

Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Secara *In Vitro* Solid Lipid Nanopartikel Tetrahidrokurkumin

Tyrosine Inhibitory Activities of Tetrahydrocurcumin Solid Lipid Nanoparticle

Nurul Hidayatri*, Deni Rahmat, Agung Eru Wibowo

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila Jakarta,
Jl. Raya Lenteng Agung No.56-80, Srengseng Sawah, Jakarta 12640

*Email korespondensi: nurul.hidayatri@gmail.com

Abstrak

Tetrahidrokurkumin (THC) adalah salah satu senyawa polifenol yang memiliki khasiat sebagai pencerah kulit. THC merupakan turunan kurkumin dimana THC memiliki warna serbuk kuning muda hingga putih. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi aktivitas penghambatan enzim tirosinase terbaik dari senyawa tetrahidrokurkumin yang diformulasi dalam bentuk solid lipid nanopartikel (SLN) dengan menggunakan asam kojat sebagai kontrol positif. SLN yang terbentuk dikarakterisasi dari ukuran partikel, morfologinya, zeta potensial serta indeks polidispersitas dan diuji aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase secara *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan SLN THC memiliki ukuran partikel $321,36 \pm 1,800$ nm, indeks polidispersitas $0,265 \pm 0,005$ dan zeta potensial sebesar $-28,73 \pm 0,450$ mV. Untuk senyawa SLN THC menunjukkan aktivitas sebagai penghambat enzim tirosinase dengan nilai IC_{50} hambatan tirosinase $1,1050$ μ g/ml.

Kata Kunci: tetrahidrokurkumin (THC), solid lipid nanopartikel (SLN), enzim tirosinase, pencerah

Abstract

Tetrahydrocurcumin (THC) is a polyphenol compound that has skin lightening properties. THC is a curcumin derivative that is white in color so it will not give a yellow color to the formulation like curcumin. This study aims to determine the potential for the best tyrosinase inhibitory activity of tetrahydrocurcumin compounds formulated in the form of solid lipid nanoparticles (SLN) using kojic acid as a positive control. The SLN formed was characterized by its particle size, morphology, zeta potential and polydispersity index and tested for its inhibitory activity against the tyrosinase enzyme *in vitro*. The results showed the SLN THC had a particle size of 321.36 ± 1.800 nm, a polydispersity

index of 0.265 ± 0.005 and a zeta potential of -28.73 ± 0.450 mV. The SLN THC compound showed activity as tyrosinase enzyme inhibitor with an IC_{50} value of $1.1050 \mu\text{g/ml}$.

Keywords: tetrahydrocurcumin (THC), solid lipid nanoparticle (SLN), tyrosinase enzyme, tyrosinase, lightening

Submitted: 17 Juli 2021

Accepted: 13 Desember 2021

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v3i6.730>

1 Pendahuluan

Warna kulit pada seseorang ditentukan oleh jumlah melanin yang terdapat pada kulit. Dari beberapa penelitian diketahui bahwa tingkat kegelapan dari warna kulit sebanding dengan jumlah melanin yang disintesa oleh melanosit. Melanin yang disintesa dalam melanosit pada lapisan epidermis memiliki fungsi yang penting untuk melindungi tubuh dari pengaruh buruk radiasi ultraviolet [1]. Oleh karena itu bila kita terpapar radiasi sinar matahari dalam waktu lama dan sering akan meningkatkan produksi melanin yang mengakibatkan hiperpigmentasi. Proses pembentukan melanin ini terjadi dengan bantuan enzim dan sinar UV yang terdapat dalam sinar matahari. Untuk mengurangi hiperpigmentasi kita perlu mengurangi pembentukan dari melanin [2]. Pembentukan melanin pada tubuh manusia dapat dikurangi dengan menghambat langsung tirosinase. Dimana inhibitor tirosinase bekerja dengan cara menghambat L-Tirosin menjadi L-Dopa (monofenolase) dan L-Dopa menjadi dopaquinone (diphenolase) [3]. Hidroquinon merupakan salah satu digunakan dalam tambahan bahan kosmetik untuk memperoleh efek pemutih dengan menghilangkan flek gelap pada kulit. Akan tetapi, penggunaan dalam jangka waktu panjang dapat menyebabkan kelainan pada ginjal (nephropathy) proliferasi sel, dan bersifat karsinogenik dan teratogenik [4].

