

KARYA AKHIR

**PERBANDINGAN EFEKTIVITAS TOPIKAL SERUM
DEOXYARBUTIN 2% DAN TOPIKAL SERUM HYDROQUINONE
4% SEBAGAI AGEN PENCERAH KULIT**

**COMPARISON OF EFFECTIVENES BETWEEN
2% DEOXYARBUTIN AND 4% HYDROQUINONE SERUM
AS A DEPIGMENTING AGENT**



YULIA ASMARANI
NIM: C115171006

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp.1)
PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN KULIT DAN KELAMIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**PERBANDINGAN EFEKTIVITAS TOPIKAL SERUM
DEOXYARBUTIN 2% DAN TOPIKAL SERUM HYDROQUINONE
4% SEBAGAI AGEN PENCERAH KULIT**

Karya Akhir

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Spesialis

Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis

Disusun dan diajukan oleh

YULIA ASMARANI

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp.1)
DEPARTEMEN ILMU KESEHATAN KULIT DAN KELAMIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

KARYA AKHIR

**PERBANDINGAN EFEKTIFITAS TOPIKAL SERUM DEOXYARBUTIN 2% DAN
TOPIKAL SERUM HYDROQUINONE 4% SEBAGAI AGEN PENCERAH KULIT**

Disusun dan diajukan oleh

YULIA ASMARANI

Nomor Pokok : C115171006

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

Pada tanggal 03 September 2020

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasehat,

Prof. DR. Dr. Anis Irawan Anwar, Sp.KK(K),
FINSDV, FAADV

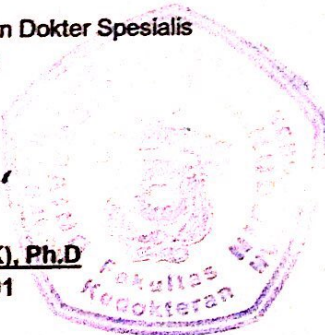
Pembimbing Utama

Dr. Asnawi Madjid, Sp.KK(K),
MARS, FINSDV, FAADV

Pembimbing Anggota

Manajer Program Pendidikan Dokter Spesialis
Fakultas Kedokteran Unhas

dr. Uteng Bahrin, Sp.PK(K), Ph.D
NIP: 19680518 199802 2 001



Dekan,
Wakil Dekan Bidang Akademik,
Riset dan Inovasi

Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
NIP: 19671103 199802 1 001

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Yulia Asmarani
No. Stambuk : C115171006
Program Studi : Ilmu Kesehatan Kulit & Kelamin

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Oktober 2020

Yang menyatakan



Yulia Asmarani

PRAKATA

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah menganugerahkan rahmatNya sehingga penulis diberikan kemudahan untuk menyelesaikan tesis yang berjudul "Perbandingan Efektivitas Topikal Serum Deoxyarbutin 2% dan Topikal Serum Hydroquinone 4% Sebagai Agen Pencerah Kulit".

Adapun pengajuan tesis ini ditujukan sebagai pemenuhan beberapa syarat kelulusan pada jenjang perkuliahan Pendidikan Dokter Spesialis 1. Dalam penyusunan tesis ini tentunya penulis mengalami tantangan serta kesulitan, namun berkat bantuan dan bimbingan dari semua pihak, akhirnya tesis ini dapat terselesaikan.

Terimakasih penulis ucapkan kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dan Ketua Program Pendidikan Dokter Spesialis I Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar atas izin dan kesempatan yang telah diberikan sehingga penulis dapat mengikuti dan menyelesaikan pendidikan dokter spesialis di Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Kepada pembimbing tesis I saya yang terhormat Prof. DR.Dr. Anis Irawan Anwar, SpKK(K), FINS DV, FAADV dan kepada pembimbing II tesis saya yang terhormat Dr. Asnawi Madjid, SpKK(K),MARS,FINS DV, FAADV, kepada yang terhormat Kepala Bagian Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin FK Unhas DR .Dr. Siswanto Wahab, Sp.KK(K),FINS DV,FAADV, kepada yang terhormat DR. Dr. Khairuddin Djawwad, Sp.KK(K),FINS DV,FAADV sebagai Kepala Program Studi (KPS) Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin FK Unhas, terimakasih sebesar-besarnya penulis ucapkan atas seluruh kebaikan, nasehat, bantuan, arahan, bimbingan, didikan serta curahan perhatian yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan hingga terselesaikan tesis ini,

Ucapan terimakasih penulis kepada yang terhormat DR.dr.Ilham Jaya Patellongi, M. Kes selaku pembimbing statistik, kepada yang terhormat Prof. DR. Dr.

Suryani As'ad, Sp.GK(K), M.sc selaku penguji, serta kepada yang terhormat DR. Dr. Anni Adriani, Sp.KK(K), FINSDV,FAADV selaku penguji dalam tesis ini. Terimakasih penulis ucapkan atas segala bimbingan, arahan, bantuan, didikkan, perhatian dan segala kebaikan yang diberikan kepada penulis selama pendidikan hingga terselesaikan tesis ini. Terima kasih penulis ucapkan kepada Dr. Wong Lip Wih dari PT.Lipwih Synergylab Estetika atas dukungan dan bantuan dalam penyediaan bahan penelitian sehingga penelitian bisa berjalan lancar.

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis ucapkan seluruh Staf pengajar dan guru-guru di Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Terimakasih atas segala bimbingan, didikkan, kesabaran, *sharing* ilmu dan pengalaman, perhatian, kekeluargaan serta segala kebaikan kepada penulis sejak awal hingga selesai menempuh Pendidikan.

Terimakasih kepada suami Solihin dan kedua anakku Kevin Khlafani Arrozaq dan Kirana Khanza Aqilla atas segala pengorbanan, kesabaran, pengertian, dukungan dan doa sehingga penulis dapat mewujudkan cita-cita untuk menjadi Dokter Spesialis. Terimakasih yang sedalam-dalamnya kepada kedua orangtua (Alm) Djamingan dan Purwantini, kepada kedua mertua saya Hi.Samlawi dan Hj. Tutik yang telah memberi kasih sayang, doa, dukungan, perhatian dan kebaikan yang tidak terhingga sehingga penulis bisa ada di titik ini dan dapat menyelesaikan pendidikan dengan lancar. Terimakasih kepada adik-adikku Dimas Raditya dan Agil Ajimas Surya yang telah banyak membantu, memudahkan, mendoakan, mendukung dan memberi semangat penulis dalam menyelesaikan pendidikan.

Terimakasih kepada seluruh teman-teman Peserta Program Pendidikan Spesialisasi Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin atas segala bantuan, kebaikan, semangat dan pengertian bagi penulis selama menempuh pendidikan. Teristimewa kepada teman-teman seperjuangan 'Furious 8" dr. Dewi Nur Komalasari, dr. Kirana Prasanty Mokoagow, dr. Irene Djuardi, dr. Welly Wijayanti, dr. Erlian Dimas Anggraini, dr. Andi Nurhaerani Zainuddin, serta kepada dr. Johanes Wijaya, dr. Olivia Wibisono, SpDV, dan Ivan Kurniadi terimakasih penulis ucapkan atas segala persahabatan, persaudaraan, perhatian, dukungan, bantuan dan doa sehingga penulis bisa menyelesaikan

pendidikan dengan baik. Juga kepada teman-teman dr. Raja Tina, dr. Andi Hardianty, dr. Pipim, dr. Rika dan dr. Farah, dr. Anita Berliana terimakasih penulis ucapkan atas dukungan dan partisipasinya dalam kegiatan penelitian sehingga penelitian ini bisa berjalan lancar dan mendapatkan hasil yang baik.

Terimakasih kepada seluruh pihak yang namanya tidak tercantum tapi terlibat dalam proses pendidikan dan menjadi inspirasi dan pelajaran bagi penulis.

Doa yang tulus penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang terlibat, semoga Allah SWT senantiasa selalu memberikan berkah kesehatan dan rezeki yang luas, Insyaallah segala kebaikan dan bantuan kepada penulis diberikan balasan berkali-kali lipat.

Dengan sepuh hati penulis menyadari bahwa tesis ini masih penuh kekurangan dan keterbatasan, baik dari segi kualitas maupun kuantitas data atau referensi yang ditampilkan. Penulis berharap kritik dan saran dari seluruh pihak demi menjadikan tesis ini menjadi lebih baik. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat dan berguna bagi kemajuan Pendidikan dalam bidang Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin.

Makassar, 1 Oktober 2020

Yulia Asmarani

PERBANDINGAN EFEKTIVITAS TOPIKAL SERUM DEOXYARBUTIN 2% DAN TOPIKAL SERUM HYDROQUINONE 4% SEBAGAI AGEN PENCERAH KULIT

Yulia Asmarani^{1,2,3}, Anis Irawan Anwar^{1,2,3}, Asnawi Madjid^{1,2}, Ilham Jaya Patellong⁴, Suryani As'ad⁵, Anni Adriani^{1,2}

¹Departemen Dermatologi dan Venereologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

²Rumah Sakit Dr. Wahiddin Sudirohusodo, Makassar, Indonesia

³Rumah Sakit Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

⁴Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

⁵Departemen Gizi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

Pendahuluan: Masyarakat Indonesia memiliki tipe kulit Fitzpatrick III dan IV, berwarna gelap kecokelatan. Bahan aktif pencerah kulit menghambat secara spesifik satu atau lebih maturasi melanosit. Hydroquinone (HQ) merupakan gold standard pengobatan hiperpigmentasi. deoxyArbutin (dA) senyawa baru agen pencerah kulit yang memiliki efek inhibisi tirosinase hampir sama dengan HQ. **Tujuan:** Mengetahui efek serum deoxyArbutin 2% terhadap kecerahan kulit dan membandingkan dengan serum hydroquinone 4%.

Metode: Penelitian ini menggunakan metode double-blind, wanita usia 25-45 tahun, Fitzpatrick III-IV, serum A dileskan pada bagian volar lengan bawah dan serum B pada lengan kiri setiap malam sebelum tidur selama 12 minggu dan diukur menggunakan chroma meter

Hasil: Nilai rerata kecerahan kulit pada kelompok serum deoxyarbutin 2% meningkat dari 52.407 menjadi 54.083 sedangkan pada kelompok serum hydroquinone 4% juga mengalami peningkatan dari 52.579 menjadi 54.081. Hal ini bermakna bahwa serum deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4% memperlihatkan efektivitas yang sama dalam meningkatkan rerata kecerahan kulit.

Kesimpulan: Serum deoxyarbutin 2% dan serum hidroquinon 4% memiliki efektivitas yang sama dalam mencerahkan kulit

Kata Kunci: Deoxyarbutin, Hydroquinone, melanosit

COMPARISON OF EFFECTIVENES BETWEEN 2% DEOXYARBUTIN AND 4% HYDROQUINONE SERUM AS A DEPIGMENTING AGENT

Yulia Asmarani^{1,2,3}, Anis Irawan Anwar^{1,2,3}, Asnawi Madjid^{1,2}, Ilham Jaya Patellong⁴, Suryani As'ad⁵, Anni Adriani^{1,2}

¹Departement of Dermatology and Venereology, Faculty of Medicine, Hasanuddin University, Makassar, Indonesia.

²Dr. Wahidin Sudirohusodo Hospital, Makassar, Indonesia.

³Hasanuddin University Hospital, Makassar, Indonesia.

⁴Departement of Physiology, Faculty of Public Health, Hasanuddin University, Makassar, Indonesia

⁵Departement of Clinical Nutrition, Faculty of Medicine, Hasanuddin University, Makassar, Indonesia

Introduction: Indonesian people have Fitzpatrick III and IV skin types, dark brown in color. The skin lightening active ingredient specifically inhibits the maturation of one or more melanocytes. Hydroquinone (HQ) is the gold standard for treating hyperpigmentation. deoxyArbutin (dA) is a new skin lightening agent that has almost the same tyrosinase inhibition effect as HQ.

Objective: To determine the effect of serum deoxyArbutin 2% on skin brightness and compare it to 4% serum hydroquinone.

Methods: This study used a double-blind method, women aged 25-45 years, Fitzpatrick III-IV, serum A was rubbed on the volar part of the forearm and serum B on the left arm every night before going to bed for 12 weeks and measured using a chroma meter.

Results: The mean value of skin brightness in the 2% serum deoxyarbutin group increased from 52,407 to 54,083 while the 4% serum hydroquinone group also increased from 52,579 to 54,081. This means that serum deoxyarbutin 2% and hydroquinone 4% show the same effectiveness in increasing the average skin brightness.

Conclusion: Deoxyarbutin serum 2% and serum hydroquinone 4% have the same effectiveness in lightening the skin.

Keywords: Deoxyarbutin, Hydroquinone, melanocytes

DAFTAR ISI

BAB I	17
PENDAHULUAN.....	17
1.1 Latar Belakang Masalah	17
1.2 Rumusan Masalah.....	22
1.3 Tujuan Penelitian	22
1.3.1. Tujuan Umum.....	22
1.3.2. Tujuan Khusus	22
1.4 Hipotesis Penelitian	23
1.5 Manfaat Penelitian	23
BAB II.....	25
TINJAUAN PUSTAKA	25
2.1 Variasi Warna Kulit.....	25
2.2. Regulasi Pigmen Kulit.....	28
2.2.1. Pigmen Kulit Konstitutif	28
2.2.2. Faktor Yang Mempengaruhi Pigmentasi	37
2.3. Agen pencerah kulit.....	41
2.4. Hidroquinon	42
2.4.1. Struktur Kimia dan Mekanisme Kerja	42
2.4.2. Absorpsi, Ekskresi dan Eliminasi	45
2.4.3 Efek Samping	46
2.5. Deoxyarbutin	51
2.5.1 Struktur Kimia.....	51
2.5.2 Mekanisme Kerja	52
2.5.3 Absorpsi, metabolisme dan Toksikokinetik	54
2.5.4 Uji Keamanan	57
2.6. Alat Ukur Penelitian Chroma Meter	60
2.7 Kerangka Teori	64

2.8	Kerangka Konsep	65
BAB III		66
METODE PENELITIAN		66
3.1.	Desain Penelitian	66
3.2 .	Tempat dan Waktu Penelitian	66
3.2.1	Tempat Penelitian	66
3.2.2	Waktu Penelitian	66
3.3	Populasi Penelitian	66
3.3.1	Populasi Target.....	66
3.3.2	Populasi Terjangkau.....	67
3.4	Sampel	67
3.4.1.	Cara Pengambilan Sampel	67
3.5	Kriteria Inklusi dan Eksklusi	68
3.5.1	Kriteria Inklusi	68
3.5.2	Kriteria Eksklusi.....	69
3.6.	Prosedur Penelitian	69
3.6.1	Persiapan	69
3.6.2.	Penjelasan dan Penandatanganan Informed Consent	70
3.6.3.	Teknik Pelaksanaan	70
3.6.4.	Prosedur Pengukuran menggunakan Chroma Meter.....	72
3.6.5	Bahan Penelitian.....	73
3.7	Identifikasi Variabel	73
3.8.	Definisi Operasional	73
3.9	Pengolahan dan Analisis Data	75
3.10.	Izin Penelitian dan Kelayakan Etik (Ethical Clearance)	76
BAB IV		78
HASIL PENELITIAN		78
4.1.	Karakteristik Subjek Penelitian	78

4.2. Efektivitas serum deoxyarbutine 2% dan serum hydroquinone 4% terhadap perubahan nilai kecerahan kulit.....	79
4.2.1. Efek serum deoxyarbutin 2% terhadap perubahan nilai kecerahan kulit (L*)	80
Untuk menilai efek serum deoxyarbutin 2% terhadap perubahan kecerahan kulit (Nilai L*) sebelum dan sesudah pengolesan serum pada setiap waktu observasi dilakukan uji one way anova uji t berpasangan. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel 2.	80
4.2.2. Efek serum hydroquinone 4% terhadap perubahan nilai kecerahan kulit (L*)	82
4.3. Perbandingan efektivitas serum deoxyarbutin 2% dan serum hydroquinone 4% terhadap perubahan kecerahan kulit	83
4.4. Efek samping penggunaan serum deoxyarbutin 2% dan serum hydroquinone 4%	85
BAB V	86
PEMBAHASAN	86
BAB VI.....	91
PENUTUP.....	91
DAFTAR PUSTAKA	92
LAMPIRAN	99

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema susunan kulit manusia.....	27
Gambar 2. Klasifikasi fototipe kulit fitzpatrick	28
Gambar 3. Skema struktur epidermis.....	30
Gambar 4. Epidermal melanin unit signaling-pathway	32
Gambar 5. Karakteristik tahap perkembangan melanosom selama sintesis melanin	34
Gambar 6. Skema sederhana sintesis melanin.....	35
Gambar 7. Faktor yang mempengaruhi pigmentasi kulit.....	39
Gambar 8. Struktur kimia Hydroquinone	42
Gambar 9. Mekanisme inhibisi melanogenesis oleh HQ.....	45
Gambar 10. Struktur kimia HQ dan derivate glukosida	52
Gambar 11. Konica Minolta Chroma Meter Model CR-400 ®	63

DAFTAR TABEL

Tabel 1.Karakteristik Subjek.....	79
Tabel 2.Perubahan nilai kecerahan kulit (L*) pada kelompok serum deoxyarbutin 2%.....	80
Tabel 3.Perubahan nilai kecerahan kulit (L*) pada kelompok serum Hydroquinone 4%	82
Tabel 4.Perbandingan nilai perubahan kecerahan kulit (ΔL^*) antara serum Deoxyarbutine 2% dan serum Hydroquinone 4%	84

DAFTAR GRAFIK

Grafik 1.Perubahan nilai L* pada serum deoxyarbutin 2%.....	81
Grafik 2. Perubahan nilai L* pada serum hydroquinone 4%	83
Grafik 3. Perbandingan delta L* serum deoxyarbutin 2% dan serum hydroquinone 4%	85

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.Konica Minolta Chroma Meter Model CR-400 ®	99
Lampiran 2.Serum yang diujikan dengan kode CT01R dan CT01L	99
Lampiran 3.Patron khusus ukuran 4x4cm	100
Lampiran 4.Foto klinis subjek sebelum perlakuan	100
Lampiran 5.Foto Klinis pasien setelah 12 minggu perlakuan	100
Lampiran 6. Diskripsi statistik nilai L* pada kelompok deoxyarbutin 2%	101
Lampiran 7. Uji normalitas nilai L* kelompok deoxyarbutin 2%	104
Lampiran 8. Paired samples test kelompok deoxyarbutin 2%	105
Lampiran 9. Diskripsi statistik nilai L* kelompok hydroquinone 4%	106
Lampiran 10. Uji normalitas nilai L* kelompok hydroquinone 4%	108
Lampiran 11. Paired samples test kelompok hydroquinone 4%	109
Lampiran 12. Diskripsi statistik nilai delta L* kelompok deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4%	110
Lampiran 13. Uji normalitas nilai delta L* kelompok deoxyarbutin dan hydroquinone 4%	115
Lampiran 14. . Independent t test kelompok deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4%	115
Lampiran 15. Independent t test kelompok deoxyarbutin dan hydroquinone 4%	115
Lampiran 16. Uji Mann-Whitney delta L* kelompok deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4%	116
Lampiran 17.Lembar inform consent.....	117
Lampiran 18.Investigational brochure	119

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

BQ : Benzoquinone

CIE : Commission Internationale de l'Eclairage

dA : deoxyArbutin

DOPA : L-3,4-dihydro xyphenylalanine

Eoxy : Oksi tirosinase

FDA : Federation Drug Association

HEC : Hydroxyethylcellulose

HQ : Hidroquinon

IL : Interleukin

ITA^o : *Individual Typology Angle*

LTs : Leukotriens

MED : Minimum Eritema Dose

MITF : Microphthalmia transcription faktor gene

MoS : Margin of Safety

NCC : Neural Crest Cells

NO : Nitrit Oksida

NOAEL: No-Adverse-Effect-Level

NRG 1: Neuregulin 1

NTP : National Toxicology Program

NTs : Neurotrofin

OTC : Over-The-Counter

PAR-2: Protease Active-Receptor-2

ROS : Spesies Oksigen Reaktif

SCCC: Scientific Committee on Consumer Safety

SSP : Sistem Saraf Pusat

SCF : Stem Cell Factor

UV-R : UV radiasi

UV : Ultraviolet

POMC: Proopiomelanocortin

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TYR : Tyrosinase

TXs : Thromboxanes

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Pencerah kulit merupakan bahan yang sudah lama digunakan dan berakar dalam kebudayaan sebagian masyarakat. Praktek kuno ini dapat dilacak sejak abad ke-16. Di Negara Asia, termasuk India, China , Jepang dan Korea memiliki kulit cerah berkaitan dengan kecantikan. Di Afrika , masyarakat juga mencerahkan kulit dengan berbagai alasan dari segi estetika, psikologis, sosiologis sampai politik dan motif ekonomi. Pada saat ini produk pencerah kulit , pemutih kulit juga digunakan sebagai anti penuaan dan produk peremajaan kulit. Mengingat produk anti penuaan merupakan produk kosmetik yang paling pesat pertumbuhannya membuat produk pencerah kulit semakin terkenal secara klinis dan kosmetik.(Desmedt et al., 2016). Produk depigmentasi dan pencerah kulit yang sudah lama digunakan di negara Asia dimana kulit putih merupakan kriteria mayor estetika, juga mempengaruhi populasi barat , dimana mereka terlalu sering berjemur terpapar matahari sehingga menimbulkan bintik-bintik di kulit (Couteau and Coiffard, 2016).

Indonesia sebagai negara yang terletak di khatulistiwa memiliki matahari yang terus bersinar sepanjang tahun. Masyarakat Indonesia memiliki tipe kulit Fitzpatrick III dan IV, berwarna gelap kecokelatan. Tipe kulit ini juga

cenderung mengalami masalah pigmentasi berlebihan seperti halnya jerawat, menimbulkan stres yang berat dan perasaan malu. Hal ini menimbulkan keinginan untuk memiliki warna kulit yang lebih cerah. Produk pencerah kulit tersedia secara komersial sebagai kosmetik dengan tujuan untuk menghasilkan tampilan kulit yang lebih cerah. Selain itu produk ini juga bermanfaat untuk pengobatan gangguan pigmentasi seperti melasma dan hiperpigmentasi postinflamasi. Pencerah kulit bekerja pada beberapa tingkat yang berbeda dalam pembentukan melanin kulit. Beberapa diantaranya dikenal sebagai kompetitif inhibitor tirosinase, enzim yang berperan dalam melanogenesis. Produk lain menghambat maturasi enzim atau menghambat transpor granula pigmen (melanosome) dari melanosit untuk mengelilingi keratinosit. (Smit et al., 2009)

Bahan aktif pencerah kulit menghambat secara spesifik satu atau lebih maturasi melanosit atau proses distribusi. Agen seperti kortikosteroid, hidroquinon, monobenil hidroquinon, tretinoin dan garam merkuri merupakan agen pencerah kulit yang kuat. Selain merkuri, semua agen tersebut sering digunakan oleh dermatologis untuk mengobati lesi hiperpigmentasi seperti melasma, hiperpigmentasi post inflamasi dan lentigo solaris. Pengawasan dibutuhkan karena agen-agen ini dapat menimbulkan efek samping lokal yang berat. Mengingat resiko efek samping maka agen-agen tersebut telah dilarang digunakan dalam produk kosmetik. Namun produk kosmetik ilegal

mengandung agen-agen tersebut masih dapat ditemukan (Couteau and Coiffard, 2016).

Hidroquinon (HQ) adalah salah satu agen yang paling sering digunakan dalam produk pemutih kulit. Hidroquinon juga merupakan gold standar untuk pengobatan hiperpigmentasi di USA. HQ pertama kali tercatat sebagai agen *bleaching* oleh Oettel pada tahun 1936 dan dipasarkan di USA sebagai produk dan resep sejak 1960-an (Levitt, 2007). HQ adalah pencerah kulit paling konvensional mengurangi jumlah melanin melalui inhibisi tirosinase, namun efek samping berat pada penggunaan jangka panjang seperti kerusakan melanosit, dermatitis iritatif, dermatitis kontak, hiperpigmentasi post inflamasi, dan onkronosis .(Chawla et al., 2008) Saat ini, US FDA menyatakan larangan penggunaan berlebihan HQ didasarkan pada laporan timbulnya exogenous okronosis pada manusia dan adenoma hepar, adenoma ginjal, dan leukemia pada murin pada penggunaan dosis besar dalam periode lama (Levitt, 2007). Untuk alasan keamanan , penggunaan HQ telah dilarang di Uni Eropa sebagai bahan aktif dalam kosmetik sejak tahun 2001 dan larangan terhadap HQ yang dijual bebas diusulkan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan AS (FDA) pada tahun 2006 (Miao et al., 2016). Hal ini mendorong penemuan agen pencerah yang baru yang efektif dan lebih aman dari HQ. Namun berbagai pengobatan lesi hiperpigmentasi belum ada yang menghasilkan efektifitas dan keamanan yang memuaskan pada manusia (Chawla et al., 2008).

Penghambat melanogenesis lain seperti kojic acid dan arbutin menunjukkan aktivitas in vivo yang lemah atau efektif jika dikombinasikan dengan obat lain seperti steroid dan retinoid (Chawla et al., 2008). Beberapa penelitian yang membandingkan efek HQ dengan agen pencerah baru juga telah dilakukan oleh para peneliti di Departemen Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin diantaranya adalah penelitian oleh Faridha Ilyas dkk membandingkan efek Hydroquinone 4% dengan ekstrak kunyit 0,25 %, Farida Tabri dkk membandingkan efek kombinasi glutathione 2 % tokoferil asetat 1 % magnesium askorbat fosfat 3 % dengan hydroquinone 4 % dan Anis Irawan dkk yang melakukan studi membandingkan efektifitas kombinasi asam traneksamat, fermentasi galactomyces, niacinamid dan alpha arbutin dengan hydroquinone 4 %.

Salah satu senyawa baru , deoxyArbutin (dA) menunjukkan penghambatan cepat aktivitas enzim tyrosinase pada percobaan in vitro in situ dan pencerah kulit yang berkelanjutan pada marmut yang tidak berbulu dan berpigmen serta pada kulit manusia (Chawla et al., 2008). Sebuah percobaan yang dilakukan oleh Boissy et. al membandingkan efek inhibisi tirosinase deoxyarbutin (dA) dibandingkan dengan HQ, kojic acid dan arbutin menunjukkan bahwa deoxyarbutin (dA) memiliki efek inhibisi tirosinase hampir sama dengan HQ, sedangkan kojic acid dan arbutin tidak memiliki efek inhibisi tirosin. Studi pada hewan percobaan menunjukkan keamanan deoxyarbutin

(dA) pada mata, tidak bersifat mutagenic dan tidak bersifat fotoalergi (Boissy et al., 2005a). Percobaan yang dilakukan oleh *Hamed et al* membandingkan efektifitas (dA) 3% dan HQ 4% pada kulit manusia yang sebelumnya dipaparkan pada sinar UV menunjukkan bahwa (dA) lebih efektif meningkatkan kecerahan kulit dibanding HQ. (Mov, 2006a). Deoxyarbutin merupakan tirosinase yang kuat, kurang sitotoksik, dan memiliki potensi antioksidan tertentu, dapat berfungsi sebagai alternatif yang efektif dan aman dibandingkan HQ untuk digunakan sebagai pencerah kulit (Hu et al., 2009, Miao et al., 2016).

