

**THE ANTIHYPERPIGMENTATION EFFECT
PARE LEAVES (*Momordica charantia L.*) ETHANOL EXTRACT
ON GUINEA PIG (*Cavia porcellus*) SKIN**

Risha Fillah Fithria^{1*}, Yance Anas¹, and Febi Ariska Wahyu Putri¹

¹ Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy,

Wahid Hasyim University

*Email: rishafithria@yahoo.com

Abstrak

*Hiperpigmentasi pada kulit telah terbukti dapat diatasi dengan ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia L.*) (EEDP) secara invitro. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek antihiperpigmentasi EEDP pada kulit Guinea pig (*Cavia porcellus*). Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan randomized matched post test only control group design. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan cairan penyari etanol 70%. Dua puluh lima ekor Guinea pig dipapar sinar ultraviolet B 2 menit/hari selama 2 minggu, kemudian dibagi ke dalam 5 kelompok. Kelompok negatif diberi dimethyl sulfoxide (DMSO); kelompok positif diberi krim farma yang mengandung hydroquinone 4%, tretinooin 0,05%, and fluocinolone acetonide 0,01%; serta kelompok perlakuan diberi EEDP 200, 400, and 600 ppm. Seluruh perlakuan diberikan sekali sehari selama 2 minggu kemudian dilakukan biopsi jaringan. Uji histopatologi dilakukan menggunakan pewarnaan fontana-masion dan nuclear fast red. Perbedaan jumlah melanin pada seluruh kelompok dianalisa menggunakan uji Kruskal Wallis, diikuti dengan Mann-Whitney dengan taraf kepercayaan 95%. Data menunjukkan bahwa EEDP terbukti mempunyai efek antihiperpigmentasi dan seluruh kelompok EEDP mempunyai efek yang lebih baik dibanding dengan sediaan krim farma.*

Kata Kunci : Antihiperpigmentasi, Daun Pare, Guinea pig, Melanin.

PENDAHULUAN

Produk topikal mengandung obat yang digunakan untuk mencegah maupun mengobati hiperpigmentasi terdiri dari hidrokuinon, steroid, dan *retinoic acid*. Bahan-bahan tersebut dalam pemakaian jangka panjang menimbulkan beberapa efek yang tidak diinginkan, salah satunya yaitu okronosis. Efek yang tidak diinginkan tersebut mendorong dilakukannya penelitian untuk mencari penghambat enzim tirosinase yang aman bagi kesehatan misalnya dari bahan alam. Antioksidan melalui berbagai penelitian telah terbukti mampu mengatasi hiperpigmentasi. Salah satu senyawa antioksidan yang terdapat dalam bahan alam adalah daun pare. Ekstrak etanol daun pare diketahui memiliki kandungan flavonoid yang dapat menghambat aktivitas enzim tirosinase sebagai senyawa inhibitor kompetitif enzim tirosinase karena struktur dari flavonoid yang mirip dengan DOPA sebagai substrat (Chang, 2009). Tsai dkk (2014) membuktikan bahwa ekstrak etanol daun pare 200 μ g/mL memiliki aktifitas antimelanogenik, antitirosinase, dan penghambatan pembentukan melanin intraseluler.

METODE PENELITIAN

Design Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *randomized matched post test only control group design*.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun pare yang didapat dari budidaya tanaman daerah Boja, Jawa tengah; etanol 70% sebagai cairan penyari; DMSO (Dimethyl Sulfoxide); Reagen *Fotana masion* dan *nuclear fast red*; Xylene; Eter; Formalin 40%; Formalin *buffer fosfat* 10%; serta Krim farma (Hidrokuinon 4%; retinoic acid 0,05%; dan fluocinolone acetonide 0,01%)

Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan antara lain seperangkat alat maserasi; *Rotary evaporator*; kandang guinea pig; lampu phillips narrowbrand 311 nm; tempat minum hewan uji; alat cukur; timbangan digital; peralatan bedah yaitu gunting anatomis untuk bedah, scalpel; peralatan untuk membuat sediaan histologi seperti mikrotom, gelas obyek dan gelas penutup; mikroskop; kamera; dan penggaris.

