



Artikel Penelitian

**POTENSI MADU DAN EKSTRAK AMPAS TEH SEBAGAI PENGHAMBAT TIROSINASE UNTUK BAHAN AKTIF KOSMETIKA PEMUTIH**La Ode Sumarlin<sup>1\*</sup>, Nur Ernita<sup>2\*</sup>, Hajar<sup>3</sup><sup>1</sup>Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta Ciputat, 15412,<sup>2</sup>Pusat Laboratorium Terpadu Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta Ciputat, 15412<sup>3</sup>Program Studi Peternakan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Sulawesi Tenggara, Kendari, 93121**INFO ARTIKEL****ABSTRAK****Riwayat Artikel**

Diterima 11 Januari 2023

Diterima 30 September 2023

Tersedia online 03 Oktober 2023

\*Penulis korespondensi:

[sumarlin@uinjkt.ac.id](mailto:sumarlin@uinjkt.ac.id)[nur.ernita@uinjkt.ac.id](mailto:nur.ernita@uinjkt.ac.id)

Efforts to lighten skin color biochemically through the process of inhibiting melanin formation can be done by inhibiting tyrosinase. Bleach acts as an inhibitor of melanin production and is known as a competitive tyrosinase inhibitor. In this research, the potency of teabag and honey dregs will be analyzed singly and in mixed form. The method used is the anti-tyrosinase test using L-DOPA as a substrate. The results of the analysis showed that almost all of the tea extract samples tested positive (Flavonoids, Alkaloids, Tannins, Saponins, Steroids) except for Quinone and Triterpenoid compounds. Honey for positive samples only saponin compounds, while those for other compounds are negative. Tea extract has the potential to inhibit the tyrosinase enzyme, because it contains flavonoids, tannins and steroids. Tests for the inhibition of the tyrosinase enzyme in honey and tea and their mixtures had an IC value of  $>1000 \mu\text{g/ml}$ , so the inhibitory activity was very weak. However, research has shown that teabag and honey dregs have bioactive potential through phytochemical tests. However, its ability as a tyrosinase inhibitor needs to be further studied through a variety of extraction methods and appropriate solvents.

Keywords: Antityrosinase; Honey; Tea dregs

Upaya pencerahan warna kulit secara biokimiawi melalui proses penghambatan pembentukan melanin dapat dilakukan dengan cara menghambat tirosinase. Pemutih bertindak sebagai penghambat produksi melanin dan dikenal sebagai penghambat tirosinase yang bersifat kompetitif. Pada penelitian akan dianalisis potensi ampas teh celup dan madu secara tunggal dan dalam bentuk campurannya. Metode yang digunakan adalah uji anti tirosinase menggunakan L-DOPA sebagai substrat. Hasil analisis menunjukkan bahwa sampel ekstrak teh hampir semua senyawa uji positif (Flavonoid, Alkaloid, Tanin, Saponin, Steroid) kecuali senyawa Quinon dan Triterpenoid. Madu untuk sampel positif hanya senyawa saponin, sedang yang untuk senyawa lain negatif. Ekstrak teh berpotensi dalam menghambat enzim tirosinase, karena kandungan senyawa flavonoid, tanin dan steroid. Pengujian penghambatan enzim tirosinase pada madu dan teh serta campuran keduanya memiliki nilai  $\text{IC}_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ , maka aktivitas daya hambat sangat lemah. Namun demikian dalam penelitian telah menunjukkan bahwa ampas teh celup dan madu potensi bioaktif melalui uji fitokimia. Akan tetapi kemampuannya sebagai penghambat tirosinase perlu dilakukan lagi kajian melalui berbagai variasi metode ekstraksi dan pelarut yang tepat.

Katakunci: Ampas teh, madu, penghambat tirosinase, pemutih

## 1. Pendahuluan

Indonesia terletak di daerah tropis, terkenal dengan suhu tinggi dan radiasi ultraviolet (UV) pada tingkat tertinggi. Paparan terhadap sinar UV dalam waktu yang cukup lama secara langsung dan lama dapat menyebabkan gangguan pada kulit, misalnya warna kulit yang memudar. Warna kulit yang coklat adalah hasil dari produksi melanin yang berlebihan [1]. Proses penyusunan senyawa melanin (melanogenesis) terjadi dengan bantuan biokatalis, khususnya katalis tirosinase [2].

Dengan demikian, keberadaan melamin akan dipercepat dengan adanya tirosinase. Oleh karena itu upaya untuk memperlambat atau mengurangi produksi melanin dapat dilakukan melalui penghambatan tirosinase. Pada akhirnya, ketika tirosinase terhambat maka produksi melamin akan berkurang dan pigmentasi coklat pada kulit juga akan berkurang.

Secara umum, penghambatan tirosinase dapat dilakukan dengan bahan alam dan bahan sintesis. Penghambat tirosinase yang berbeda ditemukan dalam berbagai termasuk asam hialuronat, arbutin, asam kojat, merkuri dan hidrokuinon. Senyawa ini memiliki daya hambat yang besar, namun berbahaya karena dapat menyebabkan kanker [3]. Dengan demikian upaya untuk menemukan bahan-bahan alami yang aman bagi kesehatan manusia menjadi topik yang menarik untuk bahan penelitian

Madu merupakan bahan alami yang manis dan harum, memiliki manfaat nutrisi yang tinggi dan mempengaruhi kesehatan manusia seperti pelindung oksidasi, bakteriostatik, mitigasi, antimikroba, dan menyembuhkan luka [4]. Madu *Euphorbia* telah diteliti dan memiliki potensi besar sebagai antioksidan, anti-inflamasi dan sumber anti-tirosinase untuk aplikasi farmasi dan kosmetik (Boutoub et al., 2021) dan madu *Astragalus* menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap enzim AChE, BChE, urease, dan tirosinase [5].

Bahan alam lain sangat potensial dan jumlah banyak adalah ampas teh celup. Hal ini beralasan karena Indonesia adalah produsen teh terbesar ke-5 di dunia setelah Sri Lanka, Kenya, India dan China, dengan tingkat produksi mencapai 154.598 ton/tahun [6]. Padahal, pada ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) terdapat senyawa polifenol yang berpotensi menghambat tirosinase pada konsentrasi 0,5% [7] dan teh kombucha dari buah anggur berpotensi sebagai anti penuaan [8].

Kemampuan madu dan ampas teh sebagai penghambat tirosinase disebabkan oleh komponen utamanya khususnya senyawa flavonoid dan turunannya. Ekstrak madu kelengkeng bubuk memiliki antioksidan tertinggi memiliki nilai kandungan total flavonoid tertinggi ( $0,079 \pm 0,001$  mg QE/g) [9]. Meziat et al., [10] menyatakan bahwa ekstrak kaya flavonoid dari *F. carica* dapat dianggap sebagai bahan bioaktif multifungsi untuk digunakan dalam formulasi farmasi diantaranya sebagai pemutih kulit. Fan et al., [11] juga menemukan bahwa modifikasi struktural flavonoid sebagai penghambat tirosinase yang efektif.

Klasifikasi kemometri dari madu kastanye oleh Kucukaydin et al., [12] menggunakan PCA dan HCA menunjukkan bahwa beberapa senyawa fenolik memberikan kontribusi yang signifikan. Pemanfaatan ampas teh juga ditunjang oleh keberadaan polifenol, misalnya pada ekstrak etanol ampas teh hijau memiliki kandungan polifenol sebesar 46 % yang setara dengan 460 mg GAE/g sampel [13], tanin, fenol, dan steroid [14]. Aoki et al., [15] mengkaji ekstrak teh oolong secara in vivo efektif dalam memutihkan melalui efek penghambatan pada melanogenesis melalui mekanisme penurunan tirosinase intraseluler pada tingkat mRNA, *Lonicera japonica* (bunga, daun dan ranting) sebagai pemutih yang diduga melalui mekanisme penghambatan tirosinase [16].

