



# Uji Aktivitas Inhibitor Tirosinase Ekstrak Kulit Buah Cokelat (*Theobroma cacao* L.) dan Formulasinya dalam Bentuk Sediaan Nanoemulsi

(Tyrosinase inhibitory activity of cocoa pod husk extract (*Theobroma cacao* L.) and its formulation into nanoemulsion system)

Sani Ega Priani\*, Ainul Fatihah Halim, Sri Peni Fitrianiingsih & Livia Syafnir

Program Studi Farmasi Universitas Islam Bandung, Jl. Tamansari No.1, Kec. Bandung Wetan, Kota Bandung, Jawa Barat

**ABSTRACT:** Cocoa pod husk is known to contain various active compounds such as polyphenols and flavonoids, that potential to have tyrosinase inhibitory activity. Nanoemulsion based delivery system predicted could increase percutaneous penetration and effectiveness of cocoa pod husk extract. The purpose of this study was to determine the tyrosinase inhibitory activity of cocoa pod husk extract and to formulate it into a nanoemulsion system with good physical properties. Cocoa pod husk powder was extracted by maceration method using 70% ethanol and then submitted for tyrosinase inhibitory activity testing using the dopachrome method. The cocoa pod husk nanoemulsion was prepared using grape seed oil, tween 80 as a surfactant, and glycerin as a cosurfactant. The results showed that cocoa pod husk extract had tyrosinase inhibitory activity with an IC50 value of 199.98 ppm. The cocoa pod husk nanoemulsion showed clear and homogeneous appearance, pH  $6.21 \pm 0.02$ , viscosity  $1070 \pm 24.5$  cps, show Newtonian behaviour with a globule size of  $108 \pm 15$  nm. The cocoa pod husk nanoemulsion has good physical stability based on centrifugation, heating cooling, and freeze thaw tests. This study's conclusions are cocoa pod husk has tyrosinase inhibitory activity and it has been developed into a nanoemulsion system with good physical characteristic and stability.

**Keywords:** nanoemulsion; cocoa pod husk; tyrosinase inhibitor; stability.

**ABSTRAK:** Limbah kulit buah cokelat diketahui mengandung berbagai senyawa aktif seperti polifenol dan flavonoid sehingga berpotensi memiliki aktivitas inhibitor enzim tirosinase. Sistem penghantaran obat dalam bentuk nanoemulsi diketahui dapat meningkatkan penetrasi percutan dan meningkatkan efektivitas dari senyawa aktif. Tujuan dari penelitian ini untuk menguji aktivitas inhibitor tirosinase ekstrak kulit buah cokelat dan memformulasikannya menjadi sediaan nanoemulsi yang memiliki sifat fisik yang baik. Simplisia diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% dan selanjutnya diuji aktivitas inhibitor tirosinasenya dengan metode dopakrom berbasis *colorimetric enzymatic assay*. Sediaan nanoemulsi ekstrak kulit buah cokelat dibuat dengan menambahkan minyak biji anggur, tween 80 sebagai surfaktan, dan gliserin sebagai kosurfaktan untuk selanjutnya dikarakterisasi secara fisik. Hasil uji menunjukkan ekstrak kulit buah cokelat memiliki aktivitas inhibitor tirosinase dengan nilai IC50 199,98 ppm. Sediaan nanoemulsi mengandung ekstrak kulit buah cokelat penampilan fisik yang jernih dan homogen, pH  $6,21 \pm 0,02$ , viskositas  $1070 \pm 24,5$  cps, sifat alir Newtonian, dengan ukuran globul  $108 \pm 15$  nm. Sediaan nanoemulsi memiliki stabilitas fisik yang baik berdasarkan uji sentrifugasi, *heating cooling*, dan *freeze thaw*. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah cokelat terbukti memiliki *aktivits* inhibitor tirosinase dan telah berhasil diformulasikan menjadi sediaan nanoemulsi dengan sifat fisik dan stabilitas yang baik

**Kata kunci:** nanoemulsi; kulit buah coklat; inhibitor tirosinase; stabilitas.

## Pendahuluan

Kakao atau cokelat (*Theobroma cacao* L.) merupakan komoditas penting di Indonesia ataupun dunia. Kulit buah cokelat merupakan limbah dalam proses produksi cokelat, yang jumlahnya dapat mencapai 70% dari keseluruhan buahnya [1,2]. Pemanfaatan limbah kulit buah cokelat saat ini masih sangat rendah, padahal beberapa penelitian telah membuktikan banyaknya senyawa aktif yang terkandung dalam kulit buah cokelat. Polifenol dan flavonoid merupakan contoh golongan senyawa aktif yang diketahui

banyak terkandung pada kulit buah cokelat [3-5]. Kadar senyawa polifenol dalam kulit buah cokelat sekitar 153,51 mg GAE/g sedangkan kadar senyawa flavonoid  $22,42 \pm 0,98$  mg rutin ekivalen/g [6,7]. Keberadaan senyawa aktif tersebut membuatnya berpotensi memiliki berbagai aktivitas salah satunya adalah aktivitas inhibitor tirosinase.