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah Guinea pig jantan, strain lokal, berumur 3 bulan dengan berat badan 300-350 gram. Jumlah hewan uji tiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus Federer (2011) sebagai berikut :

$$\begin{array}{ll} (n-1)(t-1) & \geq 15 \\ (n-1)(11-1) & \geq 15 \\ (n-1)(10) & \geq 15 \\ 10n - 10 & \geq 15 \\ 10n & \geq 25 \\ n & \geq 2,5 \\ n & = 2,5 \times 3 \end{array}$$

Keterangan :

n : Banyaknya sampel

t : Banyaknya perlakuan

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut didapatkan jumlah n adalah 3 yang artinya jumlah hewan uji tiap kelompok adalah 3 ekor, namun untuk berjaga-jaga apabila hewan uji mati selama penelitian, maka digunakan 5 ekor tiap kelompok.

Pembuatan serbuk simplisia

Daun pare yang telah diperoleh dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50-70°C sampai kering dengan tanda daun mudah hancur bila diremas dengan tangan. Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak dalam penyimpanan yang lama (Harborne, 1987). Simplisia kering dibuat serbuk dengan cara diblender kemudian diayak dengan ayakan ukuran 25 mesh kemudian diukur kadar airnya dengan alat *moisture balance*. Persyaratan kadar air pada simplisia kering sebelum dilakukan proses penyarian yaitu kurang dari 10%.

Pembuatan ekstrak etanol Daun Pare (*Momordica charantia L.*)

Pembuatan ekstrak daun pare dilakukan dengan menyari simplisia menggunakan metode maserasi dengan cairan pelarut etanol 70%. Serbuk simplisia ditimbang kurang lebih 500 gr dimasukkan dalam toples, ditambah cairan penyari yaitu etanol 70% sebanyak 1 L, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya supaya tidak terjadi kerusakan dekomposisi kandungan senyawa (Depkes, 1986) sambil sesekali diaduk sehari minimal 3 kali. Setelah 5 hari, campuran simplisia dan etanol 70% diserai sehingga diperoleh filtrat (maserasi) I. Ampas ditambah etanol 70% secukupnya hingga 1 L kemudian ditutup dan dibiarkan selama 2 hari, terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Setelah 2 hari, campuran ampas dan etanol 70% diserai kembali dan diperoleh filtrat (maserasi) II. Filtrat I dan II kemudian dicampur dan dipekatan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu < 50°C sampai diperoleh ekstrak kental etanol. Setelah didapatkan ekstrak etanol masing-masing simplisia, rendemen dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Randemen} = \frac{\text{berat ekstrak yang didapat}}{\text{berat serbuk yang diekstraksi}} \times 100\%$$

Uji Aktivitas Antihiperpigmentasi

Sebanyak 25 ekor *Guinea pig* diadaptasi selama 1 minggu. Rambut bagian punggung belakang hewan uji dicukur seluas 3x3 cm. Hewan uji diberi paparan sinar ultraviolet B dari lampu phillips narrowband 311 nm masing-masing 2 menit per hari selama 2 minggu, kemudian dibagi menjadi 5 kelompok secara acak. Kelompok kontrol negatif diberi pelarut DMSO. Kelompok kontrol positif diberi krim farma yang terdiri atas hidrokuinon 4%, tretinooin 0,05%, fluosinolon asetonid 0,01%. Kelompok 1, 2, dan 3 diberi perlakuan ekstrak etanol daun pare (DP) dengan konsentrasi masing-masing 200, 400, and 600 ppm. Seluruh perlakuan diberikan 1 x sehari selama 2 minggu. Hari ke 15, hewan uji dieutanasi dengan eter kemudian dilakukan biopsi jaringan dengan kedalaman 2mm (sampai sub kutan) pada bagian lesi pigmentasi dengan panjang 2 cm. Jaringan kulit dimasukan dalam larutan formalin 40% kemudian jaringan kulit hewan uji dibuat sediaan histologis untuk pemeriksaan jumlah melanin.

