksi yang terjadi antara elastase dan substrat (MeOSuc-AAPV-pNA) sedangkan pada larutan sampel dan inhibitor kontrol (elastatinal) laju dari aktivitas enzim menurun hal ini karena adanya kemampuan dari sampel dalam menghambat aktivitas elastase untuk bereaksi dengan substrat.

Berdasarkan nilai slope yang diperoleh dari persamaan regresi linier antara slope kontrol dan slope inhibitor (sampel dan elastatinal) dihasilkan penghambatan (%) aktivitas *human neutrophil elastase* (HNE) oleh adanya inhibitor (Gambar 3).

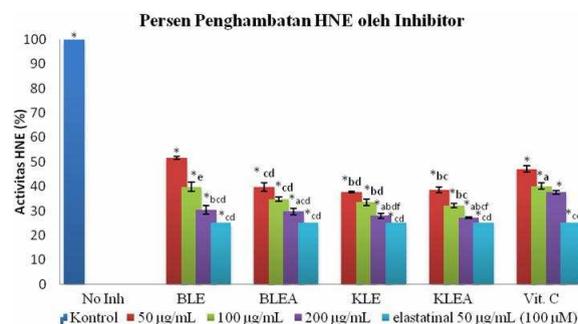
Gambar 3 menunjukkan adanya penurunan aktivitas dari enzim elastase oleh inhibitor kontrol maupun sampel *L.domesticum*. Terlihat bahwa pada konsentrasi rendah (50 µg/mL) KLE memberikan % penurunan aktivitas enzim hingga tersisa 37,71% dan diikuti oleh KLEA (38,46 %), BLEA (39,83 %), BLE (51,63 %). Sedangkan pada konsentrasi tinggi (200 µg/mL) terlihat bahwa KLEA, KLE dan inhibitor elastatinal memberikan aktivitas yang hampir sama yaitu 27,14 %, 27,94 dan 25,29 % diikuti oleh BLEA (29,78 %) dan BLE (30,39 %). Untuk konsentrasi moderat (100 µg/mL) diperoleh hasil bahwa KLEA memiliki aktivitas yang paling baik yaitu sebesar 32,09 % diikuti oleh KLE (33,51 %), BLEA (34,83 %) dan BLE (39,83 %). Berdasarkan dari hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat kulit buah langsung (KLEA) memiliki aktivitas yang baik diantara yang lainnya. Jika dibandingkan dengan kontrol positif vitamin C, diperoleh hasil bahwa larutan sampel *L.domesticum* signifikan lebih baik dibandingkan dengan vitamin C. Karim *et al.*, (2014) dalam penelitian terhadap inhibisi elastase telah memperoleh hasil yang serupa bahwa vitamin C memberikan aktivitas yang rendah terhadap penghambatan elastase jika dibandingkan dengan larutan ekstrak sampel.



Gambar 1. Profil KLT golongan senyawa ekstrak *L.domesticum*



Gambar 2. Kinetika aktivitas dari enzim elastase pada kontrol (tanpa inhibitor), blanko (tanpa enzim dan inhibitor) dan inhibitor kontrol elastatinal (100 µM) yang diamati selama 10 menit. Slope kontrol (0,0106 mOD/menit), blanko (0,0000 mOD/menit) dan inhibitor elastatinal (0,00268 mOD/menit) (n = 3).



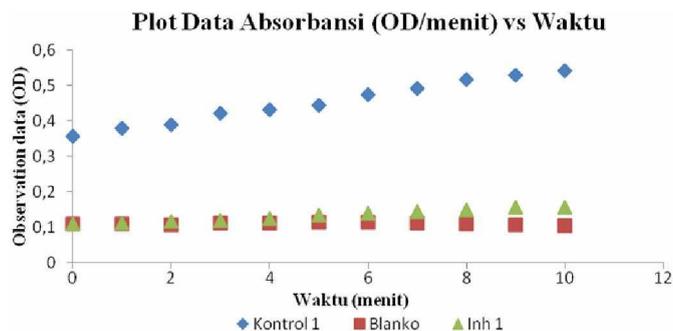
Gambar 3. Persen penurunan aktivitas Neutrophil enzim elastase oleh inhibitor. Data hasil pengukuran diekspresikan sebagai mean ± SD (n = 3). *menunjukkan perbedaan signifikan dari sampel (inhibitor) terhadap Kontrol (tanpa inhibitor) $p < 0,05$. abcdef perbedaan alphabet menunjukkan tidak berbeda signifikan dari setiap sampel, inhibitor kontrol dan pembanding ($p > 0,05$).