Deoxyarbutin bersifat termolabil dalam solusio air dan pada $\text{PH} < 7$ akan terdekomposisi dan terdegradasi menjadi HQ. Sehingga pada tahun 2015 *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCC) di Eropa menyatakan penggunaan deoxyarbutin dalam kosmetik hingga konsentrasi 3% dalam sediaan krim kurang aman. Oleh karna itu dalam penelitian ini, peneliti mencoba membandingkan efektivitas deoxyarbutin dengan konsentrasi 2% dalam serum dengan formulasi anhidrat sehingga lebih stabil terhadap suhu dan cahaya dengan harapan senyawa ini memiliki efektifitas yang lebih baik dibandingkan HQ 4% dengan efek samping yang lebih minimal (Ulrike Barnauer, 2015). Sampai saat ini diketahui oleh peneliti belum ada laporan terbuka ataupun studi yang dipublikasi terkait efektivitas deoxyarbutin dalam konsentrasi 2% sebagai agen pencerah kulit.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang masalah, maka dapat dirumuskan pernyataan penelitian sebagai berikut :

- a. Apakah pemberian serum deoxyarbutin 2% secara topikal dapat meningkatkan kecerahan kulit setelah 2 minggu pemakaian hingga minggu ke-12.
- b. Apakah pemberian serum hydroquinone 4% secara topikal terbukti meningkatkan kecerahan kulit setelah 2 minggu pemakaian hingga minggu ke-12.
- c. Apakah ada perbedaan efek antara pemberian serum deoxyarbutin 2% dan serum hydroquinone 4% terhadap kecerahan kulit setelah 2 minggu pemakaian hingga minggu ke-12.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek serum deoxyarbutin 2% terhadap kecerahan kulit dan membandingkan dengan serum hydroquinone 4% yang merupakan agen pencerah kulit standar.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Mengetahui efek serum deoxyarbutin 2% terhadap perubahan kecerahan kulit setelah 2 minggu pemakaian hingga minggu ke-12.

- b. Membuktikan efek serum hydroquinone 4% terhadap perubahan kecerahan kulit setelah 2 minggu pemakaian hingga minggu ke-12.
- c. Membandingkan efek antara serum Deoxyarbutin 2% dan serum Hydroquinone 4% terhadap perubahan kecerahan kulit setelah 2 minggu pemakaian hingga minggu ke-12.

1.4 Hipotesis Penelitian

Adapun hipotesis penelitian ini adalah :

- a. Serum deoxyarbutin 2% memiliki efek meningkatkan kecerahan kulit sejak 2 minggu pemakaian dengan efek yang terus meningkat hingga minggu ke-12.
- b. Serum deoxyarbutin 2% memiliki efektivitas yang sama dengan serum hydroquinone terhadap peningkatan kecerahan kulit sejak 2 minggu pemakaian hingga minggu ke-12

1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Memberikan data ilmiah mengenai perubahan tingkat kecerahan kulit sebelum dan setelah 12 minggu menggunakan serum deoxyarbutin 2%
- b. Sebagai bahan acuan untuk penelitian di masa yang akan datang.

- c. Menambah wawasan di bidang ilmu kesehatan kulit dan kelamin khususnya tentang efektivitas serum deoxyarbutin 2% untuk kepentingan alternatif pencerah kulit yang lebih baik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

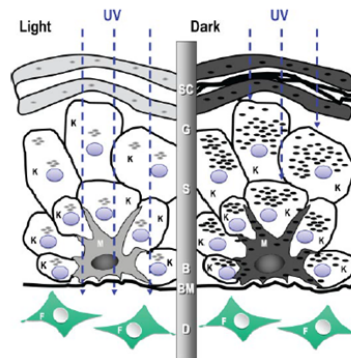
2.1 Variasi Warna Kulit

Kulit memainkan peran yang sangat penting, menyediakan penghalang fisik yang luas terhadap faktor mekanik, kimia, dan mikroba yang dapat mempengaruhi status fisiologis tubuh. Selain itu, kulit juga berfungsi sebagai kekebalan tubuh melalui pembentukan pigmen yang memberikan sistem pertahanan yang unik terhadap UV radiasi (UV-R). Hal ini dipertentarkan oleh melanosit yang mentransfer melanosom melalui dendritnya ke keratinosit, di mana mereka membentuk tabir melanin yang mengurangi kerusakan DNA akibat UV pada epidermis manusia (Costin and Hearing, 2007).

Warna kulit yang terlihat adalah hasil dari spektrum daya serap dan pantulan cahaya oleh kromofor di kulit. Ini sangat ditentukan oleh jumlah melanin, jenis (rasio eumelanin hitam / coklat terhadap pheomelanin merah / kuning), distribusi intraseluler dan lokasi di dalam lapisan kulit. Perbedaan pigmentasi fenotip tidak bergantung pada jumlah melanosit yang secara relatif konstan pada berbagai kelompok etnis, melainkan bergantung pada jumlah dan jenis dari melanin dan transfer melanin serta distribusi melanin ke keratinosit (Lowell A. Goldsmith et al., 2012, Videira et al., 2013). Meskipun

jumlah melanosit pada kulit manusia konstan, namun ukuran, jumlah dan distribusi melanosom pada keratinosit bervariasi. Jumlah melanin pada kulit berbeda tidak hanya pada tipe kulit yang berbeda tapi juga pada lokasi tubuh yang berbeda. Perbedaan ini diregulasi oleh ekspresi gen yang mengontrol seluruh aktivitas dan ekspresi protein melanosom di dalam melanosit masing-masing individu. Hal ini ditunjukkan pada melanosit dengan melanin rendah lebih lambat mensintesis tirosinase dan mendegradasinya lebih cepat dibandingkan melanosit dengan kandungan melanin tinggi (Costin and Hearing, 2007). Ukuran dan distribusi melanosom bervariasi pada warna kulit yang berbeda. Pada individu keturunan Afrika, melanosom biasanya besar dan tersebar sendiri-sendiri di keratinosit. Pada individu kulit putih, melanosom lebih kecil dan dikelompokkan dalam membran. (Lowell A. Goldsmith et al., 2012) Melanosom individu berkulit gelap lebih besar, lebih banyak, dan memanjang, merupakan hasil dari degradasi tertunda dalam keratinosit dan mengakibatkan peningkatan pigmentasi yang terlihat. Perbedaan-perbedaan ini dalam melanosom hadir saat lahir dan tidak ditentukan oleh faktor ekstrinsik seperti sinar ultraviolet. Ada dua jenis melanin: eumelanin - coklat-hitam atau polimer tidak larut gelap - dan pheomelanin - polimer larut merah-kuning yang dibentuk oleh konjugasi sistein atau glutathione. Eumelanin adalah tipe utama pada individu dengan kulit dan rambut gelap dan lebih efisien dalam fotoproteksi. Pheomelanin sebagian besar ditemukan pada individu dengan rambut merah.

dan fototipe kulit I dan II, dimana lebih rentan terjadi tumor kulit (Videira et al., 2013).



Gambar 1. Skema susunan kulit manusia

Pada kulit terang dan kulit gelap. Dari atas ke bawah: SC, stratum corneum; G, stratum granulosum; S, stratum spinosum; B, stratum basale; BM, basement membrane; D, dermis. Cell types: K, keratinocyte; M, melanocyte; F, fibroblast; shaded oval, melanin

Warna kulit paling sering didefinisikan sebagai fototipe kulit Fitzpatrick IV sampai VI. Jenis kulit ini, menurut definisi, mudah gelap dan terbakar minimal, jarang, atau tidak pernah. Sistem fototipe kulit Fitzpatrick awalnya dikembangkan untuk menilai respons pasien terhadap paparan UV dengan tujuan untuk mengobati kondisi kulit dengan cahaya. Menggunakan sistem ini, pasien dibedakan jenis kulitnya berdasarkan kemampuan yang dilaporkan untuk gelap atau terbakar. Sistem ini mendefinisikan *minimum erythema dose* (MED) untuk setiap jenis kulit, yang kemudian digunakan untuk memandu dosis terapi UV untuk berbagai penyakit kulit. Penilaian kulit ini telah ada sejak

lama dan berevolusi menjadi cara untuk menggambarkan warna kulit pasien (BAUMANN, 2009).

TABLE 14-1
The Fitzpatrick Skin Phototypes

SKIN TYPE	APPEARANCE	REACTION TO SUN EXPOSURE
Type I	Very fair; blond or red hair; light-colored eyes; freckles common	Always burns, never tans
Type II	Fair skinned; light eyes; light hair	Burns easily
Type III	Very common skin type; fair; eye and hair color varies	Sometimes burns, gradually tans
Type IV	Mediterranean Caucasian skin; medium to heavily pigmented	Rarely burns, always tans
Type V	Black skin, Mideastern skin; rarely sun sensitive	Tans
Type VI	Black skin, rarely sun sensitive	Tans easily

Gambar 2. Klasifikasi fototipe kulit fitzpatrick

2.2. Regulasi Pigmen Kulit

2.2.1. Pigmen Kulit Konstitutif

Pigmentasi kulit yang terlihat adalah hasil dari dua tahapan penting yaitu sintesis melanin oleh melanosit dan transfer melanosom ke keratinosit. Namun terdapat urutan tahapan yang harus terjadi untuk menghasilkan sintesis dan distribusi melanin yang normal :

a. Migrasi melanoblast selama perkembangan embrio

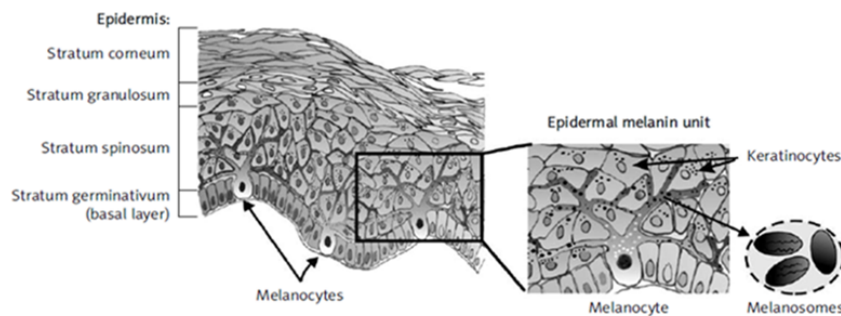
Melanoblast berasal dari pada puncak saraf sel embrionik disebut *neural crest cells (NCC)* pada bulan kedua tahap perkembangan embrio. Melanoblas kemudian bermigrasi menuju lokasi target spesifik pada dermis, epidermis, folikel rambut, uvea, stria vaskular, organ vestibular dari endolymphatic telinga dan leptomeningen otak. Pada manusia proses migrasi

ini mengambil waktu antara minggu ke-10 dan ke-12 untuk perkembangan dermis dan 2 minggu berikutnya pada epidermis. Kelangsungan hidup dan migrasi dari melanoblas *neural crest* selama embriogenesis sangat dipengaruhi oleh reseptor spesifik pada permukaan sel dan ekstraseluler ligan, misalnya *stem cell factor* (SCF) mengikat reseptor KIT pada melanosit dan melanoblas (Costin and Hearing, 2007).

b. Diferensiasi melanoblas menjadi melanosit

Ketika melanoblas sudah sampai pada tujuan akhir, maka akan berdiferensiasi menjadi melanosit yang terjadi pada bulan ke-6 kehidupan fetus yang berada pada *epidermal-dermal junction sites* (Costin and Hearing, 2007). Diferensiasi melanoblas menjadi melanosit serta migrasi ke situs yang sesuai berfungsi untuk menghasilkan pola pigmentasi normal (Yamaguchi et al., 2007). Melanosit dapat ditemukan di dermis selama masa gestasi. Melanosit pada dermis secara bertahap berkurang selama masa gestasi dan akhirnya menghilang setelah kelahiran. Namun melanosit pada *epidermal-dermal junction* terus berproliferasi dan mulai membentuk melanin (Costin and Hearing, 2007). Melanosit berada di lapisan basal epidermis tempat mereka membentuk unit melanin epidermis sebagai hasil dari hubungan antara satu melanosit dan 30-40 keratinosit terkait. Rasio melanosit terhadap keratinosit adalah 1: 10 pada lapisan basal epidermis. Keseimbangan ini dipertahankan selama kehidupan manusia tetapi mekanisme pastinya tidak diketahui. Sekitar

1200 melanosit ada per mm² kulit tidak tergantung dari ras manusia. Ukuran unit melanosit epidermis serupa secara independen sesuai ras manusia, tetapi bervariasi antara area tubuh (Cichorek et al., 2013). Meskipun melanosit dan keratinosit pada stratum basal epidermis memiliki jumlah yang relatif stabil dengan proliferasi lambat, namun keratinosit pada lapisan atas epidermis berproliferasi cepat (Yamaguchi et al., 2007).



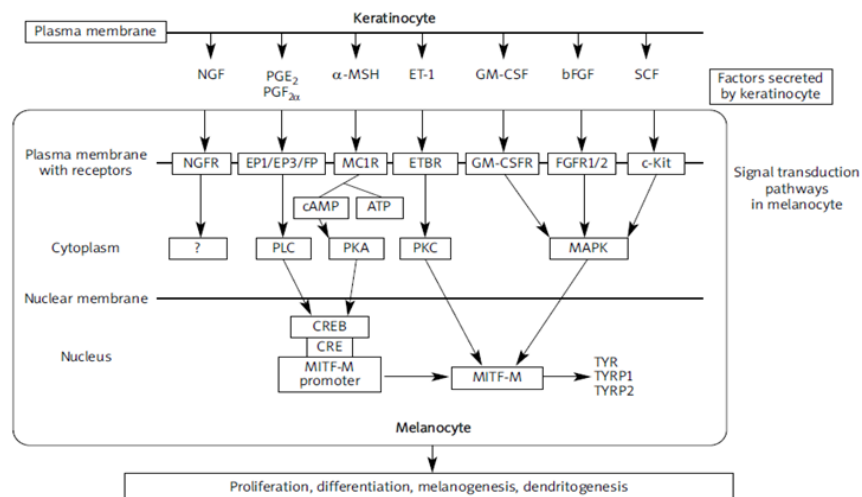
Gambar 3. Skema struktur epidermis

Melanosit berada di antara sel-sel lapisan basal dan melalui proses dendritik berkomunikasi dengan sekitar 30-40 keratinosit dalam unit melanin epidermal. Melanosit mensintesis melanin dalam melanosom diangkut ke keratinosit untuk melindunginya dari radiasi UV

c. *Epidermal melanin unit signaling-pathway*

Unit epidermal melanin adalah struktur kompleks di dalam epidermis dengan dua sel yaitu melanosit dan keratinosit. Kompleks melanosit keratinosit berespon cepat terhadap stimulasi lingkungan melalui jalur sinyal parakrin dan autokrin. Biasanya keratinosit, fibroblast dan kemungkinan sel lain di kuli memproduksi sitokin, faktor pertumbuhan dan mediator inflamasi yang dapat

meningkatkan produksi melanin serta transfer melanin ke keratinosit. Ada sejumlah stimulator parakrin dari melanogenesis seperti proopiomelanocortin (POMC) peptide yang mengandung (α-MSH, β-MSH, ACTH). Hormon melanotrofik ini ditemukan di awal 1950-an oleh Dr. Aaron B. Lerner. Ekspresi POMC di keratinosit diinduksi oleh Ultraviolet (UV). Fibroblas memiliki peranan dalam kelangsungan melanosit melalui sekresi sitokin parakrin seperti stem cell factor (SCF), neuregulin 1 (NRG1). Pengaruh sitokin ini tidak hanya proliferasi dan pigmentasi melanosit, tetapi juga bentuk, dendritik, mobilitas dan sifat adhesi.



Gambar 4. Epidermal melanin unit signaling-pathway

Proliferasi melanosit, diferensiasi, melanogenesis berada di bawah kendali faktor yang disekresikan oleh keratinosit di sekitarnya. SCF – stem cell factor, bFGF – basic fibroblast growth factor, GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, ET-1 – endothelin 1, α -MSH – melanocyte-stimulating hormone, PGE2 – prostaglandin E2, PGF2 α – prostaglandin F2 α , NGF – nerve growth factor, c-Kit – tyrosine kinase receptor, FGFR1/2 – fibroblast growth factor receptor, GM-CSFR – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor, ETBR – endothelin B receptor, MC1R – melanocortin 1 receptor, EP1/EP3/FP – prostanoid receptors, NGFR – nerve growth factor receptor, MAPK – mitogen-activated protein (MAP) kinases, PKC – protein kinase C, PKA – protein kinase A, PLC – phospholipase C, TYR – tyrosinase, TYRP1 – tyrosinase-related protein 1, TYRP2 – tyrosinase-related protein 2, MITF-M – melanocyte-specific MITF (microphthalmia- associated transcription factor) isoform, CRE – cAMP response elements, CREB – cAMP response element-binding

Penemuan gen penyandi dasar sejak 10 tahun lalu yaitu helix-loop-helix leucine zipper transkripsi microphthalmia transcription faktor gene (MITF), memberikan dorongan utama untuk studi regulasi transkripsi dalam garis keturunan melanosit. Memang, MITF tampaknya berada di pusat jaringan regulasi faktor transkripsi dan jalur pensinyalan yang mengontrol kelangsungan hidup, proliferasi dan diferensiasi melanoblas dan melanosit. Tidak hanya pengembangan melanosit yang dipengaruhi oleh protein ini tetapi juga pigmentasi melalui pengaturan efek transkripsional pada tirosinase, TRP-1 dan TRP-2. MITF dulu terbukti menjadi faktor transkripsi kunci untuk Rab27A, protein penting untuk transportasi melanosome. Karena itu, MITF memainkan peran sentral dalam sintesis melanin, serta biogenesis dan transportasi melanosome (Cichorek et al., 2013, Lin and Fisher, 2007).

c. Melanogenesis

Melanosom merupakan organela bermembran tempat sintesis melanin terjadi. Perkembangannya membutuhkan tyrosinase (TYR) dan protein terkait tirosinase (TYRP1, TYRP2). Tiga enzim tersebut, tyrosinase sangat penting untuk melanogenesis dan disintesis pada ribosom RER dan diangkut ke kompleks Golgi di mana ia mengalami glikosilasi, yang merupakan proses penting untuk struktur normal dan fungsi. Di dalam melanosom mengandung region catalytic (berkisar 90% dari protein) diikuti oleh region transmembran pendek dan region sitoplasma yang mengandung sekitar 30 asam amino. Residu histidin terletak pada region catalytic dari tyrosinase dan mengikat ion copper yang diperlukan untuk aktivasi tyrosinase.

Ada empat tahap dalam pengembangan melanosome (Tabel 1). Premelanosom (Tahap I) berbentuk bulat, vesikel kecil dengan matriks amorf. Melanosom pada Tahap II memiliki matriks fibrillar yang terorganisir dan terstruktur (utamanya dari family gp100) dan tirosinase ada tetapi pigmen sintesis belum ada. Awal mula melanin produksi berlangsung pada Tahap III, di mana pigmen disimpan pada protein fibril. Pada tahap IV pigmen terakhir mengisi seluruh melanosom. Melanosom bermelanin yang sepenuhnya kehilangan aktivitas tirosinase dan diangkut ke keratinosit sekitarnya oleh unsur-unsur sistem sitoskeletal.

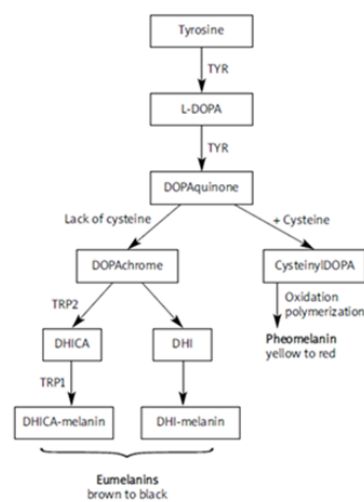
Melanosom features	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
				
Shape	Spherical	Elongated	Elliptical, ellipsoidal	Elliptical, ellipsoidal
Internal structure	–	Matrix fibrils are visible	Matrix fibrils are visible	Matrix fibrils are covered by polymerized melanin
TYR	–	+	+	+
TYRP1	–	+	+	+
TYRP2	–	+	+	+
Melanin synthesis	–	–	Begins, settle on internal fibrils	Filled by melanin
Color			Brown	Dark brown to black

Gambar 5. Karakteristik tahap perkembangan melanosom selama sintesis melanin

Dua jenis utama melanin yang diproduksi yaitu pheomelanin dan eumelanin. Mereka berbeda dalam warna dan cara sintesis. Melanin memiliki banyak khasiat yang bermanfaat bagi tubuh seperti penyerapan penghamburan sinar UV, membersihkan radikal bebas, reaksi reduksi oksidasi dan penyimpanan ion.

Ketersediaan substansi dan fungsi dari enzim melanogenesis menentukan tentang jenis melanin yang dihasilkan. (Gambar 3). Proses melanogenesis berupa hidrosilasi tyrosine oleh Tyrosinase (TYR) menjadi L-3,4-dihydro xyphenylalanine (DOPA) yang cepat teroksidasi menjadi DOPAquinone. Kehadiran sistein DOPAquinone bereaksi DOPAquinone menghasilkan 3- atau 5-cysteinyIDOPA, yang kemudian mengoksidasi dan mempolimerisasi, menimbulkan melanin larut kuning-merah – pheomelanin. Dengan tidak adanya tiol (sistein, glutathione atau thioredoxin) eumelanin

coklat-hitam diproduksi. DOPAquinone secara spontan mengalami siklisasi ke DOPAchrome . DOPAchrome kehilangan secara spontan asam mengkatalisasi konversi lebih lanjut pada akhirnya membentuk warna coklat yang lebih muda DHICA-melanin.



Gambar 6. Skema sederhana sintesis melanin

Tirosin di bawah pengaruh enzim dasar seperti tirosinase (TYR), tirosin- protein terkait 1 (TYRP1) dan 2 (TYRP2) berubah menjadi polimer melanin, campuran pigmen bernama eumelanin

d. Transfer melanosom

Melanosom bergerak dari daerah perinuklear melanosit di mana mereka diproduksi menuju membran plasma karena fungsi mikrotubulus, filamen aktin, dan myosin, yang serupa untuk pergerakan organel lain dalam jenis sel lainnya . Dynein dan kinesin memediasi mikrotubulus- transportasi intraseluler dependen. Tiga gen pigmen berbeda diketahui sejauh ini terlibat dalam gerakan dinamis melanosom, dan mutasi dalam dari gen-gen tersebut menghasilkan akumulasi pigmen yang luar biasa di daerah perinuklear

melanosit mutan karena gangguan transportasi mereka ke pinggiran sel. Rab27a, melanophilin, dan myosin Va membuat kompleks menghubungkan melanosom ke motor berbasis F-actin. Rab27a (dikenal sebagai ashen pada tikus), melanophilin (dikenal sebagai timah), dan myosin Va (dikenal sebagai dilute) dan mutasi dari gen tersebut menyebabkan berbagai bentuk sindrom Griscelli (tipe II, III, dan I, masing-masing) pada manusia. *Rab27a* menautkan *synaptoagmin*- seperti *protein2-a* (*Slp2-a*) dengan fosfatidilserin, dengan demikian menempelkan melanosom pada membran plasma, yang menunjukkan peran *Slp2-a* sebagai pengatur melanosome eksositosis (Yamaguchi and Hearing, 2009). Setelah menempel pada tepi dendrit melanosit, melanosom dilepaskan dan menyatu dengan keratinosit berdekatan. Terdapat beberapa teori tentang mekanisme transfer melanosom, namun studi terbaru menyatakan bahwa transfer melanosom ke keratinosit kemungkinan terjadi melalui mekanisme fagositosis melanosom oleh keratinosit. Regulator utama transfer melanosom adalah *protease active-receptor-2* (PAR-2). Namun studi terbaru menyatakan bahwa membrane glikoprotein, PAR-2, niasinamid yang memodulasi pengenalan dan transfer melanosom ke keratinosit. Setelah melanosom ditransfer ke keratinosit maka mereka secara selektif dan dominan terlokasi pada bagian apek nucleus sehingga bisa efektif mengabsorpsi sinar UV melindungi nucleus dibawahnya dari kerusakan. Byers dan Maheswary melaporkan bahwa dynein dan

fagositosom melanosom agregat di sitoplasma yang memediasi jalur ini. Ketika keratinosit berdiferensiasi menjadi bentuk terminal yaitu korneosit, melanosom yang ada secara bertahap terdegradasi. Saat keratinosit berubah menjadi korneosit maka melanosom tidak lagi ditemukan, kecuali pada tipe kulit gelap terkadang masih ditemukan meskipun jarang (Boissy, 2003)

2.2.2. Faktor Yang Mempengaruhi Pigmentasi

Pigmentasi kulit konstitutif menggambarkan determinasi genetik dari melanin dan dapat berubah oleh beberapa faktor berupa faktor intrinsik dan ekstrinsik.

A. Faktor intrinsik

Selain faktor intrinsik dari melanosit, keratinosit dan fibroblast melalui aktifitas parakrin dan autokrin, terdapat faktor lain yang mempengaruhi melanogenesis seperti sel endotel dan hormon melalui suplai darah, dari sel-sel inflamasi dan dari sistem saraf (Yamaguchi and Hearing, 2009, Videira et al., 2013).

Sel-sel endotel. Sel-sel endotel adalah sumber ET-1, PG, dan nitrit oksida (NO). NO tidak hanya berperan dalam relaksasi otot polos tetapi juga memulai melanogenesis, eritema, dan imunosupresi sebagai respons terhadap radiasi UV.

