

## Uji Aktivitas Inhibisi Enzim Tirosinase *In-Vitro* Krim Ekstrak Akar Manis (*Glycyrrhiza glabra* L.)

### (*In Vitro* Enzyme Tyrosinase Inhibitory Activity Test on Liquorice Root Extract Cream (*Glycyrrhiza glabra* L.))

SITI UMRAH NOOR\*, FARIDAH, PAMELA MAGDALENA

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta 12640

Diterima 5 oktober 2018, Disetujui 26 Oktober 2018

**Abstrak:** Ekstrak akar manis (*Glycyrrhiza glabra* L.) mengandung senyawa isoflavon glabridin yang berkhasiat sebagai pemutih kulit. Tujuan penelitian untuk menentukan potensi terbaik krim pemutih kulit menggunakan kontrol positif asam kojat. Diformulasi 1 formula blangko, 3 formula krim menggunakan variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% akar manis (0,01; 0,11; 1,01)% berdasarkan konsentrasi inhibisi tirosinase *in-vitro* dari ekstrak. Digunakan metode secara spektrofotometri dengan mengukur serapan dopakrom menggunakan *microplate reader* diinkubasi suhu 37 °C,  $\lambda$  490 nm, 20 menit. Krim M/A dibuat dengan mencampurkan ekstrak bersama basis bersuhu 70-75 °C, 400 rpm, 25 menit. Uji stabilitas dilakukan 4 minggu pada penyimpanan suhu kamar dan 40 °C, dievaluasi mutu fisiknya. Hasil  $IC_{50}$  asam kojat sebesar 20,88  $\mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50}$  variasi ekstrak berturut-turut sebesar (126,75; 1130,90; 10092,41)  $\mu\text{g/mL}$ . Krim berwarna putih susu-putih kekuningan; beraroma bunga; lembut; homogen; tidak terjadi pemisahan; bertipe M/A; sifat alir tiksotropik plastis; viskositas, kemampuan sebar, ukuran globul, pH semakin meningkat berturut-turut sebesar (455000- 620000)cPs, (2695,82-3545,83) $\text{mm}^2$  (54,66-66,27) $\mu\text{m}$ , (4,44-5,04); aktivitas inhibisi tirosinase formula 1, 2 dan 3, penyimpanan minggu 0, 2 dan 4 berturut-turut sebesar (1,78;-25,74;22,04)%, (6,74;6,12;4,49)%, (- 28,78;53,06;20,32)%. Dapat disimpulkan formula krim dengan konsentrasi ekstrak akar manis 1,01% merupakan formula terbaik sehingga dapat digunakan sebagai pemutih kulit.

**Kata kunci:** Ekstrak akar manis, tirosinase, *microplate reader*, krim pemutih.

**Abstract:** Liquorice root extract (*Glycyrrhiza glabra* L.) contains glabridin, an isoflavone substance that can be used as skin whitening. The study was carried out to determine the potential of the best skin whitening cream using positive control of kojic acid. Formulated 1 blank formula, 3 cream formulas using various concentrations of ethanol extract 70% liquorice roots of (0.01, 0.11, 1.01)% based on the value of tyrosinase inhibition activity *in vitro* from extracts. Spectrophotometric method is used to measure the absorption of dopacrome by a microplate reader which was incubated at 37 °C at  $\lambda$  490 nm for 20 minutes. Oil in water cream was prepared by mixing extract with cream base at a temperature of 70-75°C at a speed of 400 rpm for 25 minutes. Stability test was carried out for 4 weeks at room temperature storage and a temperature of 40 °C, evaluated for physical quality. The results of determination of  $IC_{50}$  of kojic acid was 20.88  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ;  $IC_{50}$  of extract variation were (126.75; 1130.90; and 10092.41)  $\mu\text{g/mL}$  respectively. Cream has milky white- yellowish color; smell of flowers; soft texture; homogeneous; there is no separation; has type M/A; plastic thixotropic flow properties; has an increasing value including viscosity, spreadability, globule size, and pH, which are respectively (455000-620000)cPs, (2695.82-3545.83) $\text{mm}^2$ , (54.66-66.27) $\mu\text{m}$ , and (4.44-5.04); tyrosinase inhibition activity in formula 1, 2 and 3 were stored at weeks 0, 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> were respectively (1.78;-25.74; 22.04)%, (6.74; 6, 12; 4.49)%, and (-28.78; 53.06; 20.32)%. It can be concluded that the cream formula containing liquorice root extract with a concentration of 1.01% is the best formula so it can be used as skin whitening.

**Keywords:** Liquorice root extract, tyrosinase, microplate reader, whitening cream.

\* Penulis korespondensi, Hp. 08161404198  
e-mail siti\_umrahnor@yahoo.co

## PENDAHULUAN

NODA cokelat dan warna kulit yang semakin gelap disebabkan oleh proses penuaan atau sengatan matahari. Noda cokelat pada kulit merupakan hasil pembentukan melanin yang berlebihan. Melanin merupakan pigmen warna cokelat yang dapat melindungi jaringan kulit dari penghamburan sinar ultraviolet (UV). Jika melanin diproduksi berlebihan maka terjadi hiperpigmentasi. Melanin merupakan hasil oksidasi L-tirosin menjadi L-DOPA yang secara alami dikatalis oleh enzim tirosinase dan sinar UV<sup>(1)</sup>.

Salah satu cara mencerahkan warna kulit adalah dengan menghambat pembentukan melanin melalui penghambatan enzim tirosinase. Zat pemutih bertindak sebagai penghambat produksi melanin dan dikenal sebagai inhibitor kompetitif tirosinase. Berbagai inhibitor tirosinase banyak ditemukan dalam bahan kosmetik sebagai pencegah hiperpigmentasi, diantaranya adalah asam hialuronat, arbutin, asam kojat, merkuri dan hidrokuinon. Senyawa ini memiliki daya pemutih sangat besar, namun merkuri dan hidrokuinon bersifat karsinogenik<sup>(2,3)</sup>. Berdasarkan hal tersebut diperlukan bahan alami yang memiliki daya pemutih yang sama besar atau lebih besar dari senyawa-senyawa tersebut dan aman bila digunakan.