Dengan demikian, baik madu maupun ampas teh celup memiliki potensi diimplementasikan sebagai bahan aktif kosmetika yang bekerja melalui penghambatan tirosinase. Selain itu akan sangat berguna untuk pemanfaatan bahan yang tidak dipakai lagi (ampas teh) dalam bentuk *sunscreen*, *cream*, ataupun *lotion* yang selama ini belum banyak dieksplorasi.

## 2. Bahan dan Metode

### 2.1 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, Sampel madu (Apis dan Trigona), Ampas produk kemasan merek teh (produksi di Indonesia) yang telah digunakan dalam sekali seduhan dengan air panas, Kertas Saring, *Aluminium Foil*, Etanol 96% (Teknis), Metanol (Teknis), Aquades, Larutan  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M dan pekat,  $\text{CHCl}_3$ , larutan *Dragendorf*,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  anhidrat, larutan HCl, amil alkohol,  $\text{FeCl}_3$  10%, NaOH 1N, DMSO (dimetilsulfoksida), bufer kalium fosfat, asam kojat, 12 mM L-DOPA (difenolase), dan tirosinase (Sigma, 333 Unit  $\text{mL}^{-1}$  dalam buffer fosfat).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, beberapa alat *glassware* (*Beacker glass*, *Erlenmeyer*, pengaduk kaca, *magnetic stirrer*, *hot plate*, *rotary evaporator*, termometer, *spatula*, *reader plate multi-well*).

## 2.2 Ekstraksi Madu dan Ampas Teh

Madu (Apis dan Trigona) dan ampas produk kemasan merek teh tertentu dikumpulkan, yang akan digunakan sebagai sampel penelitian.

Contoh madu 100 gram dilarutkan dalam 300 ml metanol. Campuran madu dengan pelarut metanol dicampur dengan pengaduk *stirer* selama 30 menit. Setelah didiamkan selama 24 jam, endapan yang terbentuk sebagai filtrat diisolasi menggunakan kertas saring. Kemudian, dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu 64°C. Ini adalah konsentrat pekat sebagai konsentrat kasar (*crude*) dari contoh madu.

Sementara itu, residu teh dihilangkan dengan teknik ekstraksi dingin, khususnya dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Ampas teh dicelupkan ke dalam air menjadi ampas teh basah. Ampas teh basah sebanyak 100 gram dilarutkan dalam 700 mL etanol 96% diamkan selama 5 x 24 jam sambil diaduk selama 15 menit/hari. Hasil maserasi (maserat) dipisahkan dengan kertas saring dan residu dilakukan maserasi kembali sampai pelarut menjadi bening. Lalu, maserat dipekatkan dengan *evaporator* pada temperatur  $\pm 40^\circ\text{C}$  dan kecepatan  $\pm 80$  rpm, sehingga diperoleh konsentrat ampas teh pekat/kental. Akhirnya, baik ekstrak pekat madu (1) maupun ampas teh (2) siap dicampurkan dengan perbandingan 1: 1 (b/b) untuk pengujian penghambatan tirosinase kombinasi sampel madu dan ampas teh (3).

## 2.3 Uji Skrining Fitokimia

Sebelum pengujian penghambatan tirosinase, ekstrak etanol teh dan ekstrak metanol madu dilakukan uji skrining fitokimia secara kualitatif dengan uji reagen. Skrining fitokimia pada ekstrak etanol teh dan ekstrak metanol madu meliputi flavonoid, tanin, saponin, kuinon, alkaloid dan steroid/triterpenoid, prosedurnya seperti berikut.

### 2.3.1 Alkaloid

Sebanyak 1 gram contoh ditambahkan beberapa tetes  $\text{NH}_3$ , kemudian ditumbuk. Lalu, 5 mL  $\text{CHCl}_3$  ditambahkan pada larutan  $\text{NH}_3$  tersebut. Bahan-bahan yang tercampur tersebut, dipisahkan dan filtratnya ditambahkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M. Lapisan asam dipisahkan menjadi 3 bagian. Lapisan pertama ditambahkan ke Dragendorf, menghasilkan endapan jingga; lapisan kedua ditambahkan ke larutan Mayer, menghasilkan endapan putih; dan lapisan ketiga ditambahkan ke larutan Wagner, menghasilkan endapan berwarna coklat. Semua proses ini berlangsung secara bersamaan.

### 2.3.2 Steroid/Triterpenoid

Sebanyak 1 gram sampel ditambahkan beberapa tetes etanol panas, lalu disaring. Kemudian filtrat di panaskan hingga kering. Campuran dihomogenkan dengan 1 mL dietil eter setelah itu. Setelah itu, tambahkan masing-masing satu tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  anhidrat. Jika warnanya hijau/biru, larutan sampel mengandung senyawa Steroid dan jika warnanya merah/ungu, larutan sampel mengandung senyawa Triterpenoid.

### 2.3.3 Flavonid, Tanin, Saponin dan Kuinon

Sebanyak 5 gram sampel dilarutkan dalam aquades, lalu di panaskan selama 5 menit, kemudian di saring. Filtrat yang di hasilkan di bagi menjadi 4 perlakuan. Perlakuan pertama, ke dalam filtrat di tambahkan sedikit serbuk Mg, Campuran larutan HCl dan Ethanol (1:1), dan beberapa tetes Pelarut Amil Alkohol. Ketika pada lapisan Amil Alkohol terbentuk warna jingga, maka larutan sampel mengandung senyawa Flavonoid. Perlakuan kedua, ke dalam filtrat di tambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  10% sebanyak 3 tetes. Jika terbentuk warna hitam kehijauan, maka larutan sampel mengandung senyawa Tanin. Perlakuan ketiga, filtrat di kocok kuat, ketika timbul buih yang stabil, maka sampel mengandung senyawa Saponin. Perlakuan keempat, ke dalam filtrat ditambahkan larutan  $\text{NaOH}$  1 N sebanyak 3 tetes, jika larutan sampel berwarna merah, maka sampel mengandung senyawa Kuinon.

## 2.4 Pengujian Penghambatan Tirosinase (Ekstrak madu (1), ampas teh (2), campurannya (3))

Penghambatan aktivitas tirosinase (monofenolase) dan auto-oksidasi DOPA (difenolase). Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode seperti yang dijelaskan sebelumnya [17], [18]. Ekstrak dilarutkan dalam DMSO (dimetil sulfoksida) hingga konsentrasi akhir 20 mg  $\text{mL}^{-1}$ . Larutan stok ekstrak ini kemudian diencerkan hingga 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dalam 50 mM bufer kalium fosfat (pH 6,5).

