



Uji Aktivitas Antioksidan dan Daya Hambat Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol *Azolla filiculoides* Lam.

(Study of antioxidant activity and tyrosinase inhibitor of ethanol extract of *Azolla filiculoides* Lam.)

Bayu Febram Prasetyo*

Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB, Jl. Raya Dramaga, Babakan, Kec. Dramaga, Kota Bogor, Jawa Barat

ABSTRACT: *Azolla* (*Azolla filiculoides* Lam.) is an aquatic fern of the *Salviniaceae* family. *Azolla filiculoides* used as natural feed that are abundantly available in nature but have not been optimally utilized. *Azolla* could be symbiotized with *Cyanobacteria*. *Azolla* has bioactive compounds as antioxidants and tyrosinase inhibitors. The purpose of this study was to measure antioxidant activity by DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazin) and tyrosinase inhibitor from ethanol extract of *Azolla filiculoides* by ELISA method in vitro with L-tyrosine and L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) substrate. Extraction by maceration method and using 96% ethanol as solution. The result of phytochemical analysis showed that *azolla* extract contains flavonoid, tannins, saponins, steroids and triterpenoids. The phytochemical compounds potentially as antioxidants and tyrosinase inhibitor, particularly flavonoid and tannin compounds. Antioxidant activity assay showed that the ethanol extract of *Azolla filiculoides* was strong with IC_{50} 23.00 ppm. Tyrosinase inhibitor activity assay showed that tyrosinase inhibition activity on diphenolase activity (IC_{50} 996.60 ppm) more effective than monophenolase activity (IC_{50} 1893.09 ppm).

Keywords: antioxidant activity; *azolla filiculoides*; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazin; DPPH; tyrosinase.

ABSTRAK: *Azolla* (*Azolla filiculoides* Lam.) merupakan tanaman paku air dari famili *Salviniaceae*. *Azolla filiculoides* digunakan sebagai pakan alami dengan ketersediaannya melimpah di alam yang belum termanfaatkan secara optimal. Tanaman ini dapat bersimbiosis dengan *Cyanobacteria*. *Azolla* memiliki senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai antioksidan dan inhibitor tirosinase. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil 1-pikrihidrazil) dan daya hambat tirosinase pada ekstrak etanol *Azolla filiculoides* menggunakan metode ELISA secara in vitro dengan substrat L-tirosin dan L-DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin). Ekstraksi menggunakan metode maserasi dan pelarut etanol 96%. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Azolla* mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid. Kandungan fitokimia tersebut berpotensi sebagai antioksidan dan inhibitor tirosinase, terutama senyawa flavonoid dan tanin. Uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Azolla filiculoides* memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 23.00 ppm. Uji aktivitas inhibisi tirosinase ekstrak *azolla* menunjukkan daya hambat yang lebih efektif pada aktivitas diphenolase (IC_{50} 996.60 ppm) dibandingkan aktivitas monophenolase (IC_{50} 1893.09 ppm).

Kata kunci: aktivitas antioksidan; *azolla filiculoides*; 2,2-difenil 1-pikrihidrazil; DPPH; tirosinase.

Pendahuluan

Faktor lingkungan yang menjadi sumber eksogen dari produksi radikal bebas seperti stres, radiasi ozon, polusi, pestisida dan bahan kimia industri dapat menyebabkan kerusakan molekul, protein, lipid, RNA, DNA pada tubuh [1,2]. Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan oksidatif secara seluler sehingga melemahkan sistem pertahanan tubuh dan berbagai kerusakan seperti diabetes, kanker, radang sendi, arteriosklerosis, penyakit neuro degeneratif dan penuaan dini [2,3].