Enzim tirosinase adalah enzim yang mengatalisis proses melanogenesis atau proses sintesis

### Article history

Received: 09 Okt 2020

Accepted: 25 Des 2020

Published: 30 April 2021

### Access this article



\*Corresponding Author: Sani Ega Priani

Program Studi Farmasi Universitas Islam Bandung, Jl. Tamansari No.1, Kec. Bandung Wetan, Kota Bandung, Jawa Barat, 40116 | Email: [egapriani@gmail.com](mailto:egapriani@gmail.com)

melanin. Enzim ini mengatalisis hidroksilasi L-Tirosinase menjadi L-DOPA dan oksidasi L-DOPA menjadi DOPA-quinone, pada tahap awal proses melanogenesis [8,9]. Senyawa aktif bahan alam seperti polifenol dan flavonoid diketahui berpotensi menjadi inhibitor tirosinase karena dapat berikatan dengan bagian sisi aktif enzim sehingga mampu menjadi inhibitor kompetitif enzim tirosinase. Senyawa flavonoid diketahui dapat beraksi sebagai *copper chelator* yang berikatan dengan Cu dari enzim tirosinase yang termasuk kategori metaloenzim [10]. Senyawa dengan aktivitas inhibitor tirosinase umum digunakan pada produk-produk kosmetik untuk mengatasi kondisi hiperpigmentasi. Hiperpigmentasi adalah masalah pada kulit yang banyak terjadi akibat produksi melanin yang berlebih [11,12].

Senyawa aktif yang memiliki aktivitas inhibitor enzim tirosinase, harus mampu menembus stratum korneum dan masuk ke bagian kulit yang lebih dalam mencapai sel-sel melanosit [13]. Salah satu pengembangan bentuk sediaan yang diketahui dapat membantu meningkatkan penetrasi zat aktif ke dalam kulit adalah nanoemulsi [14]. Nanoemulsi adalah modifikasi sistem emulsi dengan ukuran globul sangat kecil (10 - 200 nm) yang stabil dan memiliki penampilan fisik yang transparan [15]. Nanoemulsi dapat menjadi sistem penghantaran yang sesuai untuk obat ataupun kosmetik. Saat ini, sistem nanoemulsi banyak digunakan di bidang kosmeseutikal termasuk untuk mengatasi kondisi hiperpigmentasi, karena diketahui efektif untuk menghantarkan senyawa aktif ke sel targetnya [16,17].

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas inhibitor tirosinase ekstrak kulit buah cokelat dan mengembangkannya menjadi sediaan nanoemulsi yang memiliki sifat dan stabilitas fisik yang baik. Sebagai fasa minyak pada sistem nanoemulsi digunakan minyak biji anggur. Minyak biji anggur diketahui kaya akan kandungan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dan inhibitor tirosinase, sehingga diharapkan dapat membantu aktivitas dari sediaan akhir [18].

## Metode Penelitian

### Bahan

Kulit Buah cokelat (perkebunan cokelat ciamis, Indonesia), Etanol 70% (Bratachem, Indonesia), Minyak biji anggur (Lansida group, Indonesia), Tween 80 (Bratachem, Indonesia), Gliserin (Bratachem, Indonesia), L-DOPA (Sigma-aldrich, Amerika Serikat), *Mushroom* Tirosinase (Sigma-aldrich, Amerika Serikat)

### Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Cokelat

Kulit buah cokelat dibersihkan selanjutnya dikeringkan pada suhu 40 - 50°C. Simplisia kering selanjutnya diserbukan dan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan pelarut 1:3 selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan. Ekstrak cair selanjutnya dipekatnya dengan *vacuum rotary evaporator* (Buchi R-3 HB, Switzerland). Terhadap simplisia dan ekstrak dilakukan penapisan fitokimia sesuai dengan prosedur standar pengujian [5,19].