Ekstrak diuji pada konsentrasi mulai dari 7,8125 sampai 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Asam kojat yang digunakan sebagai kontrol positif juga diuji pada konsentrasi 7,8125 sampai 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Dalam *plate* 96-sumur, 70  $\mu\text{L}$  setiap pengenceran ekstrak dikombinasikan dengan 30  $\mu\text{L}$  tirosinase (Sigma, 333 Unit  $\text{mL}^{-1}$  dalam buffer fosfat) dalam tiga kali ulangan. Setelah itu diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit, 110  $\mu\text{L}$  substrat (2 mM L-tirosin atau 12 mM L-DOPA) ditambahkan ke setiap sumur. Inkubasi dimulai selama 30 menit pada suhu kamar. Optik densiti sumur kemudian ditentukan pada 510 nm dengan *reader plate multi-well*. Konsentrasi ekstrak tumbuhan merupakan setengah aktivitas tirosinase asli dihambat ( $\text{IC}_{50}$ ), ditentukan untuk setiap ekstrak tumbuhan. Asam kojat (Sigma, Czech Republic) digunakan sebagai kontrol positif.

### 3. Hasil dan Pembahasan

#### 3.1 Metode ekstraksi sampel

Pada penelitian ini digunakan metode yang mudah dan sederhana yaitu maserasi (Gambar 1). Metanol merupakan pelarut yang paling cocok untuk maserasi pada suhu kamar [19]. Metanol direkomendasikan sebagai pelarut yang optimal untuk mendapatkan kandungan fitokimia yang tinggi serta antioksidan yang tinggi [20]. Hasil uji antioksidan menunjukkan maserasi segar metanol 95% menunjukkan hasil tertinggi dengan  $IC_{50}$  25,22 dengan kategori aktivitas antioksidan kuat, kandungan fenol total 68,43 mg/g, kandungan flavonoid total 295,95 mg/g [21].

Metode tradisional, seperti maserasi, pengadukan, maserasi berbantuan, dan ekstraksi Soxhlet, adalah yang paling banyak digunakan di seluruh dunia [22], [23], [24]. Ekstraksi maserasi adalah berdasarkan pemisahan padat-cair, dengan pelarut organik atau air sebagai fase cair. Pelarut utama yang digunakan untuk ekstraksi senyawa fenolik adalah metanol, etanol, air, atau campuran dari pelarut ini [24], [25]. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa jenis perlakuan pelarut dan waktu maserasi berpengaruh terhadap karakteristik ekstrak jeruk nipis [26]. Metanol pelarut adalah pelarut yang digunakan dalam uji flavonoid yang lebih polar dari kloroform dengan a tingkat polaritas sekitar 4,1 [27].

Metanol adalah pelarut ekstraksi terbaik, yang menunjukkan aktivitas antioksidan maksimum diikuti oleh kloroform dan terakhir n-heksana. Hasil penelitian kami mengungkapkan bahwa ekstrak metanol yang dibuat dengan teknik maserasi menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih baik. Disimpulkan dari penelitian ini bahwa teknik maserasi lebih efektif dibandingkan dengan teknik Soxhlets [28].



**Gambar 1.** Sampel saat maserasi (a), Sampel setelah *Rotary Evaporator* (b)

#### 3.2 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan salah satu metode analisis kualitatif keberadaan senyawa pada tumbuhan yang sederhana dalam penggunaannya. Pada penelitian ini skrining yang dilakukan adalah uji flavonoid, tanin, saponin, kuinon, alkaloid dan steroid/triterpenoid. Setelah dilakukan uji skrining fitokimia dari ekstra teh dan madu (Tabel 1).

Hasil skrining fitokimia dari ekstra teh dan madu pada Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak teh lebih banyak mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, steroid, tannin, flavonoid, dan saponin. Sementara itu, pada sampel penelitian ini, ekstrak madu hanya mengandung senyawa golongan saponin (Sp). Pada uji flavonoid hasil positif diperoleh dari ekstrak TSW, Ekstrak TSS dan ekstrak TWS (Tabel 1), sedangkan hasil negatif didapatkan pada madu TR BGR dan madu APLK. Hasil positif pada uji flavonoid ditandai adanya perubahan warna jingga setelah serbuk Mg dan HCl pekat ditambahkan pada larutan, dikarenakan terjadinya mereduksi ikatan glikosida dengan flavonoid [29].

**Tabel 1** Data hasil skrining fitokimia sampel ekstrak ampas teh dan madu

Sampel	F	T	Sp	Q	Alkaloid			ST	Tp
					W	M	D		
Ekstrak TSW	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Ekstrak TSS	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Ekstrak TTJ	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Madu TR BGR	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Madu APLK	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Keterangan; F : Flavonoid; T : Tanin; Sp : Saponin; Q : Quinon; ST : Steroid; Tp : Triterpenoid; W: Wagner; M: Mayer; D: Dragendorff  
 TSW : Teh Sariwangi; TSS : Teh Sosro; TTJ : Teh Tong Djie.; TR BGR : Madu Trigona Bogor; APLK : Madu Apis Kelengkeng

Komponen bioaktif dalam teh diantaranya katekin (flavan-3-ol), suatu gugus flavonoid meliputi (-)-epikatekin (EC), (-)-epigallocatekin (EGC), (-)-epikatekin-3-galat (ECG), dan (-)-epigallocatekin-3-galat (EGCG) [30].

Flavonoid yang telah dibuktikan mengandung penghambat tirosinase, misalnya senyawa flavonol (*quercetin*, kaempferol dan *myricetin*), flavon (norartocarpetin), isoflavon (*kalicosine*), flavanol (dihydromorin dan taxifolin), flavanon (stepogenin), isoflavon (gliasperin C), glabridin dan *chalcone* [31]. Ternyata, ciri-ciri struktur kimiawi teh polifenol terkait erat dengan potensi antioksidannya [32]. Polifenol teh adalah zat aktif penting dalam teh, dengan aktivitas antioksidan yang sangat baik, kemampuan anti-glikasi [33].

Pada uji tanin, diperoleh hasil positif pada ekstrak TSW, Ekstrak TSS dan ekstrak TWS. Pada madu TR BGR dan APLK tidak mengandung tannin ditandai dengan hasil negatif. Identifikasi adanya tannin ditandai dengan perubahan warna hijau kehitaman dikarenakan terdeteksi keberadaan gugus fenol akibat penambahan  $\text{FeCl}_3$ . Senyawa yang diduga mengandung tanin yang mungkin dapat berperan sebagai penghambat tirosinase adalah asam galat [34].

Selanjutnya uji saponin, hasil yang didapatkan semua ekstrak teh dan madu mengandung saponin ditandai dengan adanya buih stinggi 1 cm yang stabil. Hal ini terjadi karena senyawa saponin memiliki gugus hidrofilik yang berikatan dengan air dan gugus hidrofobik yang berikatan dengan oksigen di udara, gugus polar berada di luar misel dan gugus non polar berada di dalam misel, maka uji saponin mengungkapkan bahwa semua ekstrak teh dan madu yang mengandung saponin memiliki busa stabil setinggi 1 cm. Pedoman respon hidrolisis ini digambarkan dengan susunan foam atau buih [35]. Senyawa saponin mengalami hidrolisis menjadi aglikon dan glikon [36].

Pada uji quinon diketahui bahwa semua sampel ekstrak teh dan madu tidak mengandung senyawa golongan quinon karena memiliki hasil negatif. Hal ini dikarenakan, pada percobaan tidak terbentuk endapan merah, sedangkan hasil positif pada uji quinon ditunjukkan dengan terbentuknya red fast karena pemuaian NaOH yang mendeptonasi gugus fenol pada quinon sehingga terbentuk partikel enolat. Partikel enolat akan mengalami resonansi di antara elektron dalam ikatan rangkap  $\pi$  yang dapat mempertahankan cahaya spesifik dan memantulkan warna [37].

