

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Produk pemutih kulit yang digunakan mengandung beberapa zat aktif. Zat aktif yang ditambahkan ke dalam formula kosmetik harus dibawah pengawasan dermatologis. Zat aktif yang ditambahkan tersebut dapat berupa zat alami atau sintetis dan mempunyai mekanisme kerja yang berbeda dalam melanogenesis. Zat yang bersifat sebagai pemutih kulit yang sering disebut *whitening agent*, umumnya bersifat menghambat kerja enzim tirosinase, dimana enzim ini berfungsi membentuk pigmen melanin di kulit, zat aktif yang ditambahkan seperti hidrokuinon, arbutin, asam kojik dan sebagainya. Disamping *whitening agent*, ada pula yang disebut dengan *lightening agent* dan *brightening agent* dimana mempunyai beberapa mekanisme yaitu dapat mencerahkan kulit tetapi tidak mengubah warna kulit secara signifikan seperti vitamin C dan dapat mengangkat sel kulit mati seperti asam salisilat. Baik *whitening agent*, *lightening agent* dan *brightening agent*, semuanya sering disebut dengan *depigmenting agent* atau zat yang dapat mengurangi warna gelap pada kulit (Burger, *et.al.*, 2016 dan Ogbechie-godec & Elbuluk, 2017).

Penggunaan *depigmenting agent* secara klinis menunjukkan tingkat keberhasilan yang berbeda. Saat ini penggunaan secara topikal yang efektif menggunakan tiga kombinasi *depigmenting agent* yang mengandung hidrokuinon, tretinoin dan fluosinolon asetonid. Namun penggunaan tiga kombinasi tersebut dikaitkan dengan frekuensi efek samping yang relatif tinggi, oleh karena itu adanya

kebutuhan untuk menemukan *depigmenting agent* yang efektif dengan efek samping yang minimal untuk penggunaan topikal (Shin & Park, 2014).

Radiasi sinar ultraviolet (UV) yang terus menerus merupakan salah satu sebab terjadinya melanogenesis yang dapat menimbulkan hiperpigmentasi, untuk itu perlu adanya perlindungan pada kulit manusia. Aplikasi tabir surya topikal merupakan salah satu strategi untuk melindungi efek buruk dari radiasi sinar UV pada kulit (Saewan & Jimtaisong, 2013). Akumulasi jumlah melanin abnormal pada bagian kulit, khususnya pada wajah, menimbulkan hiperpigmentasi yang dapat menimbulkan masalah pada penampilan atau estetika kulit wajah. Untuk menghindari hiperpigmentasi tersebut digunakan kosmetika yang mengandung *depigmenting agent* (Solano, *et.al.*, 2006).

Radiasi UV menyebabkan dimulainya proses melanogenesis menghasilkan melanin. Melanin merupakan polimer biologis homogen yang terdapat pada lapisan kulit, dimana monomer utamanya adalah *eumelanin* dan *pheomelanin*. Karakter bio-radikal dan kerentanannya terhadap radiasi sinar UV membuat melanin menjadi suatu fotoprotektor alami kulit terhadap kerusakan yang disebabkan radiasi sinar UV. Radiasi UV yang menyebabkan kerusakan pada kulit dimana sinar UV yang diabsorpsi akan membentuk *reactive oxygen species* (ROS), suatu radikal bebas yang terdapat pada kulit (Berman & Cockerell, 2013). Melanin (terutama *eumelanin*) merupakan satu-satunya perlindungan sinar UV alami pada kulit dengan menghilangkan efek radikal bebas, tetapi akibat yang dihasilkannya membentuk kulit berwarna kecoklatan. Apabila pembentukan melanin tidak merata pada kulit akan menimbulkan flek atau bercak hitam pada kulit (Herrling, *et.al*, 2007 dan Mujahid *et al.*, 2017).