Azolla merupakan pteridopita akuatik yang terdistribusi hidup di daerah tropis, subtropis atau

daerah bertemperatur lembab. *Azolla* adalah kelompok tanaman paku air yang berasal dari famili *Azollaceae*. Secara tradisional *Azolla* biasa digunakan sebagai pupuk hayati karena mampu memperbaiki nitrogen di atmosfer. *Azolla* juga dimanfaatkan sebagai pakan ternak, obat-obatan, bahan bakar hidrogen, produksi biogas, pemurni air dan pengontrol gulma [4,5]. *Azolla filiculoides* Lam. memiliki kandungan protein yang tinggi dengan asam amino esensial yang lengkap terutama lisin, treonin, triptofan, dan metionin. *Azolla* hidup secara bersimbiosis

Article history

Received: 03 August 2020

Accepted: 22 April 2021

Published: 30 April 2021

Access this article



*Corresponding Author: Bayu Febram Prasetyo

Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB, Jl. Raya Dramaga, Babakan, Kec. Dramaga, Kota Bogor, Jawa Barat, 16680 | Email: febram1977@gmail.com

dengan *Cyanobacteria (Anabaena azollae)* [6] yang memiliki kandungan beta-karoten, sehingga memungkinkan bahwa *Azolla filiculoides* Lam. berpotensi sebagai antioksidan dalam melindungi tubuh dari radikal bebas [7].

Tumbuhan memiliki metabolisme yang mampu mensintesis zat aktif biologis sebagai bentuk pertahanan dalam melindungi diri dari serangan seperti hama, serangga, jamur, bakteri dan patogen tumbuhan lainnya [5]. Zat aktif biologis atau senyawa biokimia tersebut memiliki berbagai manfaat bagi manusia. Kandungan senyawa biokimia pada tumbuhan dapat menjadi sumber antioksidan alami bagi manusia dan mengurangi resiko berbagai penyakit, dimana dapat diperoleh dari biji-bijian, buah-buahan, sayuran dan lainnya [1].

Berbagai jenis azolla diketahui memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami. Salah satunya kandungan fitokimia yang terdapat dalam *Azolla microphylla* yaitu tinggi akan kandungan tanin, steroid, fenol dan antrakuinon yang diketahui memiliki potensi sebagai agen antioksidan yang baik [8]. Pada produk-produk kosmetik saat ini dibutuhkan bahan kosmetik yang memiliki antioksidan yang baik serta memberikan efek mencerahkan. Salah satu enzim yang berperan dalam pigmentasi pada kulit yaitu enzim tirosinase, dimana enzim ini bertanggung jawab terhadap penggelapan kulit dan rambut serta berperan penting melawan kerusakan kulit akibat sinar ultraviolet (UV) [9].

Saat ini terdapat banyak inhibitor tirosinase yang memiliki karakteristik yang baik seperti hidrokuinon, arbutin, asam kojat, asam azelaic dan asam L-askorbat. Hidrokuinon menjadi agen paling populer untuk menangani hiperpigmentasi karena mampu menghambat aktivitas tirosinase. Namun senyawa ini memiliki efek samping seperti iritasi kulit, toksisitas, mutagenesis, karsinogenisitas. Senyawa fenolik dan flavonoid memiliki kapasitas untuk melindungi kulit dari kerusakan DNA akibat UV pada keratinosit. Hal ini disebabkan karena senyawa fenolik dan flavonoid memiliki kemiripan struktur dengan tirosin yang berfungsi sebagai penghambat aktivitas tirosinase [10]. Antioksidan dan kemampuan sebagai inhibitor tirosinase dari tumbuhan dapat menjadi strategi alternatif mengatasi permasalahan kulit seperti hiperpigmentasi. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan skrining fitokimia, aktivitas antioksidan hingga inhibitor tirosinase dari bahan alami yaitu *Azolla filiculoides* Lam.

Metode Penelitian

Bahan

Azolla filiculoides Lam. (Bantul DI Yogyakarta, Indonesia telah dideterminasi di LIPI Pusat Penelitian

Biologi dengan nomor 167/IPH.1.01/If.07/II/2020), vitamin C (Pusat Studi Biofarmaka, Indonesia), etanol 96% (Bratachem, Indonesia), asam kojat (Pusat Studi Biofarmaka, Indonesia), reagen uji fitokimia (Pusat Studi Biofarmaka, Indonesia), L-DOPA, L-Tyrosine dan 2,2-difenil 1-pikrihidrasil (DPPH) (Pusat Studi Biofarmaka, Indonesia nomor sertifikat 405.035/LPSB IPB/II/19).