Pada uji alkaloid diperoleh bahwa semua ekstrak teh berupa ekstrak TSW, Ekstra TSS dan ekstrak TWS mengandung senyawa golongan alkaloid ditandai dengan hasil positif, sedangkan madu TR BGR dan madu APLK tidak memiliki kandungan alkaloid karena hasilnya negatif. Pada uji alkaloid, HCl 2 N yang ditambahkan ditujukan untuk pemisahan alkaloid dari simplisia. Hal ini terjadi karena sifat alkaloid basa yang akan berbentuk garam ketika ditambahkan. Pemanasan dilakukan untuk memutuskan ikatan antara alkaloid yang tidak termasuk dalam susunan garam, kemudian dilakukan reaksi pengendapan menggunakan tiga reagen [38].

Uji alkaloid pada pereaksi Mayer mendapatkan hasil positif dengan terbentuknya warna putih atau kuning yang cepat, karena nitrogen dalam alkaloid bereaksi dengan partikel  $\text{K}^+$  dari kalium tertiodomerkurat(II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Dalam reagen Wagner, hasil positif ditunjukkan oleh pembentukan warna coklat yang mengendap karena logam  $\text{K}^+$  membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen. Dalam alkaloid, kompleks kalium-alkaloid terbentuk, sedangkan dalam reagen Dragendorff, pembentukan warna jingga menunjukkan hasil yang positif, karena adanya nitrogen menyebabkan pembentukan ikatan kovalen koordinat dengan  $\text{K}^+$  (ion logam) dan menghasilkan endapan [39].

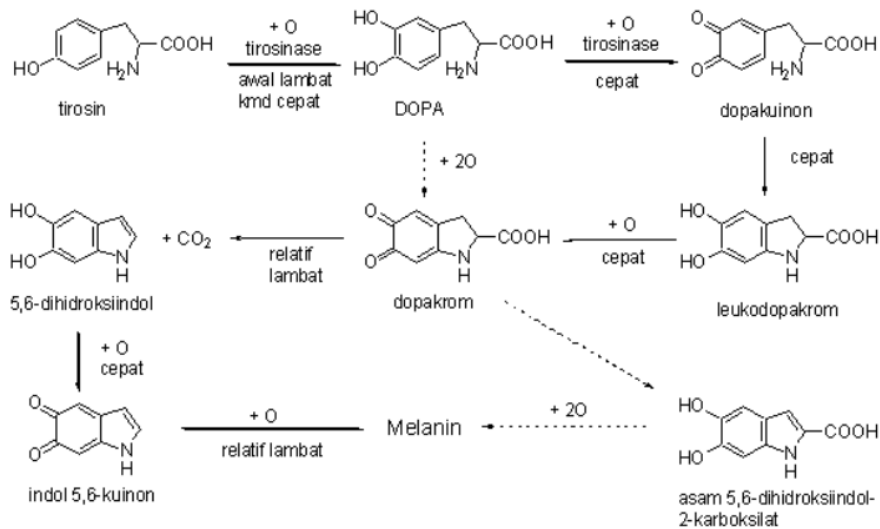
Pada uji steroid/ triterpenoid diketahui bahwa ekstrak TSW, Ekstra TSS dan ekstrak TWS mengandung senyawa golongan steroid sedangkan madu TR BGR dan madu APLK tidak mengandung senyawa golongan steroid ataupun triterpenoid dikarenakan memiliki hasil negatif. Hasil tes steroid yang positif ditunjukkan dengan penyesuaian warna hijau/biru, sedangkan triterpenoid positif ditunjukkan oleh perubahan warna merah/ungu sebagai akibat respons terhadap reagen Liebermann-Bouchard ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  anhidrat). Hal ini bergantung pada kemampuan campuran triterpenoid dan steroid untuk membentuk warna oleh  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (dalam larutan asam asetat anhidrida). Perbedaan warna yang terlihat pada pengujian triterpenoid dan steroid adalah karena kedudukan pada atom C-4 [40]. Bahkan steroid dapat berperan menghambat katalis tirosinase [41].

### 3.3 Penghambatan Tirosinase

Mengevaluasi efikasi penghambat tirosinase untuk melihat apakah senyawa bioaktif dalam ekstrak teh dan madu serta kombinasi kedua ekstrak tersebut dihambat oleh enzim tirosinase. Dalam melanosit, enzim tirosinase terlibat dalam biosintesis melanin. Melanogenesis adalah proses dimana pigmen melanin diproduksi (Gambar 2). Enzim penghambat alami dapat dimanfaatkan dalam industri kosmetik dan obat-obatan sebagai agen depigmentasi [7].

Menghambat aktivitas tirosinase adalah cara yang sangat efektif dan aman untuk mencegah pencoklatan enzimatik pada makanan dan melawan hama di bidang pertanian. Polifenol teh (TPs), dianggap sebagai aditif makanan yang aman dan tidak beracun, telah dilaporkan karena kemampuan penghambatan potensialnya terhadap tirosinase.

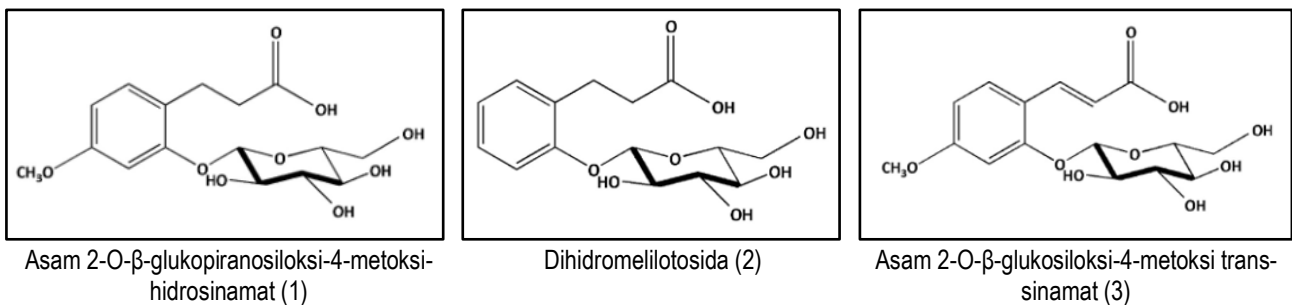




Gambar 2. Skema reaksi terbentuknya melanin [42]

Pada penelitian tersebut, spektroskopi fluoresensi, siklik voltametri (CV), oksimetri dan pendekatan simulasi molekuler digunakan untuk menjelaskan mekanisme penghambatan yang mendasari TP's dengan struktur yang berbeda termasuk (+)-katekin,(-)-epicatechin gallate (ECG) dan (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) terhadap tirosinase.

Spektrum fluoresensi menunjukkan bahwa ketiga TP mampu mengikat tirosinase dengan proporsi molar 1: 1. Analisis kurva CV dan pemanfaatan oksigen menunjukkan bahwa ketiga TP ini dapat dioksidasi oleh tirosinase, mengungkapkan bahwa ketiga TP ini adalah penghambat bunuh diri tirosinase. Selanjutnya, EKG dan katekin membuat tirosinase menjadi tidak aktif secara ireversibel karena gugus katekolnya (cincin B) dikatalisis oleh tirosinase melalui jalur seperti kresolase, sementara EGCG menghambat aktivitas tirosinase dengan bersaing atau menunda oksidasi substrat. Simulasi molekuler selanjutnya mengkonfirmasi bahwa cincin B EKG dan katekin memberikan kontribusi yang signifikan terhadap aktivitas penghambatan tirosinase, dan memiliki interaksi langsung dengan ion tembaga binuklir berpasangan dalam orientasi optimal yang diperlukan oleh jalur seperti kresolase [43].