Sel-sel inflamasi. Hiperpigmentasi diamati secara klinis sebagai respons terhadap inflamasi. Mediator kimia yang diturunkan dari arakidonat,

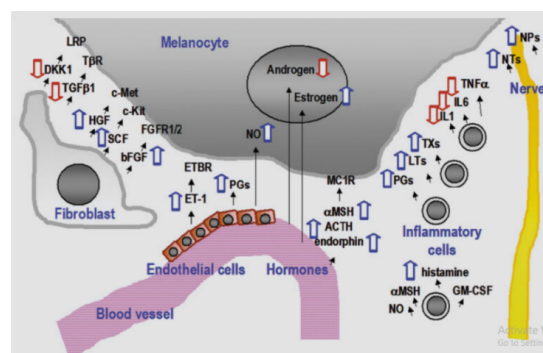
terutama Pg termasuk PGE2 dan PGF2a, leukotrien (LTs) termasuk LTC4 dan LTD4, dan thromboxanes (TXs) termasuk TXB2, bertanggung jawab atas pigmentasi yang disebabkan oleh peradangan karena bahan kimia tersebut merupakan penambah aktivitas TYR . Faktor-faktor lain yang berhubungan dengan peradangan yang meningkat melanogenesis termasuk histamin, NO, GM-CSF, dan α -MSH. Namun, tidak semua sitokin inflamasi meningkatkan pigmentasi kulit. Interleukin (IL) -1, IL-6, dan tumor necrosis factor (TNF α) dikenal untuk menekan pigmentasi kulit, yang menunjukkan pentingnya penjabaran lebih lanjut hubungan antara melanogenesis dan peradangan.(Yamaguchi and Hearing, 2009)

Saraf. Karena melanosit dan neuron berasal dari saraf sel puncak selama embriogenesis, faktor yang diturunkan sel saraf, termasuk neurotrofin (NTs, seperti NGF) dan neuropeptide (NP, seperti peptida yang berhubungan dengan gen kalsitonin / CGRP) memiliki efek stimulasi pada melanosit, yang mendukung teori neuronal untuk menjelaskan terjadinya vitiligo segmental(Costin and Hearing, 2007)

Hormonal. Hiperpigmentasi kadang-kadang terlihat selama kehamilan dan kondisi ini disebut melasma, chloasma, atau topeng kehamilan. Hal itu terjadi terutama di pipi, bibir atas, dagu, dan dahi. Meskipun POMC / MC1-R / cAMP adalah jalur utama, ada reseptor melanosit lain yang terkait dengan adenyl cyclase dan produksi cAMP, seperti reseptor muskarinik dan reseptor

α dan β estrogen. Katekolamin bisa diproduksi oleh keratinosit dari L-DOPA, yang prekursor melanin, dan dapat berikatan dengan reseptor adrenergik $\alpha 1$ dan $\beta 2$ pada melanosit, merangsang melanogenesis melalui jalur cAMP dan PKC- β (Videira et al., 2013).

Melanosit mengandung cytosolic dan reseptor estrogen, menyebabkan melanosit pada pasien dengan melasma secara inheren lebih sensitif terhadap efek stimulasi estrogen dan kemungkinan hormon steroid seks lainnya. Estrogen memiliki efek signifikan pada berbagai jenis sel penting dalam fisiologi kulit, termasuk keratinosit, fibroblas, dan melanosit. Stimulasi proliferasi dan sintesis DNA keratinosit epidermis manusia oleh estrogen telah diperagakan in vitro dan itu telah diperlihatkan bahwa kultur keratinosit manusia memiliki afinitas tinggi pengikat estrogen. Selain meningkat proliferasi keratinosit, estradiol mempercepat sekresi GM-CSF oleh 3 kali lipat pada kultur keratinosit manusia. Baru-baru ini ditunjukkan bahwa androgen memodulasi aktivitas TYR melalui regulasi cAMP, pengatur utama pigmentasi kulit.



Gambar 7. Faktor yang mempengaruhi pigmentasi kulit

B. Faktor ekstrinsik

Radiasi sinar ultraviolet . UV adalah faktor ekstrinsik terpenting pada regulasi melanogenesis. Ini adalah stimulus utama untuk pigmentasi yang diinduksi atau didapat, yang dikenal sebagai “tanning”. (Yamaguchi and Hearing, 2009). Respon pigmetasi ini memiliki dua fase yang berbeda diistilahkan dengan pewarnaan pigmen langsung (IPD) dan pigmentasi tertunda . Pigmentasi langsung biasanya dimulai selama paparan UV, maksimal dan memudar selama beberapa menit hingga beberapa hari tergantung pada dosis UV dan kulit individu. Tidak diperlukan sintesis pigmen baru, dan warnanya berubah tampaknya hasil dari redistribusi melanosom, yang organel subselular tempat melanin diendapkan, dari perikaryon ke dendrit melanosit epidermal. Pigmentasi tertunda terdeteksi 3-4 hari setelah satu paparan UV yang cukup. Pigmentasi tertunda memiliki puncak luas intensitas maksimum dari sekitar 10 hari hingga 34 minggu, tergantung pada total dosis UV dan kulit individu, dan memudar secara bertahap selama beberapa minggu. Paparan UV berulang dapat menghasilkan pigmentasi yang bertahan selama berbulan-bulan setelah paparan terakhir. Pigmetasi tertunda dimanifestasikan secara histologis dengan peningkatan jumlah melanosit, dendrisitas melanosit , jumlah melanosome dan derajat melanisasi, dan luasnya transfer melanosom ke keratinosit. Pigmen melanin paling banyak terdapat di lapisan basal kulit. Di kulit kecokelatan oleh sinar matahari atau

lainnya yang didominasi UVB (290- 320 nm) dapat juga melanin dijumpai dalam suprabasilar keratinocytes, sedangkan pigmentasi oleh UVA (320-400 nm) pigmen lebih terbatas pada lapisan basal saja. (Gilchrest et al., 1996)

Efek langsung radiasi UV terhadap melanosit paparan radiasi UV, sangat menunjukkan bahwa keratinosit mengeluarkan faktor spesifik yang bertanggung jawab untuk aktivasi melanosit yang diinduksi paparan UV. Karena itu, keratinosit tampaknya merupakan komponen seluler utama dalam respon pigmentasi fisiologis. Mekanisme ini dijelaskan pada gambar 3.

2.3. Agen pencerah kulit

Produk pencerah kulit tersedia secara komersial dengan tujuan kosmetik untuk mendapatkan warna kulit yang lebih terang. Secara klinis, mereka juga digunakan untuk pengobatan gangguan hiperpigmentasi seperti melasma, *café au lait spot* dan lentigo solaris. (Gillbro and Olsson, 2011).

Agen pencerah kulit memiliki berbagai mekanisme dalam mencerahkan kulit:

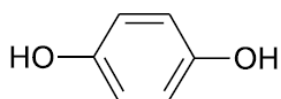
- a. Menghambat melanogenesis/ *Inhibitor tirosinase*
- b. Menghambat transfer melanosom
- c. Melanosit sitotoksik
- d. Mempercepat *epidermal turnover* dan deskuamasi
- d. Antioksidan, dll

Karena enzim tirosinase adalah enzim pembatas laju biosintesis melanin, banyak produk kosmetik dengan tujuan mencerahkan kulit

menggunakan efeknya pada enzim ini (Dover, 1991). Contoh produk tersebut adalah hidroquinon dan deoxyarbutin yang akan dibandingkan efektivitasnya sebagai agen pencerah kulit dalam penelitian ini.

2.4. Hidroquinon

2.4.1. Struktur Kimia dan Mekanisme Kerja



Gambar 8. Struktur kimia Hydroquinone

Hidroquinone (1,4-dihydroxybenzene; HQ) merupakan agen depigmentasi yang paling populer, diperkenalkan untuk penggunaan klinis sejak 1961. Hidroquinone (1,4-dihydroxybenzene; di USA. Hidroquinon digunakan dalam formulasi topikal sebagai agen pemutih kulit dan depigmentasi. Digunakan dalam pengobatan melasma (chloasma), freckles, lentigo senilis, dan hiperpigmentasi pascainflamasi. Penggunaan HQ ini dianggap sebagai penggunaan obat yang berada di bawah lingkup FDA. (Andersen et al., 2010). Hidroquinon disetujui untuk digunakan dalam krim pemutih kulit dengan kadar maksimal 2% sebagai produk *over-the-counter* (OTC) dan untuk konsentrasi lebih tinggi harus dengan resep dokter dengan kadar maksimal yang disetujui FDA hingga 4% hidrokuinon bersama dengan dua bahan aktif tambahan.

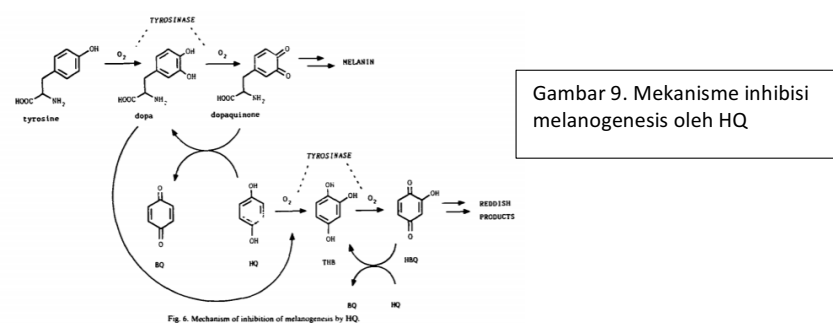
Beberapa percobaan telah menunjukkan kemanjuran terapeutiknya sendiri atau dalam hubungan dengan senyawa lain. HQ tampaknya mengarahkan efeknya terutama dalam melanosit dengan menghambat aktivitas tyrosinase, seperti melanosit epidermis hiperaktif dan telah dianggap sebagai referensi standar dalam mengevaluasi agen depigmentasi. Produk oksidasi adalah kuinon dan spesies oksigen reaktif (ROS), yang menyebabkan kerusakan membran oksidatif lipid dan protein, termasuk tirosinase, dan penipisan glutathione berkontribusi pada aksi pencerahan. HQ mungkin mengganggu pigmentasi bahkan melalui: (i) kovalen mengikat histidin atau berinteraksi dengan tembaga di aktif situs tirosinase, (ii) penghambatan DNA dan RNA sintesis dan (iii) perubahan pembentukan melanosom dan tingkat melanisasi.

Passi and Nazzaro-Porro menunjukkan bahwa HQ bukan sebagai tirosin inhibitor namun lebih tepatnya beraksi sebagai substrat alternatif dari enzim. Penemuan ini didukung oleh Havens dan Tramposch yang menunjukkan bahwa dengan adanya aksi dari tyrosinase, HQ secara cepat di konsumsi dan berubah menjadi produk yang tidak dikenali, bersamaan dengan BQ (benzoquinone) sebagai metabolit minor. Dengan menggunakan kombinasi teknik analitik *Palumbo et al* memperoleh bukti konklusif bahwa HQ merupakan substrat yang buruk untuk enzim tyrosinase, namun dengan adanya sejumlah katalitik dopa yang dihasilkan dari tirosin dalam percobaan

ko-oksidasi atau sengaja ditambahkan untuk campuran inkubasi, dikonsumsi secara efisien oleh enzim, dan menjadi kompetitor yang efektif dari substrat 'alami' tirosin. Pada percobaan, kapasitas HQ untuk tirosinase mengejutkan karena efek pelepasan elektron yang kuat dari kelompok para-hidroksil pada cincin fenol, jauh melebihi rantai samping alanin, dan aksesibilitas jalur dehidrogenasi yang mengarah ke BQ yang stabil bersama HQ memiliki kemampuan oksidasi yang jauh lebih tinggi daripada tirosin. Alasan yang masuk akal dari perbedaan ini adalah dengan menganggap bahwa di hadapan dopa konfirmasi kritis perubahan tyrosinase terjadi, dimana enzim diaktifkan ke arah yang kurang efektif yaitu substrat HQ.

Bahwa oksidasi HQ yang cepat karena kehadiran dopa katalitik adalah hasil dari enzimatik sejati dibandingkan proses redoks cyclic sederhana dengan mengorbankan pasangan dopa-dopaquinone, terlihat dari pembentukan preferensial HBQ lebih dari BQ. Namun, ada kemungkinan bahwa beberapa BQ diproduksi selama oksidasi HQ berasal dari proses redoks cyclic dimediasi oleh dopa. Hal ini akan memastikan bahwa setiap dopaquinone yang terbentuk secara enzimatis akan dikurangi kembali menjadi dopa oleh HQ, sehingga tingkat konstan kofaktor tersedia untuk menjaga tyrosinase tetap aktif. Nasib kimiawi HBQ saat ini sedang diselidiki dan dapat melibatkan beberapa pertukaran redoks dengan yang terbaik untuk memberikan dimerisasi HQ ke BQ dan atau reaksi gabungan dengan spesies

fenolik dan kuinonoid yang ada dalam campuran inkubasi untuk akhirnya menghasilkan pigmen coklat kemerahan. (Palumbo et al., 1991)



Gambar 9. Mekanisme inhibisi melanogenesis oleh HQ

2.4.2. Absorpsi, Ekskresi dan Eliminasi

Hydroquinone cepat diserap dan diekskresikan dalam urin pada tikus setelah pemberian oral. Penyerapan topikal dalam vehikulum alkohol lebih besar daripada dari larutan berair. Hydroquinone dalam larutan berair diserap melalui kulit manusia di tingkat $0,55 \pm 0,13 \text{ mg / cm}^2 \text{ per jam}$ (Andersen et al., 2010).

Percobaan pada kulit manusia (tebal 500 mm) dari 6 donor digunakan untuk memeriksa penetrasi 2% krim HQ tunggal dan dikombinasi dengan pretreatment 2% sodium azide saja dan kombinasi pretreatment dengan 2% sodium azide. Didapatkan jeda waktu 8 jam dicatat dan diyakini dikaitkan dengan waktu yang diperlukan untuk krim HQ untuk menembus kulit dan ke dalam cairan penerima (Andersen et al., 2010). Penyerapan HQ manusia pada aplikasi topikal kurang efisien dibandingkan dengan pemberian oral. Ketika

penyerapan diukur sebagai eliminasi hidrokuinon melalui urin setelah aplikasi (2,0% dalam alkohol) ke dahi sukarelawan manusia (6 laki-laki sukarelawan) selama 24 jam, rata-rata penyerapan perkutan yang dilaporkan adalah 57% (SD = 11%) dengan puncak eliminasi dalam waktu 12 jam dan eliminasi total pada 5 hari. (Bucks et al., 1988) Produk utama diamati dari proses metabolisme adalah konjugat sulfat dan glukuronida. Oksidasi menjadi 1,4-benzoquinon menghasilkan metabolit reaktif yang membentuk konjugat mono atau polyglutathione. Konjugat glutathione diyakini sebagai agen penyebab nefrotoksisitas hewan pengerat dan karsinogenesis ginjal. Konstanta laju metabolisme untuk konversi HQ ke konjugat monoglutathione (HQ-SG) dan selanjutnya ke asam merkapturat (HQ-Cys) dalam biakan hepatosit yang diisolasi dari F344, tikus dan manusia diukur. Hepatosit manusia juga menunjukkan yang lebih tinggi kapasitas untuk metabolisme HQ-SG ke HQ-Cys daripada tikus hepatosit. Asetilasi lebih disukai daripada deasetilasi dalam kedua spesies. Secara keseluruhan, penulis menyimpulkan bahwa kapasitas untuk metabolisme HQ dan HQ-SG lebih besar pada manusia daripada pada tikus, menunjukkan kapasitas yang lebih besar untuk detoksifikasi konjugat.

2.4.3 Efek Samping

a. Sistem Saraf

DeCaprio (1999) mengemukakan bahwa efek akut yang dihasilkan oleh paparan hidrokuinon tingkat tinggi terutama mempengaruhi sistem saraf pusat

(SSP), dengan tanda-tanda termasuk tremor, air liur, hipereksitabilitas, koordinasi, kejang-kejang, gagal pernapasan, koma, dan kematian (DeCaprio, 1999) Ditemukan bahwa tremor terjadi dalam 1 jam pemberian oral 64 atau 200 mg / kg hidrokuinon pada tikus percobaan (Topping et al., 2007).

Terdapat satu laporan kasus yang menyatakan bahwa aplikasi hidrokuinon dermal dapat menyebabkan neuropati perifer pada manusia. Kasus ini melibatkan seorang wanita berusia 30 tahun yang telah menggunakan dua krim pemutih kulit yang mengandung hidrokuinon selama kurang lebih 4 tahun. Wanita itu memiliki kelemahan, sensasi terbakar, hilangnya refleks tendon dalam, dan gangguan sensasi dalam pada ekstremitas bawahnya, bersama dengan tekanan darah yang sangat rendah. Setelah 4 bulan tidak menggunakan krim pemutih kulit, gejala hilang (Karamagi et al., 2001).

b. Kulit

Eksogen Okronosis

Okronosis eksogen dapat menjadi akibat aplikasi topikal hidrokuinon, fenol, resorinol, atau konsumsi oral antimalaria. Okronosis eksogen akibat HQ pertama kali dideskripsikan pada tahun 1975 oleh Findlay pada pasien yang secara teratur menggunakan agen pemutihan topikal ini. Kondisi ini terjadi secara eksklusif pada pasien dengan fototipe tinggi (Klasifikasi Fitzpatrick). Okronosis eksogen karena penggunaan HQ secara terus menerus dan kronis,

belum tentu dalam konsentrasi tinggi. Okronosis eksogen akibat penggunaan HQ 2% telah diuraikan. Ada berbagai teori yang menjelaskan okronosis eksogen. Yang paling diterima adalah *Penneys* yang menghubungkan hiperpigmentasi disebabkan hambatan enzim oksidase homogentisik oleh HQ. Hambatan ini seperti pada okronosis endogen, menimbulkan akumulasi homogentisic asam yang berpolimerisasi membentuk pigmen okronosis di papiler dermis.

Ochronosis eksogen bermanifestasi sebagai hiperpigmentasi pada daerah yang terpapar matahari. Ini terjadi pada permukaan osseous dan sering mempengaruhi wilayah zygomatic, memiliki pola simetris. Lesi berupa makula abu-abu-coklat atau biru-hitam biasanya dengan papula hiperkromik, pinpoint, seperti kaviar (Charlín et al., 2008). *Simmons et al* dan *Levin and Maibach* melaporkan kasus-kasus okronosis eksogen akibat pemakaian HQ jangka panjang dengan konsentrasi bervariasi antara 2-6% (Simmons et al., 2015, Levin and Maibach, 2001).

Iritasi Kulit

Laporan iritasi kulit atau alergi yang berhubungan dengan hidrokuinon jarang terjadi. Studi yang melibatkan kelompok yang lebih besar umumnya mencatat efek samping ringan dan sementara, biasanya dalam sebagian kecil dari subyek, yang termasuk eritema, pengelupasan kulit, sensasi terbakar dan

reaksi uji tempel yang mengiritasi (Bentley-Phillips dan Bayles, 1975; Kanerva et al., 1999; Taylor et al., 2003; Torok et al., 2005; O'Donoghue, 2006).

Vitiligo / leukoderma

Merupakan penyakit kulit yang ditandai dengan hilangnya pigmen akibat kematian atau disfungsi melanosit. Kontak leukoderma dapat terjadi ketika kulit terpapar bahan kimia dengan struktur yang mirip dengan tyrosine (Fisher, 1994). Setidaknya 5 kasus leukoderma kontak telah dilaporkan terkait dengan penggunaan krim kulit yang mengandung hidroquinone (Fisher, 1982; Romaguera dan Grimalt, 1985). Krim mengandung 2% (Fisher, 1982) atau 3% (Romaguera dan Grimalt, 1985) hidroquinone. Dalam kasus ini bukan mencerahkan melainkan terjadi depigmentasi lengkap di daerah yang dirawat (Fisher, 1998). Kondisi ini dapat menyebabkan area-area depigmentasi berupa bercak-bercak dengan daerah-daerah seperti hiperpigmentasi (leukoderma-en-confetti) (Confetti, 1998). Kondisi ini bukan respons alergi dan tidak terdeteksi oleh uji tempel (Fisher, 1998). Pada setidaknya satu kasus, kontak leukoderma menunda operasi, karena depigmentasi terjadi di pusat lesi lentigo maligna, menunjukkan bahwa HQ dapat mempengaruhi melanosit abnormal selain melanosit normal (Fisher, 1998).

c. Kesuburan

Data kesuburan terbaru menunjukkan bahwa HQ kurang toksik. Studi yang melibatkan HQ pada toksisitas reproduksi sudah lama (beberapa berasal

dari 1950-an dan menggunakan dosis tinggi dan tidak ada standar protokol. Studi modern dengan teratogenisitas terstandarisasi dan bioassay reproduksi gagal menunjukkan toksisitas reproduksi. Rincian diberikan dalam tinjauan luas toksikologi hidrokuinon oleh DeCaprio (DeCaprio, 1999).

d. Karsinogenesis dan mutagenesis

Studi karsinogenesis tentang pemberian secara oral hidrokuinon telah mengindikasikan 'beberapa bukti' dari karsinogenisitas pada tikus. HQ memiliki efek nefrotoksisitas secara genetik pada tikus tikus yang rentan, namun tidak terjadi pada manusia, dan tidak ada bukti toksisitas ginjal didokumentasikan untuk HQ pada manusia setelah in vivo atau paparan topikal dan oral. Pada percobaan pada hewan, tidak ada metabolit benzene termasuk phenol, HQ atau benzoquinone yang berpotensi menimbulkan peningkatan level myelotoxic. Namun mononuklear sel leukemia diobservasi pada tikus betina yang mendapat HQ oral selama 2 tahun, dan tidak ditemukan perubahan myelotoxic pada manusia pada pemakaian jangka panjang.

Karena tidak ada hasil bioassay NTP (National Toxicology Program) yang menunjukkan bukti karsinogenisitas, agen internasional untuk penelitian kanker tersebut menempatkan HQ dalam kategori 3; yaitu tidak dapat diklasifikasikan sebagai penyebab karsinogenik pada manusia.

2.5. Deoxyarbutin

2.5.1 Struktur Kimia

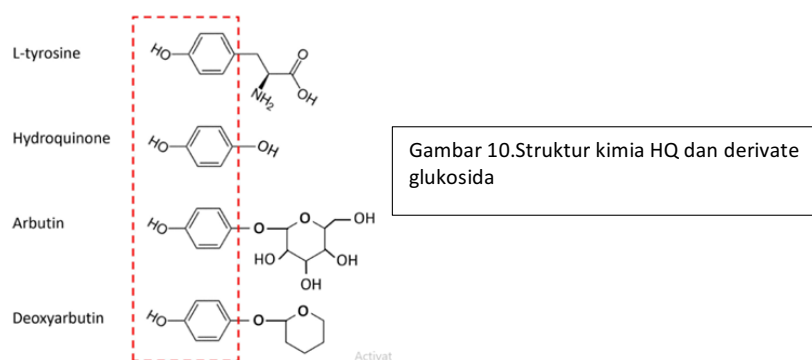
Deoxyarbutin (dA) atau (4-(tetrahydro-2H-pyran-2yl)oxy)phenol,D-Arb) merupakan derivate glukosida dari HQ. Agen pencerah kulit ini disintesis dengan melepaskan gugus hidroksil dari rantai glukosa dari beta-arbutin. Karena tidak memiliki struktur beta-glukosida diharapkan dapat menjadi substrat untuk enzim beta-glukosida yang terdapat di kulit bakteri dan jaringan manusia. Karena dA kehilangan grup hidroksil dari bagian glukosa, diharapkan zat ini menjadi lebih lipofilik dan lebih mudah diserap ke dalam kulit dibandingkan arbutin (alpha atau beta- arbutin).

dA digunakan sebagai bahan aktif pencerah kulit dalam preparat kosmetik dengan konsentrasi maksimum 3%. Meskipun berdasarkan bukti ilmiah dikatakan aman untuk digunakan dalam produk kosmetik sampai konsentrasi maksimal 3% dalam cream wajah, namun HQ dapat terbentuk pada tingkat yang menimbulkan kekhawatiran terkait keamanan produk tersebut selama siklus produk (seperti kondisi penyimpanan, stabilitas saat pemakaian). Sehingga disimpulkan bahwa penggunaan dA dengan konsentrasi sampai 3% tidak aman.

Dilaporkan bahwa dA stabil selama setidaknya 2 tahun ketika terlindung dari kelembaban, suhu di atas 8 ° C dan cahaya. Namun, dA tidak stabil dalam media yang sedikit asam dan terhidrolisis menjadi HQ pada suhu kamar . Ini

relevan ketika digunakan dalam produk kosmetik pada kulit (yang memiliki pH agak asam), dan ketika ada paparan suhu dan cahaya yang lebih tinggi. Oleh karena itu, dalam kondisi penggunaan, harus dipertimbangkan bahwa dA dapat mengalami hidrolisis menjadi HQ.

Perkiraan tentang kemungkinan kandungan HQ dalam formulasi dA berasal dari uji stabilitas dalam larutan dan “kontaminasi” bahan awal yang dilaporkan sekitar $5 \pm 2\%$ HQ dalam I – basis krim yang diterapkan dalam studi kinetik dengan marmut. Dengan tidak adanya data lain, SCCS mengasumsikan 10% HQ sebagai kontaminan dalam dA dalam kondisi digunakan.



2.5.2 Mekanisme Kerja

Deoxyarbutin menunjukkan kemampuan luar biasa untuk menurunkan regulasi sintesis melanin melalui penghambatan tyrosine hydroxylase dan aktivitas DOPA-oxidase dari tirosinase dalam melanosit manusia yang utuh..Analisis umpan balik *Lineweaver-Burk* menunjukkan bahwa inhibitor

tyrosinase yang diuji adalah inhibitor kompetitif. Jenis penghambatan ini menunjukkan bahwa senyawa ini mengikat sebagai analog substrat monofenolik, yaitu di situs yang sama dengan tirosin, hingga bentuk oksitirosinase (Eoxy) . Interaksi ini antara inhibitor dan tirosinase menunjukkan afinitas tinggi sebagaimana tercermin dalam nilai K_i rendah.

dA penghambat potensial tyrosinase, bisa bertindak sebagai substrat enzim. Oxytyrosinase mampu menghidroksilasi deoxyarbutin dan menyelesaikan siklus katalitik dengan mengoksidasi membentuk o-difenol menjadi kuinon, sedangkan enzim menjadi deoksityrosinase, yang berevolusi untuk oxytyrosinase dengan adanya oksigen. Senyawa ini adalah satu-satunya yang dijelaskan tidak melepaskan o-difenol setelah langkah hidroksilasi. Oksitirosinase menghidroksilasi dA dalam posisi orto dari gugus hidroksil fenolik melalui substitusi elektrofilik aromatik. Karena orbital oksigen dan atom tembaga bukan coplanar, tetapi dalam posisi aksial / ekuator, oksidasi / reduksi terpadu tidak dapat terjadi dan terlepas dari atom tembaga untuk mengikat lagi dalam posisi coplanar, memungkinkan oksidasi / reduksi atau pelepasan o-difenol dari situs aktif ke medium. Dalam kasus deoxyarbutin, the o-difenol yang terbentuk ditolak oleh air karena hidrofobisitasnya, sehingga dapat mengikat dengan benar dan dioksidasi menjadi kuinon sebelum dilepaskan. Simulasi dari interaksi β -arbutin, deoxyarbutin dan produk o-difenolnya dengan tyrosinase menunjukkan bagaimana ligan ini mengikat di pusat tembaga

tirosinase. Adanya penghalang energi dalam pelepasan produk o-difenol dari deoxyarbutin, yang tidak ada dalam kasus β -arbutin, bersama dengan perbedaan dalam polaritas dan, akibatnya perbedaan interaksi dengan air membantu memahami perbedaan dalam perilaku kinetik kedua senyawa ini. Oleh karena itu, diusulkan agar pelepasan produk o-difenol dari deoxyarbutin dari situs aktif mungkin lebih lambat daripada dalam kasus β -arbutin, berkontribusi terhadap oksidasi ke kuinon sebelum dilepaskan dari protein ke dalam fase air.