*Depigmenting agent* secara umum mempunyai mekanisme kerja menghambat pembentukan melanin dengan cara inhibisi tirosinase termasuk penghambatan pematangan dan peningkatan degradasinya, down-regulasi aktivitas MC1R, penghambatan MITF, gangguan pada proses pematangan dan transfer melanosom serta penurunan melanosit. Terhambatnya aktifitas MITF oleh *depigmenting agent* akan menginhibisi kerja enzim TYR, TRP-1 dan TRP-2 sehingga laju proses melanogenesis juga dapat dihambat (Ando, 2017 dan Hsiao & Fisher, 2014) .

*Depigmenting agent* yang digunakan dapat berasal dari bahan sintetis atau bahan alam. *Depigmenting agent* sintetis yang sering digunakan adalah hidrokuinon dan turunannya, asam retinoat, asam alfa dan beta-hidroksi, asam askorbat, asam kojik, dan asam azelat. *Depigmenting agent* dari bahan alam biasanya berupa ekstrak herbal atau senyawa fitokimia. Beberapa penelitian mengenai efektifitas *depigmenting agent* yang berasal dari bahan sintetis seperti hidrokuinon, menunjukkan efek samping yang membahayakan seperti iritasi, eritema dan rasa terbakar bila digunakan pada konsentrasi diatas 4% serta bila digunakan terus menerus dengan kadar dibawah 2% dapat terjadi leukoderma kontak dan okronosis eksogen, sehingga menyebabkan pelarangan atau penggunaannya yang terbatas pada beberapa negara (Burger, *et.al.*, 2016 dan Couteau & Coiffard, 2016).

Penggunaan hidrokuinon telah dilarang pada beberapa negara di Amerika dan Eropa, tetapi penggunaannya pada negara di Asia seperti Jepang masih bisa dengan batas konsentrasi tertentu. Keamanan penggunaan kosmetik yang mengandung hidrokuinon pada ibu hamil mempunyai kategori C (manfaat dari penggunaan pada wanita hamil dapat diterima walaupun ada potensi risikonya), hal

ini berdasarkan tidak adanya penelitian penggunaan hidrokuinon langsung pada manusia, namun mempunyai efek samping yang dapat diamati pada sistem reproduksi hewan percobaan (Matsumoto *et al.*, 2016). Penelitian mengenai hidrokuinon sebagai *depigmenting agent* mempunyai efek inhibisi melanogenesis dimana enzim tirosinase mengoksidasi hidrokuinon dan menghasilkan benzokinin yang dapat menimbulkan toksik terhadap sel melanosit sehingga dapat menimbulkan leukoderma kontak (Palumbo *et.al.*, 1991).

Penelitian *depigmenting agent* yang lebih aman dan lebih efektif terus dilakukan, sejumlah *depigmenting agent* berasal dari isolasi tanaman, jamur, bakteri dan alga (Masaki, 2017). Beberapa penelitian menunjukkan ekstrak tanaman mampu menghambat melanogenesis secara *in vitro* dan selanjutnya juga menunjukkan potensi setelah dilakukan isolasi senyawa aktif (Burger *et al.*, 2016). Beberapa senyawa polifenol, flavonoid, stilben dan derivat asam hidroksisinamat menunjukkan aktivitas antioksidan dan karakteristik sebagai fotoprotektif yang berasosiasi dengan fungsi pencegahan terkait dengan sifat tabir surya berkorelasi dengan kapasitas antioksidan terhadap efek ROS yang diinduksi radiasi UV (Stevanato, *et.al.*, 2014).

Senyawa fitokimia seperti shogaol menghambat melanogenesis pada jalur cAMP dan ERK yang dapat menurunkan aktivitas MITF pada sel B16F0 (Huang *et.al.*, 2014). Hesperidin senyawa yang banyak terkandung dalam tanaman jeruk populer sebagai antioksidan dapat menghambat melanogenesis melalui jalur ERK pada sel B16F0 (Lee *et.al.*, 2015). Asam galat dapat menghambat melanogenesis pada jalur sinyal ERK dan Wnt menggunakan sel B16F10 (Su *et al.*, 2013). Alternol dapat menurunkan kandungan melanin dan aktivitas tirosinase pada sel B16F0

(Wang *et al.*, 2016). Daidzein suatu senyawa fitokimia dari kacang kedelai dapat menghambat pembentukan melanin dan aktivitas tirosinase secara intraseluler pada sel B16F0 (C. Chang & Tsai, 2016). 1-O-metil-fruktofuranose, senyawa yang berasal dari buah *Schisandra chinensis*, mempunyai aktivitas menurunkan ekspresi protein melanogenik seperti MITF, TYR dan TRP-1 pada sel B16F0 (Oh *et al.*, 2010).