### Uji Aktivitas Inhibitor Tirosinase Ekstrak Kulit Buah Cokelat

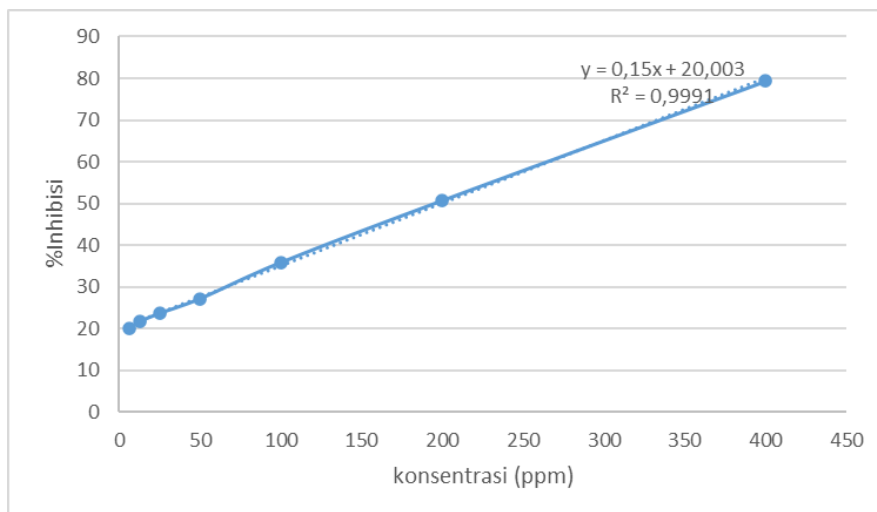
Uji aktivitas inhibitor tirosinase dilakukan dengan metode dopakrom berbasis *colorimetric enzymatic assay*. Sebanyak 20 µL larutan ekstrak dalam dimetil sulfoksida (6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, dan 400 ppm) dimasukkan ke *microplate* (96 lubang). Sebanyak 138 µL dapar fosfat (50 mM) dan 2 µL enzim tirosinase (2500 U / mL dalam dapar fosfat pH 6,5) ditambahkan ke setiap sampel ekstrak. Terakhir, tambahkan 40 µL L-DOPA (2,5 mM). Campuran tersebut kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Absorbansi di setiap sumur dibaca pada 475 nm menggunakan *microplate reader*. Selanjutnya lakukan perhitungan % inhibisi.

$$\% \text{ inhibisi} = [(A-B)/A] \times 100 \%$$

Dengan A adalah nilai absorbansi larutan uji tanpa inhibitor (ekstrak), dan B adalah nilai absorbansi larutan uji

**Tabel 1.** Optimasi formula basis nanoemulsi

Bahan (%)	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Minyak biji anggur	5	5	5	5	5	5
Tween 80	30	30	30	35	35	35
Gliserin	25	30	35	25	30	35
Aquadest ad	100	100	100	100	100	100



**Gambar 1.** Kurva regresi linier uji aktivitas inhibitor tirosinase ekstrak

dengan inhibitor (ekstrak). Dengan menggunakan analisis regresi selanjutnya dilakukan perhitungan IC50 [20].

**Pengembangan Formula Nanoemulsi**

Tahap pengembangan formula diawali dengan tahap optimasi formula nanoemulsi minyak biji anggur tanpa penambahan ekstrak. Dibuat 6 formula sesuai dengan tabel 1. Terhadap sediaan dilakukan evaluasi meliputi pengamatan organoleptis dan % transmittan.

Formula basis optimum selanjutnya dijadikan formula dasar untuk mengembangkan sediaan nanoemulsi ekstrak kulit buah cokelat, dengan menggunakan konsentrasi ekstrak 1% dengan penambahan etanol 5% untuk melarutkan ekstrak. Nanoemulsi dibuat dengan cara mencampurkan minyak biji anggur, tween 80, gliserin, dan ekstrak yang sudah dilarutkan dalam etanol lalu dipanaskan pada suhu 30 - 40°C. Tambahkan aquadest yang sudah dipanaskan pada suhu yang sama ke dalam campuran pertama selanjutnya diaduk menggunakan *magnetic stir plate*

pada kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Selanjutnya sediaan nanoemulsi disonikasi menggunakan *sonicator bath* (bransonic CPX 2800 H, Amerika Serikat) selama 30 menit [21,22].