Cara Kerja

Azolla filiculoides direndam dalam air yang berisi pupuk kandang hingga *Azolla* menjadi segar. *Azolla* didiamkan hingga tidak ada air yang menetes. *Azolla* segar diekstraksi, evaporasi dan dilakukan pengujian skrining fitokimia serta uji aktivitas antioksidan dan daya hambat enzim tirosinase.

Prosedur Kerja

Pembuatan Ekstrak *Azolla filiculoides* Lam.

Metode ekstraksi menggunakan metode maserasi yang mengacu pada [11]. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% selama 3 hari (3x24 jam) dengan pergantian pelarut setiap harinya. Perbandingan simplisia dan pelarut yang digunakan adalah 1:10. Filtrat yang diperoleh dievaporasi dengan *Rotary Evaporator vacuum Dlab Re 100S* (Beijing, China) pada suhu 40 °C dan tekanan 30 mbar hingga didapatkan ekstrak kering *Azolla filiculoides* Lam..

Pengujian fitokimia [12]

Identifikasi Alkaloid.

Sebanyak 1 gram ekstrak ditetesi NH₃ kemudian dihaluskan dan ditambahkan 5 ml CHCl₃ lalu disaring. Filtrat ditambahkan H₂SO₄ 2M hingga terbentuk lapisan asam. Lapisan dibagi 3 bagian yaitu ditambahkan dengan reagen Dragendrof (jika positif berwarna jingga), reagen Mayer (jika positif berwarna putih) dan reagen Wagner (jika positif berwarna coklat).

Identifikasi Flavonoid, Tanin dan Saponin.

Sebanyak 5 gram ekstrak ditambahkan akuades dan dipanaskan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat dibagi 3 bagian untuk uji flavonoid, tanin dan saponin. Uji flavonoid yaitu ekstrak ditambahkan serbuk Mg, HCl:Etanol (1:1) dan amil alkohol. Uji positif jika berwarna jingga. Uji tanin yaitu ekstrak ditetesi FeCl₃ 10% dan uji positif jika berwarna hitam kehijauan. Uji saponin yaitu ekstrak dikocok dan uji positif jika berbuih secara stabil.

Identifikasi Hidrokuinon.

Sebanyak 1 gram ekstrak ditambahkan metanol dan dipanaskan. Ekstrak disaring dan ditambahkan 3 tetes NaOH 10%. Uji positif jika berwarna merah.

Identifikasi Triterpenoid dan Steroid.

Sebanyak 1 gram ekstrak ditambahkan etOH (etil alkohol) panas, disaring dan dipanaskan hingga kering. Ekstrak ditambahkan 1 ml dietil eter dan dihomogenkan, lalu ditambahkan 1 tetes H₂SO₄ dan 1 tetes CH₃COOH anhidrat. Uji positif jika berwarna merah atau ungu (triterpenoid) dan berwarna hijau atau biru (steroid).

Pengujian Aktivitas Antioksidan Metode DPPH [13] Pembuatan Larutan DPPH.

Pembuatan stok DPPH 125 µM dibuat dengan melarutkan 2.5 mg DPPH dengan etanol di dalam labu dan diukur hingga 50 ml. Labu ukur dilapisi dengan aluminium foil.

Pembuatan Larutan Sampel dan Pembanding.

Preparasi sampel dan vitamin C sebagai larutan pembanding yaitu masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg. Sampel dan vitamin C dilarutkan dengan dimetil sulfoksida (DMSO) sebanyak 1 ml, kemudian sampel disonikasi dengan Probe Sonicator Ultrasonic Homogenizer (Biologics, USA) hingga larut dan divorteks dengan Vortex 2 (IKA, Malaysia). Sampel dibuat dengan konsentrasi 10, 50, 100, 150 dan 200 ppm. Sampel dan vitamin C dimasukkan ke dalam *microplate* sebanyak 100µL. Sampel ulangan satu dan dua ditambahkan DPPH sebanyak 100 µL, kontrol negatif ditambahkan etanol sebanyak 100 µL. *Microplate* diinkubasi dengan Oven 125 Basic Dry (IKA, Malaysia) pada suhu ruang (kondisi gelap) selama 30 menit, kemudian diukur dengan pengukuran ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) dengan NS-100 *Nano Scan Microplate Reader* (Hercuvan, United Kingdom) pada panjang gelombang 517 nm. Persentase inhibisi dihitung dengan rumus:

$$\text{Inhibisi (\%)} = ((\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}) / \text{Absorbansi Blanko}) \times 100\%$$

Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi $y = a(x) + b$. Konsentrasi sampel sebagai absis (sumbu X) dan nilai persen inhibisi antioksidan sebagai ordinatnya (sumbu Y). Persamaan regresi digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration 50%*) yaitu besarnya konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan dalam mereduksi radikal bebas DPPH sebesar 50% [14].

Penentuan Aktivitas Inhibitor Tirosinase [15]

Larutan ekstrak induk dengan konsentrasi 20 mg mL⁻¹ dibuat dengan 2 mg ekstrak kental dilarutkan dalam 1 ml dimetil sulfoksida (DMSO). Konsentrasi ekstrak yang

digunakan 31.25-2000 ppm dengan pengenceran larutan induk dalam buffer natrium fosfat (50 µM dan pH 6.5). Kontrol positif yang digunakan asam kojat (konsentrasi 7.56-500 ppm). Ekstrak berbagai konsentrasi sebanyak 70 µL dimasukkan ke dalam *microplate* dan ditambahkan 30 µL enzim tirosinase dari *Azolla*. *Plate* disimpan dalam ruang inkubasi (37 °C) selama 5 menit. Kemudian substrat (2 µM L-tirosin dan 12 µM L-3,4-*dihydroxyphenylalamine* atau L-DOPA) sebanyak 110 µL ditambahkan ke *microplate* dan disimpan dalam ruang inkubasi selama 30 menit.

Nilai absorbansi tiap sumur *microplate* ditentukan menggunakan *multi-well reader* pada panjang gelombang 492 nm. Konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat setengah dari aktivitas tirosinase ditentukan dengan membandingkan absorbansi sampel tanpa penambahan ekstrak. Persentase aktivitas tirosinase dihitung dengan rumus:

$$\text{Inhibisi (\%)} = ((\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}) / \text{Absorbansi Blanko}) \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ dari persamaan regresi linier antara % inhibisi (sumbu Y) dan konsentrasi ekstrak (sumbu X), persamaan regresi sebagai berikut:

$$Y = a + bx$$

Keterangan : Y : variabel dependen
x : variabel independen
a : konstanta
b : koefisien regresi

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif menggunakan *software Microsoft Excel 2013*.

Hasil dan Diskusi

Pengujian fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi jenis senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak *Azolla filiculoides* Lam.. Pengujian dilakukan secara kualitatif berdasarkan visualisasi warna dan endapan yang ditunjukkan pada [Tabel 1](#).

Berdasarkan hasil pemeriksaan fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Azolla filiculoides* Lam. mengandung flavonoid, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid, sedangkan kandungan fitokimia alkaloid dan kuinon tidak ditemukan pada ekstrak *Azolla* ditunjukkan pada [Tabel 1](#). Pada hasil pemeriksaan fitokimia menunjukkan hampir semua golongan senyawa ditemukan pada ekstrak. Suatu ekstrak dapat menunjukkan profil fitokimia yang

Tabel 1. Kandungan senyawa fitokimia ekstrak azolla (*Azolla filiculoides* Lam.)