Gambar 3. Struktur isolat ekstrak *P. mahaleb* sebagai penghambat tirosinase [44]

Dengan memeriksa kinetika enzim dari senyawa dengan turunan asam sinamat yang efektif, jenis penghambatan dan konstanta pengikatan enzim  $K_i$  dihitung. Senyawa 1, 2 dan 3 menunjukkan aktivitas penghambatan tirosinase nonkompetitif yang tinggi terhadap substrat L-tirosin, dengan nilai  $IC_{50}$  masing-masing sebesar 0,22, 0,31 dan 0,37 mM. Selain itu, senyawa 1, 2 dan 3 (Gambar 3) menunjukkan efek penghambatan yang bergantung pada dosis pada kadar tirosinase dan melanin intraseluler dalam sel melanoma B16F10 yang diinduksi  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) [44].

Pengujian penghambatan enzim tirosinase menggunakan L-DOPA sebagai substrat karena substrat dengan tirosinase ini akan menghasilkan dopachrome yang kemudian dapat memproduksi melanin. Jika terdapat penghambat tirosinase maka pembentukan melanin dapat dihentikan. Artinya proses ini dapat menjadi parameter bahwa jika konsentrasi tersebut mengandung senyawa penghambat tirosinase, maka kerja katalis tirosinase akan terhambat dalam menghasilkan melanin [45].

Dalam bahasan ini, munculnya senyawa dopachrome terlihat melalui pembentukan warna coklat yang dapat menekan respon substrat-tirosinase. Akibatnya, terjadi penurunan produksi dopachrome yang terlihat melalui parameter berkurangnya kepekatan warna coklat yang ditimbulkan. Sementara itu, ekstrak yang tidak memiliki aktivitas

penghambatan dan kontrol (tanpa ekstrak tambahan) berwarna keunguan dari senyawa dopachrome. Jika jumlah dopakrom yang terbentuk sangat besar, penghambatan tirosinase tidak terjadi. Untuk melihat pembentukan senyawa dopakrom, dapat diukur pada frekuensi 490 nm. Besarnya aktivitas ekstrak dalam menghambat reaksi tirosinase-substrat ditentukan oleh daya serap yang diperoleh, atau absorbansi [31].

Kemampuan tirosinase ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  sebagai nilai konsentrasi senyawa penghambat tirosinase yang dapat menekan setengah dari aksi tirosinase. Semakin rendah nilai  $IC_{50}$  semakin besar aktivitas penghambat tirosinase. Senyawa pembanding dalam pengujian ini adalah asam kojat yang berfungsi sebagai kontrol karena mampu memberikan informasi perbedaan penghambatan dan memiliki keandalan yang tinggi dibandingkan dengan bahan-bahan lain. Untuk menghitung persentase penghambatan tirosinase menggunakan perhitungan dengan 3 (tiga) kali pengulangan pengukuran. Untuk mencari  $IC_{50}$  dibuat regresi persamaan linear yang didapat dari kurva hubungan antara % inhibisi dengan konsentrasi [46].

Pada Tabel 2 menunjukkan Persen (%) inhibisi bertambah seiring dengan meningkatnya konsentrasi. Persen inhibisi dalam aktivitas inhibitor tirosinase diartikan sebagai kemampuan suatu senyawa bioaktif di dalam sampel dalam menghambat enzim tirosinase pada konsentrasi larutan uji tertentu. Sehingga semakin besar nilai inhibitor maka aktivitas sebagai penghambat enzim tirosinase semakin besar, sedangkan nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh semakin kecil. Pada sampel yang diuji dapat terlihat bahwa nilai % inhibisi terendah didapatkan dari madu TR BGR yang berarti aktivitas sebagai inhibitor tirosinase sangat kecil. Pada ekstrak TSW memiliki % inhibisi tertinggi yang membuat aktivitas dalam penghambatan enzim menjadi lebih besar dibandingkan dengan sampel uji lainnya [47].

Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi suatu senyawa (bahan alam) yang memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas tirosinase sebesar 50%. Nilai ini akan memberikan petunjuk penting kemampuan suatu bahan dapat menghambat aktivitas suatu enzim. Pada Tabel 2. diketahui bahwa nilai  $IC_{50}$  pada sampel ekstrak teh dan madu serta campuran keduanya memiliki nilai yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menyatakan bahwa sampel memiliki aktivitas penghambatan enzim tirosinase yang sangat lemah, dikarenakan semakin tinggi nilai  $IC_{50}$  maka aktivitas inhibitor tirosinase menjadi kecil. Berdasarkan pembagian tersebut maka konsentrasi penghambatan sebesar 200-1000  $\mu\text{g/mL}$ , suatu bahan dikategorikan kurang aktif namun masih berpotensi sebagai penghambat tirosinase. Akan tetapi, nilai  $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$  maka dapat dikatakan sampel uji memiliki aktivitas penghambatan tirosinase yang sangat lemah. Pada kontrol asam kojat memiliki nilai  $IC_{50}$  yang kecil sebesar 26,33  $\mu\text{g/ml}$  yang mana nilai  $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ , maka kontrol asam kojik mempunyai aktivitas penghambatan enzim tirosinase yang kuat.

**Tabel 2.** Data hasil perhitungan  $IC_{50}$

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Ln Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ekstrak TSW	1000	6,90775	37,749	4.405,17
	500	6,2146	24,893	
	100	4,60517	8,868	
	50	3,91202	0,926	
	25	3,2188	-0,142	
Ekstrak TSS	1000	6,90775	15,135	5.980.899,48
	500	6,2146	9,046	
	100	4,60517	0,855	
	50	3,91202	0,463	
	25	3,2188	-0,57	
Ekstrak TTJ	1000	6,90775	24,786	43.163,72
	500	6,2146	18,803	
	100	4,60517	8,761	
	50	3,91202	2,6	
	25	3,2188	-0,321	
Madu TR BGR	1000	6,90775	2,208	$3,0829 \times 10^{36}$
	500	6,2146	1,175	
	100	4,60517	0,392	
	50	3,91202	0,036	
	25	3,2188	0,036	
Madu APLK	1000	6,90775	2,279	$3,2701 \times 10^{35}$
	500	6,2146	1,104	
	100	4,60517	0,214	
	50	3,91202	0,142	
	25	3,2188	-0,356	

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Ln Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Ekstrak TSW + Madu TR BGR	1000	6,90775	17,058	997.492,59
	500	6,2146	12,322	
	100	4,60517	4,38	
	50	3,91202	0,783	
	25	3,2188	-0,819	
Ekstrak TSW + Madu APLK	1000	6,90775	17,842	949.793,62
	500	6,2146	11,538	
	100	4,60517	3,454	
	50	3,91202	0,285	
	25	3,2188	0,071	
Ekstrak TSS + Madu TR BGR	1000	6,90775	8,013	949.914,41
	500	6,2146	5,627	
	100	4,60517	0,285	
	50	3,91202	0,214	
	25	3,2188	-0,071	
Ekstrak TSS + Madu APLK	1000	6,90775	7,443	1004,09 x 10 <sup>8</sup>
	500	6,2146	5,413	
	100	4,60517	0,926	
	50	3,91202	0,499	
	25	3,2188	0,321	
Ekstrak TTJ + Madu TR BGR	1000	6,90775	11,859	1390,92 x 10 <sup>9</sup>
	500	6,2146	5,662	
	100	4,60517	1,852	
	50	3,91202	0,57	
	25	3,2188	0,142	
Ekstrak TTJ + Madu APLK	1000	6,90775	11,254	1390,92 x 10 <sup>9</sup>
	500	6,2146	4,523	
	100	4,60517	1,674	
	50	3,91202	0,285	
	25	3,2188	-0,071	
Asam Kojat (Kontrol)	500	6,214608098	96,617	26,33
	250	5,521460918	81,731	
	125	4,828313737	68,056	
	62.5	4,135166557	59,046	
	31.25	3,442019376	52,671	
	15.625	2,748872196	42,13	
	7.8125	2,055725015	35,969	