**Evaluasi Fisik Sediaan Nanoemulsi**

Terhadap sediaan nanoemulsi selanjutnya dilakukan evaluasi meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, *rheology*, dan penentuan ukuran globul. Uji pH dilakukan dengan pH meter (Mettler Toledo, Seven Compact TM S220, Amerika Serikat), Uji viskositas dilakukan dengan menggunakan viscometer (Brookfield RV D220, Amerika Serikat) menggunakan *spindle* no 15 pada nilai putaran 10, 20, 50, 100 rpm (naik-turun). Penentuan ukuran globul nanoemulsi dilakukan menggunakan alat *particle size analyzer* (Beckman Coulter LS 13 320, Amerika Serikat) [23,24].

**Tabel 2.** Hasil optimasi basis nanoemulsi

Formula	Organoleptis	% transmittan
F1	keruh, cair, tidak berbau	< 80
F2	keruh, cair, tidak berbau	< 80
F3	keruh, cair, tidak berbau	< 80
F4	keruh, cair, tidak berbau	< 80
F4	keruh, cair, tidak berbau	< 80
F5	jernih, cair, tidak berbau	85,27 ± 5,59
F6	jernih, cair, tidak berbau	98,10 ± 1,47

**Tabel 3.** Formula akhir nanoemulsi ekstrak kulit buah coklat

Bahan	Kandungan (%)
Ekstrak kulit buah coklat	1
Minyak biji anggur	5
Tween 80	35
Gliserin	35
Etanol	5
Aquades ad	100

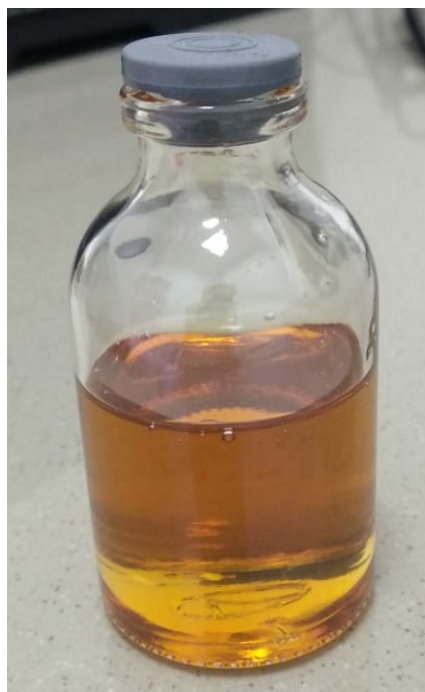
### Uji Stabilitas Sediaan Nanoemulsi

Uji stabilitas nanoemulsi dilakukan dengan tiga tahapan yakni uji sentrifugasi, *heating cooling*, dan *freeze thaw*. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Selanjutnya sediaan masuk ke dalam tahap pengujian *heating cooling* dengan menyimpan sediaan pada dua suhu berbeda yaitu  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  dan  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  masing-masing selama tidak kurang dari 48 jam, dan dilakukan sebanyak 3 siklus. Tahap yang terakhir adalah pengujian *freeze thaw* dengan menyimpan sediaan pada suhu pada suhu  $-20^\circ\text{C}$  dan  $25^\circ\text{C}$  masing-masing selama tidak kurang dari 48 jam sebanyak 3 siklus. Pada setiap tahap pengujian dilakukan pengamatan meliputi kejernihan, pemisahan fase, dan pengendapan [25].

### Hasil dan Diskusi

Ekstrak kulit buah coklat merupakan bahan aktif yang digunakan pada penelitian ini. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan etanol 70% karena berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui penggunaan pelarut tersebut karena diketahui mampu menarik senyawa polifenol dan flavonoid dengan baik, disebabkan karena kesesuaian polaritasnya. Hasil uji penapisan fitokimia terhadap simplisia dan ekstrak menunjukkan hasil positif untuk senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, tannin, kuinon, polifenol, monoterpen dan seskuiterpen [5].

Ekstrak yang dihasilkan selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas inhibitor tirosinase. Aktivitas inhibitor