Golongan Senyawa	Hasil
Flavonoid	+
Alkaloid	-
Tanin	+
Saponin	+
Quinon	-
Steroid	+
Triterpenoid	+

Keterangan : (+) ada senyawa metabolit, (-) tidak ada senyawa metabolit

beragam berdasarkan dengan pelarut dan jenis media yang digunakan pada saat proses ekstraksi. Hal ini menunjukkan bahwa pemilihan metode dan pelarut menjadi salah satu faktor penting yang mempengaruhi hasil pemeriksaan fitokimia [16]. Pelarut etanol merupakan pelarut yang diizinkan untuk digunakan pada proses ekstraksi selain air dan campuran etanol-air. Pelarut etanol memiliki dua bagian gugus berbeda yaitu gugus -OH yang bersifat polar dan CH₂CH₃ yang bersifat non polar [17]. Kedua sifat tersebut memungkinkan etanol dalam menarik senyawa lebih banyak.

Flavonoid merupakan metabolit sekunder golongan polifenol alami yang banyak ditemukan pada tumbuhan seperti daun, biji, kulit kayu dan bunga. Flavonoid diketahui memiliki banyak manfaat sebagai obat yaitu untuk penyakit kanker, antioksidan, antibakteri, antiradang, disfungsi kardiovaskular dan luka karena radikal bebas [18]. Flavonoid dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan mikroba [19].

Tanin diketahui memiliki aktivitas antimikroba dan antioksidan, serta potensial sebagai agen sitotoksik dan antineoplastik [19]. Saponin juga memiliki sifat sebagai anti jamur. Steroid juga diketahui memiliki aktivitas kardiotonik dan sifat insektisida serta antimikroba. Kandungan fitokimia seperti flavonoid, terpenoid, steroid dan lainnya memiliki sifat farmakologis yang beragam termasuk

aktivitas antioksidannya. Senyawa fenol memiliki aktivitas antioksidan, anti diabetes, anti karsinogenik, anti mikroba, anti alergi, anti mutagenik dan anti inflamasi.

Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol azolla dianalisis menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrasil) dengan nilai IC₅₀ (Inhibitor Concentration 50%) dan vitamin C digunakan sebagai kontrol positif pada uji ini. Hasil analisis aktivitas antioksidan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa ekstrak etanol azolla memiliki nilai IC₅₀ sebesar 23.00 ppm. Ekstrak etanol azolla memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Suatu senyawa yang dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ <10 ppm, kuat jika nilai IC₅₀ 10 hingga 50 ppm, sedang jika nilai IC₅₀ >50 hingga 100 ppm, lemah jika nilai IC₅₀ 100 hingga 250 ppm, dan tidak ada jika nilai IC₅₀ >250 ppm [20]. Semakin besar nilai IC₅₀ menunjukkan semakin lemah aktivitas antioksidan dalam mereduksi radikal bebas, dan sebaliknya jika semakin kecil nilai IC₅₀ menunjukkan semakin kuat aktivitas antioksidan yang dimiliki.

Penelitian yang dilakukan [19] menunjukkan bahwa ekstrak *Azolla pinnata* memiliki aktivitas dalam mengeliminasi radikal bebas. Hal ini pun ditunjukkan pada hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak *Azolla filiculoides* Lam. menggunakan metode DPPH yang berpotensi dalam

Tabel 2. Nilai *Inhibitor Concentration* 50% (ppm) ekstrak etanol *Azolla filiculoides* Lam.

Sampel	IC ₅₀ (ppm)
Vitamin C	2.59
Ekstrak <i>Azolla filiculoides</i> Lam.	23.00

Keterangan : IC₅₀ (ppm) : *Inhibitor Concentration* 50% (part per millions)

menangkal stres oksidatif. Zat kimia DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil) merupakan radikal bebas yang berpusat pada nitrogen organik dengan pita penyerapan maksimum sekitar 515-528 nm (517 nm) dalam larutan alkohol. Saat menerima atom elektron atau hidrogen, DPPH menjadi molekul diamagnetik yang stabil. Efek antioksidan terhadap radikal DPPH yaitu karena kemampuan dalam mendonorkan atom hidrogen [19].

Kemampuan flavonoid sebagai senyawa antioksidan dikarenakan sifatnya sebagai akseptor yang baik terhadap radikal bebas [21], begitu juga dengan tanin yang mampu menangkap radikal bebas secara efektif dengan mendonor elektron atau atom hidrogen [22]. Senyawa fenolik diketahui memiliki sifat antioksidan yang terbentuk dalam kondisi stres. Kondisi lingkungan memainkan peran penting dalam terbentuknya metabolit sekunder terutama yang diakibatkan oleh faktor stres [5].