Pembuatan sediaan histologi

1. Tahap fiksasi

Jaringan kulit marmut direndam dalam larutan formalin *buffer fosfat* 10% selama 1 hari. Kemudian dilakukan *trimming* bagian jaringan yang akan diambil.

2. Tahap dehidrasi

Jaringan kulit marmut direndam dalam alkohol bertingkat berturut turut 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% masing-masing 3 kali selama 25 menit.

3. Tahap *clearing*

Jaringan dimasukkan ke dalam *clearing agent* (*alcohol:xylene* 1:1) selama 30 menit dan dicelupkan ke dalam *xylene* murni sampai transparan.

4. Tahap *embedding*

Setelah dilakukan infiltrasi sebanyak 4 kali dengan paraffin murni, kemudian jaringan ditanam ke dalam paraffin cair, dibiarkan membentuk blok (\pm 1 hari) agar mudah diiris dengan mikrotom.

5. Tahap pemotongan

Proses pemotongan jaringan dengan menggunakan *microtome* Leica 820, tebal 5 μ secara serial, diambil irisan ke 5, 10, 15 untuk selanjutnya dilakukan penempelan pada gelas obyek yang sudah diolesi pelekat dan terakhir dilakukan pengecatan dengan *Masson-Fontana* (Hastiningsih dan Indiradewi, 2015).

Pewarnaan dengan *Fontana Masson* dan *Nuclear Fast Red*

1. Jaringan yang masih mengandung paraffin, dilakukan deparafinasi (slide direndam dalam *xylene* sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit)
2. Dilakukan rehidrasi (slide direndam dalam etanol 100%, 95%, 70%, dH₂O masing-masing selama 2 menit)
3. Selanjutnya slide direndam dengan larutan *Silver Nitrate Fontana* selama 2 jam dan diinkubasi pada suhu 56°C di dalam oven.
4. Kemudian slide dicuci menggunakan dH₂O sebanyak 3 kali, lalu ditetesi larutan *Gold Chloride* 1% dan didiamkan selama 5 menit.
5. Slide dicuci dengan menggunakan dH₂O kemudian ditetesi larutan *Sodium thiosulfate* 5% dan didiamkan selama 1 menit.
6. Kemudian slide dicuci menggunakan dH₂O dan dicat menggunakan *Nuclear Fast Red* selama 5 menit.
7. Kemudian slide dicuci menggunakan dH₂O sebanyak 2 kali dan dilakukan dehidrasi menggunakan etanol 70%, 95% dan 100% selama masing-masing 20 detik.
8. Kemudian *clearing* menggunakan *xylene* sebanyak 2 kali masing-masing 2 menit dan *mounting* pada medium yang berbasis *xylene*.
9. Hasil pengecatan adalah *granule* melanin berwarna hitam dengan inti sel berwarna merah muda dan sitoplasma berwarna merah muda pucat (*pink-pale*) (Hastiningsih dan Indiradewi, 2015).

Prosedur Pengamatan Hasil

Jumlah melanin dihitung dengan metode analisis digital, setiap sediaan preparat difoto dengan menggunakan kamera *Optilab Pro* dan mikroskop Olympus CX41 dengan pembesaran 400 kali, masing-masing preparat difoto sebanyak 3 kali disimpan dalam format JPEG. Hasil foto diedit menggunakan piranti lunak *Adobe Photoshop CS3* versi 10.01 untuk memilih jaringan epidermis menggunakan *tool Polygonal Lasso* yaitu sisi kiri, tengah dan sisi kanan sediaan. Lapangan pandang yang diambil yaitu lapangan pandang yang paling banyak melanin yang ditandai dengan daerah berwarna hitam (Hastiningsih dan Indiradewi, 2015).

Prosedur Penghitungan Jumlah Melanin Epidermis

Perhitungan jumlah melanin dalam satuan *pixel* dilakukan dengan piranti lunak *ImageJ* version 1,47t menggunakan *channel red* dengan mengatur *threshold*. Jumlah melanin yang ternormalisasi dihitung berdasarkan rumus berikut per lapangan pandang (McMullen, dkk., 2010).

$$\frac{\text{pixel melanin}}{\text{pixel epidermis}} \times 100\%$$

Analisis Data

Jumlah melanin pada seluruh kelompok uji dianalisa perbedaannya menggunakan *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* dengan taraf kepercayaan 95%.