Saat ini banyak bahan alam yang sudah diteliti sebagai zat pemutih kulit salah satunya adalah akar manis<sup>(4,6)</sup>. Akar manis (*Glycyrrhiza glabra* L.) merupakan bahan alam yang memiliki kandungan glabridin, glabrin, isoliquiritigenin licurasida, isoliquiritin, and licochalcon yang dapat menghambat produksi enzim melanin melalui penghambatan enzim tirosinase<sup>(7-10)</sup>.

Berdasarkan penelitian, telah dilakukan pembuatan ekstrak akar manis yang diekstraksi menggunakan etanol<sup>(11)</sup>. Untuk membuktikan aktivitas ekstrak akar manis sebagai zat pemutih maka dilakukan uji inhibisi tirosinase yang diperoleh nilai IC<sub>50</sub> (*Inhibitory concentration*). Dari hasil uji aktivitas, ekstrak divariasikan berdasarkan nilai IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> dan IC<sub>100</sub> dan diformulasikan dalam bentuk krim kosmetika tipe M/A<sup>(12,13)</sup>. Krim tipe M/A dipilih karena mudah dicuci, dihilangkan dari kulit dan pakaian, tidak berminyak, selain itu basis krim mengandung air dalam jumlah banyak sedangkan sel hidup biasanya lembab sehingga akan mempercepat pelepasan obat dan dapat memelihara kelembaban sel kulit<sup>(14,15)</sup>.

Emulgator dan bahan tambahan lain dalam basis krim akan menurunkan tegangan permukaan kulit sehingga absorpsi lebih cepat<sup>(16)</sup>. Krim M/A nyaman digunakan, tidak menyebabkan rasa lengket pada wajah dan memberikan dispersi obat yang baik pada permukaan kulit<sup>(16,17)</sup>. Tujuan penelitian untuk

menentukan potensi terbaik krim pemutih kulit yang mengandung ekstrak akar manis melalui uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase secara *in-vitro*.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Akar manis (*Glycyrrhiza glabra* L.), asam kojat (Thornhill, Kanada), L-DOPA (SIGMA-Aldrich, USA), Tyrosinase from Mushroom (SIGMA-Aldrich, USA), kalium dihidrogen fosfat, NaOH, sudan III, biru metilen, natrium metabisulfat (Aditya Birla), asam stearat triple press (Shanghai Fuxin, Cina), setil alkohol (BASF, Jerman), stearyl alkohol (Ecogreen, Singapura), lanolin anhidrat (Wuxi, Cina), paraffin cair (Sonneborn, Belanda), gliseril monostearat (DANISCO, Cina), polisorbitat 80 (KAO Corporation, Jepang), propilen glikol (Dow Chemical Co., Kanada), metil dan propil paraben (Ueno Fine Chemicals, Jepang), butil hidroksi toluen (Sterlitamak Petrochemical Plant, Rusia).

**Alat.** Rotary vacuum evaporator, microplate reader ELx 800, 96 well-microtiter plate, timbangan analitik (AND tipe GR 200), microbalance (Mettler MT 5), micropipette, water bath (Mettmert), viskometer (Brookfield tipe RV), lemari pendingin, oven (Mettmert), stirrer (Eurostar), pH meter (Metrohm tipe 620), alat ukur kemampuan sebar, mikroskop optik (Olympus), kaca objek, cover glass, sentrifugator (Kokusan H 103-N).

**METODE. Penyediaan Bahan Penelitian.** Bahan utama yang digunakan adalah akar manis yang diperoleh dari Herbaltama-Jogjakarta.

**Pembuatan Ekstrak Akar Manis.** Akar manis dibersihkan, dikeringkan dengan cara dijemur langsung di bawah sinar matahari pagi, dihaluskan sampai berupa serbuk dengan ukuran 4/18. Sebanyak kurang lebih 1 kg akar manis, direndam dengan etanol 96% sebanyak 10 liter, diaduk selama 4 jam lalu biarkan terendam selama 24 jam. Untuk memisahkan ampas, filtrat disaring. Ampas diremaserasi, disaring kembali sampai diperoleh filtrat yang jernih tidak berwarna, diuapkan dengan menggunakan penguap putar vakum (*rotary vacuum evaporator*) pada suhu  $\pm 50$  °C, tekanan 100mmHg, dan kecepatan 70 rpm sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang, dikemas dan disimpan pada lemari pendingin<sup>(11)</sup>.

**Karakterisasi Ekstrak Akar Manis.** Karakterisasi akar manis meliputi pemeriksaan rendemen ekstrak, organoleptic, pH dan ketercampuran dengan pelarut. Pemeriksaan organoleptic meliputi warna, bau dan rasa. Dilakukan pemeriksaan ketercampuran ekstrak akar manis dengan air, propilen glikol, larutan dapar fosfat dan DMSO 1%.

### Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase Secara *In Vitro*. Penyiapan Bahan Kimia.

1). Pembuatan dapar fosfat 0,1 M dengan pH sebesar 6,8. Kalium dihidrogen fosfat (BM: 136,09) ditimbang seksama sebanyak 1,3609 gram, kemudian dilarutkan dengan aquadest 100 mL. Larutan tersebut ditambahkan larutan NaOH 0,2 N sebanyak 22,4 mL dan ditambahkan akuades hingga mencapai 200 mL; 2). Pembuatan larutan substrat L-DOPA. L-DOPA (BM: 197,19) ditimbang seksama sebanyak 39,438 mg, kemudian dilarutkan dengan larutan dapar fosfat (0,1 M, pH=6,8) dalam labu tentukur sampai 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi 20 mM. Dibuat juga seri konsentrasi 10; 5; 2,5; 1,25; dan 0,625 mM. Pada saat preparasi hingga uji penghambatan tirosinase dilakukan, larutan ini dihindarkan dari cahaya dengan cara menutup vial dengan alumunium foil; 3). Pembuatan larutan tirosinase. Tirosinase ditimbang seksama sebanyak 0,0859 mg kemudian dilarutkan dengan larutan dapar fosfat dalam labu ukur 10,0 mL sehingga didapatkan konsentrasi 496 U/mL. Larutan tersebut diencerkan sehingga mencapai konsentrasi 310, 155, dan 75 U/mL. Pada saat preparasi hingga uji penghambatan tirosinase dilakukan, larutan ini dihindarkan dari cahaya dengan cara menutup vial dengan alumunium foil<sup>(9)</sup>.