2.5.3 Absorpsi, metabolisme dan Toksikokinetik

a. Absorpsi

Studi penyerapan perkutan manusia in vitro dilakukan di bawah persyaratan pedoman saat ini dan di bawah kondisi GLP menunjukkan bahwa setelah aplikasi dermal dA 3% dalam emulsi standar o / w (160,81 μg deoxyarbutin / cm^2) diterapkan selama 24 jam untuk kulit yang layak dari tiga wanita donor, dA terdeteksi di semua kompartemen yang relevan untuk menilai penyerapan dan penetrasi kulit. Pemulihan mengungkapkan tidak ada indikasi degradasi bahan uji. Ketersediaan kulit yang tinggi dari $58,12 \pm 11,96\%$, sesuai dengan $93,66 \pm 20,15 \mu\text{g dA} / \text{cm}^2$ diamati. Karena beberapa keterbatasan dalam penelitian in vitro (rendahnya jumlah donor), SCCS mempertimbangkan untuk menggunakan rata-rata + 2 SD, yaitu 80,04% atau 134 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ untuk penetrasi kulit dalam penilaian keamanan.

b. Metabolisme

Metabolisme hati dA in vitro, diperiksa dalam hepatosit dari kelinci, tikus, kelinci percobaan dan manusia, terbukti cepat dan lengkap. Glukuronidasi dan sulfonasi ditunjukkan sebagai jalur metabolisme utama. Tidak ada metabolisme HQ atau produk penguraianya yang terdeteksi secara in vitro. Informasi tentang metabolisme hati dA tersedia, sementara data tentang metabolisme di kulit manusia masih kurang. Studi skrining yang tersedia pada penetrasi kulit dan nasib metabolisme dA pada kelinci percobaan menunjukkan penyerapan tinggi dA yang menembus cepat melalui kulit; itu glukuronidasi dan sulfonasi, dan kemudian dengan cepat diekskresikan. dA ditemukan memiliki profil metabolisme yang berbeda dari HQ menunjukkan bahwa HQ tidak dapat dihasilkan di kulit atau secara sistemik setelah aplikasi topikal dA. Ini didukung oleh fakta bahwa dalam studi penetrasi kulit secara in vitro menggunakan kulit manusia, pemulihan tidak menunjukkan indikasi degradasi bahan uji. Informasi dari studi in vivo dengan aplikasi topikal pada marmut menunjukkan metabolisme dA fase II yang luas.

c. Toksisitas

Toksisitas oral dan kulit akut dari dA dapat dianggap rendah. Studi yang dilakukan sesuai dengan pedoman pengujian saat ini di bawah kondisi GLP dengan bahan uji yang ditandai menghasilkan nilai LD50 untuk toksisitas oral dan kulit akut > 2000 mg / kg bb pada tikus. Studi oral sebelumnya pada ,

dermal dan intraperitoneal akut dengan validitas terbatas umumnya mengkonfirmasi toksisitas akut rendah untuk semua rute aplikasi pada spesies yang diuji.

Toksisitas sistemik setelah aplikasi oral berulang pada tikus jantan dan betina selama 28 hari adalah rendah dan efeknya hanya dapat diamati pada tingkat dosis batas yang diterima secara internasional saat ini yaitu 1000 mg / kg bb yang terdiri dari temuan klinis sementara, sedikit konsumsi makanan dan berat badan terbelakang, efek hematologis minor pada wanita dan sedikit penurunan parameter kimia klinis tunggal. Berat hati relatif dari kedua jenis kelamin dan bobot ginjal relatif dari laki-laki meningkat tetapi tanpa korelasi histopatologis. Pada pengamatan fungsional tidak menunjukkan indikasi adanya gangguan neurologis pada tingkat dosis apa pun. The No-Adverse-Effect-Level (NOAEL) untuk toksisitas subakut pada tikus setelah 28 hari pengobatan oral adalah 316 mg / kg bb. Nilai ini dapat dianggap sebagai gambaran terburuk untuk dA karena lingkungan asam lambung akan menyebabkan degradasinya menjadi Hq yang kemudian menyebabkan keracunan yang diamati. Juga mengingat efek rute yang teramati yang diamati dalam tes genotoksisitas in vivo. SCCS menyimpulkan bahwa rute aplikasi oral harus dianggap tidak tepat untuk menyelidiki keamanan dA dalam konteks aplikasi dermalnya, oleh karena itu memilih studi toksisitas kulit subkronik untuk memperoleh NOAEL untuk perhitungan margin keselamatan. Aplikasi

kulit berulang dari deoxyarbutin pada kelinci baik sebagai formulasi krim 3% selama 28 hari atau sebagai 1, 5 dan 40% larutan propilen glikol / etanol selama 91 hari tidak mengarah pada temuan sistemik terkait-zat apa pun hingga tingkat dosis tertinggi yang diselidiki. NOAEL masing-masing untuk toksisitas sistemik pada kelinci adalah 40% dA sesuai dengan sekitar 800 mg / kg bb. Nilai ini akan digunakan untuk penilaian risiko dan perhitungan margin of safety (MoS).

2.5.4 Uji Keamanan

a. Iritasi kulit dan membrane mukosa

Deoxyarbutin tidak menunjukkan potensi korosif pada kulit dalam uji TER in vitro dan terbukti tidak menyebabkan iritasi pada kulit kelinci New Zealand White yang utuh. Dalam tes iritasi mata menggunakan kelinci New Zealand White, iritasi mata sedikit dan sementara, tetapi skor ambang batas untuk klasifikasi sebagai iritasi mata tidak tercapai. Namun, karena kemerahan dan khususnya kemosis diamati selama periode pengamatan, zat uji dianggap sebagai iritasi mata ringan. Formulasi krim standar yang mengandung dA 3% tidak menyebabkan tanda-tanda iritasi mata pada kelinci, tetapi volume rendah formulasi uji (sekitar 10 µl, yaitu 1/10 dari volume yang direkomendasikan dalam OECD TG 405) yang digunakan dalam penelitian ini menghalangi evaluasi potensi iritasi mata dari formulasi tes. Tes patch berulang pada

manusia tidak mengungkapkan potensi iritasi kulit untuk deoxyarbutin pada konsentrasi hingga 6,0%.

b. Sensitasi Kulit

Potensi kepekaan dA diselidiki dalam dua tes kelenjar getah bening lokal murine. Studi yang lebih baru menyelidiki konsentrasi 10% - 50% dan dilakukan sesuai dengan pedoman OECD dan EC yang sebenarnya. Penelitian sebelumnya menyelidiki konsentrasi 3% - 20%, tetapi jumlah hewan dan hari paparan sedikit lebih tinggi serta pengukuran kelenjar getah bening individu digunakan. Tes kelenjar getah bening lokal yang dilakukan menunjukkan bahwa dA adalah perangsang kulit sedang.

c. Efek mutagenik dan genotoksik

Secara keseluruhan, genotoksisitas dA cukup diselidiki dalam tes genotoksisitas yang valid untuk 3 titik akhir genotoksisitas: mutasi gen, penyimpangan kromosom, dan aneuploidi. dA tidak menyebabkan mutasi gen pada bakteri. Pada limfosit manusia, dA menunjukkan potensi clastogenik dengan dan tanpa aktivasi metabolik. Namun, ketika reaksi clastogenik diamati dengan dan tanpa enzim pengaktif metabolik, dan dA diketahui tidak stabil pada nilai pH yang lebih rendah, hidrolisis kimia terhadap hidrokuinon dapat terjadi pada suatu batas tertentu. Kemudian, bukan sebagai dA melainkan produk kimia pemecahannya yaitu Hq, agen klastogenik dan sitotoksik yang dikenal secara in vitro dan in vivo. Hasil in vitro positif pada klastogenisitas

tidak dikonfirmasi dalam dua tes mikronukleus terpisah dengan dA di bawah prosedur aplikasi standar injeksi intraperitoneal. Sebaliknya, tingkat dosis deoxyarbutin yang diaplikasikan secara oral diinduksi mikronukleus dalam eritrosit polikromatik dari sumsum tulang tikus jantan dan betina. Ini diharapkan karena kerusakan kimia dari dA menjadi Hq di lingkungan asam lambung. Dengan demikian, rute aplikasi oral untuk menyelidiki kemungkinan genotoksik atau potensi klastogenik dari dA harus dianggap tidak tepat dalam konteks evaluasi keamanan zat yang diterapkan melalui kulit. Deoxyarbutin tidak menginduksi peningkatan jumlah sel spermatogonial dengan penyimpangan kromosom struktural atau numerik. Namun, karena kurangnya indikasi paparan sel spermatogonial, tes ini memiliki nilai terbatas. Berdasarkan laporan ini, senyawa induk deoxyarbutin dapat dianggap tidak memiliki potensi genotoksik in vivo dan tes tambahan tidak diperlukan. Arbutin dianggap dimetabolisme secara berbeda oleh glikosidase yang berbeda atau dengan hidrolisis spontan, namun semuanya membentuk hidrokuinon (HQ). Yang terakhir dianggap sebagai bagian genotoksik; oleh karena itu pembacaan berdasarkan pelepasan HQ adalah kemungkinan untuk menilai potensi genotoksik arbutin sebagai suatu kelompok.

d. Toksisitas reproduksi

Studi toksisitas perkembangan dan reproduksi belum diajukan. Aplikasi dA oral yang diulang selama 28 hari pada tikus hingga batas dosis 1000

mg / kg bb serta aplikasi kulit berulang pada kelinci hingga 3 bulan dan konsentrasi uji tertinggi 40% (sesuai dengan sekitar 800 mg / kg bb) tidak menyebabkan indikasi gangguan pada organ reproduksi pria atau wanita.

e. Photo-induced toxicity

dA terbukti tidak memiliki fotoiritasi dan tidak memiliki potensi fotoalergi ketika diuji dalam konsentrasi hingga 50% dalam propilen glikol di bawah kondisi penelitian gabungan pada marmot jantan dan betina.

Data pada manusia menunjukkan perlakuan tes patch berulang pada manusia yang independen menunjukkan bahwa deoxyarbutin hingga konsentrasi 6,0% tidak menunjukkan potensi iritasi kulit atau sensitasi pada manusia.

2.6. Alat Ukur Penelitian Chroma Meter

Warna kulit manusia merupakan kombinasi selektif penyerapan dan penghamburan oleh sejumlah panjang gelombang. Beberapa molekul dan partikel utama penyerap cahaya disebut kromofor. Tiga kromofor dominan yang ada di epidermis adalah eumelanin, pheumelanin, dan karotin. Kromofor lain yang terletak pada pembuluh darah dermis yaitu oxyhemoglobin dan bilirubin (Piérard, 1998). Melanin memiliki tingkat absorpsi tidak terbatas terhadap semua spektrum warna. Karoten jarang tampak pada kulit normal dan berwarna kuning. Hemoglobin cukup spesifik dan memiliki absorpsi yang tinggi terhadap spektrum cahaya hijau dan absorpsi rendah terhadap warna

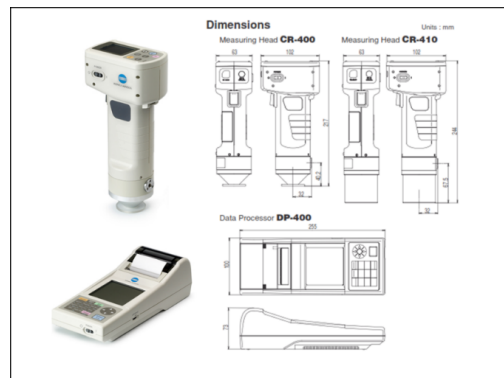
merah. Dengan meningkatnya eritema maka dan semakin banyak cahaya hijau yang diabsorpsi dan sedikit yang dihamburkan. Optik kulit tergantung kromofor pada melanin yang ada di epidermis dan hemoglobin yang terletak lebih dalam di dermis. refleksi pada kulit. Gelombang panjang (warna merah) dapat penetrasi lebih dalam pada kulit sehingga menyebabkan absorpsi yang lebih besar pada jaringan, hal ini menjelaskan mengapa struktur yang lebih dalam seperti pembuluh arteri dan vena berwarna lebih kontras dan tampak kebiruan (Fullerton et al., 1996).

Pengukuran warna kulit adalah yang paling penting bagi para peneliti dan dokter yang terlibat dalam dermatologis serta bidang kosmetik. Pengukuran non-invasif kandungan melanin epidermis diperlukan untuk studi in vivo yang melibatkan depigmentasi kulit dan repigmentasi (Kasraee, 2016). Warna adalah persepsi radiasi elektromagnetik pada kisaran panjang gelombang 400-700 nm yang ditangkap mata dan diteruskan menjadi stimulasi perspektif oleh otak. Warna yang terlihat adalah kombinasi trikromatik merah, biru dan hijau. Hampir semua studi komparatif menunjukkan bahwa mata manusia dapat membedakan warna secara spesifik sama dengan perangkat spesifik. Namun penilaian kuantitatif dan repetitif menjadi reliabel jika pengukuran dibuat secara objektif. Hal ini dapat dilakukan dengan menggunakan alat reflektan tristimulus colorimetry CIE (Commission Internationale de l'Eclairage).

Chromameter (Minolta, Osaka, Japan) adalah instrument tristimulus kalorimetri berdasarkan pemindaian spektrofotometri reflektansi (Kasraee, 2016). Dengan instrumen ini permukaan kulit diterangi oleh lampu busur xenon berdenyut. Cahaya terpantul secara tegak lurus ke permukaan dikumpulkan untuk analisis tristimulus warna pada 450, 560 dan 600 nm, menggunakan warna sistem $L^* a^* b^*$, sebagaimana ditentukan oleh CIE . Secara khusus, sistem $L^* a^* b^*$ sangat mudah dipahami, dengan parameter L^* mengekspresikan kecerahan warna (bervariasi antara a nilai 100 untuk permukaan putih dan 0 untuk permukaan hitam) (Sabancilar et al., 2011). Parameter a^* mewakili perubahan sepanjang sumbu merah hingga hijau dengan perubahan dari + 60 untuk permukaan merah - 60 untuk permukaan hijau. Parameter b^* berubah dari + 60 untuk permukaan kuning hingga - 60 untuk permukaan biru. (Clarys et al., 2000).

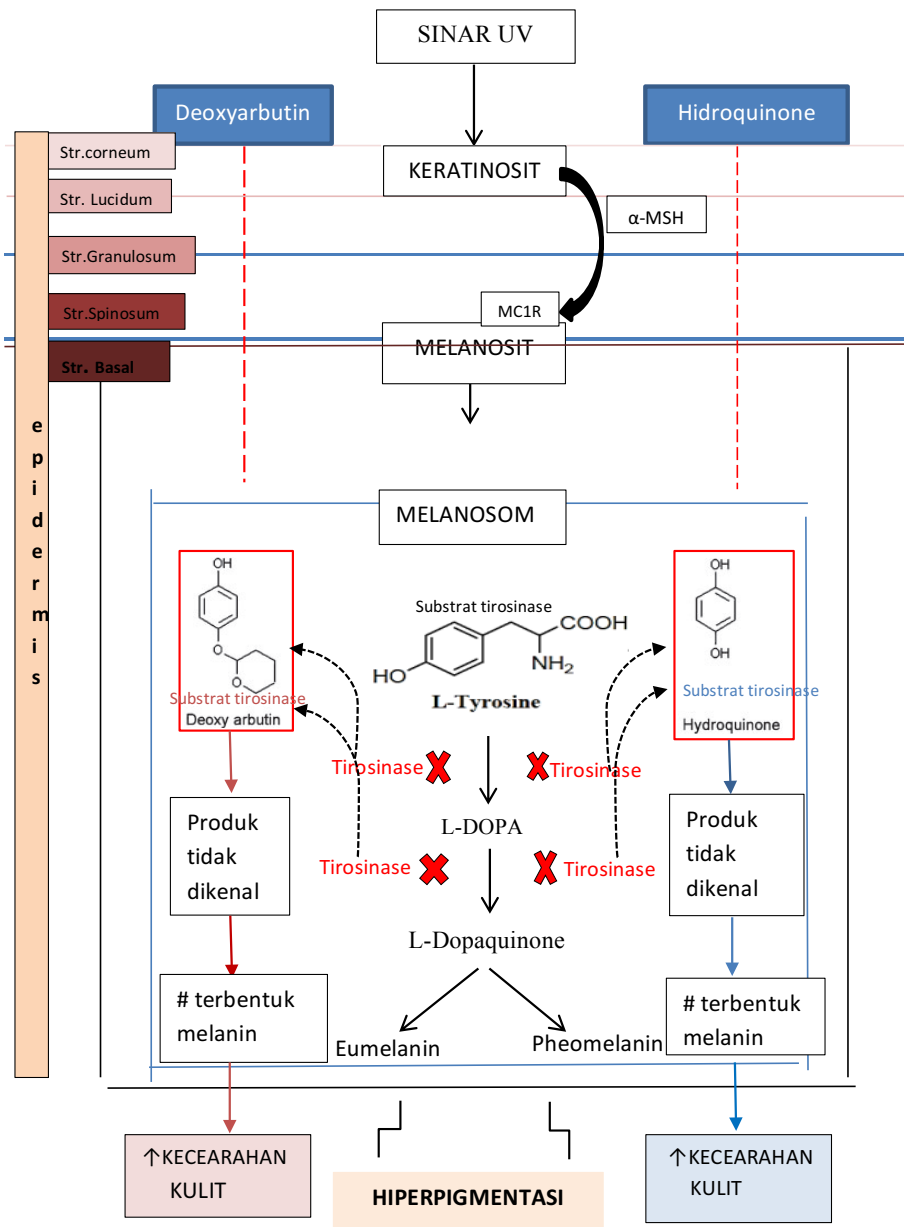
Dengan sistem CIE dapat menilai hubungan antara jumlah kromofor kulit dan perubahan nilai $L^* a^* b^*$ dan indeks eritema dan melanin pada kulit. . Nilai L^* , b^* , atau kombinasi L^* dan b^* adalah parameter yang sesuai untuk evaluasi derajat pigmentasi, jika volume darah kulit konstan pada tiap kali pengujian. Nilai a^* dan indeks eritema merupakan parameter yang baik untuk mengevaluasi derajat eritema atau volume darah kulit. (Takiwaki, 1998). Pengukuran aktifitas agen depigmentasi seperti hidroquinon dan agen untuk menggelapkan warna kulit seperti DHA dapat dilakukan menggunakan

spektometri atau kalorimetri dengan mengukur nilai L^* , b^* , Chroma C^* atau ITA° (*Individual Typology Angle*)(Piérard, 1998)

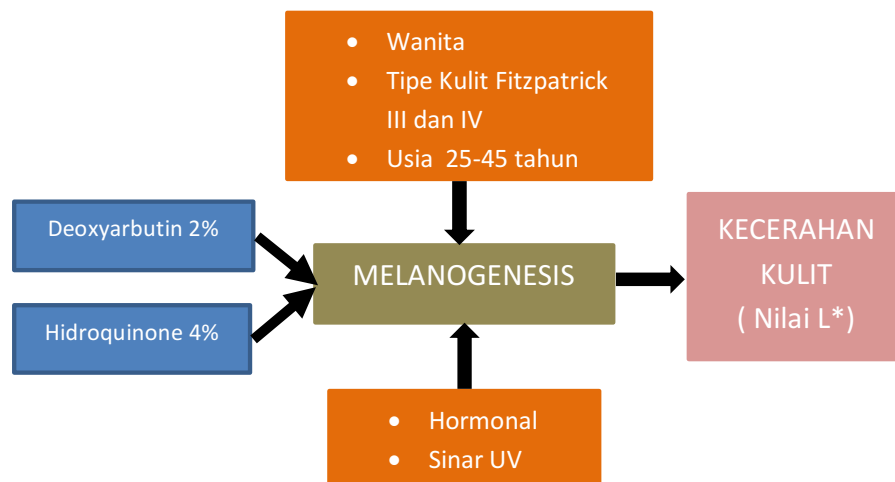


Gambar 11. Konica Minolta Chroma Meter Model CR-400 ®

2.7 Kerangka Teori



2.8 Kerangka Konsep



Keterangan :

	Variabel bebas
	Variabel antara
	Variabel tergantung
	Variabel kendali

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *double-blind, pre- and post-treatment randomized controlled clinical trial*.

3.2 . Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Anamnesis dan pemeriksaan fisik dilakukan di poliklinik Dermatologi dan Venereologi Rumah Sakit Pendidikan UNHAS, Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2019 – Mei 2020. Penelitian dimulai setelah mendapatkan keterangan lolos kaji etik dari Komisi Etik FKUH

3.3 Populasi Penelitian

3.3.1 Populasi Target

Populasi target adalah semua individu wanita sehat yang berusia 25-45 tahun.

3.3.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah semua individu wanita yang berusia lebih dari 25 tahun sampai 45 tahun yang memenuhi kriteria inklusi yang berdomisili di Makassar pada saat masa penelitian.

3.4 Sampel

3.4.1. Cara Pengambilan Sampel

1. Semua individu wanita sehat yang berusia 25 tahun sampai 45 tahun.
2. Subyek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi selanjutnya diberikan intervensi menggunakan dua macam bahan uji.
3. Tidak bisa dilakukan intervensi secara bersamaan (starting point masing-masing subyek berbeda).

Perkiraan jumlah sampel penelitian akan mengacu pada hasil studi preliminari untuk menghitung besar sampel sesungguhnya. Studi preliminari dilakukan untuk menilai standar deviasi yang kemudian akan dirumuskan dalam formula uji hipotesis rerata dua populasi berpasangan (Sastroasmoro and Ismael, 2008).

$$\begin{aligned}\text{Rumus yang digunakan: } n &= \left[\frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta}) \cdot S_d}{d} \right]^2 = \left[\frac{(1,96 + 0,842) \cdot \frac{(1,169 + 0,799)}{2}}{0,838 - 0,389} \right]^2 \\ &= \left[\frac{2,802 \cdot 0,984}{0,449} \right]^2 = 38\end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan rumus tersebut didapatkan jumlah sampel minimal (n) sebanyak 38 sampel.

Keterangan:

N = jumlah sampel

Sd = simpang baku dari rerata selisih (standar deviasi)

d = selisih rerata kedua kelompok yang bermakna

Z_{α} = nilai standar deviasi alfa (1.96) untuk $\alpha = 0.05$

Z_{β} = nilai standar deviasi beta (0.842) untuk power 80%

3.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

3.5.1 Kriteria Inklusi

Subyek wanita yang berkunjung ke Poliklinik Dermatologi dan Venereologi Rumah Sakit Pendidikan UNHAS, Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo dengan:

1. Subyek wanita dengan tipe kulit Fitzpatrick III dan IV
1. Wanita berusia 25 tahun sampai dengan 45 tahun
2. Bersedia menjadi subyek penelitian dan menandatangani *informed consent*.
3. Waktu bekerja terbanyak didalam ruangan.
4. Selalu menggunakan lengan panjang ketika berada di luar ruangan.

3.5.2 Kriteria Eksklusi

Pasien dengan:

1. Riwayat adanya kanker kulit pada diri subyek atau keluarganya, terutama melanoma
2. Riwayat penggunaan suplemen apapun yang mengandung hidroquinon, deoxyarbutin dan atau suplemen antioksidan lain dalam waktu 1 bulan sebelum mulai penelitian
3. Hamil atau menyusui.
4. Memakai kontrasepsi hormonal.
5. Memakai bahan pencerah kulit topikal lainnya dalam waktu 1 bulan sebelum penelitian.
6. Adanya dermatosis lain
7. Riwayat penyakit jantung, DM dan anemia
8. Riwayat alergi obat atau kelainan kulit akibat efek samping terapi oral
9. Riwayat alergi terhadap bahan-bahan yang akan diujikan.

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1 Persiapan

Peneliti diberi izin untuk melaksanakan penelitian oleh Bagian Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Rancangan penelitian diajukan ke Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin untuk mendapatkan persetujuan (ethical clearance). *Informed*

consent akan diberikan pada subyek yang hanya akan dilaksanakan bila telah diperoleh izin tertulis dari subyek.

3.6.2. Penjelasan dan Penandatanganan Informed Consent

Subyek penelitian diberi penjelasan mengenai penelitian yang akan dilakukan, bila bersedia ikut dalam penelitian, maka diminta untuk menandatangani informed consent. Pada penelitian ini dilakukan anamnesis, pemeriksaan fisis, status dermatologis, pengukuran menggunakan *chroma meter*, dan dokumentasi menggunakan fotografi medik.

3.6.3. Teknik Pelaksanaan

a. Pemilihan subjek penelitian :

- Anamnesis: identitas subyek (nama, umur) riwayat pemakaian tabir surya, aktivitas sehari-hari dan durasi terpapar matahari setiap hari, riwayat penggunaan kontrasepsi hormonal. Riwayat penyakit (epilepsi, keganasan, dermatitis kontak karena kosmetika, jantung, anemia dan DM), riwayat penyakit kulit lainnya, riwayat penyakit keluarga.
- Pemeriksaan fisis meliputi: tanda-tanda vital, status generalis, status dermatologis dan tipe kulit Fitzpatrick.

- b. Seleksi subyek penelitian, yaitu dipilih dari subyek yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dengan anamnesis dan pemeriksaan fisis.
- c. Subyek penelitian diberikan penjelasan dan diminta kesediaannya secara sukarela untuk terlibat dalam penelitian dan menandatangani *informed consent*.
- d. Dilakukan pengukuran kecerahan kulit awal menggunakan alat *chroma meter*.
- e. Kemudian subyek dijelaskan dan diajarkan cara pengolesan serum yang berbeda pada volar tangan kanan dan tangan kiri. Setiap serum yang diujikan diambil sebanyak 2 tetes kemudian dioleskan pada bagian volar lengan bawah kanan (serum A) dan kiri (serum B) setiap malam sebelum tidur selama 12 minggu. Untuk memastikan tempat pengolesan serum sama setiap kali pengolesan, dibuat patron khusus. Patron dibuat berbentuk kotak dengan ukuran 4 x 4 cm.
- f. Serum deoxyarbutin 2% dan serum hydroquinone 4% ditempatkan dalam container yang identik, kemudian diberi kode serum A dan B. Peneliti dan subjek tidak mengetahui isi container. Perubahan klinis kemudian diikuti selama 12 minggu ke depan oleh peneliti. Setelah penelitian selesai, kode A dan B kemudian diinformasikan pada peneliti mengenai kandungannya.

g. Subyek penelitian dievaluasi selama 12 minggu dengan jumlah kunjungan setiap 2 minggu (T0, T14, T28, T32, T46, T70, T84). Pada setiap kali kunjungan, dilakukan pengamatan klinis evaluasi terapi, pengukuran dengan *chroma meter*. dan mencatat hasil evaluasi terapi dan hasil pengukuran serta efek samping yang ditimbulkan, kemudian membuat foto dokumentasi bagian yang dioleskan serum yaitu bagian volar lengan bawah kiri dan kanan dengan menggunakan kamera digital merk canon 16,1 megapixel, penerangan biasa, jarak 20 cm dan latar belakang hitam.