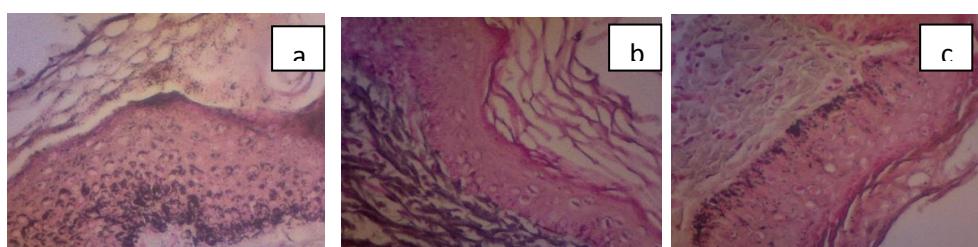
HASIL DAN PEMBAHASAN

Guinea pig dipilih sebagai hewan uji pada penelitian ini karena *Guinea pig* mudah didapat, tidak mahal, mudah penanganannya dan memiliki banyak persamaan secara biologis dengan manusia, serta memiliki beberapa macam melanin baik dari jenis eumelanin, pheomelanin, dan albino. Hewan uji yang digunakan berjenis kelamin jantan untuk menghindari adanya pengaruh hormon *Melanocyte Stimulating Hormone* (MSH), estrogen, dan progesteron yang banyak terdapat pada betina daripada jantan. Oleh karena itu, melanin yang diproduksi tidak banyak dipengaruhi oleh pemicu internal termasuk hormon tetapi dikarenakan adanya rangsangan sinar UVB.

Hewan uji dipapar sinar UVB 311 nm pada bagian kulit punggung selama 2 minggu. Penyinaran dilakukan pada siang hari untuk mengkondisikan seperti pemaparan sinar matahari. Penyinaran sinar UVB ini dimaksudkan untuk merangsang produksi melanin oleh sel melanosit yang berada pada stratum basal (germinativum). Perlakuan hewan uji dilakukan selama 2 minggu pada malam hari untuk menghindari sinar matahari karena pengobatan hiperpigmentasi harus terhindar dari sinar matahari sehingga tercapai hasil yang maksimal. Efek antihiperpigmentasi pada penelitian ini dilihat dari jumlah melanin masing-masing kelompok di akhir perlakuan.

Data jumlah melanin dihitung melalui aplikasi analisis *ImageJ* dari gambar jaringan kulit *Guinea pig*. Preparat histopatologi kulit hewan uji dapat dilihat pada Gambar 1.

Secara kualitatif, terlihat perbedaan jumlah melanin pada penampang jaringan kulit *Guinea pig* antara KN, KP, dan 3 kelompok perlakuan ekstrak. Jika dilihat dari reratanya, persentase jumlah melanin kelompok perlakuan ekstrak etanol daun pare 200 ppm adalah 2,014 %, EEDP 400 ppm adalah 1,062 %, dan EEDP 600 ppm adalah 0,622 %. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin besar kemampuan penghambatan pembentukan melanin yang ditandai dengan persen jumlah melanin yang semakin kecil. Jumlah melanin dari ketiga perlakuan tersebut kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan negatif yang tersaji pada Gambar 2.