**Uji Pendahuluan.** 1) optimasi panjang gelombang maksimum. Sebanyak 120 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan L-DOPA 5 mM, dan 40 µL larutan enzim tirosinase 310 U/mL dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Larutan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* ELx 800 pada panjang gelombang 405, 450, 490 dan 630 nm; 2). Optimasi waktu inkubasi. Sebanyak 120 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan L-DOPA 5 mM, dan 40 µL larutan enzim tirosinase 310, 155 dan 75 U/mL dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Larutan diinkubasi selama 10,20, 30 dan 40 menit pada suhu 37°C. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* ELx 800 pada panjang gelombang maksimum; 3. Optimasi konsentrasi enzim tirosinase. Sebanyak 120 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase 310 U/mL dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Masing- masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Konsentrasi substrat dibuat dua macam yaitu 10,5 dan 2,5 mM yang kemudian masing- masing konsentrasi ditambahkan ke dalam larutan enzim konsentrasi 310, 155, dan 75 U/mL. Larutan diinkubasi selama waktu optimum pada suhu 37 °C. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* ELx 800 pada panjang gelombang maksimum.

4). Optimasi konsentrasi substrat L-DOPA. Sebanyak 120 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase 310 U/mL dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Masing- masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Konsentrasi substrat dibuat enam macam yaitu 20; 10; 5; 2,5; 1,25 dan 0,625 mM yang kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan ke dalam larutan enzim dengan konsentrasi optimum. Larutan diinkubasi selama waktu optimum pada suhu 37 °C. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* ELx 800 pada panjang gelombang maksimum.

**Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase ( $IC_{50}$ ) dari Baku Pembanding Asam Kojat.** Pembuatan larutan sampel asam kojat sebagai kontrol positif. Serbuk asam kojat ditimbang seksama 5 mg dan dilarutkan dengan larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8) dalam labu ukur 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi 500 µg/mL. Kemudian larutan dipipet 2,0 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8). Kemudian larutan asam kojat diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan asam kojat 50; 20; 10; 5 dan 2,5 µg/mL.

Pengujian larutan sampel asam kojat sebagai kontrol positif. Sejumlah 80 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan asam kojat, 40 µL larutan L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase dengan konsentrasi optimum dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Masing-masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Pengujian juga dilakukan terhadap larutan kontrol dan blanko kontrol. Larutan kontrol terdiri dari 120 µL LDF, 40 µL L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase sedangkan larutan blanko kontrol terdiri dari bahan yang sama dengan kontrol tanpa enzim. Larutan diinkubasi selama waktu optimum pada suhu 37 °C. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* ELx 800 pada panjang gelombang maksimum.

**Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase ( $IC_{50}$ ) Ekstrak Akar Manis. Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Akar Manis.** Ekstrak akar manis ditimbang sejumlah 200 mg dan dilarutkan dengan larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8) dalam labu ukur 10,0 mL. Kemudian larutan ekstrak diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak akar manis 4000, 2000, 1000, 500, 200, 100, 50 dan 25 µg/mL.

**Pengujian Larutan Sampel Ekstrak Akar Manis.** Sejumlah 80 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan ekstrak, 40 µL larutan L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase dengan konsentrasi optimum dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Masing-masing sampel dibuat blanko di mana

tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Pengujian juga dilakukan terhadap larutan kontrol dan blangko kontrol. Larutan kontrol terdiri dari 40  $\mu$ L DMSO 1%, 80  $\mu$ L LDF, 40  $\mu$ L L-DOPA, dan 40  $\mu$ L sedangkan larutan blangko kontrol terdiri dari bahan yang sama dengan kontrol tanpa enzim. Larutan diinkubasi selama waktu optimum pada suhu 37 °C. Serapan diukur menggunakan microplate reader ELx 800 pada panjang gelombang maksimum.

Pemeriksaan bahan tambahan. Pemeriksaan bahan tambahan sediaan krim meliputi natrium metabisulfit, asam stearat, setil alkohol, stearyl alkohol, lanolin anhidrat, paraffin cair, gliseril monostearat, polisorbat 80, propilen glikol, metil paraben, propil paraben, butil hidroksi toluen, asam sitrat, air suling dan parfum dilakukan pemeriksaan berdasarkan monografi masing-masing bahan

Formula sediaan krim. Komponen sediaan krim terdiri dari ekstrak akar manis, Na. metabisulfit, asam stearat, setil alkohol, stearyl alkohol, lanolin anhidrat, paraffin cair, gliseril monostearat, metil paraben, propil paraben, butil hidroksi toluene, polisorbat 80, propilen glikol, pewangi, dan aquadestilata<sup>(14)</sup>.