Seiring dengan pengembangan kosmetik yang aman maka pemilihan bahan aktif yang berasal dari bahan alam sebagai pencerah wajah berkembang dengan pesat. Beberapa bahan aktif seperti fenol, flavonoid, kumarin dan turunan lainnya telah diidentifikasi dari

sumber alam [5]. Tetrahidrokurkumin (THC) merupakan senyawa turunan kurkumin yang tidak berwarna sampai berwarna putih yang sering disebut dengan kurkumin putih. Dalam penelitian Sabinsa Corp (2003) diketahui bahwa THC memiliki daya penghambatan tirosinase dengan nilai IC_{50} $0.000492 \mu\text{g/ml}$ dibanding Kurkumin $0.730 \mu\text{g/ml}$. THC menjadi solusi untuk diperolehnya sediaan yang tidak meninggalkan warna kuning pada kulit serta memiliki kelebihan seperti lebih stabil pada pH fisiologis dan memiliki aktivitas lebih baik dari kurkumin dalam penghambatan tirosinase [6].

Lemak padat nanopartikel (Solid Lipid Nanoparticle/SLN) merupakan salah satu sistem nanopartikel. SLN dikembangkan sebagai alternatif sistem pembawa emulsi, liposom dan polimer. SLN menawarkan sifat unik seperti ukuran partikel yang relatif kecil, luas area permukaan yang besar, tingkat penyerapan obat yang tinggi serta berpotensi sebagai pembawa/ sediaan yang dapat meningkatkan kinerja zat aktif dan biodegradable yang menunjukkan toksisitas rendah, tidak menggunakan pelarut organik dalam preparasinya seperti pada polimer nanopartikel yang dapat berbahaya bagi tubuh [7].

Dalam penelitian ini THC dibentuk menjadi SLN Lemak padat nanopartikel (Solid Lipid Nanoparticle/SLN) dengan metode emulsifikasi. Solid lipid nanopartikel tetrahidrokurkumin (SLN THC) akan dikarakterisasi pH, ukuran partikelnya, indeks polidispersitas, zeta potensial dan morfologi nanopartikel. Lalu dilakukan pula uji aktivitas sebagai pencerah secara *in vitro* dengan melihat nilai penghambatan terhadap enzim tirosinase SLN THC. Penelitian ini diharapkan memberikan informasi untuk perkembangan

ilmu pengetahuan dalam pemanfaatan nanoteknologi khususnya untuk dunia farmasi dalam pembuatan solid lipid nanopartikel dengan bahan Tetrahidrokurkumin.

2 Metode Penelitian

2.1 Bahan

Tetrahidrokurkumin (Sami Labs, India), Apifil (Gattefose, Prancis), Lecinol S-10 (Nikkol, Jepang), Polysorbat 80 (Fagron, Yunani), Aquadest (Pancasakti Putra Kencana, Indonesia), Enzim tirosinase (Sigma-Aldrich, USA), Substrat L- DOPA (Sigma-Aldrich, USA), Asam Kojat (Sigma-Aldrich, USA), DMSO (Merck, Jerman), KH_2PO_4 (Merck, Jerman)

2.2 Alat

Alat Gelas (Pyrex, USA), T 25 Digital Ultra Turrax (IKA, China), Hot magnetic stirrer (VELP Scientifica, Italia), pH meter (Zetasizer Nano ZSP (Malvern, USA), 96 well-microtiter plate, microplate reader (Bio-Rad, USA), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu, Jepang)

2.3 Pembuatan SLN Tetrahidrokurkumin.

Pembuatan SLN THC menggunakan metode emulsifikasi dengan cara, lelehkan lemak padat yaitu Apifil pada suhu 70-80°C. Kemudian pada wadah terpisah larutkan Lecinol S-10 dengan aquadest dan lalu panaskan suhu 70-80°C, dan panaskan tween 80 dalam wadah terpisah suhu 70-80°C lalu masukkan THC ke dalam tween 80 yang telah panas aduk ad larut. Apifil yang telah melebur, di aduk di hot magnetic stirrer dengan suhu 70-80°C, sambil diaduk masukkan campuran Tween 80 dan THC aduk sekitar 1 menit lalu masukkan larutan Lecinol S-10 aduk sampai terbentuk emulsi yang bening. Setelah itu segera pindahkan ke wadah berisi air dingin suhu $\pm 4^\circ\text{C}$ dan dilanjutkan homogenisasi dengan Ultraturrax 5600 rpm selama 1 jam.