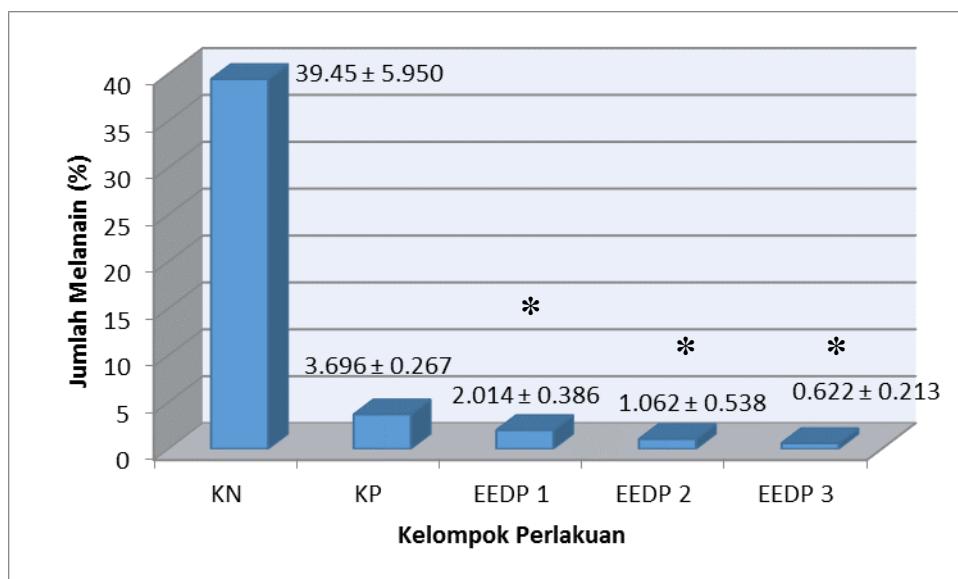


Keterangan :

- a. Kontrol Negatif
- b. Kontrol Positif
- c. EEDP 200 ppm
- d. EEDP 400 ppm
- e. EEDP 600 ppm

Gambar 1. Hasil Uji Histopatologi

Seluruh konsentrasi EEDP menunjukkan jumlah melanin yang lebih sedikit secara signifikan dibandingkan KN ($p = 0.009$, $p = 0.009$, dan $p = 0.009$), yang artinya EEDP mempunyai efek antihiperpigmentasi. Bahkan seluruh konsentrasi EEDP tersebut mempunyai efek antihiperpigmentasi yang lebih baik dibandingkan kelompok kontrol positif (standar terapi krim farma). Konsentrasi 600 ppm ($p = 0.028$) terbukti mempunyai efek antihiperpigmentasi yang lebih baik daripada konsentrasi 200 ppm, namun sebanding dengan konsentrasi 400 ppm ($p = 0.175$).

**Gambar 2. Rerata Jumlah Melanin**

Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Tsai dkk (2014) bahwa ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantia* L.) diketahui memiliki aktifitas antimelanogenik, antitirosinase, dan penghambatan pembentukan melanin intraseluler pada konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ meskipun pada penelitian ini konsentrasi yang paling baik yaitu 600 ppm.

Ekstrak etanol daun pare diketahui memiliki kandungan flavonoid yang dapat menghambat aktivitas enzim tirosinase sebagai senyawa inhibitor kompetitif enzim tirosinase karena struktur dari flavonoid yang mirip dengan DOPA sebagai substrat (Chang, 2009). Menurut Chang (2012)

bahwa kandungan flavonoid sebagai senyawa antioksidan memiliki mekanisme penghambatan melanogenesis melalui jalur *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF).

Priyadarsini *et al.*, (2003) menyatakan bahwa atom H dari senyawa fenolik sangat potensial sebagai aktivitas antioksidan. Banyak senyawa fenolik diketahui potensial dalam aktivitas antioksidan serta beberapa di antaranya berperan untuk inhibitor melanogenesis (Barnes, dkk., 2004; Han, dkk., 2007).

Kelompok kontrol positif pada penelitian ini berupa krim farma yang terdiri atas tiga kombinasi obat atau yang dikenal dengan *triple combination therapy*. Menurut Taylor (2005) menyebutkan bahwa *triple combination therapy* lebih cocok untuk kulit orang Asia yang terdiri atas hidrokuinon 4% (HQ), tretinooin 0,05% (RA), dan fluosinolon asetonid 0,01% (FA). *Triple combination therapy* tersebut terbukti lebih aman dan efektif dalam pengobatan melasma selama 8 minggu.