Spesies oksigen reaktif (ROS) mencakup beberapa yaitu hidrogen peroksida, radikal hidroksil, nitrat oksida, anion superoksida, peroksinitrit dan beberapa lainnya yang mampu memicu proses degeneratif dalam tubuh. Senyawa seperti asam fenolat, polifenol dan flavonoid dari tumbuhan memiliki kemampuan sebagai antioksidan, karena mampu untuk mengais *reactive oxygen species* (ROS) yang menghasilkan radikal bebas [23].

Aktivitas Inhibitor Tirosinase

Kandungan fitokimia pada ekstrak *Azolla filiculoides* Lam. juga memiliki potensi sebagai inhibitor tirosinase yang ditunjukkan pada hasil uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase yang ditunjukkan pada Tabel 3.

Aktivitas inhibitor tirosinase dilakukan dengan pengujian inhibisi enzim tirosinase secara *in vitro* menggunakan substrat L-tirosin dan L-DOPA. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa bioaktif pada ekstrak *Azolla filiculoides* Lam. dalam menghambat enzim tirosinase. Enzim tirosinase merupakan enzim yang terlibat dalam biosintesis melanin dalam melanosit, dimana pigmen melanin diproduksi melalui proses melanogenesis. Hal ini menjadikan enzim

tirosinase sebagai enzim pembatas laju sintesis melanin [10]. Penghambatan aktivitas enzim tirosinase (mengkatalis reaksi monophenolase dan diphenolase) ditunjukkan dengan menurunkan sintesis melanin [24].

Hasil analisis aktivitas inhibitor tirosinase menunjukkan bahwa ekstrak etanol azolla memiliki nilai IC_{50} diphenolase sebesar 996.60 ppm dan monophenolase sebesar 1893.09 ppm, sedangkan pada asam kojat nilai IC_{50} diphenolase sebesar 62.79 ppm dan monophenolase sebesar 31.73 ppm. Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi yang mampu menghambat 50% aktivitas enzim tirosinase. Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan bahwa senyawa semakin berpotensi sebagai inhibitor tirosinase [25]. Namun berdasarkan hasil uji nilai IC_{50} asam kojat lebih kecil dibandingkan dengan nilai IC_{50} ekstrak azolla. Asam kojat merupakan salah satu inhibitor tirosinase yang baik dan digunakan sebagai kontrol positif pada uji ini [10]. Suatu senyawa yang dikatakan memiliki aktivitas inhibitor aktif jika nilai $IC_{50} < 1000$ ppm, sedangkan inhibitor tidak aktif jika nilai $IC_{50} > 1000$ ppm [26]. Berdasarkan hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak azolla merupakan inhibitor aktif tirosinase pada aktivitas diphenolase jika dibandingkan dengan aktivitas monofenolase.

Tirosinase atau polifenol oksidase adalah enzim yang mengandung tembaga glikosilasi yang terdapat pada organisme seperti hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Tirosinase mengkatalisis dua reaksi utama yaitu ortohidroksilasi L-tirosin menjadi L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) yang disebut aktivitas monofenolase dan oksidasi L-DOPA menjadi dopaquinon yang disebut aktivitas difenolase. Kedua hasil reaksi tersebut diubah menjadi produk akhir yaitu melanin [9].

Salah satu faktor eksternal pada gangguan kulit yaitu radiasi ultraviolet yang dapat menyebabkan hiperpigmentasi, kanker dan imunomodulasi. Paparan berulang radiasi UV dapat mengaktifkan sintesis melanin sehingga meningkatkan kandungan melanin pada kulit. Selain itu, UV juga mampu menginduksi stres oksidatif yang dapat menginduksi kerusakan DNA dalam keratinosit dan mengaktifkan p53 yang merangsang ekspresi gen

Tabel 3. Uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase.