3.6.4. Prosedur Pengukuran menggunakan Chroma Meter

Chroma Meter adalah perangkat tristimulus yang ringan, portabel dan untuk pengukuran warna oleh perangkat ini dapat dilakukan secara langsung dengan mengukur refleksi dan perbedaan warna. Pengukuran Chroma Meter terhadap warna kulit didasarkan pada sistem warna L^* , a^* , dan b^* . Dalam penelitian ini, parameter L^* yang digunakan untuk menilai kegelapan/kecerahan (luminance). Suatu studi menyebutkan bahwa L^* merupakan parameter yang paling sensitif untuk menentukan perbedaan pigmentasi pada penilaian kecerahan kulit, terutama pada tipe kulit Fitzpatrick III dan IV seperti pada penelitian ini. (Lee et al., 2008) Chroma Meter digunakan untuk mengukur kecerahan kulit (L^*) pada hari 0,14, dan 32,46,70,84 untuk menilai perubahan kecerahan kulit secara obyektif.

3.6.5 Bahan Penelitian

Bahan penelitian dalam sediaan serum diperoleh dari *LW Synergy Lab*, terdiri dari :

Bahan aktif :

Serum A : deoxyarbutin konsentrasi 2%

Serum B : hydroquinone konsentrasi 4%

Vehikulum : *Hydroxyethylcellulose (HEC), Glycerin, butyleneglycol*

3.7 Identifikasi Variabel

Identifikasi variable terdiri dari Variabel kendali, variabel bebas, variabel antara, dan variabel tergantung.

Variabel bebas	:	serum hydroquinone 4%, serum deoxyarbutin 2%
Variabel antara	:	melanogenesis
Variabel kendali	:	wanita, tipe kulit Fitzpatrick III dan IV, usia 25-45 tahun, hormonal, sinar UV
Variabel tergantung	:	kecerahan kuli

3.8. Definisi Operasional

1. Efektivitas adalah hubungan antara *output* dan tujuan dimana efektivitas diukur dari sejauh mana tingkat *output* . Dalam penelitian ini *output* tersebut dinilai secara kualitatif dengan pengamatan langsung dan melalui dokumentasi fotografi. *Output* kuantitatif diukur menggunakan alat Konika Minolta Chroma

Meter CR-400 ®, merupakan perangkat terstimulus yang ringan, portabel dan untuk pengukuran warna secara objektif. Kami menetapkan 4 kategori peningkatan kecerahan warna kulit (Fitzpatrick, 2013):

- Minimal to no improvement (<25%)
- Moderate improvement (26-50%)
- Clinical improvement (51-75%)
- Excellent improvement (76-100%)

2. Deoxyarbutin (4-(tetrahydro-2H-pyran-2yl)oxy)phenol,D-Arb) merupakan derivat glukosida dari Hidroquinone (HQ), menunjukkan kemampuan luar biasa untuk menurunkan regulasi sintesis melanin melalui penghambatan tyrosine hydroxylase dan aktivitas DOPA-oxidase dari tirosinase dalam melanosit manusia yang utuh.
3. Hidrokuinon (1,4 dihydroxybenzene): suatu senyawa hidrosifenolik yang menghambat konversi DOPA menjadi melanin dengan menghambat enzim tirosinase.
5. Tipe kulit Fitzpatrick III dan IV : Pengklasifikasian tipe kulit sistem Fitzpatrick, berdasarkan reaksi kulit terhadap matahari. Tipe IV memiliki ciri reaksi jarang terbakar dan selalu menjadi lebih coklat jika terpapar matahari sedangkan tipe III sedikit lebih mudah terbakar dibandingkan tipe IV

kemudian bertahap menjadi coklat terang. Diukur berdasarkan formula ITA (Individual Typology Angle) dari pemeriksaan *Croma meter*.

6. Efek samping: adalah terjadinya semua reaksi yang tidak diinginkan selama pemberian serum deoxyarbutin 2% atau hidroquinon 4%.
7. *Drop out*: adalah subyek penelitian yang tidak datang sesuai dengan jadwal yang diberikan, dengan batas waktu maksimum 3 hari sejak tanggal yang ditentukan.
8. *Complete trial*: adalah subyek penelitian yang menyelesaikan seluruh jadwal penelitian yang ditentukan.
9. *Discontinued trial*: adalah subyek penelitian yang mengalami efek samping moderat hingga berat selama masa penelitian sehingga subyek penelitian dan peneliti memutuskan untuk menghentikan penelitian dan mengobati efek samping atau berada dalam kondisi yang memenuhi kriteria eksklusi.

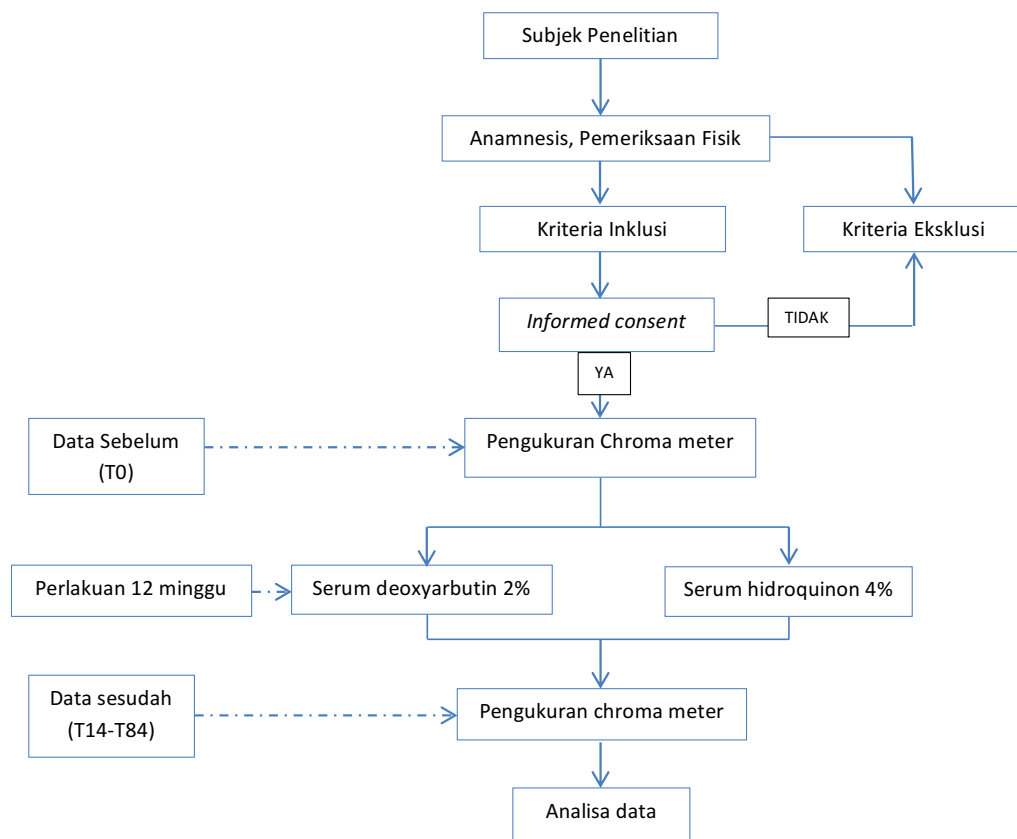
3.9 Pengolahan dan Analisis Data

Semua data yang terkumpul akan dianalisis dengan menggunakan program SPSS versi 22.. untuk menilai perubahan skor berdasarkan waktu pengukuran pada setiap kelompok serum, digunakan Uji T berpasangan. Untuk menilai perbedaan antara kedua kelompok serum digunakan uji t independent. Hasil uji statistik signifikan jika nilai $p < 0,05$.

3.10. Izin Penelitian dan Kelayakan Etik (Ethical Clearance)

Pemberian informasi dan permintaan izin (informed consent) dari subyek atau keluarganya untuk dimasukkan untuk dimasukkan dalam penelitian ini, serta persetujuan kelayakan etik penelitian dari Komisi Etik Penelitian Biomedis pada Manusia Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dilakukan dalam penelitian ini.

3.11. Alur Penelitian



BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Karakteristik Subjek Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui efektivitas serum deoxyarbutin 2% sebagai agen pencerah kulit dibandingkan dengan serum hydroquinone 4% sebagai kontrol positif yang merupakan standar pengobatan lesi hiperpigmentasi. Pada penelitian ini kedua macam serum diberikan pada subjek yang sama dimana kedua jenis serum yang diujikan disamarkan dengan kode A (CT01 R) dan kode B.(CT01 L). Setiap subjek mengoleskan serum A pada volar kanan dan serum B pada volar kiri. Pada akhir penelitian data yang terkumpul dilaporkan kepada pihak farmasi (WLW syn) untuk dibuka kode dari masing-masing serum, dan diketahui bahwa kode serum A(CT01 R) adalah deoxyarbutin 2% dan serum B(CT01 L) adalah hydroquinone 4%.

Subjek penelitian berjumlah 64 subjek wanita yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi serta menandatangani *inform consent* sebelum mengikuti penelitian. Selama masa penelitian terdapat 4 orang subjek yang *drop out* dan 1 orang subjek *discontinued trial* dikarenakan hamil. Sehingga jumlah total subjek penelitian yang menyelesaikan penelitian adalah 59 subjek. Dari 59 subjek terdapat dua kelompok usia yaitu 25-35 tahun sebanyak 40 (67.8%)

subjek dan usia 36-45 tahun sebanyak 19 (32.2%) subjek. Berdasarkan tipe kulit dibagi dua kelompok yaitu tipe kulit Fitzpatrick III sebanyak 25 (42.4%) subjek dan tipe kulit Fitzpatrick IV sebanyak 34 (57.6%) subjek. Ringkasan dari karakteristik subjek penelitian dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Subjek

(n = 59)

Karakteristik		n	%
Umur*	25-35 tahun	40	67.8%
	36-45 tahun	19	32.2%
Tipe Kulit Fitzpatrick	III	25	42.4%
	IV	34	57.6%

*Rentang Umur 25-45 tahun ; Rerata : 31 tahun

4.2. Efektivitas serum deoxyarbutine 2% dan serum hydroquinone 4% terhadap perubahan nilai kecerahan kulit

Untuk mengetahui efektivitas serum deoxyarbutin 2% dan serum hydroquinone 4% terhadap perubahan kecerahan kulit dilakukan dengan cara membandingkan nilai kecerahan kulit sebelum dan sesudah perlakuan (pengolesan serum). Pemeriksaan warna kulit dilakukan saat kunjungan pertama, dan selanjutnya setiap 2 minggu hingga minggu ke-12 untuk menilai perubahan warna kulit, dengan menggunakan alat Konica Minolta Chroma

Meter Model CR-400. Pengukuran terhadap warna kulit didasarkan pada sistem warna L*, a*, dan b*. Dalam sistem ini, kecerahan kulit ditunjukkan oleh parameter L*.

4.2.1. Efek serum deoxyarbutin 2% terhadap perubahan nilai kecerahan kulit (L*)

Untuk menilai efek serum deoxyarbutin 2% terhadap perubahan kecerahan kulit (Nilai L*) sebelum dan sesudah pengolesan serum pada setiap waktu observasi dilakukan uji one way anova uji t berpasangan. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel 2.

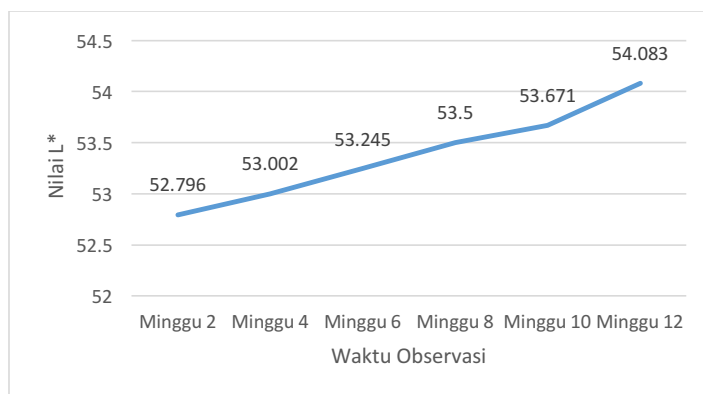
Tabel 2. Perubahan nilai kecerahan kulit (L*) pada kelompok serum deoxyarbutin 2%

Waktu Observasi	L*		L*		Perubaha n nilai L*	Nilai p
	Sebelum		Sesudah			
	Mean	SD	Mean	SD		
Minggu 2	52.407	3.411	52.796	3.265	0.389	0.000
Minggu 4	52.407	3.411	53.002	3.293	0.595	0.000
Minggu 6	52.407	3.411	53.245	3.304	0.838	0.000
Minggu 8	52.407	3.411	53.500	3.101	1.093	0.000
Minggu 10	52.407	3.411	53.671	3.103	1.264	0.000

Minggu 12	52.407	3.411	54.083	3.110	1.676	0.000
------------------	--------	-------	--------	-------	-------	-------

Dari tabel di atas terlihat bahwa rerata nilai kecerahan kulit (L^*) sebelum pengolesan serum adalah 52.407 (± 3.411) dan mengalami perubahan bermakna pada minggu ke-2 dengan rerata nilai L^* 52.796 (± 3.265) dengan nilai p 0.000 ($p < 0.05$). Nilai kecerahan kulit semakin berubah secara bermakna pada setiap waktu observasi dibandingkan sebelum pengolesan serum, dengan perubahan tertinggi pada minggu ke-12, nilai L^* 54.083 (± 3.110), nilai $p = 0.000$ ($p < 0.05$).

Grafik 1. Perubahan nilai L^* pada serum deoxyarbutin 2%



4.2.2. Efek serum hydroquinone 4% terhadap perubahan nilai kecerahan kulit (L*)

Untuk menilai efek serum hydroquinone 4% terhadap perubahan nilai kecerahan kulit (L*) sebelum dan sesudah pengolesan serum pada setiap waktu observasi dilakukan uji one way anova uji t berpasangan. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel 3.

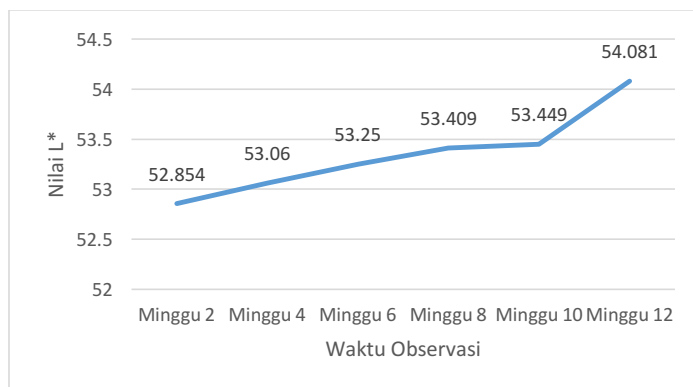
Tabel 3. Perubahan nilai kecerahan kulit (L*) pada kelompok serum Hydroquinone 4%

Waktu Observasi	L* Sebelum		L* Sesudah		Perubahan Nilai L*	Nilai p
	Mean	SD	Mean	SD		
Minggu 2	52.579	3.531	52.854	3.421	0.275	0.018
Minggu 4	52.579	3.531	53.060	3.335	0.481	0.003
Minggu 6	52.579	3.531	53.250	3.407	0.671	0.000
Minggu 8	52.579	3.531	53.409	3.354	0.830	0.000
Minggu 10	52.579	3.531	53.449	3.380	0.870	0.000
Minggu 12	52.579	3.531	54.081	3.396	1.501	0.000

Dari tabel di atas terlihat bahwa rerata nilai kecerahan kulit (L*) sebelum pengolesan serum adalah 52.579($\pm$ 3.531) dan mengalami perubahan bermakna pada minggu ke-2 dengan rerata nilai L* 52.854 ($\pm$ 3.421) dengan

nilai $p = 0.018$ ($p < 0.05$). Nilai kecerahan kulit semakin berubah secara bermakna pada setiap waktu observasi dibandingkan sebelum pengolesan serum, dengan perubahan tertinggi pada minggu ke-12, nilai $L^* 54.081 (\pm 3.396)$, nilai $p = 0.000$ ($p < 0.05$).

Grafik 2. Perubahan nilai L^* pada serum hydroquinone 4%



4.3. Perbandingan efektivitas serum deoxyarbutin 2% dan serum hydroquinone 4% terhadap perubahan kecerahan kulit

Dari ulasan sebelumnya dapat disimpulkan bahwa kedua macam serum yang diujikan memiliki efek meningkatkan kecarahan kulit yang signifikan pada setiap waktu observasi. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan efektivitas antara serum deoxyarbutin 2% dan serum hydroquinone 4% terhadap perubahan kecerahan kulit (ΔL^*) dilakukan uji komparatif *T test independent* pada data dengan distribusi normal dan non parametrik *mann-*

whitney test pada data dengan distribusi tidak normal . Hasil analisis perbandingan dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4.Perbandingan nilai perubahan kecerahan kulit (ΔL^*) antara serum Deoxyarbutine 2% dan serum Hydroquinone 4%

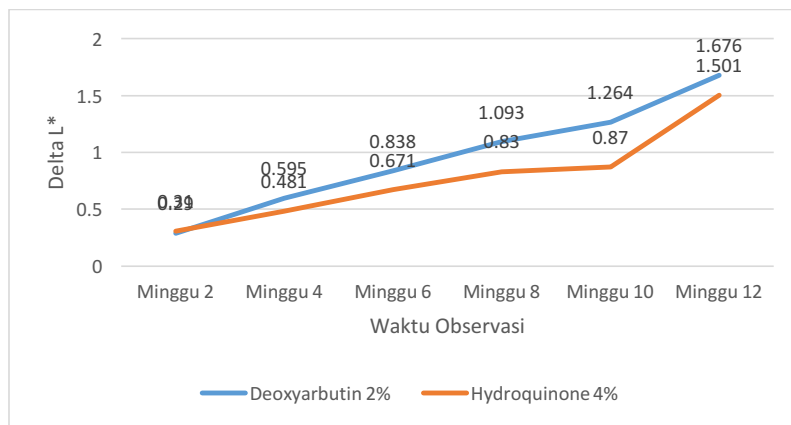
Waktu Observasi	Serum Deoxyarbutin2%			Serum Hydroquinone 4%			Nilai p
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD	
Minggu 2	0.389	0.290	0.799	0.275	0.310	0.863	0.640**
Minggu 4	0.595	0.640	1.232	0.481	0.420	1.185	0.610*
Minggu 6	0.838	0.790	1.169	0.671	0.690	1.320	0.468*
Minggu 8	1.093	0.99	1.353	0.830	0.69	1.274	0.281*
Minggu 10	1.264	1.170	1.394	0.870	0.860	1.250	0.109*
Minggu 12	1.676	1.640	1.365	1.501	1.320	1.296	0.478*

*T test independent

**Mann whitney test

Dari tabel di atas terlihat tidak ada perbedaan signifikan antara nilai (ΔL^*) dua kelompok dengan nilai $p > 0.05$ yang ditemukan pada setiap waktu observasi dari minggu ke-2 sampai minggu ke-12. Maka dapat disimpulkan bahwa efektivitas kedua serum yang diujikan adalah sama dalam meningkatkan kecerahan kulit pada setiap waktu observasi.

Grafik 3. Perbandingan delta L* serum deoxyarbutin 2% dan serum hydroquinone 4%



4.4. Efek samping penggunaan serum deoxyarbutin 2% dan serum hydroquinone 4%

Selama periode penelitian dilakukan pengamatan terhadap keluhan yang dirasakan setelah pengaplikasian serum. Pengamatan dilakukan secara berkala setiap dua minggu pada saat kunjungan. Tidak ada subjek yang merasakan keluhan iritasi, gatal ataupun muncul bintik hitam baik pada serum deoxyarbutin 2% maupun serum hydroquinone 4%.

BAB V

PEMBAHASAN

Total sampel penelitian ini berjumlah 59 subjek wanita dewasa usia 25-45 tahun. Rentang usia ini dipilih untuk mempermudah penjangkauan subjek dan observasi penelitian. Berdasarkan katagori usia yang dikeluarkan oleh Depkes RI 2009, usia dewasa awal memiliki rentang 26-35 tahun sedangkan usia dewasa akhir memiliki rentang 36-45 tahun (Al Amin, 2017). Berdasarkan data survei tenaga kerja menunjukkan usia dengan mobilitas yang paling tinggi berada pada rentang 25-49 tahun (Novi R, 2018).

Skala warna kulit Fitzpatrick (FP) tipe I-VI merupakan skala klinis yang paling bermanfaat dalam menilai sensitivitas terhadap radiasi ultraviolet, dengan tipe kulit angka yang semakin rendah lebih rentan terhadap sengatan matahari dan memiliki risiko kanker kulit yang lebih tinggi (Fitzpatrick, 1988, Del Bino and Bernerd, 2013). Pada tipe kulit rendah sangat mudah terbakar dan tidak menjadi kecoklatan jika terkena sinar matahari, sebaliknya tipe kulit yang semakin tinggi semakin jarang terbakar dan sangat mudah menjadi coklat jika terkena sinar matahari (Choe et al., 2006). Penelitian ini dilakukan pada 59 subjek wanita dengan kulit FP tipe III dan IV, yang merupakan mayoritas warna kulit orang Indonesia (Wisnubrata, 2019). Pada FP tipe III dan IV sangat

jarang menimbulkan efek terbakar setelah terpapar sinar ultraviolet namun warna kulit bertahap berubah menjadi coklat sedangkan pada FP IV setelah paparan ultraviolet kulit cepat berubah menjadi coklat tua.

Dari hasil penelitian ini pada kelompok serum deoxyarbutin 2% didapatkan nilai rerata kecerahan kulit (L^*) sebelum perlakuan adalah 52.407 (nilai baseline) dan terdapat peningkatan nilai kecarahan kulit (L^*) bermakna setelah penggunaan serum deoxyarbutin 2% selama 12 minggu dengan nilai L^* 54.083 ($p=0.00$) . Hasil penelitian ini sejalan penelitian yang dilakukan *Hamed et al.* dimana deoxyarbutin terbukti meningkatkan kecerahan kulit yang lebih signifikan dibandingkan HQ (Mov, 2008). Meskipun belum pernah dilakukan penelitian pada manusia menggunakan dosis deoxyarbutin 2% namun *Bossy et al* telah melakukan uji respon dosis deoxyarbutin dengan berbagai persentase (0.1%, 0.3%, 1%, 3%) pada studi hewan dan menemukan efek yang bermakna pada dosis 1 dan 3% (Boissy et al.,2005).

Deoxyarbutin pertama kali disintesis pada studi yang dilakukan oleh *Boissy et al* pada tahun 2005, (boissy 2005) merupakan inhibitor kompetitif tirosinase yang efektif, menyebabkan penurunan kandungan melanin dalam melanosit. Pada studi invitro deoxyarbutin terbukti memiliki efektivitas inhibisi enzim tirosinase dengan K_i (inhibitor constanta) 10 kali lebih rendah dibanding HQ dan 350 kali lebih rendah dibandingkan arbutin (Boissy et al.,2005). Deoxyarbutin secara reversibel mengurangi aktifitas enzim tirosinase dan

melanin pada studi invitro pada tiga sel kulit manusia normal (melanosit, keratinosit dan fibroblas) (Mov, 2006).

Pada kelompok serum hydroquinone 4 % didapatkan nilai rerata kecerahan kulit (L^*) sebelum perlakuan adalah 52.579 (nilai baseline) dan terdapat peningkatan nilai kecerahan kulit (L^*) bermakna setelah penggunaan serum hydroquinone 4% selama 12 minggu dengan nilai $L^*54.081$ ($p=0.00$). Hal ini sesuai dengan literatur yang ada bahwa hidroquinone merupakan gold standar pengobatan lesi hiperpigmentasi (Decaprio, 1998).

Perbandingan efektivitas antara serum deoxyarbutin 2% dan serum hydroquinone 4% adalah sama dalam meningkatkan kecerahan kulit. Meskipun demikian penelitian sebelumnya dengan konsentrasi deoxyarbutin 3% menunjukkan peningkatan kecerahan kulit yang lebih baik dibandingkan hydroquinone 4%. Penelitian tersebut dilakukan oleh *hamid et al* dimana pada penelitian tersebut sebanyak 25 subjek diinduksi dengan paparan UV dengan *tanning bed* pada 3 lokasi di area punggung hingga terjadi *tanning*. Kemudian masing-masing diaplikasikan deoxyarbutin 3%, hydroquinone 4% dan tanpa perlakuan. Tampak penggunaan deoxyarbutin dengan konsentrasi 3% memiliki efek peningkatan kecerahan kulit yang lebih baik dibandingkan dengan aplikasi hydroquinone 4%. Hal ini mendukung bahwa deoxyarbutin memiliki efek lebih cepat memudarkan efek penggelapan kulit akibat paparan UV dibandingkan dengan hydroquinone yang sebaliknya menghambat respon ini (Mov, 2006).

Penelitian pada hewan dengan aplikasi topikal deoxyarbutin 3% pada lokasi yang sebelumnya dipaparkan dengan sinar UV menunjukkan peningkatan kecerahan kulit yang lebih baik dibandingkan dengan hydroquinone 4%. Namun penelitian yang dilakukan oleh *Boissy et al* memberikan hasil yang agak berbeda dimana deoxyarbutin dengan konsentrasi 3% kurang memberikan respon yang bermakna terhadap perubahan kecerahan kulit pada grup berkulit gelap dibandingkan grup kaukasian. Hal ini diduga karena deoxyarbutin kurang memiliki efek untuk meningkatkan kecerahan kulit alami dan mungkin lebih efektif jika digunakan pada musim panas atau menghambat efek *tanning* akibat paparan sinar matahari (Boissy et al, 2005). Pada penelitian ini diduga dosis yang lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya dan lokasi pengolesan pada area tertutup tanpa adanya induksi sinar UV menyebabkan deoxyarbutin kurang memberikan hasil maksimal, meskipun masih memiliki efektivitas yang sama dibandingkan dengan hydroquinone.

Pada penelitian ini tidak ditemukan efek samping baik pada kelompok serum deoxyarbutin 2% dan kelompok serum hydroquinone 4%. HQ menyebabkan exogen ochronosis dan menyebabkan leucoderma permanen atau jaringan parut dengan penggunaan jangka panjang. Selain itu, penelitian pada hewan dan penelitian sel in vitro menunjukkan bahwa HQ kemungkinan karsinogenik mungkin terkait dengan metabolit benzene. Berbeda dengan HQ, dalam literatur pada uji patch test berulang dengan konsentrasi deoxyarbutin

sampai 6% tidak menimbulkan iritasi dan sensitasi pada manusia. HQ terbukti menginduksi jumlah radikal bebas hidroksil sedangkan D-Arb menunjukkan aktivitas pembersihan radikal hidroksil sedang, yang berarti bahwa senyawa dapat digunakan sebagai agen pencerah kulit dan antioksidan dengan sitotoksitas yang lebih rendah (Garcia-Jimenez et al., 2017).