2.4 Karakterisasi Nanopartikel

2.4.1 Pemeriksaan ukuran partikel, distribusi partikel nano dan indeks polidispersitas

Pemeriksaan ukuran partikel, distribusi partikel dan indeks polidispersitas dengan

menggunakan alat particle size analyzer pada suhu 25°C. Sampel dilarutkan menggunakan air destilasi sebelum analisis, lalu masukkan kedalam kuvet dan kuvet yang berisi sampel dimasukkan kedalam holder kemudian diukur diameter dari nanopartikel yang ada.

2.4.2 Pemeriksaan zeta potensial

Nilai potensial zeta diukur menggunakan zeta potential analyzer pada suhu 25°C. Sampel dilarutkan menggunakan air destilasi sebelum analisis, lalu masukkan kedalam kuvet dan kuvet yang berisi sampel dimasukkan kedalam holder dan di pilih menu zeta potensial (mV).

2.4.3 Pemeriksaan morfologi partikel

Pemeriksaan morfologi partikel dapat dilakukan dengan metode TEM (*Transmission Electron Microscopy*). Sebanyak 1-3 tetes larutan SLN THC disebar ke grid kisi tembaga yang telah dilapisi karbon kemudian ditambahkan pewarna uranyl asetat didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit, dilakukan pada voltase 120 KVA. Sampel yang akan dianalisis disiapkan setipis mungkin sehingga elektron dapat menembusnya dan hasil dari tembusan electron ini kemudian diolah menjadi gambar.

2.5 Uji Aktivitas Penghambatan Tirosinase

Pengujian ini menggunakan metode dari Batubara dkk [2]. Sampel dilarutkan dengan 10 ml DMSO sehingga diperoleh konsentrasi 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kemudian dibuat seri larutan dengan dapar fosfat pH 6,5 sehingga diperoleh konsentrasi larutan 0,391; 0,781; 1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Sejumlah 70 μl larutan sampel dicampur dengan 30 μl (Sigma, 333 Unit/ml) larutan enzim tirosinase dimasukkan kedalam 96 *well-microtiter plate* dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Lalu tambahkan 110 μl substrat L-Dopa 2 mM kedalam 96 *well-microtiter plate* dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang lalu dibaca menggunakan alat *multi-well plate reader* pada Panjang gelombang 492 nm. Asam Kojat digunakan sebagai control positif dan dibuat larutan seri 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, dan 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Persen penghambatan dihitung menggunakan persamaan 1.

$$\% \text{ penghambatan tirosinase} = \frac{A-B}{A} \times 100\% \text{ [8].....(Persamaan 1)}$$

Keterangan:

A = absorbansi sampel tanpa penambahan inhibitor

B = absorbansi sampel dengan penambahan inhibitor

Tabel 2. Metode Pengujian Penghambatan Enzim Tirosinase

Bahan	Plate (µl)					
	Kontrol Blanko	Kontrol Blanko + Enzim	Blanko	Kontrol Sampel	Kontrol Sampel + Enzim	Sampel
Larutan Dapar Fosfat (pH 6.5)	210	180	70	140	110	-
Sampel	-	-	-	70	70	70
Enzim Tirosinase	-	30	30	-	30	30
Larutan L-Dopa	-	-	110	-	-	110

3 Hasil dan Pembahasan

3.1 Evaluasi Karakteristik Solid Lipid Nanopartikel Tetrahidrokurkumin

3.1.1 Organoleptik

Hasil pembuatan SLN THC dengan metode emulsifikasi didapat sediaan emulsi cair mudah untuk dituang berwarna putih susu dengan pH 5,5. Selama penyimpanan 14 hari pada suhu kamar emulsi yang dihasilkan bersifat stabil, tidak mengalami perubahan warna dan tidak terjadi pemisahan. Hasil menunjukkan bahwa surfaktan yang digunakan mampu mengurangi tegangan antar permukaan antara fase minyak dan air, sehingga emulsi dihasilkan stabil.