Cara pembuatan sediaan krim. a). Fase minyak: asam stearat, setil alkohol, stearyl alkohol, lanolin anhidrat, paraffin cair, gliseril monostearat dilebur di atas tangas air pada suhu 70-75 °C. Kemudian ditambahkan antioksidan butil hidroksi toluen dan diaduk sampai larut. b). Metil paraben dan propil paraben dilarutkan dalam propilen glikol. c). Fase air: polisorbat 80, larutan metil paraben dan propil paraben dalam propilen glikol, aquadest suhu 70-75 °C dicampurkan lalu suhu dijaga 70-75 °C di atas penangas air. d). Basis krim dibuat dengan cara fase air dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam fase minyak kemudian dihomogenkan dengan *stirrer* pada kecepatan dan waktu optimum. Pencampuran dilakukan pada suhu 70-75°C. e). Ekstrak akar manis dicampurkan dengan sisa propilen glikol untuk melarutkan glabridin kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam basis krim dalam keadaan hangat ( $\pm 50$  °C) kemudian diaduk dengan *stirrer* pada kecepatan dan waktu optimum hingga homogen. f). Parfum ditambahkan ke dalam sediaan pada suhu hangat ( $\pm 40$  °C) kemudian diaduk dengan *stirrer* pada kecepatan dan waktu optimum hingga homogen<sup>(14)</sup>.

Uji stabilitas krim. Uji stabilitas dilakukan terhadap empat formula krim ekstrak akar manis yang diformulasikan yaitu formula blangko, formula 1, 2 dan 3 selama empat minggu. Setiap formula dilakukan replikasi sebanyak dua kali. Perbedaan dari keempat formula tersebut terdapat pada variasi konsentrasi ekstrak. Uji stabilitas krim ekstrak akar manis meliputi organoleptik, homogenitas krim, tipe krim, viskositas

dan sifat alir, kemampuan menyebar, ukuran partikel dan pH<sup>(16)</sup>.

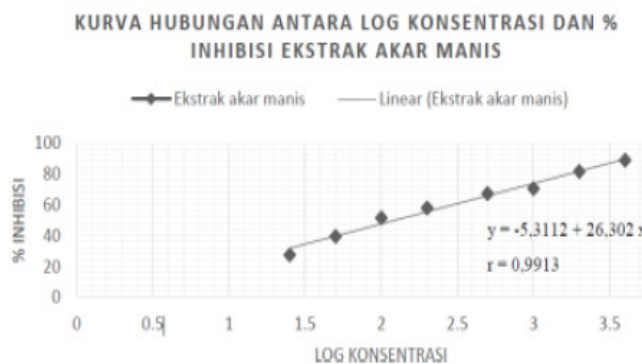
## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Hasil Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase pada Ekstrak Akar Manis secara *In Vitro*.** Inhibisi tirosinase secara *in vitro* dilakukan berdasarkan pengukuran senyawa berwarna jingga yaitu *dopakrom* yang merupakan hasil oksidasi L-DOPA oleh tirosinase. Adanya inhibitor menyebabkan produksi *dopakrom* menurun yang ditandai dengan penurunan intensitas warna jingga. Berdasarkan teori *lock and key*, enzim hanya dapat berikatan dengan substrat spesifik sehingga substrat yang digunakan harus tepat karena akan mempengaruhi hasil reaksi. Terdapat dua substrat yang berperan dalam reaksi pembentukan *dopakrom* yaitu L- tirosin dan L-DOPA.

Berdasarkan reaksi, bila digunakan substrat L-tirosin maka akan dihasilkan dua produk, L-DOPA dan *dopakrom*. Nilai serapan *dopakrom* dapat diukur dengan metode spektrofotometri sedangkan L-DOPA tidak dapat diukur dengan metode spektrofotometri pada  $\lambda$  490 nm. Pada penelitian substrat yang dipilih adalah L- DOPA karena berdasarkan reaksi, dihasilkan produk *dopakrom* dimana nilai serapan dapat diukur dengan metode spektrofotometri UV-VIS. Seluruh proses ini melibatkan reaksi enzimatik dimana semua reaksi berjalan pada kondisi optimum. Semua pengujian diukur dengan alat *microplate reader* ELX 800 dan diinkubasi pada suhu 37 °C karena merupakan suhu optimum bagi kerja enzim tirosinase.

Pada uji aktivitas inhibisi dilakukan pengukuran terhadap 4 larutan yaitu kontrol, blangko kontrol, sampel dan blangko sampel. Larutan kontrol dibuat sebagai pembanding nilai serapan antara tanpa adanya senyawa penghambat dan dengan senyawa penghambat. Blangko kontrol maupun blangko sampel digunakan sebagai factor koreksi. Dalam preparasi sampel ekstrak akar manis, ekstrak dilarutkan dengan pelarut DMSO 1%. Sehubungan dengan hal tersebut, larutan kontrol dan blangko kontrol juga harus ditambahkan DMSO 1% agar tidak mempengaruhi nilai  $IC_{50}$ .

Hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase ekstrak akar manis secara *in vitro* disajikan pada Gambar 1. Pengukuran  $IC_{50}$  dari ekstrak akar manis dilakukan dengan membuat seri konsentrasi ekstrak akar manis 4000, 2000, 1000, 500, 200, 100, 50 dan 25 ppm. Seri konsentrasi ini akan digunakan untuk membuat persamaan linear untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  ekstrak. Dari hasil diperoleh nilai  $IC_{50}$  ekstrak akar manis 126,7548  $\mu$ g/mL. Nilai  $IC_{50}$  ini akan digunakan dalam formulasi sediaan krim. Dari hasil



Gambar 1. Grafik hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase ekstrak akar manis.



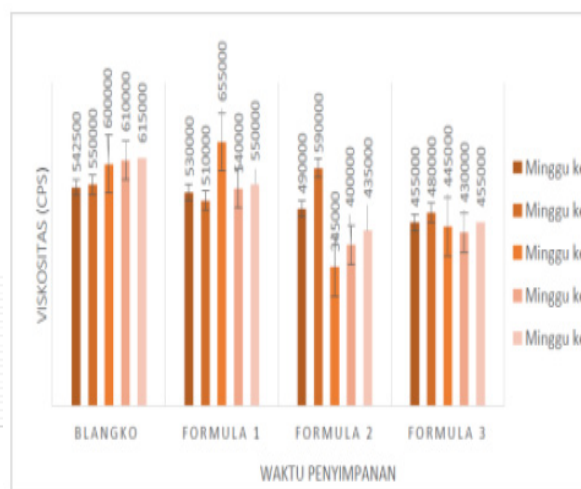
Gambar 2. Grafik hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase asam kojat.

diperoleh nilai IC<sub>50</sub> ekstrak akar manis lebih besar dibanding asam kojat. Hal ini disebabkan karena dalam pengujian digunakan *crude extract* yang dapat mengganggu aktivitas inhibisi tirosinase.