Peningkatan kecerahan kulit yang signifikan secara statistik berkorelasi dengan perubahan biologik (*biologic significancy*) berupa tampilan kulit yang lebih cerah pada area yang diteliti. Hal ini membuktikan bahwa deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4% merupakan agen pencerah kulit yang efektif. Namun deoxyarbutin 2% memiliki keunggulan karena dinyatakan lebih aman dibandingkan hydroquinone 4%.

BAB VI

PENUTUP

6.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Serum deoxyarbutin 2% terbukti meningkatkan kecerahan kulit secara bermakna sejak minggu ke-2 setelah perlakuan sampai minggu ke-12
2. Serum hydroquinone 4% terbukti meningkatkan kecerahan kulit secara bermakna sejak minggu ke-2 setelah perlakuan sampai minggu ke-12
3. Efek serum deoxyarbutin 2% tidak lebih inferior dibandingkan serum hydroquinone 4% dalam meningkatkan kecerahan kulit sejak minggu ke-2 perlakuan sampai minggu ke-12.

6.2. Saran

1. Dibutuhkan penelitian lanjutan dengan dosis dan lama penelitian yang berbeda
2. Untuk penelitian selanjutnya lokasi pengolesan serum sebaiknya dilakukan pada area yang terpapar sinar matahari.

DAFTAR PUSTAKA

- AL AMIN, M. J. M. 2017. Klasifikasi Kelompok Umur Manusia Berdasarkan Analisis Dimensifraktal Box Counting Dari Citra Wajah Dengan Deteksi Tepi Canny. 2.
- ANDERSEN, F. A., BERGFELD, W. F., BELSITO, D. V., HILL, R. A., KLAASSEN, C. D., LIEBLER, D. C., MARKS, J. G., SHANK, R. C., SLAGA, T. J. & SNYDER, P. W. 2010. Final amended safety assessment of hydroquinone as used in cosmetics. *International journal of toxicology*, 29, 274S-287S.
- BAUMANN, L. 2009. Cosmetic Dermatology PRINCIPLES AND PRACTICE. In: SOGOL SAGHARI, E. W. (ed.) second ed. new york: Mcgraw -Hill Medical.
- BOISSY, R. E. 2003. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. *Experimental dermatology*, 12, 5-12.
- BOISSY, R. E., VISSCHER, M. & DELONG, M. A. 2005a. DeoxyArbutin: a novel reversible tyrosinase inhibitor with effective in vivo skin lightening potency. *Experimental dermatology*, 14, 601-608.
- BUCKS, D. A., MCMASTER, J. R., GUY, R. H. & MAIBACH, H. I. 1988. Percutaneous absorption of hydroquinone in humans: Effect of 1-dodecylazacycloheptan-2-one (azone) and the 2-ethylhexyl ester of 4-

- (dimethylamino) benzoic acid (escalol 507). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 24, 279-289.
- CHARLÍN, R., BARCAUI, C. B., KAC, B. K., SOARES, D. B., RABELLO-FONSECA, R. & AZULAY-ABULAFIA, L. 2008. Hydroquinone-induced exogenous ochronosis: a report of four cases and usefulness of dermoscopy. *International journal of dermatology*, 47, 19-23.
- CHAWLA, S., DELONG, M., VISSCHER, M., WICKETT, R., MANGA, P. & BOISSY, R. 2008. Mechanism of tyrosinase inhibition by deoxyArbutin and its second-generation derivatives. *British Journal of Dermatology*, 159, 1267-1274.
- CHOE, Y., JANG, S., JO, S. J., AHN, K., YOUN, J. I. J. S. R. & TECHNOLOGY 2006. The difference between the constitutive and facultative skin color does not reflect skin phototype in Asian skin. 12, 68-72.
- CICHOREK, M., WACHULSKA, M., STASIEWICZ, A. & TYMIŃSKA, A. 2013. Skin melanocytes: biology and development. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 30, 30.
- CLARYS, P., ALEWAETERS, K., LAMBRECHT, R. & BAREL, A. 2000. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter®, the DermaSpectrometer® and the Mexameter®. *Skin research and technology*, 6, 230-238.

- COSTIN, G.-E. & HEARING, V. J. 2007. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB journal*, 21, 976-994.
- COUTEAU, C. & COIFFARD, L. 2016. Overview of skin whitening agents: Drugs and cosmetic products. *Cosmetics*, 3, 27.
- DECAPRIO, A. P. 1999. The toxicology of hydroquinone—relevance to occupational and environmental exposure. *Critical reviews in toxicology*, 29, 283-330.
- DEL BINO, S. & BERNERD, F. J. B. J. O. D. 2013. Variations in skin colour and the biological consequences of ultraviolet radiation exposure. 169, 33-40.
- DESMEDT, B., COURSELLE, P., DE BEER, J., ROGIERS, V., GROSBER, M., DECONINCK, E. & DE PAEPE, K. 2016. Overview of skin whitening agents with an insight into the illegal cosmetic market in Europe. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30, 943-950.
- FITZPATRICK, T. B. J. A. O. D. 1988. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. 124, 869-871.
- FULLERTON, A., FISCHER, T., LAHTI, A., WILHELM, K. P., TAKIWAKI, H. & SERUP, J. 1996. Guidelines for measurement skin colour and erythema

- A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact dermatitis*, 35, 1-10.
- GILCHREST, B. A., PARK, H. Y., ELLER, M. S. & YAAR, M. 1996. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochemistry and photobiology*, 63, 1-10.
- GILLBRO, J. & OLSSON, M. 2011. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents—existing and new approaches. *International journal of cosmetic science*, 33, 210-221.
- HU, Z.-M., ZHOU, Q., LEI, T.-C., DING, S.-F. & XU, S.-Z. 2009. Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: Biosafety as skin whitening agents. *Journal of dermatological science*, 55, 179-184.
- KARAMAGI, C., OWINO, E. & KATABIRA, E. 2001. Hydroquinone neuropathy following use of skin bleaching creams: case report. *East African medical journal*, 78, 223-224.
- KASRAEE, B. 2016. The measurement of skin color. *Agache's Measuring the Skin*, 1-6.
- LEVIN, C. Y. & MAIBACH, H. 2001. Exogenous ochronosis. *American journal of clinical dermatology*, 2, 213-217.

- LEVITT, J. 2007. The safety of hydroquinone: a dermatologist's response to the 2006 Federal Register. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57, 854-872.
- LIN, J. Y. & FISHER, D. E. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445, 843.
- LOWELL A. GOLDSMITH, M., MPH, STEPHEN I. KATZ, M., PHD, BARBARA A. GILCHREST, M., AMY S. PALLER, M., DAVID J. LEFFELL, M. & KLAUS WOLFF, M., FRCP 2012. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. *In*: KAVITHA K. REDDY, Y. M. L. & KATHERINE L. BROWN, B. A. G. (eds.) *Racial Considerations: Skin of Color* Eighth ed. United States: The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.
- MIAO, F., SHI, Y., FAN, Z.-F., JIANG, S., XU, S.-Z. & LEI, T.-C. 2016. Deoxyarbutin possesses a potent skin-lightening capacity with no discernible cytotoxicity against melanosomes. *PloS one*, 11, e0165338.
- MOV, R. 2006. Comparative efficacy and safety of deoxyarbutin, a new tyrosinase-inhibiting agent. *J Cosmet Sci*, 57, 291-308.
- NOVI R, Y. F. 2018. Analisis Mobilitas Tenaga Kerja Hasil Sakernas 2018. *In*: WINIDA A, N. D. (ed.) *Mobillitas Non Permanen Indonesia*. Jakarta: Badan Pusat statistik.

- PALUMBO, A., D'ISCHIA, M., MISURACA, G. & PROTA, G. 1991. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1073, 85-90.
- PIÉRARD, G. 1998. EEMCO guidance for the assessment of skin colour. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 10, 1-11.
- SASTROASMORO, S. & ISMAEL, S. 2008. Dasar-dasar metodologi Penelitian Klinis, edisi ketiga. CV Sagung Seto, Jakarta.
- SIMMONS, B. J., GRIFFITH, R. D., BRAY, F. N., FALTO-AIZPURUA, L. A. & NOURI, K. 2015. Exogenous ochronosis: a comprehensive review of the diagnosis, epidemiology, causes, and treatments. *American journal of clinical dermatology*, 16, 205-212.
- SMIT, N., VICANOVA, J. & PAVEL, S. 2009. The hunt for natural skin whitening agents. *International journal of molecular sciences*, 10, 5326-5349.
- TAKIWAKI, H. 1998. Measurement of skin color: practical application and theoretical considerations. *Journal of Medical Investigation*, 44, 121-126.
- TOPPING, D. C., BERNARD, L. G., O'DONOGHUE, J. L. & ENGLISH, J. C. 2007. Hydroquinone: acute and subchronic toxicity studies with emphasis on neurobehavioral and nephrotoxic effects. *Food and chemical toxicology*, 45, 70-78.

- ULRIKE BARNAUER, Q. C., PIETER COENRAADS 2015. Opinoin on deoxyarbutin tetrahydropyranyloxy phenol.
- VIDEIRA, I. F. D. S., MOURA, D. F. L. & MAGINA, S. 2013. Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais brasileiros de dermatologia*, 88, 76-83.
- WISNUBRATA. 2019. *4 Alasan Kamu Perlu Bersyukur Punya Kulit Sawo Matang* [Online]. Lifestyle.Kompas.com. Available: <https://lifestyle.kompas.com/read/2019/12/02/085058320/4-alasan-kamu-perlu-bersyukur-punya-kulit-sawo-matang?page=all>. [Accessed 2019].
- YAMAGUCHI, Y., BRENNER, M. & HEARING, V. J. 2007. The regulation of skin pigmentation. *Journal of biological chemistry*, 282, 27557-27561.
- YAMAGUCHI, Y. & HEARING, V. J. 2009. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors*, 35, 193-199.

LAMPIRAN

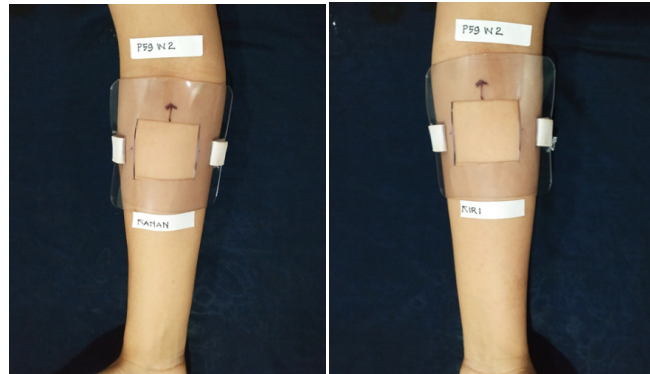
Lampiran 1. Konica Minolta Chroma Meter Model CR-400 ®



Lampiran 2. Serum yang diujikan dengan kode CT01R dan CT01L



Lampiran 3. Patron khusus ukuran 4x4cm



Lampiran 4. Foto klinis subjek sebelum perlakuan



Lampiran 5. Foto Klinis pasien setelah 12 minggu perlakuan



Lampiran 6. Diskripsi statistik nilai L^ pada kelompok deoxyarbutin 2%*

Descriptives

		Statistic	Std. Error
Baseline_R	Mean	52,4071	,44411
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	51,5181
		Upper Bound	53,2961
	5% Trimmed Mean	52,3661	
	Median	52,1300	
	Variance	11,637	
	Std. Deviation	3,41127	
	Minimum	45,39	
	Maximum	59,90	
	Range	14,51	
	Interquartile Range	5,54	
	Skewness	,170	,311
	Kurtosis	-,731	,613
Week2_R	Mean	52,7966	,42515
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	51,9456
		Upper Bound	53,6476
	5% Trimmed Mean	52,8266	
	Median	53,3600	
	Variance	10,664	
	Std. Deviation	3,26560	
	Minimum	46,30	
	Maximum	59,13	
	Range	12,83	
	Interquartile Range	5,31	
	Skewness	,006	,311
	Kurtosis	-,973	,613
Week4_R	Mean	53,0020	,42870
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	52,1439
		Upper Bound	53,8602
	5% Trimmed Mean	53,0233	
	Median	53,1600	
	Variance	10,843	
	Std. Deviation	3,29292	
	Minimum	46,36	
	Maximum	59,83	

	Range		13,47	
	Interquartile Range		4,96	
	Skewness		-,078	,311
	Kurtosis		-,584	,613
Week6_R	Mean		53,2454	,43017
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	52,3843	
		Upper Bound	54,1065	
	5% Trimmed Mean		53,2606	
	Median		53,4500	
	Variance		10,918	
	Std. Deviation		3,30421	
	Minimum		46,91	
	Maximum		60,04	
	Range		13,13	
	Interquartile Range		5,64	
	Skewness		-,076	,311
	Kurtosis		-,855	,613
Week8_R	Mean		53,4998	,40470
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	52,6897	
		Upper Bound	54,3099	
	5% Trimmed Mean		53,5557	
	Median		53,3500	
	Variance		9,663	
	Std. Deviation		3,10852	
	Minimum		47,22	
	Maximum		59,21	
	Range		11,99	
	Interquartile Range		5,02	
	Skewness		-,181	,311
	Kurtosis		-,856	,613
Week10_R	Mean		53,6712	,40406
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	52,8624	
		Upper Bound	54,4800	
	5% Trimmed Mean		53,7051	
	Median		53,8000	

Week12_R	Variance	9,633	
	Std. Deviation	3,10366	
	Minimum	47,27	
	Maximum	59,38	
	Range	12,11	
	Interquartile Range	4,22	
	Skewness	-,161	,311
	Kurtosis	-,681	,613
	Mean	54,0832	,40495
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	53,2726
		Upper Bound	54,8938
	5% Trimmed Mean	54,0957	
	Median	54,3300	
	Variance	9,675	
	Std. Deviation	3,11045	
	Minimum	47,60	
	Maximum	60,67	
	Range	13,07	
	Interquartile Range	4,78	
	Skewness	-,133	,311
	Kurtosis	-,691	,613

Lampiran 7. Uji normalitas nilai L^* kelompok deoxyarbutin 2%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Baseline_R	,075	59	,200 [*]	,982	59	,540
Week2_R	,083	59	,200 [*]	,971	59	,162
Week4_R	,057	59	,200 [*]	,983	59	,563
Week6_R	,088	59	,200 [*]	,975	59	,264
Week8_R	,075	59	,200 [*]	,970	59	,160
Week10_R	,061	59	,200 [*]	,979	59	,398
Week12_R	,063	59	,200 [*]	,984	59	,631

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 8. Paired samples test kelompok deoxyarbutin 2%

NO	PAIRED SAMPLE TEST	NILAI P																									
1	<table><tr><th colspan="5">Paired Samples Test</th></tr><tr><td>Paired ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>95% Confidence Interval of the ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Upper</td><td>t</td><td>df</td><td colspan="2">Sig. (2-tailed)</td></tr><tr><td>Pair 1 Baseline_R - Week2_R</td><td>-,18122</td><td>-3,743</td><td>58</td><td>,000</td></tr></table>	Paired Samples Test					Paired ...					95% Confidence Interval of the ...					Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		Pair 1 Baseline_R - Week2_R	-,18122	-3,743	58	,000	Nilai L* antara baseline dan minggu ke 2→ perubahan signifikan
Paired Samples Test																											
Paired ...																											
95% Confidence Interval of the ...																											
Upper	t	df	Sig. (2-tailed)																								
Pair 1 Baseline_R - Week2_R	-,18122	-3,743	58	,000																							
2	<table><tr><th colspan="5">Paired Samples Test</th></tr><tr><td>Paired ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>95% Confidence Interval of the ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Upper</td><td>t</td><td>df</td><td colspan="2">Sig. (2-tailed)</td></tr><tr><td>Pair 2 Baseline_R - Week4_R</td><td>-,27392</td><td>-3,710</td><td>58</td><td>,000</td></tr></table>	Paired Samples Test					Paired ...					95% Confidence Interval of the ...					Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		Pair 2 Baseline_R - Week4_R	-,27392	-3,710	58	,000	Nilai L* antara baseline dan minggu ke 4→ perubahan signifikan
Paired Samples Test																											
Paired ...																											
95% Confidence Interval of the ...																											
Upper	t	df	Sig. (2-tailed)																								
Pair 2 Baseline_R - Week4_R	-,27392	-3,710	58	,000																							
3	<table><tr><th colspan="5">Paired Samples Test</th></tr><tr><td>Paired ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>95% Confidence Interval of the ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Upper</td><td>t</td><td>df</td><td colspan="2">Sig. (2-tailed)</td></tr><tr><td>Pair 3 Baseline_R - Week6_R</td><td>-,53366</td><td>-5,508</td><td>58</td><td>,000</td></tr></table>	Paired Samples Test					Paired ...					95% Confidence Interval of the ...					Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		Pair 3 Baseline_R - Week6_R	-,53366	-5,508	58	,000	Nilai L* antara baseline dan minggu ke 6→ perubahan signifikan
Paired Samples Test																											
Paired ...																											
95% Confidence Interval of the ...																											
Upper	t	df	Sig. (2-tailed)																								
Pair 3 Baseline_R - Week6_R	-,53366	-5,508	58	,000																							
4	<table><tr><th colspan="5">Paired Samples Test</th></tr><tr><td>Paired ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>95% Confidence Interval of the ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Upper</td><td>t</td><td>df</td><td colspan="2">Sig. (2-tailed)</td></tr><tr><td>Pair 4 Baseline_R - Week8_R</td><td>-,74010</td><td>-6,203</td><td>58</td><td>,000</td></tr></table>	Paired Samples Test					Paired ...					95% Confidence Interval of the ...					Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		Pair 4 Baseline_R - Week8_R	-,74010	-6,203	58	,000	Nilai L* antara baseline dan minggu ke 8→ perubahan signifikan
Paired Samples Test																											
Paired ...																											
95% Confidence Interval of the ...																											
Upper	t	df	Sig. (2-tailed)																								
Pair 4 Baseline_R - Week8_R	-,74010	-6,203	58	,000																							
5	<table><tr><th colspan="5">Paired Samples Test</th></tr><tr><td>Paired ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>95% Confidence Interval of the ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Upper</td><td>t</td><td>df</td><td colspan="2">Sig. (2-tailed)</td></tr><tr><td>Pair 5 Baseline_R - Week10_R</td><td>-,90084</td><td>-6,966</td><td>58</td><td>,000</td></tr></table>	Paired Samples Test					Paired ...					95% Confidence Interval of the ...					Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		Pair 5 Baseline_R - Week10_R	-,90084	-6,966	58	,000	Nilai L* antara baseline dan minggu ke 10→ perubahan signifikan
Paired Samples Test																											
Paired ...																											
95% Confidence Interval of the ...																											
Upper	t	df	Sig. (2-tailed)																								
Pair 5 Baseline_R - Week10_R	-,90084	-6,966	58	,000																							
6	<table><tr><th colspan="5">Paired Samples Test</th></tr><tr><td>Paired ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>95% Confidence Interval of the ...</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Upper</td><td>t</td><td>df</td><td colspan="2">Sig. (2-tailed)</td></tr><tr><td>Pair 6 Baseline_R - Week12_R</td><td>-1,32022</td><td>-9,428</td><td>58</td><td>,000</td></tr></table>	Paired Samples Test					Paired ...					95% Confidence Interval of the ...					Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		Pair 6 Baseline_R - Week12_R	-1,32022	-9,428	58	,000	Nilai L* antara baseline dan minggu ke 12→ perubahan signifikan
Paired Samples Test																											
Paired ...																											
95% Confidence Interval of the ...																											
Upper	t	df	Sig. (2-tailed)																								
Pair 6 Baseline_R - Week12_R	-1,32022	-9,428	58	,000																							

Lampiran 9. Diskripsi statistik nilai L* kelompok hydroquinone 4%

Descriptives				Statistic	Std. Error
Baseline_L	Mean			52,5790	,45968
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		51,6588	
		Upper Bound		53,4991	
	5% Trimmed Mean			52,5639	
	Median			52,6900	
	Variance			12,467	
	Std. Deviation			3,53086	
	Minimum			46,19	
	Maximum			59,94	
	Range			13,75	
	Interquartile Range			6,17	
	Skewness			,058	,311
	Kurtosis			-,843	,613
Week2_L	Mean			52,8537	,44538
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		51,9622	
		Upper Bound		53,7452	
	5% Trimmed Mean			52,8231	
	Median			53,1300	
	Variance			11,703	
	Std. Deviation			3,42100	
	Minimum			46,64	
	Maximum			59,78	
	Range			13,14	
	Interquartile Range			6,11	
	Skewness			,123	,311
	Kurtosis			-,921	,613
Week4_L	Mean			53,0600	,43415
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		52,1909	
		Upper Bound		53,9291	
	5% Trimmed Mean			53,0616	
	Median			53,3100	
	Variance			11,121	
	Std. Deviation			3,33479	
	Minimum			46,29	
	Maximum			59,93	

	Range		13,64	
	Interquartile Range		5,03	
	Skewness		,030	,311
	Kurtosis		-,926	,613
Week6_L	Mean		53,2502	,44362
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	52,3622	
		Upper Bound	54,1382	
	5% Trimmed Mean		53,2737	
	Median		53,6900	
	Variance		11,611	
	Std. Deviation		3,40749	
	Minimum		46,52	
	Maximum		59,52	
	Range		13,00	
	Interquartile Range		5,42	
	Skewness		-,077	,311
	Kurtosis		-,930	,613
Week8_L	Mean		53,4095	,43668
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	52,5354	
		Upper Bound	54,2836	
	5% Trimmed Mean		53,4157	
	Median		53,6500	
	Variance		11,251	
	Std. Deviation		3,35419	
	Minimum		46,42	
	Maximum		59,91	
	Range		13,49	
	Interquartile Range		5,77	
	Skewness		,004	,311
	Kurtosis		-,895	,613
Week10_L	Mean		53,4492	,44009
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	52,5682	
		Upper Bound	54,3301	
	5% Trimmed Mean		53,4946	
	Median		53,7800	

	Variance	11,427	
	Std. Deviation	3,38036	
	Minimum	46,64	
	Maximum	60,03	
	Range	13,39	
	Interquartile Range	5,54	
	Skewness	-,115	,311
	Kurtosis	-,948	,613
Week12_L	Mean	54,0807	,44219
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	53,1955
		Upper Bound	54,9658
	5% Trimmed Mean	54,0847	
	Median	54,3400	
	Variance	11,537	
	Std. Deviation	3,39655	
	Minimum	47,28	
	Maximum	60,34	
	Range	13,06	
	Interquartile Range	5,75	
	Skewness	-,057	,311
	Kurtosis	-,897	,613

Lampiran 10. Uji normalitas nilai L* kelompok hydroquinone 4%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Baseline_L	,068	59	,200 [*]	,977	59	,320
Week2_L	,087	59	,200 [*]	,971	59	,166
Week4_L	,101	59	,200 [*]	,974	59	,232
Week6_L	,096	59	,200 [*]	,973	59	,220
Week8_L	,092	59	,200 [*]	,976	59	,304
Week10_L	,080	59	,200 [*]	,969	59	,144
Week12_L	,090	59	,200 [*]	,971	59	,170

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 11. Paired samples test kelompok hydroquinone 4%

NO	NILAI P					KELOMPOK
1	Paired Samples Test					Nilai L* antara baseline dan minggu ke 2→ perubahan signifikan
	Paired ...					
	95% Confidence Interval of the ...					
	Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		
Pair 1	Baseline_L - Week2_L	-.04977	-2,445	58	.018	
2	Paired Samples Test					Nilai L* antara baseline dan minggu ke 4→ perubahan signifikan
	Paired ...					
	95% Confidence Interval of the ...					
	Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		
Pair 2	Baseline_L - Week4_L	-.17215	-3,117	58	.003	
3	Paired Samples Test					Nilai L* antara baseline dan minggu ke 6→ perubahan signifikan
	Paired ...					
	95% Confidence Interval of the ...					
	Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		
Pair 3	Baseline_L - Week6_L	-.32720	-3,906	58	.000	
4	Paired Samples Test					Nilai L* antara baseline dan minggu ke 8→ perubahan signifikan
	Paired ...					
	95% Confidence Interval of the ...					
	Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		
Pair 4	Baseline_L - Week8_L	-.49840	-5,006	58	.000	
5	Paired Samples Test					Nilai L* antara baseline dan minggu ke 10→ perubahan signifikan
	Paired ...					
	95% Confidence Interval of the ...					
	Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		
Pair 5	Baseline_L - Week10_L	-.24444	-2,341	58	.000	
6	Paired Samples Test					Nilai L* antara baseline dan minggu ke 12→ perubahan signifikan
	Paired ...					
	95% Confidence Interval of the ...					
	Upper	t	df	Sig. (2-tailed)		
Pair 6	Baseline_L - Week12_L	-1,16383	-8,897	58	.000	

Lampiran 12. Diskripsi statistik nilai delta L^* kelompok deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4%

Descriptives				
	Type		Statistic	Std. Error
Week2_B	R	Mean	.3895	.10405
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.1812
			Upper Bound	.5978
		5% Trimmed Mean	.3880	
		Median	.2900	
		Variance	.639	
		Std. Deviation	.79920	
		Minimum	-1.58	
		Maximum	2.63	
		Range	4.21	
		Interquartile Range	.89	
		Skewness	.047	.311
		Kurtosis	.892	.613
	L	Mean	.2747	.11239
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.0498
			Upper Bound	.4997
		5% Trimmed Mean	.2883	
		Median	.3100	
		Variance	.745	
		Std. Deviation	.86328	
		Minimum	-2.07	
		Maximum	2.28	
		Range	4.35	
		Interquartile Range	.62	
		Skewness	-.411	.311

		Kurtosis	1.079	.613
Week4_B	R	Mean	.5949	.16036
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.2739
			Upper Bound	.9159
		5% Trimmed Mean	.6395	
		Median	.6400	
		Variance	1.517	
		Std. Deviation	1.23174	
		Minimum	-3.77	
		Maximum	3.45	
		Range	7.22	
		Interquartile Range	1.07	
		Skewness	-.685	.311
		Kurtosis	2.394	.613
	L	Mean	.4810	.15430
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.1721
			Upper Bound	.7899
		5% Trimmed Mean	.4026	
		Median	.4200	
		Variance	1.405	
		Std. Deviation	1.18523	
		Minimum	-1.32	
		Maximum	4.51	
		Range	5.83	
		Interquartile Range	1.55	
		Skewness	1.101	.311
		Kurtosis	2.084	.613
Week6_B	R	Mean	.8383	.15219
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.5337
			Upper Bound	1.1430
		5% Trimmed Mean	.8530	
		Median	.7900	
		Variance	1.367	
		Std. Deviation	1.16902	
		Minimum	-1.97	