Hal ini terjadi karena adanya golongan senyawa terpenoid dan flavonoid yang terdapat pada ekstrak tanaman dilaporkan memiliki efek dalam menghambat aktivitas enzim elastase (Sahasrabudhe and Deodhar, 2010; Thring *et al.*, 2009).

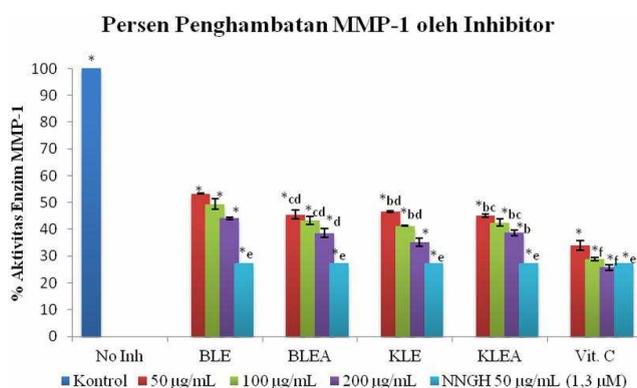
Pengujian yang serupa dilakukan untuk menentukan penghambatan aktivitas enzim kolagenase berdasarkan metode MMP-1 colorimetric drug discovery kit. Pada pengujian ini

ditentukan aktivitas penghambatan enzim kolagenase dengan konsentrasi larutan sampel 200, 100 dan 50 µg/mL dan vitamin C sebagai kontrol positif dengan konsentrasi yang sama.

Plot data (mOD) inhibitor sampel, inhibitor kontrol (NNGH), dan kontrol (tanpa inhibitor) terlihat pada gambar 4. Dari pengamatan 10 menit mOD kontrol yang diamati terdapat 10 titik waktu (mOD/menit) yang menunjukkan adanya linearitas untuk



Gambar 4. Kinetika aktivitas dari enzim MMP-1 (kolagenase) pada kontrol (tanpa inhibitor), blanko (tanpa enzim dan inhibitor) dan inhibitor kontrol NNGH (100 µM) yang diamati selama 10 menit. Slope kontrol (0,01906 mOD/menit), blanko (0,0000 mOD/menit) dan inhibitor NNGH (0,00521 mOD/menit) (n = 3).



Gambar 5. Persen penurunan aktivitas enzim kolagenase (MMP-1) oleh inhibitor. Data hasil pengukuran diekspresikan sebagai mean ± SD (n = 3). *menunjukkan perbedaan signifikan dari sampel (inhibitor) terhadap Kontrol (tanpa inhibitor) $p < 0,05$. ^{abcd}perbedaan alphabet menunjukkan tidak berbeda signifikan dari setiap sampel, inhibitor kontrol dan pembanding ($p > 0,05$).

memperoleh nilai slope yang sesuai dan terlihat bahwa dengan meningkatnya waktu (menit) laju dari aktivitas MMP-1 semakin meningkat signifikan. Berbeda halnya dengan sampel dan inhibitor kontrol terjadi penurunan laju aktivitas enzim MMP-1 yang berarti adanya penghambatan pada reaksi antara enzim dan substrat. Adanya perbedaan laju aktivitas enzim dan inhibitor sehingga dapat ditentukan persen penurunan aktivitas dari enzim berdasarkan nilai slope dari masing-masing persamaan regresi linier (gambar 5).

Gambar 5 menunjukkan bahwa besarnya penurunan % aktivitas enzim kolagenase (MMP-1) oleh inhibitor. Terlihat bahwa pada konsentrasi 200, 100 dan 50 µg/mL larutan sampel memberikan hasil penurunan aktivitas enzim kolagenase lebih dari 50 % yang dibandingkan dengan kontrol negatif (no inhibitor). Dari hasil tersebut, ekstrak BLEA, KLE dan KLEA memberikan % penurunan aktivitas enzim MMP-1

yang hampir sama disetiap konsentrasi. Sedangkan aktivitas penghambatan enzim kolagenase yang terendah terdapat pada ekstrak BLE yaitu hanya sebesar 53,28 % (50 µg/mL), 49,37 % (100 µg/mL) dan 44,18 % (200 µg/mL). Hal ini dipengaruhi kandungan senyawa terpenoid dan flavonoid pada ekstrak kulit langsung memberikan efek sinergis dalam menghambat aktivitas kolagenase dalam pembentukan *wrinkle* pada kulit (Sahasrabudhe and Deodhar, 2010; Thring *et al.*, 2009). Namun jika dibandingkan dengan vitamin C, sampel BLEA, KLE dan KLEA rata-rata memiliki hasil yang rendah dibandingkan dengan kontrol positif vitamin C pada setiap konsentrasinya sedangkan pada sampel BLE dua kali lebih rendah dibandingkan dengan vitamin C. Berdasarkan pada hasil aktivitas anti elastase dan kolagenase dapat diasumsikan bahwa ekstrak KLE dan KLEA dapat dikembangkan sebagai bahan aktif kosmetik anti aging.