**Hasil Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase pada Asam Kojat secara *in vitro*.** Asam kojat digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan senyawa inhibitor tirosinase yang sering digunakan pada sediaan kosmetik dan asam kojat menghambat enzim tirosinase secara nonkompetitif. Pada uji aktivitas dilakukan pengukuran terhadap 4 larutan yaitu kontrol, blangko kontrol, sampel dan blangko sampel. Larutan kontrol dibuat sebagai pembanding antara nilai serapan tanpa adanya senyawa penghambat dan dengan senyawa penghambat. Blangko kontrol maupun blangko sampel digunakan sebagai faktor koreksi. Pengukuran IC<sub>50</sub> dari larutan sampel asam kojat dilakukan pada lima seri konsentrasi yaitu 50; 20; 10; 5 dan 2,5 µg/mL. Seri konsentrasi ini akan digunakan untuk membuat persamaan linear untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub>. Dari hasil diperoleh nilai IC<sub>50</sub> asam kojat 20,8815 µg/mL. Hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase pada asam kojat secara *in vitro* disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 2.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase asam kojat.

Zat uji	Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas inhibisi (%)	Persamaan regresi	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Asam Kojat	50	70,2663	y = -9,4054 + 45,0122 x r = 0,9927	20,8815
	20	45,8580		
	10	33,1361		
	5	23,0769		
	2,5	10,0592		



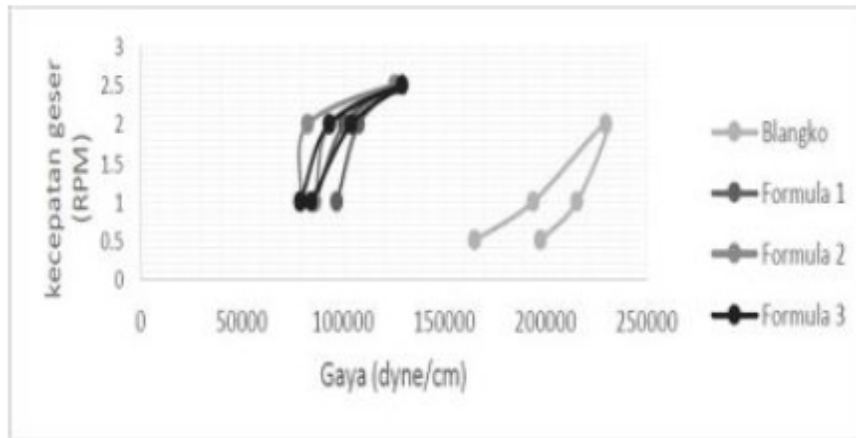
Gambar 3. Grafik hubungan viskositas terhadap waktu pada penyimpanan suhu 40°C selama 4 minggu.

**Hasil Uji Stabilitas Organoleptik Krim.** Dari hasil uji organoleptik diperoleh formula blangko dan formula 1, 2, 3 pada penyimpanan selama satu bulan pada suhu kamar dan 40 °C tidak mengalami perubahan warna dan bau, sehingga dapat dikatakan bahwa krim ekstrak akar manis stabil.

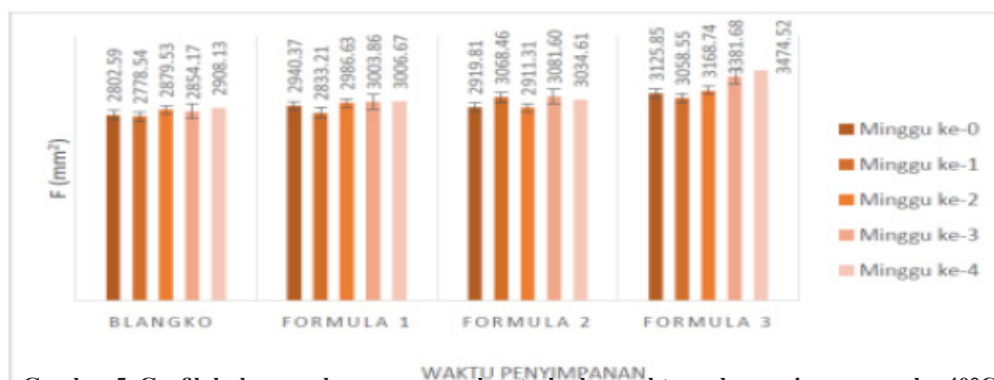
**Hasil Uji Stabilitas Homogenitas Krim.** Berdasarkan hasil uji homogenitas krim pada formula blangko, formula 1, 2 dan 3, krim tetap homogen setelah disimpan selama satu bulan pada suhu kamar dan 40°C.

**Hasil Uji Stabilitas Tipe Krim.** Berdasarkan hasil uji tipe krim pada formula blangko, formula 1, 2 dan 3, krim tidak mengalami inversi fase setelah disimpan selama empat minggu pada suhu kamar dan 40°C yaitu krim ekstrak akar manis memiliki tipe minyak dalam air.

**Hasil Uji Stabilitas Viskositas dan Sifat alir Krim.** Berdasarkan Gambar 3, formula yang mengandung ekstrak memiliki nilai viskositas yang lebih rendah dibandingkan dengan formula tanpa ekstrak dan viskositas menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Suhu penyimpanan mempengaruhi viskositas. Viskositas pada suhu



Gambar 4. Rheogram sifat alir krim.