**Gambar 2.** Sediaan nanoemulsi kulit buah coklat

**Tabel 4.** Hasil optimasi basis nanoemulsi

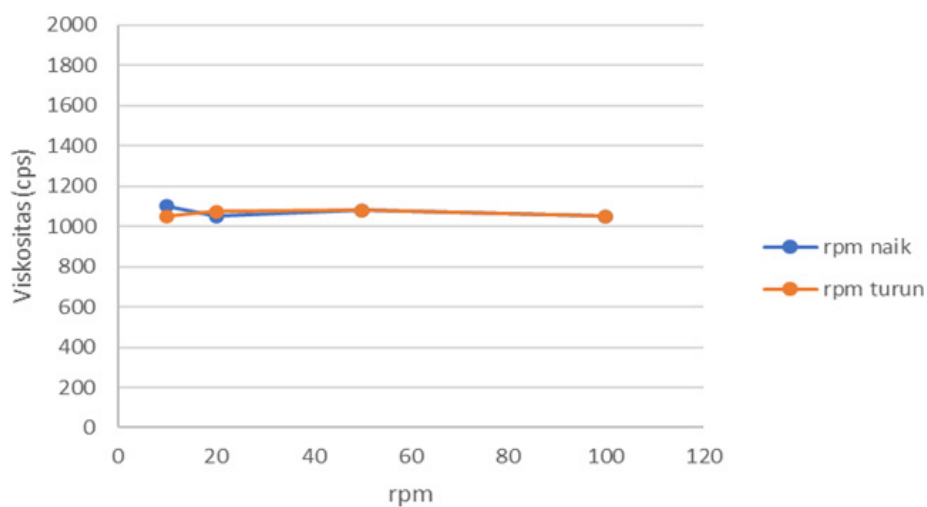
Parameter		Hasil evaluasi
Organoleptis		Jernih, kecoklatan, bau khas
Homogenitas		Homogen
pH		6,21 ± 0,02
Viskositas		1070 ± 24,5 cps
Sifat alir		newton
Diameter globul		108 ±15 nm
<b>Stabilitas</b>	Sentrifuga	Stabil
	Heating cooling	Stabil
	Freeze thaw	Stabil

tirosinase dilakukan dengan metode dopakrom berbasis *colorimetric enzymatic assay*. Tirosinase adalah enzim kunci dalam biosintesis melanin. Penghambatan enzim tersebut dapat menurunkan produksi *DOPA-chrome* dari L-DOPA sebagai substrat. Penurunan intensitas warna merah *DOPA-chrome* menunjukkan adanya penghambatan enzim oleh ekstrak, sehingga bisa dilakukan analisis berbasis spektrofotometri sinar tampak. Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah coklat memiliki aktivitas inhibitor tirosinase dengan nilai IC50 199,89 ppm ([gambar 1](#)). Keberadaan aktivitas inhibitor tirosinase dari ekstrak kulit buah coklat diketahui karena kandungan senyawa aktif dari kulit buah coklat yakni flavonoid, asam fenolat, dan stilbenoid. Senyawa senyawa tersebut diketahui mampu menjadi inhibitor kompetitif enzim tirosinase karena dapat berikatan dengan sisi aktif enzim. Beberapa senyawa flavonoid dalam kulit buah coklat

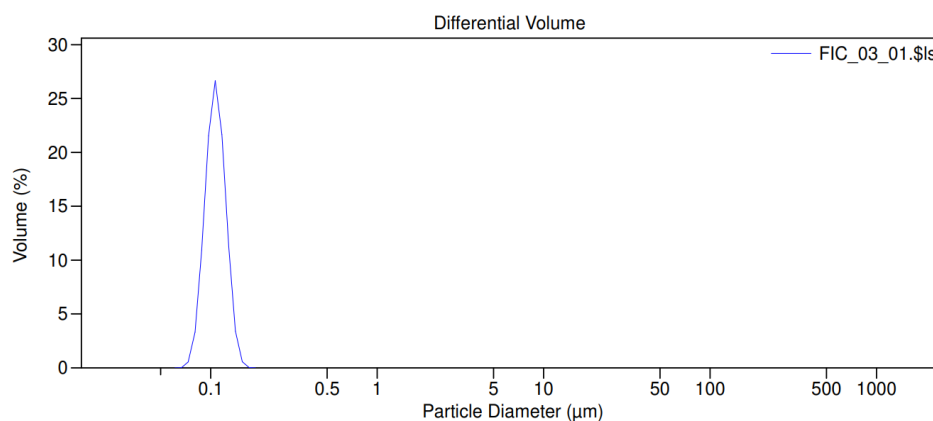
seperti apigenin, katekin, kaemferol, kuersetin berdasarkan beberapa penelitian juga diketahui memiliki aktivitas penghambatan enzim tirosinase [[7,26](#)].

Ekstrak kulit buah coklat selanjutnya dikembangkan menjadi sediaan kosmeseutikal. Untuk memberikan aktivitas inhibitor tirosinase yang baik, maka ekstrak harus berpenetrasi menembus stratum korneum, mencapai sel sel melanosit di epidermis bagian dalam, yakni stratum basalum [[27](#)]. Oleh karena itu, sistem penghantaran obat perlu dirancang dengan baik, untuk mencapai efektivitas terapi pada kondisi hiperpigmentasi. Nanoemulsi diketahui menjadi salah satu sistem penghantaran obat, yang mampu meningkatkan penetrasi senyawa aktif yang diberikan secara perkutan [[14](#)].