		Maximum	3.20	
		Range	5.17	
		Interquartile Range	1.41	
		Skewness	-.130	.311
		Kurtosis	-.032	.613
	L	Mean	.6712	.17184
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.3272
			Upper Bound	1.0152
		5% Trimmed Mean	.6427	
		Median	.6900	
		Variance	1.742	
		Std. Deviation	1.31997	
		Minimum	-2.25	
		Maximum	4.33	
		Range	6.58	
		Interquartile Range	1.74	
		Skewness	.289	.311
		Kurtosis	.388	.613
Week8_B	R	Mean	1.0927	.17616
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.7401
			Upper Bound	1.4453
		5% Trimmed Mean	1.0980	
		Median	.9900	
		Variance	1.831	
		Std. Deviation	1.35307	
		Minimum	-2.60	
		Maximum	4.53	
		Range	7.13	
		Interquartile Range	1.58	
		Skewness	-.080	.311
		Kurtosis	.777	.613
	L	Mean	.8305	.16591
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.4984
			Upper Bound	1.1626
		5% Trimmed Mean	.7904	

		Median	.6900	
		Variance	1.624	
		Std. Deviation	1.27438	
		Minimum	-1.53	
		Maximum	4.41	
		Range	5.94	
		Interquartile Range	1.62	
		Skewness	.411	.311
		Kurtosis	.360	.613
Week10_B	R	Mean	1.2641	.18146
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.9008
			Upper Bound	1.6273
		5% Trimmed Mean	1.3003	
		Median	1.1700	
		Variance	1.943	
		Std. Deviation	1.39382	
		Minimum	-3.81	
		Maximum	4.35	
		Range	8.16	
		Interquartile Range	1.55	
		Skewness	-.516	.311
		Kurtosis	1.890	.613
	L	Mean	.8702	.16274
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.5444
			Upper Bound	1.1959
		5% Trimmed Mean	.8482	
		Median	.8600	
		Variance	1.563	
		Std. Deviation	1.25003	
		Minimum	-2.87	
		Maximum	4.54	
		Range	7.41	
		Interquartile Range	1.43	
		Skewness	.202	.311
		Kurtosis	1.672	.613

Week12_B	R	Mean		1.6761	.17779
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.3202	
			Upper Bound	2.0320	
		5% Trimmed Mean		1.7110	
		Median		1.6400	
		Variance		1.865	
		Std. Deviation		1.36560	
		Minimum		-3.49	
		Maximum		4.64	
		Range		8.13	
		Interquartile Range		1.88	
		Skewness		-.688	.311
		Kurtosis		2.354	.613
	L	Mean		1.5017	.16879
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.1638	
			Upper Bound	1.8396	
		5% Trimmed Mean		1.4812	
		Median		1.3200	
		Variance		1.681	
		Std. Deviation		1.29649	
		Minimum		-1.71	
		Maximum		4.80	
		Range		6.51	
		Interquartile Range		1.71	
		Skewness		.268	.311
		Kurtosis		.537	.613

Lampiran 13. Uji normalitas nilai delta L* kelompok deoxyarbutin dan hydroquinone 4%

Lampiran 14. . Independent t test kelompok deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4%

Tests of Normality							
	Type	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Week2_B	R	.096	59	.200 [*]	.978	59	.372
	L	.151	59	.002	.950	59	.017
Week4_B	R	.114	59	.054	.944	59	.009
	L	.080	59	.200 [*]	.928	59	.002
Week6_B	R	.069	59	.200 [*]	.985	59	.699
	L	.074	59	.200 [*]	.986	59	.722
Week8_B	R	.080	59	.200 [*]	.982	59	.545
	L	.066	59	.200 [*]	.979	59	.408
Week10_B	R	.057	59	.200 [*]	.965	59	.086
	L	.086	59	.200 [*]	.972	59	.182
Week12_B	R	.103	59	.185	.954	59	.025
	L	.091	59	.200 [*]	.980	59	.423

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 15. Independent t test kelompok deoxyarbutin dan hydroquinone 4%

NO	NILAI P					KELOMPOK
1	t-test for Equality of Means					Delta L* kelompok deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4% minggu ke 4 → tidak ada perbedaan yang signifikan
	Week4_B	Equal variances assumed	.610	.11390	.22254	
2	t-test for Equality of Means					Delta L* kelompok deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4% minggu ke 6 → tidak ada perbedaan yang signifikan
	Week6_B	Equal variances assumed	.468	.16712	.22955	
	t-test for Equality of Means					Delta L* kelompok deoxyarbutin 2% dan

3	Week8_B	Equal variances assumed	.281	.26220	.24198	-.21708
		Equal variances not assumed	.281	.26220	.24198	-.21710
4	t-test for Equality of Means					
			Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Lower
4	Week10_B	Equal variances assumed	.109	.39390	.24375	-.08887
		Equal variances not assumed	.109	.39390	.24375	-.08893
5	t-test for Equality of Means					
			Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Lower
5	Week12_B	Equal variances assumed	.478	.17441	.24515	-.31114
		Equal variances not assumed	.478	.17441	.24515	-.31115

hydroquinone 4% minggu ke 8 → tidak ada perbedaan yang signifikan

Delta L* kelompok deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4% minggu ke 10 → tidak ada perbedaan yang signifikan

Delta L* kelompok deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4% minggu ke 12 → tidak ada perbedaan yang signifikan

Lampiran 16. Uji Mann-Whitney delta L* kelompok deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4%

NO	NILAI P	KELOMPOK										
1	Test Statistics^a <table><tr><td></td><td>Week2_B</td></tr><tr><td>Mann-Whitney U</td><td>1653.500</td></tr><tr><td>Wilcoxon W</td><td>3423.500</td></tr><tr><td>Z</td><td>-.468</td></tr><tr><td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td><td>.640</td></tr></table> a. Grouping Variable: Type		Week2_B	Mann-Whitney U	1653.500	Wilcoxon W	3423.500	Z	-.468	Asymp. Sig. (2-tailed)	.640	Delta L * kelompok deoxyarbutin 2% dan hydroquinone 4% minggu ke 2 → tidak ada perbedaan yang signifikan
	Week2_B											
Mann-Whitney U	1653.500											
Wilcoxon W	3423.500											
Z	-.468											
Asymp. Sig. (2-tailed)	.640											

Lampiran 17. Lembar inform consent



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Sekretariat: Lantai 3 Gedung Laboratorium Terpadu

JL. PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10, Makassar. Telp. (0411) 5780103, Fax (0411) 581431.

Contact person dr. Agussalim Bukhari, M.Med, PhD, Sp.GK (HP.081241850858),
email: agussalimbukhari@yahoo.com

Lampiran 2

FORMULIR PERSETUJUAN MENGIKUTI PENELITIAN
SETELAH MENDAPAT PENJELASAN

Setelah membaca informasi penelitian serta mendengar penjelasan dan menyadari pentingnya penelitian:

“Perbandingan Efektivitas Topikal Serum Deoxyarbutin 2% dan Serum Hydroquinone 4%
Sebagai Agen Pencerah Kulit”

Maka saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama :
Umur :
Jenis kelamin :
Pekerjaan :
Alamat :

Saya bersedia dilakukan pemeriksaan dan pengaplikasian serum untuk meningkatkan kecerahan kulit. Pengolesan serum akan dilakukan pada malam hari pada lengan bawah kanan dan kiri bagian dalam selama 12 minggu. Serum A dioleskan pada lengan kanan dan serum B dioleskan pada lengan kiri, masing-masing sebanyak 2 tetes menggunakan spet yang ada pada botol kemasan serum. Untuk memastikan tempat pengolesan serum sama setiap kali pengolesan, dibuat patron khusus. Patron terbuat dari pewarna kulit semi permanen berupa garis berbentuk segi empat berukuran 4x4 cm. Setelah pengolesan saya harus selalu memakai manset (disiapkan) bila beraktivitas di luar ruangan.

Saya mengerti sepenuhnya bahwa pemeriksaan dan pengaplikasian serum yang dilakukan tidak akan mempengaruhi kondisi kesehatan saya dan hal ini semata-mata dilakukan untuk kepentingan penelitian. Saya mengetahui bahwa saya berhak untuk menolak ikut serta dalam

penelitian ini tanpa kehilangan hak saya untuk mendapatkan pelayanan kesehatan yang seharusnya saya peroleh.

Semua biaya pemeriksaan dan biaya pengobatan bila terjadi keluhan apa pun sehubungan dengan penelitian ini, ditanggung oleh peneliti.

Bila masih ada hal yang masih belum saya mengerti atau saya ingin mendapatkan penjelasan lebih lanjut, saya bisa mendapatkannya dari dokter peneliti. Demikian persetujuan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan.

Makassar,

Yang menyatakan,

.....
(Nama subjek penelitian dan tanda tangan)

Saksi 1 (suami)

Saksi 2

Penanggung Jawab Penelitian

Nama : dr. Yulia asmarani

Alamat : Jl. Cemara III Blok GL 09, Perumahan NTI, Makassar

Telepon : 081279083271

Penanggung Jawab Medis

Nama : Prof. DR. Dr. Anis Irawan Anwar, Sp.KK (K), FINSDV, FAADV

Alamat : Jl. Sungai Saddang A 11/7A, Makassar

Telpo : 0811412678

DISETUJUI OLEH KOMISI
ETIK PENELITIAN
KESEHATAN FAK.
KEDOKTERAN UNHAS.
Tgl:.....2019

RESEARCH ARTICLE

Deoxyarbutin Possesses a Potent Skin-Lightening Capacity with No Discernible Cytotoxicity against Melanosomes

Fang Miao^a, Ying Shi^a, Zhi-Feng Fan, Shan Jiang, Shi-Zheng Xu, Tie-Chi Lei*

Department of Dermatology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, China

* These authors contributed equally to this work.

* ichlei@whu.edu.cn



OPEN ACCESS

Citation: Miao F, Shi Y, Fan Z-F, Jiang S, Xu S-Z, Lei T-C (2016) Deoxyarbutin Possesses a Potent Skin-Lightening Capacity with No Discernible Cytotoxicity against Melanosomes. PLoS ONE 11(10): e0165338. doi:10.1371/journal.pone.0165338

Editor: Ling Hou, Wenzhou Medical University, CHINA

Received: July 22, 2016

Accepted: October 10, 2016

Published: October 24, 2016

Copyright: © 2016 Miao et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (NSFC Grants 81371717 and 81573028). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Safe and effective ingredients capable of removing undesired hyperpigmentation from facial skin are urgently needed for both pharmaceutical and cosmetic purposes. Deoxyarbutin (4-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl) oxy] phenol, D-Arb) is a glucoside derivative of hydroquinone. Here, we investigated the toxicity and efficacy of D-Arb at the sub-cellular level (directly on melanosomes) and skin pigmentation using *in vivo* and *in vitro* models to compare with its parent compound hydroquinone (1,4-benzenediol, HQ). At first, we examined the ultrastructural changes of melanosomes in hyperpigmented guinea pig skin induced by 308-nm monochromatic excimer light and/or treated with HQ and D-Arb using transmission electron microscopy. The results showed that prominent changes in the melanosomal membrane, such as bulb-like structure and even complete rupture of the outer membranes, were found in the skin after topical application of 5% HQ for 10 days. These changes were barely observed in the skin treated with D-Arb. To further clarify whether membrane toxicity of HQ was a direct result of the compound treatment, we also examined ultrastructural changes of individual melanosomes purified from MNT1 human melanoma cells. Similar observations were obtained from the naked melanosome model *in vitro*. Finally, we determined the effects of melanosomal fractions exposed to HQ or D-Arb on hydroxyl radical generation in the Fenton reaction utilizing an electron spin resonance assay. D-Arb-treated melanosomes exhibit a moderate hydroxyl radical-scavenging activity, whereas HQ-treated melanosomes significantly generate more hydroxyl free radicals. This study suggests that D-Arb possesses a potent ability in skin lightening and antioxidation with less melanosome cytotoxicity.

Introduction

Melasma (chloasma) is a common skin pigmentary disorder characterized by irregular light to dark brown patches on the face, which usually cause significant psychiatric and psychological burdens for affected individuals. However, the inciting events for the pathogenesis of melasma

DeoxyArbutin: a novel reversible tyrosinase inhibitor with effective *in vivo* skin lightening potency

Boissy RE, Visscher M, deLong MA. DeoxyArbutin: a novel reversible tyrosinase inhibitor with effective *in vivo* skin lightening potency. *Exp Dermatol* 2005; 14: 601–608. © Blackwell Munksgaard, 2005

Abstract: Modulation of melanogenesis in the melanocytes can be achieved using chemicals that share structural homologies with the substrate tyrosine and as thus competitively inhibit the catalytic function of tyrosinase. We have developed a new tyrosinase inhibitor, deoxyArbutin (dA), based on this premise. **DeoxyArbutin demonstrates effective inhibition of mushroom tyrosinase *in vitro* with a K_i that is 10-fold lower than hydroquinone (HQ) and 350-fold lower than arbutin.** In a hairless, pigmented guinea pig model, dA demonstrated rapid and sustained skin lightening that was completely reversible within 8 weeks after halt in topical application. In contrast, HQ induced a short but unsustained skin lightening effect whereas kojic acid and arbutin exhibit no skin lightening effect. Results from a panel of safety tests supported the overall establishment of dA as an actionable molecule. **In a human clinical trial, topical treatment of dA for 12 weeks resulted in a significant or slight reduction in overall skin lightness** and improvement of solar lentigines in a population of light skin or dark skin individuals, respectively. These data demonstrate that dA has potential tyrosinase inhibitory activity that can result in skin lightening and may be used to ameliorate hyperpigmentary lesions.

Raymond E. Boissy^{1,2}, Marty Visscher² and Mitchell A. deLong³

¹Department of Dermatology, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH, USA;

²Skin Sciences Institute, The Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA;

³Department of Chemistry, University of Cincinnati, Cincinnati, OH, USA

Key words: melanocyte – pigments – hydroquinone – complexion coloration

Raymond E. Boissy
Department of Dermatology and Cell Biology
University of Cincinnati College of Medicine
231 Albert Sabin Way
Cincinnati, OH 45267-0592, USA
Tel: +1 513 558 6242
Fax: +1 513 558 0198
e-mail: boissyre@ucmail.uc.edu

Accepted for publication 14 April 2005

Introduction

Tyrosinase [EC 1.14.18.1] is the primary, rate-limiting enzyme responsible for conversion of the substrate tyrosine into melanins by melanocytes (1,2). Initially, tyrosinase hydroxylates tyrosine to dihydroxyphenylalanine (DOPA) and subsequently oxidizes DOPA to DOPAquinone. Inhibition of the catalytic activity of tyrosinase, either by genetic mutations as in albinisms (3) or pharmacologically with competitive inhibitors (4), results in reduced or absent melanin synthesis by melanocytes and hypopigmentation of skin.

Various compounds that bind to the active site of tyrosinase and inhibit the synthesis of melanin have been developed as agents to lighten skin and ameliorate hyperpigmented lesions. These agents include hydroquinone (HQ) (5,6), kojic acid (7), arbutin (8,9), etc. (10). However, the efficacy and safety of these compounds has been a concern. Specifically, HQ can be very irritating, induce

Ochronosis (11), and cause permanent leucoderma or scarring with long-term use (12). In addition, animal studies (13,14) and *in vitro* cell studies (15) have demonstrated that HQ is possibly carcinogenic probably related to the metabolites of benzene. Kojic acid and arbutin, although quite safe, are ineffective at levels allowed by the quasi-drug regulations in force. In addition, kojic acid has been demonstrated to be mutagenic (16) and has recently been banned for quasi-drug usage in Japan.

In an attempt to develop a more effective and safer tyrosinase inhibitor, we have synthesized and screened various candidate compounds in which the polar tail of tyrosine had been structurally altered in a systematic way. One compound, (per) dA, appears to be an excellent tyrosinase inhibitor. We demonstrate herein that this compound effectively inhibits tyrosinase activity and reduces pigmentation of guinea pig and human skin.

Materials and methods

Compounds

Figure 1 presents the chemical structure of dA and arbutin compared to tyrosine. DeoxyArbutin (dA) was initially synthesized by the authors and scaled up by Girindus America Inc. (Cincinnati, OH, USA) and Starks' Associates, Inc. (Buffalo, NY, USA). Hydroquinone, kojic acid, and arbutin were either synthesized by the authors or purchased from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA).

Tyrosinase inhibition assay

An assay was developed to measure the conversion of tyrosine to DOPA by mushroom tyrosinase with quantitative detection by high-performance liquid chromatography (HPLC). This assay was used to determine the effective concentration range and strength of inhibition (K_i). Briefly, 20 μ l of mushroom tyrosinase (3.2 μ g) in 3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid buffer (100 mM; pH 7.0) was added to 10 ml of 0.5 μ M DOPA and incubated for 10 min at 70°C. About 100 μ l of test inhibitor (ranging from 0.1 to 10.0 μ M) plus 200 μ l of tyrosine (10 μ M) were added and incubated for an additional 22 min. The reaction solution was cooled to room temperature and used for HPLC quantification of tyrosine consumption (μ M tyrosine/min/mg tyrosinase). About 6 min, run times of a 5 μ l sample through a HPLC Supelcosil LC-CN column (25 cm $\times$ 4.6 mm) using a 470 scanning fluorescence detector were employed to allow separation of tyrosine from DOPA and inhibitor. The mobile phase used was 0.05 M acetic acid/20 mM triethylamine. Units of inhibition represent percent activity of sample treated with inhibitor compared to sample treated with vehicle only.

Animal study

A hairless pigmented (black) guinea pig model was developed. Viral/pathogen-free hairless, albino guinea pigs (Charles River Laboratories, Inc., Kingston, NY, USA) and haired, pigmented guinea pigs (Kuiper's Rabbit Ranch, Gary, IN, USA) were crossbred for several generations with selection for hairless animals with interfollicular pigmentation. For experiments comparing skin lightening effects of test compounds, skin was treated daily for 9 weeks with dA, HQ, kojic acid, or arbutin (3%) prepared in I base cream consisting of water (25%), 0.2 M triethanolamine hydrochloride (44.5%), glycerin (3.75%), Panson MCX (7.5%), cutina GMS (2.5%), and tegin 90 (2.5%). Ten animals were in each treatment group, and three independent experiments were performed. Skin lightness (L -value) was measured at baseline and then weekly with a colorimeter (Minolta Chroma Meter, CR-300, Konica Minolta Photo Imaging, Mahwah, NJ, USA). For experiments comparing dose-response and reversibility of dA, skin was treated daily

for 6 weeks with 0, 0.1, 0.3, 1, and 3% dA, and evaluated for eight additional weeks after halt of treatment. Ten animals were in each treatment group.

Metabolism studies

Depilated, pigmented guinea pigs ($n=10$ /group) were topically treated once with 30 μ Cl of 14 C-dA or 14 C-HQ (3.0%) in I base cream. Urine was collected daily for 7 days. Volume of urine and amount of radioactivity per sample was determined. Excretion profiles for the time course of the experiment were calculated. In a second experiment, pigmented guinea pigs ($n=10$ /group) were topically treated with 30 μ Cl of 14 C-dA or 14 C-HQ in buffered SC-23 cream at 3.0% applied to 16 cm² daily for 4 days. Urine was collected twice daily until day 8. Excretion profile of radiolabeled metabolites was determined by LC-MS for presence of glucuronide and sulfate metabolites.

Safety assays

Vohame eye irritation. Preliminary ocular examinations were performed in three female New Zealand rabbits (Myrtle's Rabbitry, Thompson Station, TN, USA). About 10 μ l of 3% dA in a standard cream formulation was dosed into one eye, the other eye was left as untreated control. (10) Animals were scored for irritation at 24, 48, and 72 h post dosing using the Ocular Grading System (17).

Murine local lymph node assay. This assay evaluated for potential to induce contact hypersensitivity by evaluating cellular proliferation of auricular lymph node cells. Female CBA/J mice ($n=25$) were treated with 12.5 μ l of 3, 10, and 20% dA w/v in acetone, acetone only, or untreated control to ventral and dorsal surfaces of both pinnae. Animals were treated daily (4 days) and injected with 20 μ Cl of 3 H-thymidine (specific activity of 6.7 μ Ci/mmol) on day 5. Under anesthesia, auricular nodes were excised, dissociated, washed, resuspended in 5% trichloroacetic acid, and radioactivity assessed.

Ames test and Escherichia Coli assays. The Ames test assessed mutagenic activity of dA. Tester strains were Salmonella typhimurium histidine auxotrophs TA98, TA100, TA1535, TA1537, and TA1538 (18) and *E. coli* strains WPs uvrA (pKM101) and WP2 (pKM101). Cultures were prepared, and following dose determination, six dose levels (in triplicate) of test article and controls were plated with tester strains in presence and absence of rat liver S9 activation. Using plate incorporation, 500 μ l of S9 or sham mix, 100 μ l of tester strain, and 50 μ l of vehicle or test substance were added to 1.0 ml of molten selective top agar at 45 $\pm$ 2°C. For positive control, test article was replaced by 50 μ l of the control. Vortexed mixture was overlaid onto 25 ml of minimal bottom agar. Plates were inverted, incubated for 48–72 h at 37 $\pm$ 2°C, and stored at 4 $\pm$ 2°C. Plates were evaluated for evidence of test article toxicity using a dissecting microscope and scored relative to vehicle control.

Up/down procedure LD₅₀. Single-dose oral toxicity of dA was determined using Sprague-Dawley Crl:CD[®] BR VAF/Plus[®] rats (Charles River Laboratories, Inc., Portage, MI, USA). Six females were given single oral doses (mg/kg): 923 ($n=2$), 1200 ($n=3$), and 1560 ($n=1$). Results for first dose level were observed prior to establishing second dose level. Seven males were dosed at 2275 ($n=1$), 2958 ($n=3$), 3846 ($n=2$), and 5000 ($n=1$) mg/kg, respectively. Three males and three females served as controls at

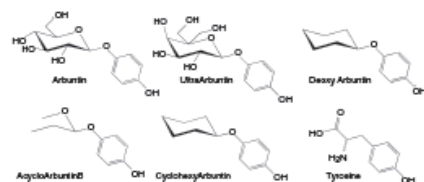


Figure 1. Chemical structures of arbutin, ultraarbutin, deoxyarbutin, acycloarbutin b, cyclohexylarbutin, and tyrosine.

a dose of >10 ml/kg of vehicle (propylene glycol). Animals were observed daily, weighed on day 7 and examined after euthanasia.

Up/down intraperitoneal LD_{50} . Single-dose up/down intraperitoneal toxicity study of dA in seven male and nine female Sprague-Dawley Crl:CD[®]BR VAF/Plus[®] rats (Charles River Laboratories) was performed. Vehicle was propylene glycol/absolute ethanol/saline at 60:20:20 V:V:V. Vehicle was evaluated at a volume of 5 ml/kg in three males and three females to assess toxicity. Animals received a single intraperitoneal injection at 240, 310, 400, 520, 680, and 1150 mg/kg body weight. Animals were observed daily, weighed on day 7 and examined after euthanasia.

Human repeat insult patch test (HRIPT). Ninety-four male and female subjects completed the HRIPT (19). Exclusion criteria were use of immunosuppressive drugs, current or frequent use of topical or systemic anti-inflammatory medications, significant skin disease (excluding facial acne), skin cancer at or near test sites, insulin-dependent diabetes, chronic respiratory disease, ongoing allergy injections, slight erythema in test site, recent malignancy treatment, lactation, or pregnancy. Occlusive patches containing 0.2 g of topical moisturizer with 3% dA was applied for 24 h to the upper arm. Subjects removed patches and returned for application of another patch on M, W, and F for 3 weeks during induction phase, followed by a 2-week rest period. In the challenge phase, patches were applied to the previous sites and to contralateral native sites for 24 h. Patch sites were scored for irritation, prior to application of the next patch during the induction phase and then for sensitization 24 and 96 h after challenge. Irritation was scored on a 4-point scale (0 none, 1 slight, 2 moderate, and 3 severe).

Dermal toxicity. Dermal toxicity of dA was evaluated in male ($n=46$) and female ($n=46$) New Zealand rabbits (Hazelton Research Products, Kalamazoo, MI, USA). In the 14-day pilot phase, two animals (one male and one female) were treated with 5, 10, 20 or 40% dA in a solvent vehicle, vehicle alone, or 3% dA in a cream. The 28-day trial evaluated 3% dA in a cream vehicle vs. vehicle alone in two groups (five males and five females per treatment), dosed daily for 6 h at 2.0 ml/kg. The test sites were then washed and dried. The 91-day study evaluated 1, 5, and 40% dA in solvent vehicle (propylene glycol/ethanol, 75:25, v/v) and vehicle alone in four groups (five males and five females), dosed daily for 6 h at 2.0 ml/kg. Test animals were assessed for weight changes and dermal irritation after 2 and 4 weeks of treatment in the 28-day study and after 2, 4, and 13 weeks in the 91-day study. Animals were euthanized and microscopic evaluations performed.

Photoirritation. Dorsal surfaces of albino guinea pigs [Crl(HA)BR strain, Charles River Laboratories, $n=9$ males, $n=9$ females] were depilated with Nee[®]. Duplicate 0.3 ml applications of test or control material were applied to four sites per animal under 2-h occlusion (Hill Top Chamber, 25-mm diameter). Test formulas were 0, 1, 5, 20, 50% w/v dA in propylene glycol. The positive control was 8-methoxypsoralen (8-MOP, Sigma Chemical Company), 0.01% w/v in acetone. Patches were removed, left side treated sites wiped, and covered with aluminum foil. Animals were exposed to 10 J/cm² of Ultraviolet A (UVA) light (320–400 nm) and patches removed. At 1, 4, 24, and 48 h following UV exposure, skin was evaluated for dermal irritation (0, no erythema; 1, slight but confluent or moderate patchy; 2, moderate; 3, severe with or without edema).

DeoxyArbutin: a reversible tyrosinase inhibitor

Photoallergy. Nuchal regions of albino guinea pigs ($n=25$) were depilated with Nee[®] and tape stripped repeatedly to glistening layer. In induction phase, sites were treated for 2 h with 0.3 ml of 50% w/v dA in propylene glycol ($n=10$ animals) or 10% w/v musk ambret in acetone (positive control, $n=5$), both applied via an adhesive patch (Hill Top Chamber[®], 25-mm diameter). For the primary challenge ($n=5$) and rechallenge ($n=5$) controls, dry patches were applied. Patches were removed and sites wiped. Untreated lumbar regions were shielded, and animals were exposed to 10 J/cm² of UVA light (320–400 nm). Induction was performed on days 2, 4, 7, 9, and 11 with depilation performed on days 4, 7, and 11. On day 22, a naïve lumbar site was depilated prior to application of 0.3 ml/patch of test material and positive control. Sites were occluded for 2 h, patches removed and sites wiped. The left side challenge site and the induction areas were shielded with aluminum foil under tape (right challenge site uncovered). Animals were exposed to 10 J/cm² of UVA light, and foil was removed. Dermal reactions were evaluated at 24 and 48 h following irradiation.