Pada madu TR BGR dan madu APLK memiliki nilai IC<sub>50</sub> yang sangat besar dibandingkan sampel uji lainnya, sehingga madu sangat lemah sekali dalam melakukan penghambatan tirosinase. Sampel uji dari ekstrak TSW mempunyai nilai IC<sub>50</sub> yang paling rendah, sehingga ekstrak TSW lebih memiliki potensi dalam aktivitas penghambatan enzim tirosinase dibandingkan sampel uji lainnya walaupun kekuatan nilai IC<sub>50</sub> terbilang sangat lemah. Nilai IC<sub>50</sub> pada campuran ekstrak teh dan madu yang paling berpotensi dalam menghambat enzim tirosinase adalah campuran dari ekstrak TSW dan madu APLK. Nilai IC<sub>50</sub> bergantung pada metode ekstraksi dan bahan terlarut yang digunakan dalam ekstraksi serta pemilihan interval konsentrasi dan substrat digunakan dalam respon terhadap aksi penghambat tirosinase. Oleh karena itu, dalam melihat respon enzimatik, penentuan substrat sangat penting karena dapat mempengaruhi hasil estimasi pengukuran [45].

Pada sampel teh dan madu serta campuran keduanya memiliki nilai IC<sub>50</sub> > 1000 µg/mL, sehingga aktivitas untuk menghambat enzim tirosinase masih terbilang sangat lemah sekali. Ekstrak teh mengandung senyawa flavonoid, tanin dan steroid diperoleh dari hasil positif skrining fitokimia. Flavonoid dapat menghambat aktivitas tirosinase sehingga dapat menghambat proses pigmentasi kulit pada proses melanogenesis.

Tanin merupakan bagian dari senyawa polifenol yang berperan sebagai pelindung oksidasi sel dan dapat berperan dalam aksi penghambatan tirosinase. Senyawa steroid juga dikenal sebagai penghambat tirosinase yang efektif. Kemampuan ekstrak teh untuk melindungi kulit dari hiperpigmentasi dan kerusakan akibat radikal bebas disebabkan oleh kandungan fitokimianya, terutama senyawa flavonoid [48]. Pilihan asam kojat sebagai kontrol positif karena menunjukkan



adanya penghambatan yang serius pada aksi monofenolase dan dampak penghambatan campuran pada aksi difenolase dari katalis tirosinase sehingga reaksi pembentukan melanin akan terganggu [49].

Adanya senyawa fenolik (fenol dan polifenol sederhana) dan turunannya serta beberapa senyawa termasuk terpenoid, fenil, piridin, piperidin, piridinon dapat bertindak sebagai inhibitor tirosinase [50]. Senyawa flavonoid, fenol dan tanin memiliki potensi dalam menghambat aktivitas tirosinase [51]. Bahkan hasil penelitian terhadap aktivitas penghambatan enzim tirosinase buah kersen lebih maksimum pada ekstrak etanol dibandingkan dengan ekstrak air dan kandungan flavonoid yang terkandung dalam buah kersen merupakan senyawa bioaktif yang dapat bertindak sebagai penghambat tirosinase [52]. Senyawa lain yang juga menjadi penghambat tirosinase adalah flavonoid melalui pengkelatan  $\text{Cu}^{2+}$ , gugus hidroksil pada cincin A dan B [53].

Senyawa polifenol umumnya ditemukan pada tanaman yang dapat dikonsumsi dan tidak dapat dikonsumsi dan telah dilaporkan memiliki beberapa efek biologis [54]. Fenolat dengan kemampuan mereduksi ion mengurangi kemungkinan jalur pembentukan radikal hidroksil dari radikal anion superoksida dan juga menghambat enzim karena kemampuannya untuk mengkhelat tembaga di situs aktif [55]. Polifenol ini telah menarik para peneliti untuk menggunakan aplikasi kulit topikal. Senyawa-senyawa flavonoid seperti isookanin, luteolin, kaempferol, kaempferol 3-O-(6'-O-trans-p-coumaroyl)-glukosida (tilirosida), kuersetin, robinetin menunjukkan beberapa mekanisme yang mungkin terjadi [56]. Selain itu, hasil pengujian menunjukkan bahwa temperatur saat pemanfaatannya sangat mempengaruhi tanin (0,09%), waktu penyeduhan (3,98%), aroma (netral) dan pengaruh yang sangat besar pada variasi rasa (nonpartisan [57].

#### 4. Kesimpulan

Dalam uji skrining fitokimia untuk sampel ekstrak teh hampir semua senyawa uji positif (Flavonoid, Alkaloid, Tanin, Saponin, Steroid) kecuali senyawa Quinon dan Triterpenoid. Madu untuk sampel positif hanya senyawa saponin, sedang yang untuk senyawa lain negatif. Ekstrak teh berpotensi dalam menghambat enzim tirosinase, karena kandungan senyawa flavonoid, tanin dan steroid. Pengujian penghambatan enzim tirosinase pada madu dan teh serta campuran keduanya memiliki nilai  $\text{IC}_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ , maka aktivitas daya hambat sangat lemah. Namun demikian dalam penelitian telah menunjukkan bahwa ampas teh celup dan madu memiliki senyawa bioaktif melalui uji fitokimia. Akan tetapi kemampuannya sebagai penghambat tirosinase perlu dilakukan lagi kajian melalui berbagai variasi metode ekstraksi dan pelarut yang tepat.

#### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat melalui Pusat Penelitian dan Penerbitan Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah Jakarta yang telah membiayai penelitian ini tahun Anggaran 2022. No. SK B-301/LP2M-PUSLITPEN/TL.03/2022.

#### Daftar Pustaka

- [1] Z. Sagala, R. W. Pratiwi, and N. U. Azmi, "Uji Aktivitas Inhibisi terhadap Enzim Tirosinase dari Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Secara In Vitro," *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, vol. 7, no. 2, pp. 34–38, May 2019.
- [2] A. Rauf, S. Ningsi, and H. Nurdin, "Potensi Penghambatan Tirosinase Ekstrak Etanol Daun Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill, var. *Pyriforme Alef*)," *Proceeding Semantic Scholar*, pp. 1–7, 2019.
- [3] S. U. Noor, F. Faridah, and P. Magdalena, "In Vitro Enzyme Tyrosinase Inhibitory Activity Test on Liquorice Root Extract Cream (*Glycyrrhiza glabra* L.)," *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, vol. 16, no. 2, p. 150, Oct. 2018, doi: 10.35814/jifi.v16i2.566.
- [4] J. Alvarez-Suarez, F. Giampieri, and M. Battino, "Honey as a Source of Dietary Antioxidants: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Human Chronic Diseases," *Curr Med Chem*, vol. 20, no. 5, pp. 621–638, Jan. 2013, doi: 10.2174/092986713804999358.
- [5] S. Küçükaydın et al., "Characterization of Turkish Astragalus honeys according to their phenolic profiles and biological activities with a chemometric approach," *Food Biosci*, vol. 53, p. 102507, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.fbio.2023.102507.
- [6] W. A. Angga, Y. Rizal, M. E. Mahata, A. Yuniza, and R. Mayerni, "Potential of Waste Tea Leaves (*Camellia sinensis*) in West Sumatra to Be Processed into Poultry Feed," *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 17, no. 6, pp. 287–293, May 2018, doi: 10.3923/pjn.2018.287.293.
- [7] H. Rahmi, S. Supandi, N. S. Radjab, and T. Julianti, "Tyrosinase Inhibition from Green Tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) gel," *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, vol. 8, no. 2, p. 59, Jun. 2021, doi: 10.24198/ijpst.v8i2.27145.
- [8] H. K. Permatasari et al., "Kombucha tea from seagrapes (*Caulerpa racemosa*) potential as a functional anti-ageing food: in vitro and in vivo study," *Heliyon*, vol. 7, no. 9, p. e07944, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07944.