Formulasi nanoemulsi pada penelitian ini, menggunakan minyak biji anggur sebagai fasa minyak. Minyak biji anggur memiliki banyak senyawa aktif



**Gambar 3.** Grafik sifat alir sediaan nanoemulsi



**Gambar 4.** Hasil uji penentuan ukuran globul nanoemulsi

seperti proantosianidin yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan inhibitor tirosinase, sehingga dapat menunjang efektifitas sediaan akhir yang dihasilkan [18,28]. Sebagai surfaktan dan kosurfaktan digunakan tween 80 dan gliserin karena berdasarkan hasil uji pendahuluan diketahui bahwa tween 80 dan gliserin memiliki ketercampuran yang baik dengan minyak biji anggur, sehingga akan mempermudah pembentukan sistem nanoemulsi. Penambahan surfaktan dan kosurfaktan dalam sistem nanoemulsi berfungsi untuk membentuk lapisan antarmuka yang rapat dan fleksibel pada sistem nanoglobul, sehingga akan mampu menurunkan nilai tegangan permukaan dan menstabilkan sistem dispersi yang terbentuk [29]. Hasil optimasi formula basis nanoemulsi tanpa penambahan ekstrak diperlihatkan pada tabel 2. Dari hasil tersebut diketahui bahwa formula yang paling sesuai untuk dijadikan formula basis nanoemulsi adalah F6, karena memiliki nilai % transmittan >95% yang menggambarkan kejernihan dari sediaan dan mengindikasikan keberhasilan pembentukan nanoglobul [30].

Selanjutnya dibuat formula akhir nanoemulsi mengacu pada formula dasar F6 dengan penambahan ekstrak kulit buah cokelat sebanyak 1% (tabel 3). Konsentrasi tersebut 50 kali dari nilai IC 50 ekstrak sebagai inhibitor enzim tirosinase. Peningkatan konsentrasi zat aktif dari nilai IC<sub>50</sub> pada sediaan, umum dilakukan baik untuk senyawa bahan alam ataupun sintetik untuk meningkatkan efektifitas pemakaian [31].

Sediaan nanoemulsi ekstrak kulit buah cokelat memiliki penampilan fisik jernih, bewarna kecokelatan, dengan bau yang khas (gambar 2). Seluruh hasil evaluasi fisik dan stabilitas sediaan nanoemulsi ditampilkan pada tabel 4. Dari hasil evaluasi tersebut diketahui bahwa sediaan nanoemulsi memiliki karakteristik fisik yang baik berdasarkan pengamatan organoleptis, homogenitas, pH,

viskositas, sifat alir, dan ukuran globul. Nilai pH sediaan sesuai dengan pH optimum untuk sediaan topikal yakni pada rentang pH 4,5 - 6,5. Sediaan memiliki viskositas yang relatif rendah, tidak masuk kategori sediaan semisolid, sesuai dengan karakteristik khas sediaan nanoemulsi. Rendahnya viskositas sediaan akan mendukung kecepatan penetrasi senyawa aktif. Sediaan nanoemulsi memiliki sifat alir newtonian, yang ditandai dengan viskositas sediaan yang relatif konstan pada berbagai kecepatan geser (gambar 3). Sifat alir Newtonian ini juga ditunjukkan oleh sediaan-sediaan nanoemulsi yang sudah dikembangkan sebelumnya. Viskositas sediaan yang sangat rendah dengan homogenitas yang baik menyebabkan sifat alirnya mirip dengan sediaan larutan [32,33].

Salah satu faktor utama yang harus diperhatikan dari sediaan nanoemulsi adalah ukuran globul. Dari hasil uji terlihat bahwa sediaan nanoemulsi memiliki ukuran globul yang sesuai yakni  $108 \pm 15$  nm (gambar 4). Ukuran tersebut sesuai dengan kriteria ukuran globul sediaan nanoemulsi (10-200 nm). Terbentuknya sistem nanoglobul pada sediaan menjadi salah satu penyebab utama peningkatan penetrasi sediaan menembus stratus korneum pada sistem nanoemulsi. Selain faktor ukuran globul, peningkatan penetrasi perkutan dari sediaan nanoemulsi dapat terjadi karena kemampuan pelarutannya yang tinggi dan juga karena keberadaan surfaktan/kosurfaktan dalam sediaan yang mampu bertindak sebagai peningkat penetrasi [15].