Katekin merupakan senyawa fitokimia yang termasuk ke dalam metabolit sekunder flavonoid. Katekin merupakan komponen utama di dalam tanaman gambir. Isolasi yang dilakukan terhadap gambir (*Uncaria gambir* (Hunter). Roxb) dapat menghasilkan katekin dengan kemurnian 96,1% (Rahmawati *et.al.*, 2012). Produksi gambir di Indonesia lebih dari 80% berasal dari Provinsi Sumatera Barat terutama di Kabupaten Limapuluh Kota. Menurut *Market Brief* tahun 2015 Kementerian Perdagangan, Indonesia merupakan eksportir utama gambir di dunia, yang masih dalam bentuk mentah. yang digunakan untuk industri farmasi, kosmetik, tekstil dan sebagainya.

Penelitian mengenai inhibisi melanogenesis katekin baru dilakukan terhadap beberapa senyawa yang terkandung dalam teh seperti epigalokatekin-galat, epigalokatekin, katekin dan asam galat, dimana memiliki aktivitas hambat sintesis melanin yang signifikan. Efek depigmentasi yang terjadi pada pemberian katekin disebabkan oleh penghambatan langsung aktivitas tirosinase pada sel B16 (Sato and Toriyama, 2009). Penelitian yang dilakukan oleh Wu *et al.*, (2006) terhadap katekin didapatkan katekin melindungi keratinosit terhadap radiasi UVB dan ROS. Katekin mencegah kerusakan keratinosit terutama melalui induksi UVB dan ROS, yang sangat berbeda dengan mekanisme aksi epigalokatekin-galat.

Katekin kurang sitotoksik daripada epigallocatekin-galat Katekin yang terdapat pada anggur merah (*Vitis vinifera*) secara in vitro mempunyai aktivitas sebagai *depigmenting agent*. Aktivitas inhibisi tirosinase diamati pada fraksi dengan kandungan oligomerik protoantosianidin dimana mengandung katekin dan epikatekin. Senyawa ini dapat menghambat pembentukan melanin pada sel B16 (Fujimaki, *et.al*, 2018).

Efek inhibisi melanogenesis dari suatu senyawa *depigmenting agent* dapat dilakukan dengan melihat aktivitas dari enzim tirosinase. Penurunan aktivitas enzim dapat mempengaruhi pembentukan melanin. Ekspresi dari gen tirosinase dapat dihubungkan dengan pembentukan protein pada kultur sel B16F10. Penurunan jumlah melanin disebabkan penurunan dari ekspresi gen tirosinase pada proses transkripsi mRNA (Huang *et.al.*, 2011). Tidak ada perbedaan dalam tingkat tirosinase mRNA, perbedaan ekspresi tirosinase muncul dari modifikasi pasca-translasi enzim yang menyebabkan aktivasi atau penghambatannya pada sel B16F10 (Burchill, 1991).

Radiasi sinar UV pada kulit akan menyebabkan stimulasi dari beberapa mediator melanogenesis yang masing-masingnya akan mensintesis melanin pada tiga jalur sinyal yang berbeda. Pada jalur sinyal siklik adenosin monofosfat (cAMP),  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) akan mengaktifkan *melanocortin 1 receptor* (MC1R) yang berperan dalam mengatur pigmentasi kulit. Salah satu enzim yang berperan dalam jalur ini adalah *cAMP Response Element Binding Protein* (CREB). Pada jalur sinyal *Wingless-type* (Wnt), Wnt akan mengaktifkan reseptor *Frizzled* dan meningkatkan aktivitas enzim  $\beta$ -catenin yang berperan dalam pengaturan polaritas sel. Pada jalur sinyal *extracellular signal-*

*regulated kinase* (ERK), *stem cell factor* (SCF) akan mengaktifkan reseptor *tyrosinase-protein kinase Kit* (cKit) dan meningkatkan aktivitas ERK yang berperan dalam proses transduksi sinyal dan komunikasi antar sel. Ketiga jalur tersebut akan mengaktifkan *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) yang akan memulai proses transkripsi pembentukan melanin dengan mengaktifkan beberapa enzim seperti *tyrosinase* (TYR), *tyrosinase related protein-1* (TRP-1) dan *tyrosinase related protein-2* (TRP-2) (Chang, 2012 dan D'Mello *et.al.*, 2016).