- [9] L. O. Sumarlin, A. Tjachja, R. Octavia, and N. Ernita, "Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Madu Cair dan Madu Bubuk Lokal Indonesia," *Al-Kimia*, vol. 6, no. 1, pp. 10–23, 2018.
- [10] L. Meziat, M. Bachir-bey, C. Bensouici, F. Saci, M. Boutiche, and H. Louaileche, "Assessment of inhibitory properties of flavonoid-rich fig (*Ficus carica* L.) peel extracts against tyrosinase,  $\alpha$ -glucosidase, urease and cholinesterases enzymes, and relationship with antioxidant activity," *Eur J Integr Med*, vol. 43, p. 101272, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.eujim.2020.101272.
- [11] M. Fan, H. Ding, G. Zhang, X. Hu, and D. Gong, "Relationships of dietary flavonoid structure with its tyrosinase inhibitory activity and affinity," *LWT*, vol. 107, pp. 25–34, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.02.076.
- [12] M. Taş-Küçükaydin et al., "Chemometric classification of chestnut honeys from different regions in Turkey based on their phenolic compositions and biological activities," *Food Chem*, vol. 415, p. 135727, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.135727.
- [13] P. D. N. Bayan and L. Syafnir, "Perbandingan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Ampas Teh Hitam dan Teh Hijau (*Camellia Sinensis* (L.) Kuntze) dengan Metode DPPH Serta Penentuan Kadar Polifenol," in *Prosiding Farmasi*, Bandung: Unisba, Aug. 2018, pp. 321–328.
- [14] N. Nurjanah, B. E. Aprilia, A. Fransiskayana, M. Rahmawati, and T. Nurhayati, "Senyawa Bioaktif Rumpun Laut Dan Ampas Teh Sebagai Antibakteri Dalam Formula Masker Wajah," *J Pengolah Has Perikan Indones*, vol. 21, no. 2, pp. 305–316, Aug. 2018, doi: 10.17844/jphpi.v21i2.23086.
- [15] Y. Aoki, T. Tanigawa, H. Abe, and Y. Fujiwara, "Melanogenesis Inhibition by an Oolong Tea Extract in B16 Mouse Melanoma Cells and UV-Induced Skin Pigmentation in Brownish Guinea Pigs," *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 71, no. 8, pp. 1879–1885, Aug. 2007, doi: 10.1271/bbb.70099.
- [16] N. T. Dung, V. K. Bajpai, A. Rahman, J. I. Yoon, and S. C. Kang, "Phenolic Contents, Antioxidant And Tyrosinase Inhibitory Activities Of *Lonicera Japonica* Thumb," *J Food Biochem*, vol. 35, no. 1, pp. 148–160, Feb. 2011, doi: 10.1111/j.1745-4514.2010.00461.x.
- [17] E. V. Curto et al., "Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors," *Biochem Pharmacol*, vol. 57, no. 6, pp. 663–672, Mar. 1999, doi: 10.1016/S0006-2952(98)00340-2.
- [18] O. Nerya, J. Vaya, R. Musa, S. Izrael, R. Ben-Arie, and S. Tamir, "Glabrene and Isoliquiritigenin as Tyrosinase Inhibitors from Licorice Roots," *J Agric Food Chem*, vol. 51, no. 5, pp. 1201–1207, Feb. 2003, doi: 10.1021/jf020935u.
- [19] T. Okselni, A. W. Septama, R. A. Pamungkas, E. P. Rahmi, M. Efdi, and M. Koketsu, "A systematic review and meta-analysis extraction techniques to reach the optimum asiaticoside content from the edible plant of *Centella asiatica*," *South African Journal of Botany*, vol. 155, pp. 261–273, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.sajb.2023.02.019.
- [20] D.-H. Truong, D. H. Nguyen, N. T. A. Ta, A. V. Bui, T. H. Do, and H. C. Nguyen, "Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and In Vitro Anti-Inflammatory Activities of *Severinia buxifolia*," *J Food Qual*, vol. 2019, pp. 1–9, Feb. 2019, doi: 10.1155/2019/8178294.
- [21] E. S. Savitri, K. Holil, R. S. Resmisari, U. Syarifah, and S. Munawaroh, "Effect of extraction solvent on total phenol, total flavonoid content and antioxidant activities of extract plants *Punica granatum*, *Vitis vinifera* L, *Ficus carica* L. and *Olea europea*," 2019, p. 030034. doi: 10.1063/1.5115638.
- [22] O. R. Alara, N. H. Abdurahman, C. I. Ukaegbu, and N. H. Azhari, "Vernonia cinerea leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique," *Ind Crops Prod*, vol. 122, pp. 533–544, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.06.034.
- [23] T. Belwal et al., "A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 100, pp. 82–102, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.trac.2017.12.018.
- [24] N. Čujić, K. Šavikin, T. Janković, D. Pljevljakušić, G. Zdunić, and S. Ibrić, "Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique," *Food Chem*, vol. 194, pp. 135–142, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.008.
- [25] U.-J. Vajić et al., "Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology," *Ind Crops Prod*, vol. 74, pp. 912–917, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.06.032.
- [26] P. J. N. Dewi, G. Putra, and L. Lutfi Suhendra, "Effect of Solvent Type and Maceration Time on Characteristics and Stability of Lime Orange Extract (*Citrus amblycarpa*) as Natural Antioxidants in Foods," *Media Ilmiah Teknologi Pangan*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, Mar. 2022.
- [27] H. Parbuntari, Y. Prestica, R. Gunawan, M. N. Nurman, and F. Adella, "Preliminary Phytochemical Screening (Qualitative Analysis) of Cacao Leaves (*Theobroma cacao* L.)," *EKSAKTA: Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, vol. 19, no. 2, pp. 40–45, Oct. 2018, doi: 10.24036/eksakta/vol19-iss2/142.