Evaluasi terakhir yang dilakukan adalah uji untuk menilai stabilitas sistem nanoemulsi, yang dilakukan dengan tiga tahapan yakni sentrifugasi, *heating cooling* dan *freeze thaw*. Hasil uji menunjukkan bahwa sediaan nanoemulsi ekstrak kulit buah cokelat stabil setelah melewati ketiga tahapan uji yang ditandai dengan tidak adanya pengendapan ataupun pemisahan fase selama proses pengujian [25]. Pengembangan lanjutan dari sediaan nanoemulsi ekstrak



kulit buah cokelat perlu dilakukan untuk menguji efektifitas dan juga keamanan sediaan baik dengan pengujian secara *in vitro* ataupun *in vivo*.

## Kesimpulan

Ekstrak kulit buah cokelat memiliki aktivitas inhibitor tirosinase dengan nilai IC<sub>50</sub> 199,98 ppm. Ekstrak kulit buah cokelat telah berhasil dikembangkan menjadi sediaan nanoemulsi yang memiliki karakteristik yang baik dengan ukuran globul 108 ±15 nm. Sediaan nanoemulsi stabil berdasarkan uji sentrifugasi, *beating cooling* dan *freeze thaw*.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada LPPM UNISBA yang telah membantu mendanai riset ini pada tahun 2019 dengan no kontrak 138/B.04/LPPM/XI/2019.