Human clinical trial

A paired comparison, vehicle-controlled, double-blind study was implemented with 3% dA formula or vehicle/formula applied to a 100 cm² area on dorsal surface of each forearm. The formula utilized was composed primarily of water (79.4%), Butylene Glycol (1.5%), Parson MCX (7.5%), Cetyl Alcohol (1.25%), and Stearyl Alcohol (1.25%). The population consisted of 50 post-menopausal female subjects stratified into two subgroups: 34 Caucasian light skin individuals (mean baseline L -value=62.7) with solar lentigines and 16 non-Caucasian darker skin individuals (mean baseline L -value=60.6) with solar lentigines. Daily treatment was for 12 weeks from mid-November to mid-February at a clinical site in the United Kingdom. For overall skin lightness evaluation, L -values were obtained using the Minolta Chroma Meter at onset (baseline) and termination (12 weeks). For assessment of solar lentigines, digital images were obtained, coded, and evaluated by manual grading by three independent expert judges at onset of the trial (baseline) and at termination (12 weeks). Images were evaluated for improvement in solar lentigines by a side-by-side comparison of treated and control images, using a 0–4 comparative scale (where 0=there is no difference; 1=I think there is a difference; 2=I know there is a difference; 3=there is a moderate difference; and 4=there is a very large difference).

Statistics

For most studies, statistical differences between control and treatment groups were assessed using Student t -test.

For local lymph node assay, data were log-transformed and analyzed by Bartlett's test for homogeneity and analysis of variance (ANOVA). Wilcoxon's rank sum test was used to compare control to treatment groups. A P -value of <0.01 was considered significant. For 28 and 91-day dermal toxicity trials, analysis of variance techniques were used to compare treatments to controls. For non-normally distributed data, ANOVA procedure of Conover and Iman was used (20). The Mann-Whitney U -test with Bonferroni correction was used for comparisons of treatments with control. Statistical significance of $P=0.05$, two-sided risk level, was used. For human clinical trial, all data for Week 12 change from baseline L -value or composite scores from evaluations were analyzed by 2-sided analysis of variance.

Results

Tyrosinase inhibition

The catalytic activity of mushroom tyrosinase was assessed in the presence of dA in comparison to HQ, arbutin, and kojic acid (Fig. 2). DeoxyArbutin was equally effective in inhibiting tyrosinase activity as HQ, whereas kojic acid and arbutin exhibited no tyrosinase inhibitory effect. The K_i (μM) of dA, HQ, kojic acid, and arbutin for purified mushroom tyrosinase were 0.05, 0.54, 7.70, and 17.60 μM , respectively, indicating that dA was the most effective tyrosinase inhibitor of the compounds tested.

Animal studies

DeoxyArbutin, HQ, kojic acid, and arbutin were evaluated for topical effect on skin pigmentation of a guinea pig model (Fig. 3a,b) through daily application of 3% solutions for 9 weeks. Both dA and HQ resulted in skin lightening during the initial 3 weeks of treatment. From week 4 until week 9 of treatment, the extent of dA-induced skin lightening plateaued while the HQ-treated skin darkened and returned to the pretreatment value (Fig. 3a,b). The dA treated sites showed no signs of skin irritation. In contrast, HQ treated skin showed signs of irritation that resulted in irregular darkening, beginning at 3 weeks of treatment (Fig. 3b). In contrast, kojic acid, and

arbutin were not significantly different from the vehicle control, vehicle at any time during the treatment period (Fig. 3a,b).

DeoxyArbutin was evaluated for dose-response and reversibility of effect upon discontinued use (Fig. 3c). By 6 weeks of treatment, 3, 1, and 0.3% dA were significantly better ($P < 0.05$) than the vehicle control. The 3 and 1% concentrations reached significance as early as 3 weeks of treatment. The 0.3% concentration produced significantly greater skin lightening than the vehicle at 5 weeks of treatment. The 0.1% level was not significantly different than the vehicle control. Following discontinuation of treatment at week 6, the skin repigmented for each concentration of dA tested (Fig. 3c). The rate of repigmentation correlated with dose of dA.

Pigmented guinea pigs treated with radiolabeled 3.0% dA were assessed for the presence of metabolites in urine in two independent studies. The total amount of radioactivity excreted in urine after one topical treatment indicated that by 48 h approximately, 90% of the radioactivity was detected in urine. Subsequently, urinary metabolism of topically applied radiolabeled dA and HQ was evaluated. DeoxyArbutin was excreted more rapidly than HQ with a $t_{1/2}$ of 9 h for dA and >167 h for HQ. At 38 h, 91–97% of dA was excreted vs. 52% for HQ. In the dA-treated guinea pigs, 52–57% and 29–30% of the inhibitor was retrieved in urine as dA-glucuronide and dA-sulfate, respectively (Table 1). In contrast, in HQ-treated guinea pigs, only 5–14% of the inhibitor was retrieved in urine collectively as HQ-glucuronide and HQ-sulfate.

Safety studies

Safety analyses for dA were performed. Specifically, these tests included [i] low-volume eye irritation, [ii] murine local lymph node assay, [iii] Ames test, [iv] *E. coli* assay, [v] up/down oral and intraperitoneal LD50, [vi] HRIPT, [vii] dermal toxicity, [viii] photoirritation, and [ix] photoallergy using standard protocols as described in *Material and Methods*. The low-volume eye irritation assay demonstrated no irritation (maximum average score of 0.0) with a 1-day median time for eye clearance indication, no complications. The murine local lymph node assay indicated no significant clinical signs and demonstrated no statistical differences between any of the treatment groups and the carrier (vehicle) and untreated control groups. The Ames test and the *E. Coli* assay demonstrated no positive responses

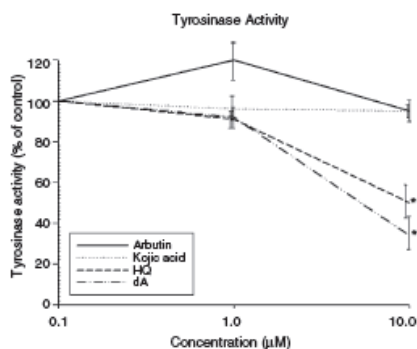


Figure 2. DeoxyArbutin (dA) exhibits tyrosinase inhibition. The consumption of tyrosine (i.e. tyrosinase activity) was quantitated in the presence of various concentrations of dA, hydroquinone (HQ), kojic acid, and arbutin compared to control as described in *Materials and Methods*. Both dA and HQ exhibit statistically significant inhibition of tyrosinase at 10 μM , whereas kojic acid and arbutin exhibited no inhibition of tyrosinase. * $P < 0.05$ for each line compared to the vehicle-treated control.

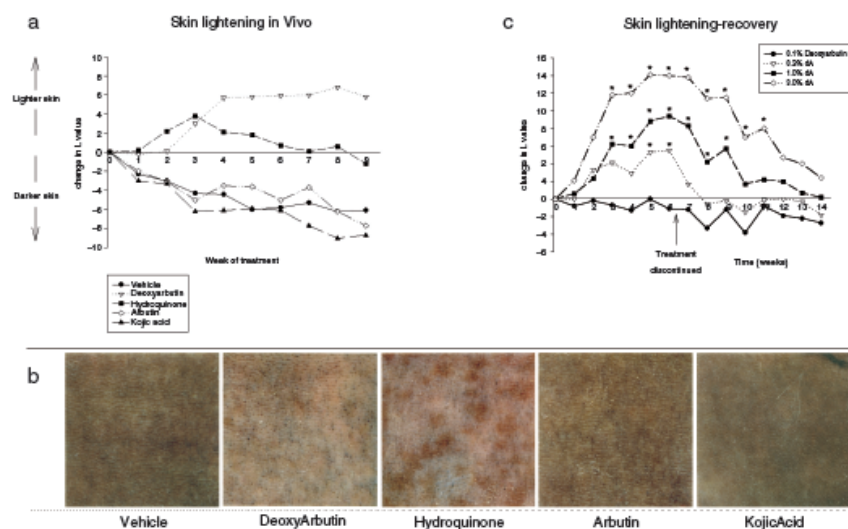


Figure 3. DeoxyArbutin (dA) effectively lightens skin pigmentation in a hairless, pigmented Guinea Pig model. Animals ($n=10$ /group) were topically treated daily for 9 weeks with vehicle, or dA, hydroquinone, arbutin, and kojic acid at 3% in I base. (a) Skin lightness was assessed weekly with a chromameter and change in L -value plotted. DeoxyArbutin exhibited a sustained skin lightening affect by the third week of application. (b) Photographs at the 9-week time point of skin areas treated with vehicle, dA, Hydroquinone, Arbutin, and Kojic Acid, respectively. (c) The skin lightening effect of dA is dose dependant reversible. Hairless, pigmented guinea pigs ($n=10$ /group) were topically treated daily with dA at 0.1, 0.3, 1.0, and 3.0% for 6 weeks and then main tained without treatment for an additional 8 weeks. Skin lightness was assessed weekly throughout the 14-week period with a chromameter and change in L -value plotted. DeoxyArbutin exhibited a dose-dependant skin lightening effect during treatment and recovery to base line within 8 weeks of halting of treatment. * $P < 0.05$ for each line compared to the vehicle treated control.

indicating that dA did not cause a mutagenic response. In the dose-range finding study, the maximum dose tested was 5000 mg per plate, and this dose was used. No positive responses were observed. No precipitate was seen with any tester strains, but toxicity was found with tester strain WP2 (pKM101). Therefore, under the test conditions, dA did not cause a positive response in the Ames test and the *E. coli* WP2 *uvrA* mutagenesis assay. In the up/down oral toxicity study for LD₅₀, animal deaths occurred on day 1. The acute oral LD₅₀ was 1148 mg/kg for females [95% confidence interval (CI) of 843–1564 mg/kg] and 3068 mg/kg for males (95% CI of

2270–4146 mg/kg). The up/down intraperitoneal LD₅₀ assay for dA indicated an acute intraperitoneal LD₅₀ of 367 mg/kg in males (95% CI of 264–511 mg/kg) and 314 mg/kg in females (95% CI of 235–419 mg/kg). All deaths occurred by day 5. No significant toxicity was found for vehicle.

HRIPT demonstrated that the formulation caused a low level of irritation, presumably due to the occlusive nature of the patch. One subject showed indications of skin sensitization, but a rechallenge test confirmed the sensitization response to both the original product and the vehicle, but not for a 1.5% solution of dA in ethanol, indicating that the sensitization response was not due to dA. Dermal application of 3% dA in a cream vehicle for 28 days resulted in transient depression in weight gain in males and moderate to marked dermal irritation in females. The incidence of skin lesions (subacute dermal inflammation and epidermal hyperkeratosis and acanthosis) was slightly higher for the cream vehicle. No abnormalities were observed on organ weights or in hematological, serum, or

Table 1. Metabolites in guinea pig urine trough 8 days after topical application of deoxyarbutin (dA) or hydroquinone (HQ) for 4 days

Experiment number	dA-glucuronide	dA-sulfate	HQ-glucuronide + HQ-sulfate
1	57%	29%	5%
2	52%	30%	14%

urinalysis. Dermal application of dA in solvent vehicle produced no adverse effects clinically or on weight gain. Slight erythema was observed for all groups, with moderate levels at the higher dose only. Upon microscopic examination, chronic dermal inflammation and epidermal hyperkeratosis, and acanthosis, the photoirritation assay demonstrated no dermal reactions to any test mixtures at either the UVA irradiated or non-irradiated sites except for a very slight patchy erythema (grade of 1.0) at two sites with 1% dA and one with 50% dA. The responses were not indicative of photoirritation. The 8-MOP positive control resulted in moderate to severe erythema at the UVA irradiated sites in all animals. Slight erythema was observed at three times on two animals for the corresponding non-irradiated sites. In the Photoallergy assay, three out of 10 animals treated with 50% dA exhibited slight erythema at the irradiated challenge site at 24 and 48 h ($n=1$). One of 10-challenge sites shielded from UVA radiation had slight erythema at 24 and 48 h. Two of five animals in dA primary challenge control group (naïve site) had slight erythema at the UVA-treated site. No significant differences were observed in incidence or severity of the challenge reactions for the dA group sites treated with UVA and those shielded from UVA. There were no significant differences in incidence or severity of challenge reactions in the UVA sites in test and primary challenge control groups, indicating that dA was not a photoallergen. The musk ambrette positive control was a photoallergen, as evidenced by the increased incidence and severity of reactions (grades of 1.0–2.0) at the UVA sites in all five animals compared with non-UVA exposed challenge site.

Human clinical trial

A human clinical trial was performed to assess the skin lightening effect of dA. A 12-week paired

forearm test comparing 3% dA in a moisturizing cream with the placebo control on 50 panelists was performed. Panelists consisted of Group 1, 34 Caucasian and Group 2, 16 mixed ethnic individual with darker basal skin tone; who were assessed for change in overall skin lightness and reduction of solar lentigines. The 3% dA containing formulation significantly reduced skin color compared to the placebo in the total population and in the Caucasian subset (Table 2a). Basal skin tone of the pigmented subset was reduced by dA but not significantly compared to the placebo at the 12-week point (Table 2a). However, it should be noted that although skin lightened by 12 weeks in both groups, there was a concomitant lightening response to placebo (Discussion). Expert blind visual assessment of the improvement in solar lentigines from baseline to week 12 in both Group 1 and Group 2 indicated an improvement for the dA formula that was statistically significant for Group 1 but not statistically significant for Group 2 vs. placebo control (Table 2b).

Discussion

The central premise that underlies medicinal chemistry research asserts the existence of a causal relationship between structure of a molecule and its physiochemical properties. However, the relationship is seldom obvious and often difficult to discern. One approach to building a clear understanding of structural characteristics responsible for observed properties of a chemical substance is termed quantitative structure-activity relationships (QSAR). While there are many different techniques used in QSAR studies, all have the same general foundation. The structure of the molecule, or parts of the structure, is converted to numerical values. These values are then examined for correlations with observed properties of interest for a set of known compounds.

Table 2. Effect of topical deoxyarbutin (dA) treatment after 12 weeks on (a) change in overall skin lightness and (b) improvement in solar lentigines in a human clinical trial.

Population	Average baseline L*	dA	Placebo	P-value
a. Change in overall skin lightness (L* value) vs. baseline				
Total group ($n=50$)	62.07	3.33 ¹	3.13	0.04
Caucasian subset ($n=34$)	62.75	3.23	3.00	0.03
Dark skin subset ($n=16$)	60.60	3.57	3.46	0.29
b. Improvement in solar lentigines vs. baseline				
Caucasian subset ($n=34$)		1.0 ²	0.67	0.05
Dark skin subset ($n=16$)		2.0	1.35	0.08

¹Amount change from baseline (i.e. delta L).

²Average score (Materials and Methods).

High correlations found between the numerical form of the structural features, and the observed properties constitute structure-activity relationship. Quantitative aspect of the relationship found is based on the ability to then estimate property of interest for new compounds not involved in original set. Thus, if one has observed property data for a set of compounds of sufficient size and diversity, it is possible to develop a QSAR and then propose new structures and to obtain estimates on the property of interest for these proposed molecules, strictly on the basis of their structure. In our case, the competitive (active site binding) inhibition of mushroom tyrosinase, the resistance of the inhibitor to oxidation by tyrosinase (thus serving as an alternate substrate), and the ability of the molecule to penetrate skin were properties optimized.

To create effective and non-irritating tyrosinase inhibitors, a classic pharmacophore determination and subsequent optimization approach was used (21,22). Compounds were selected based on the above parameters, synthesized or purchased and then tested for their ability to competitively inhibit tyrosinase *in vitro*. Our preliminary *in vitro* screening of published actives revealed that arbutin and HQ were the most attractive candidates for further exploration. However, *in vivo* tests of molecules such as arbutin failed to show any skin lightening ability, despite its tyrosinase inhibition. The effect could not be attributed to metabolism, as the galactose-derived ultraArbutin (Scheme), with a large and non-hydrolyzable sugar attached, had a similar effect. An analysis of these molecules revealed that they both had very poor skin penetration ability, which to a first approximation may be correlated to their logP. The synthesis of many alternative sugar-coupled inhibitors demonstrated that **removal of pendant hydroxyls from the sugar backbone of both hexoses and furanoses results in molecules that were better at skin penetration than arbutin and ultraArbutin**. Thus a series of increasingly deoxygenated sugars was synthesized. **Removal of every hydroxyl group resulted in a series of per-deoxy sugars, the lead molecule of which has been named dA**. Interestingly, all of these **deoxysugars** retain arbutin's resistance to oxidation by tyrosinase, while steadily increasing both their skin-penetration ability and their binding affinity for the enzyme.

In addition, following the principles of pharmacophore minimization, a series of acyclic, even more simple, highly penetrating analogs were made. One example of this series of inhibitors is AcycloArbutin B. However, these smaller

DeoxyArbutin: a reversible tyrosinase inhibitor

molecules, while excellent at skin penetration, were quickly oxidized. Ultimately, by selecting for the three variables in the screening, after the synthesis and screening of about 80 compounds, dA surfaced as the optimal candidate molecule, with a 50 nM EC₅₀ in the mushroom tyrosinase assay.

Deoxyarbutin demonstrated effective inhibition with a K_i that was 10-fold lower than HQ, and 350-fold lower than arbutin itself. The rationale for the remarkable inhibition of dA relies on a combination of factors. The lipophilicity of the substrates is one factor. Deoxyarbutin has a clogP of 1.96 as compared to a -0.5 for arbutin; while the clogP for the oxidized substrates such as CyclohexylArbutin range as high as 3.6. Part of the effectiveness is found in its relatively rigid shape, because AcyclicArbutins had similar clogP's but were less resistant to both hydrolysis as well as oxidation. **However, it should be noted that when tyrosinase is uncoupled by inhibitors, it produces H₂O₂ that can be a bleaching agent for melanin (23), thus providing an additional mechanism resulting in depigmentation common for dA and HQ.**

When applied topically to a guinea pig model, dA demonstrated a more sustained lightening effect than HQ. In fact, HQ treatment of guinea pigs produced irritation; which results in moderate post-irritation hyperpigmentation that nullifies its lightening benefits. It has been reported that in human long-term HQ use can induce cutaneous damage manifested as scarring (12). Wounding of skin that results in scarring can cause a dysregulation of cutaneous cytokines (21) that can influence melanization by melanocytes and thus cause hyperpigmentation (22). The skin lightening effect of dA in our guinea pig model was also rapidly reversible. This is another benefit of dA over HQ because the latter has been associated with permanent damage of the melanocyte resulting in leukoderma similar to vitiligo (12). Hydroquinone has been reported to be readily oxidized either spontaneously or metabolically *via* tyrosinase into cytotoxic species causing oxidative damage to cells (24). **It should also be noted that the guinea pig has more sensitive skin than humans.** In the present study, daily vehicle treatment caused some mild irritation followed by darkening of the skin color (i.e. post-inflammatory hyperpigmentation). On the other hand, because dA inhibited tyrosinase competitively, melanogenesis was downregulated, overcoming the pigmentary consequence of vehicle treatment irritation.

The results of the clinical study demonstrated that dA provided a significant effect on overall

skin lightening and moderate resolution of solar lentigines in Caucasian subjects. We attribute these significant but modest effects to design/time of the study. The test period for our study was from November to February, a period when complexion coloration generally lightens in the Northern hemisphere. Therefore, dA probably was less effective in augmenting this natural lightening and may be more effective in summer months or in inhibiting to a better degree sun-induced tanning. Dark skinned subjects in our clinical study appeared minimally (i.e. not significantly) responsive to the effects of dA. It is possible that prolonged treatment or higher concentrations of dA will be needed for effective tyrosinase inhibition in more pigmented skin. Additional clinical tests are required to confirm these hypotheses.

In conclusion, we have demonstrated that our new tyrosinase inhibitor dA is effective *in vitro* and in a guinea pig model. Further development of dA may improve its effectiveness in human for use as a general skin lightener and/or to ameliorated lesions in hyperpigmentary disorders.

References

- Hearing V J, Jimenez M. Mammalian tyrosinase – The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem* 1987; 19: 1141–1147.
- Garcia-Borron J C, Solano F. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 162–173.
- King R A, Pietsch J, Fryer J P et al. Tyrosinase gene mutations in oculocutaneous albinism I (OCA1): definition of the phenotype. *Hum Genet* 2003; 113: 502–513.
- Jimbow K, Jimbow M. Chapter 42. Chemical, pharmacologic and physical agents causing hypomelanoses. In: Boissy R E, Hearing V J, King R A, Ortonne J-P, eds. *The Pigmentary System Physiology and Pathophysiology*. New York: Oxford University Press, 1998: 621–627.
- Arndt K, Fitzpatrick T. Topical use of hydroquinone as a depigmenting agent. *JAMA* 1965; 194: 965–967.
- Palumbo A, d'Ischia M, Misurata G, Protta G. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1073: 85–90.
- Cabanes J, Chazara S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46: 982–985.
- Sugai T. Clinical effects of arbutin in patients with chloasma (in Japanese). *Hifu (Skin Res)* 1992; 34: 522–529.
- Tomita K, Fukuda M, Kawasaki K. Mechanism of arbutin inhibitory effect on melanogenesis and effect on the human skin with cosmetic use. *Fragrance J* 1990; 6: 72–77.
- Halder R, Nordlund J J. Tropical treatment of pigmentary disorders. In: Nordlund J J, Boissy R E, Hearing V J, King R A, Ortonne J-P, eds. *The Pigmentary System Physiology and Pathophysiology*. New York: Oxford University Press, 1998: 969–975.
- Levin C Y, Maibach H. Exogenous ochronosis. An update on clinical features, causative agents and treatment options. *Clin Dermatol* 2001; 2: 213–217.
- Fernandes D. Hydroquinone – a harmful agent. *S Afr Med J* 2000; 90: 829.
- Whysner J, Verna L, English J C, Williams G M. Analysis of studies related to tumorigenicity induced by hydroquinone. *Regul Toxicol Pharmacol* 1995; 21: 158–176.
- Hard G C, Whysner J, English J C, Zang E, Williams G M. Relationship of hydroquinone-associated rat renal tumors with spontaneous chronic progressive nephropathy. *Toxicol Pathol* 1997; 25: 132–143.
- Joseph P, Klein-Szanto A J, Jaiswal A K. Hydroquinones cause specific mutations and lead to cellular transformation and *in vivo* tumorigenesis. *Br J Cancer* 1998; 78: 312–320.
- Wei C I, Huang T S, Fernando S Y, Chung K T. Mutagenicity studies of kojic acid. *Toxicol Lett* 1991; 59: 213–220.
- Draize J H. Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics: The Association of Food and Drug Officials of the United States, 1959.
- Ames B N, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 347–364.
- Stotts J. Planning, conduct and interpretation of human predictive sensitization patch tests. In: Drill V A, Lazar P, eds. *Current Concepts in Cutaneous Toxicity*. New York: Academic Press, 1980: 41–53.
- Conover W J, Iman R L. Rank transformation as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *Am Stat* 1981; 35: 124–133.
- Norris D A, Morelli J G, Fujita M. Melanocyte interactions in the skin. In: Nordlund J J, Boissy R E, Hearing V J, King R A, Ortonne J-P, eds. *The Pigmentary System Physiology and Pathophysiology*. New York: Oxford University Press, 1998: 123–133.
- Matsumoto K, Robb E, Warden G, Nordlund J. Hyperpigmentation of human skin grafted on to athymic nude mice: immunohistochemical study. *Br J Dermatol* 1996; 135: 412–418.
- Wood J M, Schallreuter K U. Studies on the reactions between human tyrosinase, superoxide anion, hydrogen peroxide and thiols. *Biochim Biophys Acta* 1991; 6: 378–385.
- DeCaprio A P. The toxicology of hydroquinone – relevance to occupational and environmental exposure. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29: 283–330.



Contents lists available at ScienceDirect
Regulatory Toxicology and Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yrtph



Official report

Opinion of the Scientific Committee on Consumer safety (SCCS) –
Opinion on the safety of the use of deoxyarbutin in cosmetic products



SCCS^{a,*}, Gisela H. Degen^{b,1}

^a SCCS Secretariat at the European Commission, Directorate General for Health and Food Safety, 11, rue E. Ruppert, L-2920, Luxembourg, Luxembourg

^b Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors (IfADO), Dortmund, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2015

Accepted 17 November 2015

Available online 2 December 2015

Keywords:

SCCS

Scientific opinion

Deoxyarbutin

Tetrahydropyranyloxy phenol

Regulation 1223/2009

CAS: 53936-66-4

ABSTRACT

Conclusion of the opinion: Although on the basis of the provided scientific data the use of deoxyarbutin as such can be considered safe for consumers in cosmetic products in a concentration up to 3% in face creams, hydroquinone will be formed at levels which raise concerns with regard to the safety of such products during life-cycle of the product (e.g. storage conditions and stability under in-use conditions). Therefore, the overall conclusion of the SCCS is that the use of deoxyarbutin up to 3% in face creams is not safe.

© 2015 Published by Elsevier Inc.

Opinion to be cited as: SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on deoxyarbutin – Tetrahydropyranyloxy Phenol, 25 June 2015, SCCS/1554/15.

Authors of the Opinion

SCCS members: Dr. U. Bernauer, Prof. P.J. Coenraads, Prof. G. H. Degen (chairperson and rapporteur), Prof. M. Dusinska, Dr. W. Lijbenblum, Dr. E. Nielsen, Prof. T. Platzek, Dr. S.C. Rastogi, Dr. Ch. Rousselle, Dr. J. van Benthem.

Former SCCS member: Prof. E. A. Luch.

External experts: Prof. A. Bernard, Prof. A.M. Giménez-Arnau, Prof. T. Vanhaecke, Dr. J. Ezendam, Prof. J. Duus-Johansen, Dr. E. Mikova, Dr. E. Panteri.

SCCS Number: SCCS/1554/15.

DOI:

Adopted on: 25 June 2015.

Link to the SCCS Opinion:

http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_183.pdf.

Deoxyarbutin CAS n. 53936-66-4 (4-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]phenol) with INCI name Tetrahydropyranyloxy Phenol is a skin lightening agent synthesised through removal of hydroxyl

groups from the glucose side-chain of β -arbutin.

In the first opinion (SCCP/1158/08) on β -arbutin adopted on 15th April 2008 the SCCP raised concerns with other substances resulting in the release and/or formation of hydroquinone.

However, Hydroquinone (CAS 123-31-9) is listed in Annex II/1339 of the Cosmetic Regulation No 1223/2009; therefore it is banned as cosmetic ingredient with the exception of entry 14 in Annex III. It is only permitted for professional use in artificial nail systems in a concentration in the final product up to 0.02%. Since Hydroquinone could not be used as a skin whitener after introduction of a ban, other substances have been used for that purpose, including Arbutin.

A dossier on the related substance, deoxyarbutin, was submitted to the European Commission by Girindius AG in 2008.

Although on the basis of the provided scientific data the use of deoxyarbutin as such can be considered safe for consumers in cosmetic products in a concentration up to 3% in face creams, hydroquinone will be formed at levels which raise concerns with regard to the safety of such products during life-cycle of the product (e.g. storage conditions and stability under in-use conditions).

* Corresponding author.
E-mail address: SANTE-C2-SCCS@ec.europa.eu (SCCS).

¹ Rapporteur of the Opinion.