Penghambatan Enzim Tirosinase

Pengujian aktivitas penghambatan tirosinase ditujukan untuk mengetahui potensi dari sampel ekstrak *L.domesticum* dalam kemampuannya menghambat tyrosinase pada mekanisme pembentukan eumelanin, sehingga dapat digunakan sebagai bahan pemutih kosmetik. Penentuan penghambatan tyrosinase dilakukan dengan menggunakan mushroom tirosinase sebagai enzim dan L-dopa sebagai substrat serta asam kojat sebagai kontrol positif, seperti yang pernah dilakukan oleh Lukitaningsih (2014). Tabel 2 menunjukkan inhibitor konsentrasi pada 50% (IC₅₀) aktivitas enzim tirosinase oleh sampel. Diperoleh hasil bahwa sampel BLE memberikan nilai IC₅₀ yang rendah yaitu 124,17 µg/mL yang menunjukkan bahwa BLE memberikan aktivitas yang tertinggi dan hampir sama dengan nilai IC₅₀ dari kontrol positif asam kojat yaitu sebesar 111,04 µg/mL sedangkan aktivitas terendah terdapat pada sampel KLEA dengan nilai IC₅₀ 351,72 µg/mL dimana nilai tersebut aktivitas anti tirosinasenya tiga kali lebih rendah dibandingkan dengan KLEA dan asam kojat. Adanya senyawa fenolik maupun flavonoid yang telah dilaporkan seperti flavonol, stilben, asam fenolik, dan kuarsetin memberikan kontribusi dalam menghambat aktivitas tirosinase sehingga mencegah terjadinya depigmentasi kulit (Chen and Kubo, 2002; Lin *et al.*, 2008). Sebagaimana yang telah dilaporkan oleh (Tilaar *et al.*, 2008), bahwa ekstrak etanol buah langsung dapat digunakan sebagai depigmentasi (pemutih) dengan aktivitasnya dalam menghambat enzim tirosinase. Berdasarkan dari hasil tersebut diperoleh data bahwa BLE dan BLEA dapat dikembangkan sebagai bahan aktif kosmetik depigmentasi kulit.

KESIMPULAN

Berdasarkan dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa buah langsung dan kulit buah langsung memberikan aktivitas antioksidan yang baik pada pengujian FRAP dan BCB akan tetapi memberikan aktivitas yang lemah pada pengujian DPPH berdasarkan pada nilai IC₅₀. Meskipun demikian sampel buah dan kulit buah langsung memberikan aktivitas yang baik pada pengujian anti elastase khususnya pada KLE, KLEA dan BLEA serta pengujian anti kolagenase pada ekstrak kulit buah langsung (KLE dan KLEA). Selain itu hasil pengujian anti tirosinase juga menunjukkan aktivitas depigmentasi yang baik khususnya pada ekstrak buah langsung (BLE dan BLEA). Berdasarkan data tersebut, maka ekstrak buah dan kulit buah langsung memiliki potensi sebagai

bahan aktif kosmetik *anti aging* dan depigmentasi kulit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kemenristek DIKTI yang telah memberikan dana penelitian melalui Hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2017 yang diberikan kepada Dr. Endang Lukitaningsih, M.Si., Apt. Terima kasih juga disampaikan kepada Fakultas Farmasi yang telah memberikan fasilitas penelitian.