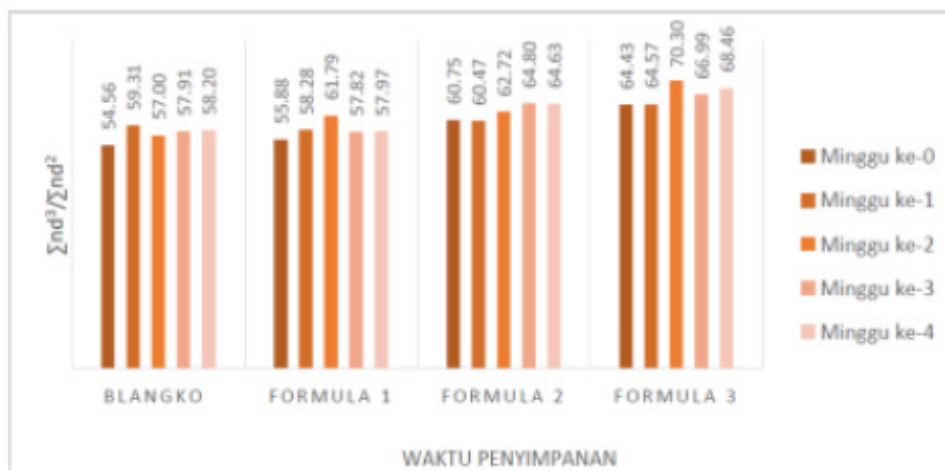
Gambar 5. Grafik hubungan kemampuan sebar terhadap waktu pada penyimpanan suhu 40°C.

kamar cenderung lebih tinggi dibandingkan pada suhu 40 °C karena kenaikan temperatur menyebabkan kenaikan fluiditas yang merupakan kebalikan dari viskositas. Formula 3 yang disimpan selama 4 minggu pada suhu kamar memiliki viskositas yang cenderung meningkat tetapi bila disimpan pada suhu 40 °C memiliki viskositas yang cenderung stabil. Berdasarkan hasil analisa statistik ANOVA 2 arah dengan asas kepercayaan 5%, diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara formula dan waktu terhadap viskositas.

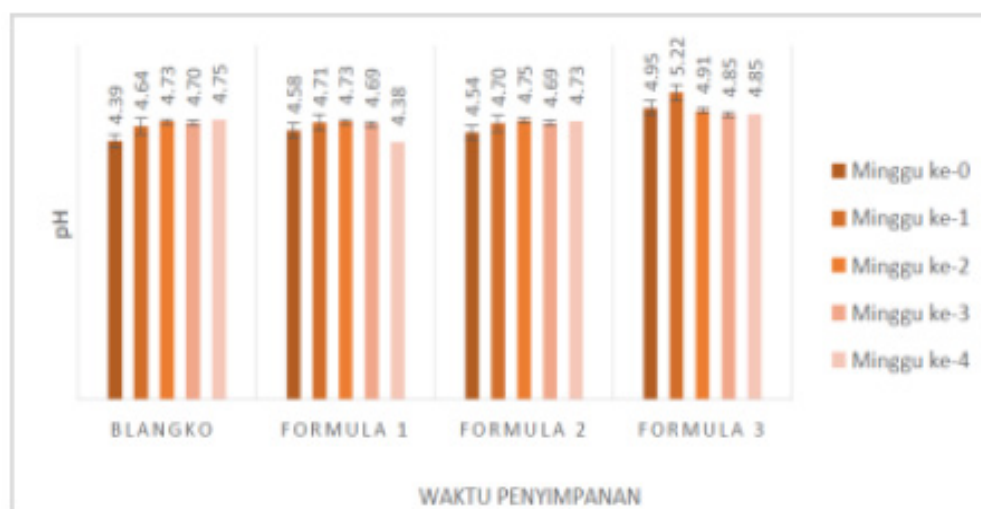
Pada Gambar 4 formula 1, 2, 3 diperoleh sifat alir tiksotropi plastis, dan formula blangko diperoleh sifat alir tiksotropi pseudoplastis dimana kurva menurun terdapat di sebelah kiri kurva menaik. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada setiap harga kecepatan geser menurun, formula ini memiliki viskositas yang lebih rendah dibandingkan kurva menaik. Pada tiksotropik pseudoplastis yaitu menunjukkan bentuk kurva menurun terdapat di sebelah kiri kurva menaik yang menunjukkan bahwa krim memiliki konsistensi yang lebih rendah pada setiap harga kecepatan geser yang menurun dibandingkan dengan kurva menaik. Tiksotropi dapat didefinisikan sebagai pemulihan yang isotherm dan lambat pada pendiaman suatu bahan yang kehilangan konsistensinya karena *shearing*. Sifat

alir tiksotropi merupakan sifat alir yang diinginkan dalam suatu sistem farmasetis, terutama dalam sediaan krim karena memiliki keuntungan daya penetrasi yang baik jika diaplikasikan ke kulit, dapat dengan mudah tersebar, dan mempunyai konsistensi dalam wadah. Kurva aliran plastis tidak melalui titik (0, 0) tapi memotong sumbu *shearing stress* jika bagian lurus dari kurva diekstrapolasikan ke sumbu pada suatu titik tertentu (*yield value*). Pada grafik dapat dilihat bahwa kurva menurun memiliki tahanan geser (gaya) yang lebih kecil dari kurva menaik karena pada awal pengukuran dibutuhkan tahanan geser yang lebih besar untuk memecah globul-globul yang bersatu selama pendiaman.

**Hasil Uji Stabilitas Kemampuan Sebar Krim.** Pada Gambar 5, disajikan hasil evaluasi kemampuan sebar krim yang menunjukkan formula blangko, formula 1, 2, 3 memiliki nilai kemampuan menyebar berturut-turut sebesar (2693,77; 2733,37; 2963,85; 3086,70)mm<sup>2</sup> pada penyimpanan suhu kamar dan (2908,13; 3006,67; 3034,61; 3474,52) mm<sup>2</sup> pada penyimpanan suhu 40 °C. Berdasarkan hasil tersebut, formula yang mengandung ekstrak memiliki nilai kemampuan menyebar yang lebih besar dibandingkan dengan formula tanpa ekstrak dan kemampuan menyebar semakin meningkat seiring



Gambar 6. Grafik hubungan ukuran globul terhadap waktu pada penyimpanan suhu 40°C.