Hidrokuinon merupakan senyawa kimia hidroksifenolik yang dapat menginhibisi perubahan DOPA menjadi melanin melalui penghambatan aktivitas enzim tirosinase. Sedangkan, tretinooin merupakan senyawa non fenolik yang mampu meningkatkan pergantian sel epidermis, menurunkan waktu kontak antara keratinosit dan melanosit serta mempromosikan penghilangan pigmen melalui epidermopoesis. Krim farma yang digunakan juga ditambahkan fluosinolon asetonid sebagai kortikosteroid untuk mengurangi iritasi atau eritema dari tretinooin dan HQ melalui efek modifikasi fungsi dari epidermis dan dermis, serta leukosit yang diekspresikan melalui empat macam mekanisme yaitu antiinflamasi, imunosupresi, antimitosis dan vasokonstriksi (Fithria, 2015).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Ekstrak Etanol Daun Pare terbukti mempunyai efek antihiperpigmentasi dan seluruh kelompok EEDP mempunyai efek yang lebih baik dibanding dengan sediaan krim farma

Saran

Perlu dilakukan uji Ketoksikan pada kulit hewan uji, serta perlu dilakukan uji klinik fase 1 dan 2.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnes, S., D'Alessandro, T., Marion, C.K., Rakesh, P.P., Brenda, J.B., and Victor, M.D., 2004, *The Importance of In Vivo Metabolism of Polyphenols And Their Biological Actions, Phytochemicals, Mechanisms of Action*, CRC Press, 51–59.
- Chang, T. S., 2009, An Update Review of Tyrosinase Inhibitors., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2705500/>, diakses tanggal 20 Maret 2015
- Depkes RI, 1986, *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Federer, W. T. 2011. *Statistical Design and Analysis for Intercropping Experiments*. New York: Springer. p 30-33.
- Fithria, R.F., 2015. *Mengatasi Hiperpigmentasi Ringan dengan Produk Sediaan Topikal*. Wahid Hasyim University Press. Semarang : 5, 13, 17, 45, 48, 51, 56, 63.
- Han, X., Shen, T., and Lou, H., 2007., Review: Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, *Int. J. Mol. Sci.*, **8**, 950–988.
- Harborne, J.B., 1987, Metode Fitokimia, diterjemahkan oleh Padmawinata, K., dan Soediro, I., ITB, Bandung
- Hastiningsih dan Indiradewi, 2015, *Krim Ekstrak Etanol Kulit Batang Pohon Nangka (Arthocarpus Heterophilus) Sama Efektifnya Dengan Krim Hidrokuinon Dalam Mencegah Peningkatan Jumlah Melanin Pada Kulit Marmut (Cavia Porcelus) Yang Dipapar Sinar UVB*. Tesis. Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Udayana, Denpasar.

- McMullen, R. L., Bauza, E., Gondran, C., Oberto, G., Domloge, N., Dal Farra, C., and Moore, D. J. 2010. Image Analysis To Quantify Histological And Immunofluorescent Staining Of Ex Vivo Skin And Skin Cell Culture. *International Journal Cosmetic Science*. 32(2): 143-154.
- Priyadarshini, K.I., Maity, D.K., Naik, G.H., Kumar, M.S., Unnikrishnan, M.K., Satav, J.G., and Mohan, H., 2003, Role of Phenolic OH And Methylene Hydrogen On The Free Radical Reactions And Antioxidant Activity of Curcumin, *Free Radical Biology And Medicine*, **35(5)**, 475–484
- Taylor, S. C. 2005. *Photoaging and Pigmentary Changes of The Skin*. In: Burgess, C, M., editor. *Cosmetic Dermatology*. 1st edition. Germany: Springer. p 29-49.
- Tsai, T., Ching-Jang, H., Wen-Huey, W., Wen-Cheng, H., Jong-Ho, C., and Po-Jung, T., 2014, Antioxidant, Cell Protective, and Anti-melanogenic Activities of Leaf Extract from Wild Bitter Melon (*Momordica charantia* Linn. Var. *Abbreviata* Ser) Cultivars, *Botanical Studies*, 55, 78.