DAFTAR REFERENSI

- Chen, Q.-X., Kubo, I., 2002. Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4108–4112.
- Enzo Life S: Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) colorimetric drug discovery kit. [http / /www.enzolifesciences.com/BML-AK404/matrixmetalloproteinase-1mmp-1 colorimetric -drug-discovery-kit](http://www.enzolifesciences.com/BML-AK404/matrixmetalloproteinase-1mmp-1-colorimetric-drug-discovery-kit) (accessed on 16 Juni 2016).
- Enzo Life Sciences: Neutrophil elastase colorimetric drug discovery kit. <http://www.enzolifesciences.com/BML-AK497/neutrophil-elastasecolorimetric-drugdiscovery-kit> (accessed on 16 Juni 2016).
- Fremont, lucie, Belguendouz, L., Delpal, S., 1999. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci. Elsevier* 64, 2511–2521.
- Graßmann, J., 2005. Terpenoids as Plant Antioxidants, in: *Vitamins & Hormones. Elsevier*, pp. 505–535.
- Hossain, M.A., Shah, M.D., 2011. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arab. J. Chem. Prod. Hosting Elsevier BV* 8, 66–71.
- Jia, N., Li, T., Diao, X., Kong, B., 2014. Protective effects of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract on hydrogen peroxide-induced damage in lung fibroblast MRC-5 cells in relation to the antioxidant activity. *J. Funct. Foods* 11, 142–151.
- Karim, A.A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., Gani, S. salwa abd, Zainudin, B.H., Abdullah, N.A., 2014. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMC Complement. Altern. Med.* 14, 381.
- Kim, D.-B., Shin, G.-H., Kim, J.-M., Kim, Y.-H., Lee, J.-H., Lee, J.S., Song, H.-J., Choe, S.Y., Park, I.-J.,

- Cho, J.-H., Lee, O.-H., 2016. Antioxidant and anti-ageing activities of citrus-based juice mixture. *Food Chem.* 194, 920–927.
- Kim, Y.H., Chung, C.B., Kim, J.G., Ko, K.I., Park, S.H., Kim, J.-H., Eom, S.Y., Kim, Y.S., Hwang, Y.-I., Kim, K.H., 2008. Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 303–311.
- Klungsupya, P., Suthepakul, N., Muangman, T., Rerk-Am, U., Thongdon-A, J., 2015. Determination of Free Radical Scavenging, Antioxidative DNA Damage Activities and Phytochemical Components of Active Fractions from *Lansium domesticum* Corr. Fruit. *Nutrients* 7, 6852–6873.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M., 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* 85, 633–640.
- Lin, J.-W., Chiang, H.-M., Lin, Y.-C., Wen, K., 2008. Natural products with skin-whitening effects. *J. Food Drug Anal.* 16.
- Lukitaningsih, E. and Holzgrabe, U., 2014. Bioactive compounds in bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) as antioxidant and tyrosinase inhibition agents. *Indonesia J. Pharm.* 25(2), 68-75
- Nishizawa, M., Emura, M., Yamada, H., Shiro, M., Chairul, Hayashi, Y., Tokuda, H., 1989. Isolation of a new cycloartanoid triterpene from leaves of *Lansium domesticum* novel skin-tumor promotion inhibitors. *Tetrahedron Lett. Elsevier Ltd* 30, pp 5615–5618.
- Nishizawa, M., Nishide, H., Hayashi, Y., 1982. The Structure of Lansioside A: A Novel Triterpene Glycoside with Amino-Sugar from *Lansium Domesticum*. *Tetrahedron Lett. Elsevier Ltd* 23, 1349-1350.
- Pokorny, J. (Ed.), 2003. Chapter 1. Antioxidants in food: practical applications, Reprint. ed, Woodhead publishing in food science and technology. *Woodhead, Cambridge.* pp 42-50
- Pouillot, A., Polla, L.L., Tacchini, P., Neequaye, A., Polla, A., Polla, B., 2011. Natural antioxidants and their effects on the skin. Formul. Packag. Mark. *Nat. Cosmet. Prod. Ed.* Dayan N Kromidas L.
- Sahasrabudhe, A., Deodhar, M., 2010. Anti-hyaluronidase, anti-elastase activity of *Garcinia indica*. *Int. J. Bot.*, 3 6, 299–303.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Raventos, L., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* 299, 119.
- Tanaka, T., Ishibashi, M., Fujimoto, H., Okuyama, E., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Hayashi, M., Komiyama, K., 2002. New Onoceranoid Triterpene Constituents from *Lansium domesticum*. *J. Nat. Prod.* 65, 1709–1711.
- Thring, T.S., Hili, P., Naughton, D.P., 2009. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement. Altern. Med.* 9.
- Tilaar, M., Wih, W.L., Ranti, A.S., Wasitaatmadja, S.M., Junardy, F.D., others, 2008. Review of *Lansium domesticum* Corrêa and its use in cosmetics. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.* 7, 183–189.
- Vaya, J., Aviram, M., 2001. Nutritional antioxidants mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Curr. Med. Chem.-Immunol. Endocr. Metab. Agents* 1, 99–117.
- Wiedow, O., Schröder, J.M., Gregory, H., Young, J.A., Christophers, E., 1990. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 265, 14791–14795.
- Wong, S.K., Lim, Y.Y., Chan, E.W.C., 2010. Evaluation of antioxidant, anti-tyrosinase and antibacterial activities of selected *Hibiscus* species. *Ethnobot. Leaflet.* 2010, 9.