Gambar 7. Grafik hubungan pH terhadap waktu pada penyimpanan suhu 40 °C.

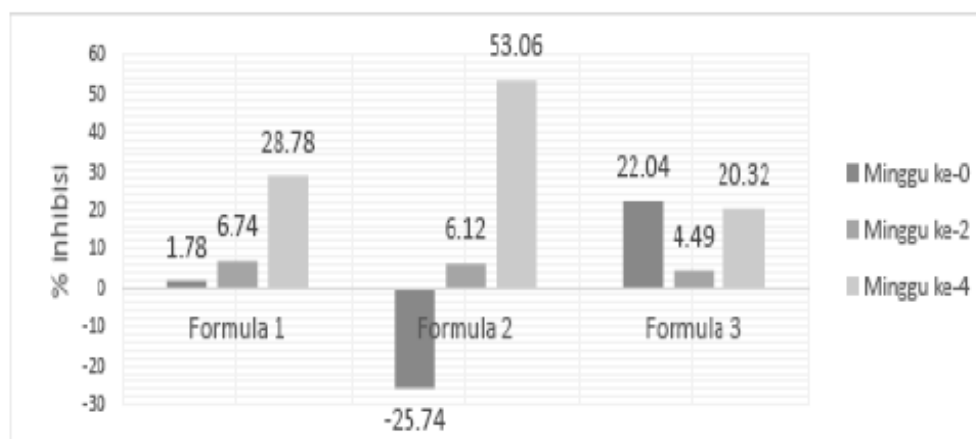
dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hal ini disebabkan karena konsentrasi ekstrak akar manis yang semakin meningkat dapat menurunkan viskositas sehingga nilai kemampuan menyebar semakin besar. Berdasarkan hasil analisa statistik ANOVA 2 arah dengan asas kepercayaan 5%, diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara formula terhadap kemampuan menyebar pada suhu kamar dan suhu 40 °C dan tidak terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap kemampuan menyebar pada suhu kamar namun terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap kemampuan menyebar pada suhu 40 °C. Pada suhu kamar, waktu tidak mempengaruhi kemampuan menyebar namun pada suhu 40 °C, waktu mempengaruhi kemampuan menyebar.

#### Hasil Uji Stabilitas Ukuran Globul Krim.

Pada Gambar 6 disajikan hasil evaluasi ukuran globul yang menunjukkan formula blangko, formula 1, 2, 3 memiliki ukuran globul berturut-turut sebesar (51,28;

58,33; 62,11; 62,51) $\mu\text{m}$  pada penyimpanan suhu kamar dan (58,2; 61,79; 64,63; 68,46) $\mu\text{m}$  pada penyimpanan suhu 40 °C. Berdasarkan hasil tersebut, formula yang mengandung ekstrak memiliki nilai ukuran globul yang lebih besar dibandingkan dengan formula tanpa ekstrak dan ukuran globul semakin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hal ini disebabkan karena konsentrasi ekstrak akar manis yang semakin meningkat dapat menurunkan viskositas sehingga ukuran globul semakin besar. Berdasarkan hasil analisa statistik ANOVA 2 arah dengan asas kepercayaan 5%, diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara formula terhadap ukuran globul pada suhu kamar dan suhu 40 °C dan tidak terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap ukuran globul pada suhu kamar namun terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap ukuran globul pada suhu 40 °C.

**Hasil Uji Stabilitas Sentrifugasi Krim.** Hasil evaluasi sentrifugasi menunjukkan bahwa tidak terjadi



Gambar 8. Hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase krim ekstrak akar manis pada minggu ke-0, minggu ke-2 dan minggu ke-4.

pemisahan pada formula blangko, formula 1, 2 dan 3 setelah disimpan selama satu bulan pada suhu kamar dan 40 °C. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa krim stabil.

**Hasil Uji Stabilitas pH Krim.** Pada Gambar 7 disajikan hasil evaluasi pH yang menunjukkan formula blangko, formula 1, 2, 3 memiliki pH berturut-turut sebesar (4,89; 4,93; 4,77; 5,04) pada penyimpanan suhu kamar dan (4,75; 4,73; 4,75; 4,85) pada penyimpanan suhu 40 °C. Berdasarkan hasil tersebut, formula yang mengandung ekstrak memiliki nilai pH yang lebih besar dibandingkan dengan formula tanpa ekstrak dan pH semakin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hal ini disebabkan karena konsentrasi ekstrak akar manis memiliki pH 4,63–5,07 sehingga akan meningkatkan pH krim ketika ekstrak dicampurkan ke dalam basis krim. Ekstrak akar manis mengandung senyawa polifenol dan saponin yang mengandung banyak gugus OH<sup>-</sup> sehingga menyebabkan pH sediaan cenderung meningkat. Berdasarkan hasil analisa ANOVA 2 arah dengan asas kepercayaan 5%, diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara formula terhadap pH pada suhu kamar dan suhu 40 °C dan tidak terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap kemampuan menyebar pada suhu 40 °C namun terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap pH pada suhu kamar. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa pada suhu yang lebih tinggi tidak mempengaruhi pH krim.