## Referensi

- Chemical Composition and Morphological of Cocoa Pod Husks and Cassava Peels for Pulp and Paper Production. Aust J Basic Appl Sci. 2013;
- Irwanto D, Wiratni W, Rochmadi R, Syamsiah S. Lactic Acid Production From Cocoa Pod Husk by Studying Further the Influence of Alkaloids on Fermentation Process using Lactobacillus Plantarum Bacteria. Reaktor. 2018; <https://doi.org/10.14710/reaktor.18.1.51-56>
- Campos-Vega R, Nieto-Figueroa KH, Oomah BD. Cocoa (Theobroma cacao L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. Trends in Food Science and Technology. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>
- Rachmawaty, Mu'Nisa A, Hasri, Pagarra H, Hartati, Maulana Z. Active Compounds Extraction of Cocoa Pod Husk (Theobroma Cacao L.) and Potential as Fungicides. In: Journal of Physics: Conference Series. 2018. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1028/1/012013>
- Baharum Z, Md Akim A, Hin TYY, Hamid RA, Kasran R. Theobroma cacao: Review of the extraction, isolation, and bioassay of its potential anti-cancer compounds. Trop Life Sci Res. 2016;
- Boungo Teboukeu G, Tonfack Djikeng F, Klang MJ, Houketchang Ndomou S, Karuna MSL, Womeni HM. Polyphenol antioxidants from cocoa pods: Extraction optimization, effect of the optimized extract, and storage time on the stability of palm olein during thermoxidation. J Food Process Preserv. 2018; <https://doi.org/10.1111/jfpp.13592>
- Abdul Karim A, Azlan A, Ismail A, Hashim P, Abd Gani SS, Zainudin BH, et al. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. BMC Complement Altern Med. 2014; <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-381>
- Vashi NA, Kundu R V. Facial hyperpigmentation: Causes and treatment. British Journal of Dermatology. 2013. <https://doi.org/10.1111/bjd.12536>
- Chang TS. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. Materials. 2012. <https://doi.org/10.3390/ma5091661>
- Zuo AR, Dong HH, Yu YY, Shu QL, Zheng LX, Yu XY, et al. The antityrosinase and antioxidant activities of flavonoids dominated by the number and location of phenolic hydroxyl groups. Chinese Med (United Kingdom). 2018; <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0206-9>
- Zolghadri S, Bahrami A, Hassan Khan MT, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2019. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>
- Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2017. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1256882>
- Al-Amin M, Cao J, Naeem M, Banna H, Kim MS, Jung Y, et al. Increased therapeutic efficacy of a newly synthesized tyrosinase inhibitor by solid lipid nanoparticles in the topical treatment of hyperpigmentation. Drug Des Devel Ther. 2016; <https://doi.org/10.2147/DDDT.S123759>
- Nastiti CMRR, Ponto T, Abd E, Grice JE, Benson HAE, Roberts MS. Topical nano and microemulsions for skin delivery. Pharmaceutics. 2017. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040037>
- Kumar M, Bishnoi RS, Shukla AK, Jain CP. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. Preventive Nutrition and Food Science. 2019. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.225>
- Wu Y, Li YH, Gao XH, Chen HD. The application of nanoemulsion in dermatology: An overview. Journal of Drug Targeting. 2013. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.765442>
- Roselan MA, Ashari SE, Faujan NH, Mohd Faudzi SM, Mohamad R. An Improved Nanoemulsion Formulation Containing Kojic Monooleate: Optimization, Characterization and In Vitro Studies. Molecules. 2020; <https://doi.org/10.3390/molecules25112616>
- Yamakoshi J, Otsuka F, Sano A, Tokutake S, Saito M, Kikuchi M, et al. Lightening Effect on Ultraviolet-Induced Pigmentation of Guinea Pig Skin by Oral Administration of a Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seeds. Pigment Cell Res. 2003; <https://doi.org/10.1046/j.1600-0749.2003.00093.x>
- Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1966. <https://doi.org/10.1002/jps.2600550302>
- Wuttisin N, Boonmak J, Thaipitak V, Thitilertdech N, Kittigowittana K. Anti-tyrosinase activity of orange peel extract and cosmetic formulation. Int Food Res J. 2017;
- Mahdi Jafari S, He Y, Bhandari B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. Int J Food Prop. 2006; <https://doi.org/10.1080/10942910600596464>
- Priani SE, Dewi WK, Gadri A. Formulasi Sediaan Mikroemulsi Gel Anti Jerawat Mengandung Kombinasi Minyak Jinten Hitam (Nigella sativa L.) dan Minyak Zaitun (Olea europaea L.). Kartika J Ilm Farm. 2019; <https://doi.org/10.26874/kjif.v6i2.143>
- Priani SE, Azhari Abdilla S, Suparnan A. PENGEMBANGAN SEDIAAN MIKROEMULSI GEL ANTIJERAWAT MENGANDUNG MINYAK KULIT BATANG KAYU MANIS (Cinnamomum burmanni Nees ex Bl). J Ilm Farm Farmasyifa. 2020; <https://doi.org/10.29313/jiff.v3i1.5464>
- Baboota S, Shakeel F, Ahuja A, Ali J, Shafiq S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. Acta Pharm. 2007; <https://doi.org/10.2478/v10007-007-0025-5>
- Yang C, Powell CA, Duan Y, Shatters R, Zhang M. Antimicrobial nanoemulsion formulation with improved penetration of foliar spray through citrus leaf cuticles to control citrus huanglongbing. PLoS One. 2015; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133826>
- Saghaie L, Pourfarzam M, Fassihi A, Sartippour B. Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. Res Pharm Sci. 2013;
- Zoller N, Hofmann M, Butting M, Hrgovic I, Bereiter-Hahn J, Bernd A, et al. Assessment of melanogenesis in a pigmented human tissue-cultured skin equivalent. Indian J Dermatol. 2019; [https://doi.org/10.4103/ijid.ijid\\_410\\_17](https://doi.org/10.4103/ijid.ijid_410_17)
- Unusan N. Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. Journal of Functional Foods. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103861>

- [29]. Azeem A, Rizwan M, Ahmad FJ, Iqbal Z, Khar RK, Aqil M, et al. Nanoemulsion components screening and selection: A technical note. *AAPS PharmSciTech*. 2009; <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9178-x>
- [30]. Christy GP, Arimurni DA, Wahyudi MDP, Martien R, Tunjung WAS. Formulation and Characterization of Kaffir Lime Oil Nanoemulsion. *Biosci Biotechnol Res Asia*. 2017; <https://doi.org/10.13005/bbra/2525>
- [31]. Noor SU, Faridah F, Michico M. FORMULATION OF LIQUORICE ROOT EXTRACT (Glycyrrhiza glabra L.) AS SKIN WHITENING CREAM. *J Tumbuh Obat Indones*. 2016; <https://doi.org/10.22435/toi.v9i2.8968.93-99>
- [32]. Kotta S, Khan AW, Ansari SH, Sharma RK, Ali J. Formulation of nanoemulsion: A comparison between phase inversion composition method and high-pressure homogenization method. *Drug Deliv*. 2015; <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.866992>
- [33]. Noor El-Din MR, El-Gamal IM, El-Hamouly SH, Mohamed HM, Mishrif MR, Ragab AM. Rheological behavior of water-in-diesel fuel nanoemulsions stabilized by mixed surfactants. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2013; <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.06.044>.



Copyright © 2021 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)