- [28] O. A. O. Adam, R. S. M. Abadi, and S. M. H. Ayoub, "The Effect of Extraction method and Solvents on yield and Antioxidant Activity of Certain Sudanese Medicinal Plant Extracts," *The Journal of Phytopharmacology*, vol. 8, no. 5, pp. 248–252, Oct. 2019, doi: 10.31254/phyto.2019.8507.
- [29] Z. Azizah, Zulharmita, and S. W. Wati, "Skrining Fitokimia Dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Pare (*Momordica charantia* L.)," *Jurnal Farmasi Higea*, vol. 10, no. 2, pp. 163–172, 2018.
- [30] T. Tounekti, E. Joubert, I. Hernández, and S. Munné-Bosch, "Improving the Polyphenol Content of Tea," *CRC Crit Rev Plant Sci*, vol. 32, no. 3, pp. 192–215, May 2013, doi: 10.1080/07352689.2012.747384.
- [31] T.-S. Chang, "An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors," *Int J Mol Sci*, vol. 10, no. 6, pp. 2440–2475, May 2009, doi: 10.3390/ijms10062440.
- [32] V.-L. Truong and W.-S. Jeong, "Cellular Defensive Mechanisms of Tea Polyphenols: Structure-Activity Relationship," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 17, p. 9109, Aug. 2021, doi: 10.3390/ijms22179109.
- [33] S. Li, L. Zhang, X. Wan, J. Zhan, and C.-T. Ho, "Focusing on the recent progress of tea polyphenol chemistry and perspectives," *Food Science and Human Wellness*, vol. 11, no. 3, pp. 437–444, May 2022, doi: 10.1016/j.fshw.2021.12.033.
- [34] Ø. M. Andersen and K. R. Markham, *FLAVONOIDS: Chemistry, Biochemistry and Applications*. New York: CRC Press Taylor & Francis, 2006.
- [35] A. P. Wardana and Tukiran, "Skrining Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kloroform Tumbuhan Gowok (*Syzygium polyccephalum*)," in *Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pembelajarannya*, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya, Sep. 2016, pp. 1–6.
- [36] P. D. Padmasari, K. W. Astuti, and N. K. Warditiani, "Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.)," *Jurnal Farmasi Udayana*, vol. 2, no. 4, pp. 1–7, 2013.
- [37] W. F. Dewatisari, L. RumiYanti, and I. Rakhmawati, "Rendemen dan Skrining Fitokimia pada Ekstrak Daun Sansevieria sp.," *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, vol. 17, no. 3, p. 197, Jan. 2018, doi: 10.25181/jppt.v17i3.336.
- [38] R. Ikalinus, S. K. Widyastuti, and N. L. E. Setiasih, "Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa oleifera*)," *Indonesia Medicus Veterinus*, vol. 14, no. 1, pp. 71–79, 2015.
- [39] R. N. Sani, F. C. Nisa, R. D. Andriani, and J. M. Maligan, "Yield Analysis and Phytochemical Screening Ethanol Extract of Marine Microalgae *Tetraselmis chuii*," *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, vol. 2, no. 4, pp. 121–126, Apr. 2014.
- [40] E. Marlina and C. Saleh, "Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Fraksi heksana, Etil Asetat dan Metanol dari Buah Labu Air (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl)," *Jurnal Kimia Mulawarman*, vol. 8, no. 2, pp. 63–69, May 2011.
- [41] W. S. Putri, N. K. Warditiani, and L. P. F. Larasanty, "Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.)," *Jurnal Farmasi Udayana*, vol. 2, no. 4, pp. 56–60, 2013.
- [42] Balsam, M.S. & Sagarin, E., 1972. *Cosmetics Science and Technology*, 2nd ed, Vol. 3, John Wiley and Sons, New York.
- [43] C. Q. Tang et al., "Identifying long-term stable refugia for relict plant species in East Asia," *Nat Commun*, vol. 9, no. 1, p. 4488, Oct. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06837-3.
- [44] Z. Bayrakçeken Güven, I. Saracoglu, A. Nagatsu, M. A. Yilmaz, and A. A. Basaran, "Anti-tyrosinase and antimelanogenic effect of cinnamic acid derivatives from *Prunus mahaleb* L.: Phenolic composition, isolation, identification and inhibitory activity," *J Ethnopharmacol*, vol. 310, p. 116378, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.jep.2023.116378.
- [45] A. Levitzki and E. Mishani, "Tyrostatins and Other Tyrosine Kinase Inhibitors," *Annu Rev Biochem*, vol. 75, no. 1, pp. 93–109, Jun. 2006, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142657.
- [46] Meiliana Charissa, Joshita Djajadisastra, and Berna Elya, "Uji Aktivitas Antioksidan dan Penghambatan Tirosinase serta Uji Manfaat Gel Ekstrak Kulit Batang Taya (*Nauclea subdita*) terhadap Kulit," *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, vol. 6, no. 2, pp. 98–107, Aug. 2016.
- [47] N. Rubinadzari, L. S. Saula, and M. R. Utami, "Perbandingan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Hijau dan Sangrai Kopi Robusta (*Coffea canephora* L.) Serta Kombinasinya Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*," *LUMBUNG FARMASI ; Jurnal Ilmu Kefarmasian*, vol. 3, no. 2, Jul. 2022.
- [48] M. Miyazawa and N. Tamura, "Inhibitory Compound of Tyrosinase Activity from the Sprout of *Polygonum hydropiper* L. (Benitade)," *Biol Pharm Bull*, vol. 30, no. 3, pp. 595–597, 2007, doi: 10.1248/bpb.30.595.
- [49] L. Saghale, M. Pourfarzam, A. Fassihi, and B. Sartippour, "Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid.," *Res Pharm Sci*, vol. 8, no. 4, pp. 233–42, Oct. 2013.
- [50] S. Zolghadri et al., "A comprehensive review on tyrosinase inhibitors.," *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 34, no. 1, pp. 279–309, Dec. 2019, doi: 10.1080/14756366.2018.1545767.
- [51] M. Gazali, "Aktivitas Inhibitor Tirosinase Rumput Laut Halimeda Spp dari Pesisir Aceh Barat," *Jurnal Perikanan Tropis*, vol. 5, no. 2, p. 149, Oct. 2018, doi: 10.35308/jpt.v5i2.1034.

- [52] K. P. Balakrishnan, N. Narayanaswamy, and A. Duraisamy, "Tyrosinase inhibition and anti-oxidant properties of *Muntingia calabura* extracts: In vitro studies," *Int J Pharma Bio Sci*, vol. 2, no. 1, pp. 294–303, Jan. 2011.
- [53] Z. Abidin, U. Khaeriah, Zuhrina, M. Pratama, and M. Baits, "Tyrosinase Inhibitor Activity Measurement of Crude and Purified Extract of *Moringa* Leaves (*Moringa oleifera* L.)," *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, vol. 1, no. 1, pp. 52–58, 2019.
- [54] M. P. Kähkönen et al., "Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds," *J Agric Food Chem*, vol. 47, no. 10, pp. 3954–3962, Oct. 1999, doi: 10.1021/jf990146l.
- [55] Y.-H. Lin et al., "Evaluation of a New Hepatitis B Virus Surface Antigen Rapid Test with Improved Sensitivity," *J Clin Microbiol*, vol. 46, no. 10, pp. 3319–3324, Oct. 2008, doi: 10.1128/JCM.00498-08.
- [56] K. Jakimiuk, S. Sari, R. Milewski, C. T. Supuran, D. Şöhretoğlu, and M. Tomczyk, "Flavonoids as tyrosinase inhibitors in silico and in vitro models: basic framework of SAR using a statistical modelling approach," *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 37, no. 1, pp. 427–436, Dec. 2022, doi: 10.1080/14756366.2021.2014832.
- [57] N. Fikri, R. Rasdiansyah, and F. Zakaria, "Pengaruh Suhu Dan Lama Penyeduhan Terhadap Kualitas Minuman Teh Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)," *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pertanian*, vol. 6, no. 4, pp. 492–500, Nov. 2021, doi: 10.17969/jimfp.v6i4.18287.