Sel *mouse melanoma* merupakan model sel melanoma yang sering digunakan dalam pengujian efek suatu *depigmenting agent* terhadap proses melanogenesis secara *in vitro* (Beaumont *et al.*, 2014). Sel *mouse melanoma* B16 merupakan sel induk dari *mouse melanoma*. Penggunaan sel *mouse melanoma* B16F0 lebih efektif dibandingkan sel *mouse melanoma* B16 dalam suatu percobaan secara *in vitro* (Nakamura *et al.*, 2002). Pengujian secara *in vitro* terhadap aktivitas hipopigmentasi secara kuantitatif dalam kultur sel meliputi penghambatan aktivitas tirosinase, penurunan kadar melanin dan analisis gambar melanin secara mikroskopis. Salah satu dari ketiga metode pengujian dapat dilakukan untuk menganalisa efek *depigmenting agent* (Kim *et al.*, 2019). Selain ketiga parameter tersebut, pengujian terhadap sitotoksitas, kelarutan, absorpsi dan penetrasi pada kulit serta stabilitas zat uji juga dapat dipertimbangkan dalam pengujian (Solano *et al.*, 2006)

Berdasarkan hal tersebut diatas peneliti tertarik untuk mengkaji pengaruh pemberian katekin yang berasal dari gambir secara *in vitro* terhadap viabilitas sel, aktivitas tirosinase, kandungan melanin dan ekspresi protein dari CREB,  $\beta$ -catenin,

ERK dan MITF pada sel *mouse melanoma* B16F0. Apabila katekin gambir dapat menurunkan aktivitas tirosinase, kandungan melanin dan ekspresi protein dari CREB,  $\beta$ -catenin, ERK dan MITF pada sel *mouse melanoma* B16F0, maka katekin gambir dapat disebut sebagai *depigmenting agent*.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah diatas, dapat dibuat rumusan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Apakah katekin gambir mempengaruhi viabilitas sel B16F0?
2. Apakah katekin gambir dapat menurunkan aktivitas tirosinase dan kandungan melanin pada sel B16F0?
3. Apakah katekin gambir dapat menurunkan ekspresi protein CREB,  $\beta$ -catenin, ERK dan MITF pada sel B16F0?

## 1.3. Tujuan Penelitian

### 1.3.1. Umum

Membuktikan katekin gambir dapat digunakan sebagai *depigmenting agent* dengan efek toksik yang rendah dan menghambat proses melanogenesis pada sel B16F0.

### 1.3.2. Khusus

1. Membuktikan katekin gambir memiliki efek toksik yang rendah terhadap sel B16F0.
2. Membuktikan katekin gambir dapat menurunkan aktivitas tirosinase dan kandungan melanin pada sel B16F0.
3. Membuktikan katekin gambir dapat digunakan sebagai inhibitor melanogenesis dengan mempengaruhi enzim yang terlibat pada tiga jalur

melanogenesis, dimana dapat menurunkan ekspresi protein CREB,  $\beta$ -catenin, ERK dan MITF pada sel B16F0.

#### 1.4. Manfaat Penelitian

1. Menambah pengetahuan mengenai katekin yang berasal dari gambir berpotensi sebagai *depigmenting agent*.
2. Menambah pengetahuan mengenai efek katekin gambir terhadap enzim yang mempengaruhi tiga jalur sinyal melanogenesis.
3. Apabila terbukti katekin dapat digunakan sebagai *depigmenting agent*, maka dapat menambah daftar senyawa yang dapat ditambahkan ke dalam sediaan kosmetik yang berefek sebagai *depigmenting agent*.