Tabel 1. Formula SLN Tetrahidrokurkumin

Bahan	Konsentrasi (%)
THC	0.25
Apifil	5
Lecinol S-10	1
Tween 80	30
Aquadest	ad 100



Gambar 2. SLN Tetrahidrokurkumin

3.1.2 Ukuran Partikel dan Indeks Polidispersitas

Hasil pengujian menggunakan particle size analyzer diketahui rata-rata ukuran partikel SLN-THC 321,36±1,800 nm, hal ini menunjukkan bahwa SLN THC masuk kedalam range ukuran partikel yang sesuai untuk kosmetik dimana rata-rata ukuran partikel yang diharapkan untuk sediaan kosmetik adalah 50 – 500 nm [9]

Nilai rata-rata indeks polidispersitas emulsi SLN adalah 0,265±0,005. Indeks polidispersitas yang mendekati 0 menandakan terbentuknya dispersi yang homogen yang artinya terbentuk dispersi ukuran partikel yang homogen dimana sistem dispersi yang terbentuk bersifat lebih stabil untuk jangka panjang.

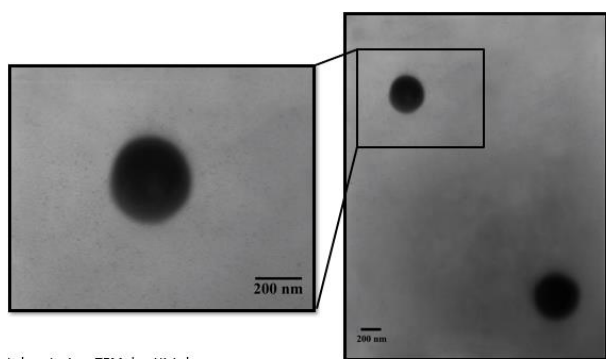
3.1.3 Potensial Zeta

Nilai hasil pengujian potensial zeta SLN THC sebesar -28,73 ± 0,450. Hal ini menunjukkan SLN yang terbentuk bermuatan negatif. Nilai zeta yang cukup besar menunjukkan gaya tolak menolak antar partikel pada formula cukup besar kemungkinan kecil partikel bergabung membentuk agregat.

3.1.4 Morfologi Nanopartikel

Pengamatan ini dilakukan dengan perbesaran 20.000 kali. Hasil TEM SLN THC menunjukkan morfologi sediaan memiliki bentuk bulat beraturan yang terdistribusi secara acak dengan skala 200 nm. Hal ini menunjukkan bahwa metode persiapan yang digunakan mikroemulsifikasi berhasil mencapai sistem SLN dengan partikel yang terdistribusi

seragam dengan ukuran yang sesuai dengan ukuran partikel nano THC berdasarkan uji PSA



Laboratorium TEM dan Histology
JEOL JEM 1010, magnification: 20.000

Gambar 3. Morfologi SLN THC

3.2 Hasil Pengujian Aktivitas Penghambatan Tirosinase SLN THC

Uji aktivitas penghambatan tirosinase dilakukan secara *in vitro* untuk mengetahui daya inhibisi senyawa aktif yang terdapat pada tetrahydrokurkumin. Nilai IC₅₀ dibawah 100 µg/ml menunjukkan potensi penghambatan aktivitas tirosinase yang paling kuat, nilai IC₅₀ 100-450 µg/ml menunjukkan potensi penghambatan yang kurang kuat, dan 450- 700 µg/ml menunjukkan potensi penghambatan aktivitas tirosinase sangat lemah [2].