**Hasil Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase** pada krim ekstrak akar manis secara *in vitro*. Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak akar manis terbukti memiliki aktivitas inhibisi tirosinase dengan dengan konsentrasi 0,01% mempunyai nilai IC<sub>50</sub> sebesar 126,7548 ppm, dengan konsentrasi 0,11% sebesar 1130,9036 ppm dan dengan konsentrasi 1,01% sebesar 10092,4050 ppm. Untuk mengetahui apakah krim akar manis memiliki

aktivitas sebagai pemutih kulit, maka dilakukan uji inhibisi tirosinase terhadap sediaan krim. Uji inhibisi tirosinase secara *in vitro* dilakukan berdasarkan pengukuran senyawa berwarna jingga yaitu dopakrom yang merupakan hasil oksidase L- DOPA oleh tirosinase. Pengukuran dilakukan pada setiap formula pada minggu ke 0, 2 dan 4. Dilakukan pula pengukuran pada kontrol dan blangko kontrol. Pada kontrol dan blangko kontrol terdapat larutan krim blangko, hal ini bertujuan untuk menghindari pengaruh bahan tambahan yang terdapat dalam formula krim. Bahan tambahan seperti antioksidan BHT dapat bereaksi dan menghambat aktivitas tirosinase sehingga akan mempengaruhi hasil pengujian. Pada preparasi sampel, larutan krim diekstraksi dengan etanol 96% lalu disentrifugasi pada kecepatan 3800 rpm selama 15 menit agar supernatan terpisah. Supernatan diambil, serapannya diukur diukur dengan alat *microplate reader* ELX 800 dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit pada panjang gelombang 490 nm. Hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase pada krim ekstrak akar manis secara *in vitro* disajikan pada Gambar 8.

Pada Gambar 8 disajikan bahwa hasil % inhibisi formula 1, 2, 3 pada minggu ke 0, ke 2 dan ke 4 berturut-turut sebesar (1,78; -25,4; 22,04)%; (6,74; 6,12; 4,49)%; dan (-28,78; 53,06; 20,32)%. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh hasil inhibisi krim ekstrak akar manis yang menurun. Hal ini disebabkan karena ekstrak akar manis mengandung senyawa glikosida, saponin, tannin dan flavonoid yang memiliki stabilitas yang berbeda. Adanya efek sinergis antara total flavonoid dan total polifenol dapat mempengaruhi aktivitas krim dalam penghambatan enzim tirosinase. Pada *Crude extract* terdapat konstituen lain seperti senyawa flavon yang dapat menginduksi melanogenesis sehingga dapat menghambat aktivitas inhibisi tirosinase. Berdasarkan hasil tersebut, Formula 3 merupakan formula terbaik



karena mempunyai persentase inhibisi tertinggi (53,06%) yang disimpan selama 2 minggu.

### SIMPULAN

Ekstrak akar manis yang mengandung glabridin memiliki potensi sebagai pemutih melalui uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase *in-vitro* dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 126,7548 µg/mL. Ekstrak akar manis dengan variasi konsentrasi 0,01%, 0,11%, dan 1,01% dapat diformulasikan ke dalam sediaan krim tipe M/A yang memenuhi parameter mutu fisik. Formula 3 dengan konsentrasi ekstrak 1,01% merupakan formula terbaik. Krim yang diperoleh diperoleh homogen, berwarna putih kekuningan, memiliki aroma bunga dengan tekstur yang sangat lembut bertipe M/A, sifat alir tiksotropi plastis dengan viskositas 520000 cPs, kemampuan sebar 3086,70 mm<sup>2</sup>, ukuran globul 62,51 µm dan pH 5,04 serta memiliki aktivitas inhibisi tirosinase sebesar 20,32% setelah disimpan selama 4 minggu.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Saag KG, Choi H. Epidemiology, risk factors and Heinrich M, Barnes J, Gibbons S., Williamson EM. Farmakognosi dan fitoterapi. Diterjemahkan oleh Hadinata AH. Jakarta: Penerbit buku kedokteran: EGC; 2005. h. 230
2. Jennifer C, Stephie CM. A review on skin whitening property of plant extracts. Bangalore. Int J. Pharm Bio Sci. 2012.3(4):332 – 47.
3. Zuidhoff HW and Van Rijsbergen JM. Whitening efficacy of frequently used whitening ingredients. C&T. 2001.116(1): 53-9.
4. Hosseinzadeh H., Nassiri M. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza sp.* and its bioactive compounds. Wiley InterScience. 2008.22: p. 709–24.
5. Vispute S, Khopade A. *Glycyrrhiza glabra* Linn IJPBS. 2011.2: p. 43.
6. Zadeh JB, Kor ZM, Gofar MK. Licorice (*Glycyrrhiza glabra* Linn) As a valuable medicinal plant. International Journal of Advance Biological and Biomedical Research. 2013.1(10):1281-8.
7. Tian M., Yan H., Row KH. Extraction of *Glycyrrhizic acid* and glabridin from Licorice. International Journal of Molecular Sciences. ISSN 1422-0067. 2008.
8. Zongping Z. Isolation and structural elucidation of tyrosinase inhibitors from five plant extracts [thesis]. Hongkong: The University of Hongkong; 2011.
9. Chang, T.S. An updated review of tyrosinase inhibitors. Department of Biological Science and Technology. National University Tainan Taiwan; 2009.
10. Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T, et al. Potency of Indonesian medicinal plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. J. Bio. Sci. 2010.10(2): 138-44.
11. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat. Jakarta. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 2000. h. 5,10-11.
12. Barel AO, Poye M, Maibach HI. Handbook of cosmetic science and technology. New York: Marcel Dekker, Inc; 2002.
13. Harry RG. Stability modern cosmeticology. Edisi VIII. New York: Chemical Publishing Co, Inc; 2000.
14. Ansel HC. Pengantar bentuk sediaan farmasi. Edisi keempat. Diterjemahkan oleh: Ibrahim F. Jakarta: UI Press; 2008: h.376-89.
15. Rowe C, Sheskey J, Quinn E. Handbook of pharmaceutical excipients sixth Edition. London: American Pharmaceutical Association; 2009. p. 75, 155, 283, 290-91, 378-9, 441-2, 445-6, 549-52, 592, 596, 766.
16. Sinko PJ. Farmasi fisik dan ilmu farmasetika martin, edisi kelima. Diterjemahkan oleh Djajadisastra J. dari Martin's physical pharmacy and pharmaceutical science. Jakarta: UI Press; 2011.
17. The Department of Health of Great Britain. British phamacoepia. London: The Stationary Office; 2009. p. A27, 962, 1334, 1557, 1658, 1729-30, 1922, 1942, 2154.