Dari hasil pengujian diperoleh nilai IC₅₀ dari SLN THC adalah 1,1050 µg/ml sedangkan serbuk THC sebesar 0,4040 µg/ml. Untuk control positif asam kojat diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 51,6663 µg/ml. Dilakukan juga perhitungan menentukan potensi faktor kali daya hambat enzim tirosinase antara THC dan SLN THC dibandingkan kontrol positif asam kojat dengan menggunakan perhitungan persamaan 2.

$$\text{nilai faktor} = \frac{IC_{50} \text{ asam kojat}}{IC_{50} \text{ sampel}} \dots\dots\dots(\text{Persamaan 2})$$

Dari hasil diperoleh THC memiliki potensi aktivitas penghambatan tirosinase 127,88 kali

lebih baik dari Asam Kojat, sedangkan SLN THC memiliki potensi aktivitas penghambatan 46.75 kali lebih baik dari Asam Kojat. Nilai SLN THC lebih rendah dibandingkan dengan nilai THC murni dapat dikarenakan pengaruh dari ada sebagian THC yang masih berikatan dengan SLN sehingga tidak berinteraksi dengan enzim tirosinase.

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Tirosinase Tetrahydrokurkumin SLN dan Tetrahydrokurkumin

Konsentrasi Sampel	Persentase Inhibisi Serbuk THC (%)	IC ₅₀ Serbuk THC (µg/ml)	Persentase Inhibisi THC-SLN (%)	IC ₅₀ SLN THC (µg/ml)
25	93,185		88,292	
12,5	90,170		84,361	
6,25	84,753		78,113	
3,125	77,720	0,4040	68,938	1,1050
1,563	69,943		60,026	
0,781	60,725		46,134	
0,391	47,051		27,741	

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Tirosinase Asam Kojat

Konsentrasi As. Kojat (µg/ml)	% inhibisi L-Dopa As.Kojat	IC ₅₀ As.Kojat (µg/ml)
500	94,257	
250	89,240	
125	77,463	
62,5	60,596	51,6663
31,25	34,624	
15,625	15,812	
7,8125	8,615	

4 Kesimpulan

Tetrahydrokurkin dapat dibentuk menjadi sediaan solid lipid nanopartikel menggunakan metode emulsifikasi dimana emulsi yang terbentuk stabil selama penyimpanan 14 hari. SLN THC memiliki potensi aktivitas penghambatan enzim yang kuat secara *in vitro* dengan nilai IC₅₀ 1,1050 µg/ml.

5 Ucapan terima kasih

Penelitian ini dilakukan atas support pendanaan dari Hibah Konsorsium Covid 19, LPDP Ristek Brin

6 Kontribusi Penulis

Nurul Hidayatri sebagai pelaksana seluruh penelitian. Deni Rahmat dan Agung Eru Wibowo sebagai dosen pembimbing

7 Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan pada penelitian ini

8 Daftar Pustaka

- [1] Aisyah F et al. 2010. Efektivitas Beberapa Bahan Alam Sebagai Bahan Pemutih Kulit: Studi IN VITRO Penghambatan Aktivitas Enzim Trosinase. *Jurnal Bahan Alam Indonesia* 7(4): 219 – 220.
- [2] I Batubara et al. 2010. Potency of Indonesian Medicinal Plants as Tirosinase Inhibitor and Antioxidant Agent. *Journal Of Biology Science* (10) 2: 138 -139.
- [3] Ninin K et al. 2013. Uji Penghambatan Tirosinase Dan Stabilitas Fisik Sediaan Krim Pemutih Yang Mengandung Ekstrak Kulit Batang Nangka (*Artocarpus heterophyllus*). *Majalah Ilmu Kefarmasian* 8(2): 57 – 124.
- [4] RC Wester et al. 1998. Human in Vivo and IN VITRO Hydroquinone Topical Bioavailability, Metabolism, and Disposition. *J Toxicol Env Heal A*
- [5] Samaneh Zolghadri and Asieh Bahrami. 2018. A comprehensive review on tirosinase inhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 34:1: 279-309
- [6] Majeed Muhammad and Prakash Lakshmi. 2008. A Lighter Skin Tone and More with Natural Actives. Sabinsa Corp.
- [7] Lohani Alka, et al. 2014. Review Article Nanotechnology – Based Cosmeceuticals. *ISRN Dermatology Vol 2014*.
- [8] Su EG. 2003. An Overview on Skin Whitening, Sino Lion (USA), Ltd. Jackson, New Jersey USA.
- [9] Ferina Angelia, et al. 2019. Teknologi Nano Di Bidang Dermatologi Kosmetik. *Media Dermato-Venereologica Indonesiana* 46(2): 92-98.