Sampel	IC_{50} (ppm)	
	Diphenolase	Monophenolase
Asam kojat	62.79	31.73
Ekstrak <i>Azolla filiculoides</i> Lam.	996.60	1893.09

Keterangan : IC_{50} (ppm) : *Inhibitor Concentration* 50% (part per millions)

opiomelanocortin lalu menghasilkan hormon perangsang melanosit α (α -MSH), hormon adrenokortikotropik dan β -endorphin [10].

Kandungan flavonoid pada ekstrak *Azolla filiculoides* mampu mengkelat ion logam sehingga mampu mencegah terjadinya reaksi redoks yang menghasilkan senyawa radikal bebas. Kemampuan flavonoid dalam depigmentasi kulit dengan cara menghambat aktivitas tirosinase pada proses melanogenesis [27]. Selain flavonoid, metabolit sekunder lain yang memiliki aktivitas inhibitor tirosinase yaitu tanin [28]. Tanin merupakan senyawa polifenol yang memiliki peran sebagai antioksidan dan inhibitor tirosinase [22]. Selain itu kandungan steroid juga diketahui sebagai inhibitor tirosinase yang baik. Kandungan fitokimia yang terdapat pada ekstrak *Azolla filiculoides* Lam. terutama senyawa flavonoid memungkinkan mampu melindungi kulit dari radikal bebas dan menjaga kulit dari hiperpigmentasi.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak etanol *Azolla filiculoides* Lam. adalah flavonoid, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid. Aktivitas antioksidan ekstrak *Azolla filiculoides* Lam. tergolong kuat dengan nilai IC_{50} yaitu 23.00 ppm. Aktivitas inhibitor tirosinase ekstrak *Azolla filiculoides* Lam. lebih aktif pada aktivitas diphenolase dibandingkan pada aktivitas monophenolase.

Referensi

- [1]. Khan MA, Rahman AA, Islam S, Khandokhar P, Parvin S, Islam MB, et al. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Res Notes*. 2013;6(1):24. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-24>
- [2]. Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*. 2019;24(22):14–6. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>
- [3]. Khan MA, Rahman MM, Sardar MN, Arman MSI, Islam MB, Khandakar MJA, et al. Comparative investigation of the free radical scavenging potential and anticancer property of *Diospyros blancoi* (Ebenaceae). *Asian Pac J Trop Biomed*. 2016;6(5):410–7. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.03.004>
- [4]. Masood A, Shah NA, Zeeshan M, Abraham G. Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla* (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculoides*). *EEB*. 2006;58(1–3):216–22. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.08.002>
- [5]. College VOC. Phytochemical and biochemical profiles of *Azolla microphylla* cultured with organic manure. *IJCAR*. 2015;4(8):131–3.
- [6]. Leterme P, Londoño AM, Muñoz JE, Suárez J, Bedoya CA, Souffrant WB, et al. Nutritional value of aquatic ferns (*Azolla filiculoides* Lam. and *Salvinia molesta* Mitchell) in pigs. *Anim Feed Sci Technol*. 2009;149(1–2):135–48. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.04.013>
- [7]. Asiah N, Sembodo R, Prasetyaningum A. Aplikasi metode foam-mat drying pada proses pengeringan spirulina. *J Teknol Kim dan Ind*. 2012;1(1):461–7. Available from: <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jtki>
- [8]. Abraham G, Aeri V. A preliminary examination of the phytochemical profile of *Azolla microphylla* with respect to seasons. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012;S1392–5. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60423-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60423-7)
- [9]. Guillen Quispe YN, Hwang SH, Wang Z, Lim SS. Screening of Peruvian medicinal plants for tyrosinase inhibitory properties: Identification of tyrosinase inhibitors in *Hypericum laricifolium* juss. *Molecules*. 2017;22(3):1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules22030402>
- [10]. Chatatikun M, Supjaroen P, Promlat P, Chantarangkul C, Waranuntakul S, Nawarat J, et al. Antioxidant and tyrosinase inhibitory properties of an aqueous extract of *Garcinia atroviridis* Griff. ex. T. Anderson fruit pericarps. *Pharmacogn J*. 2020;12(1):71–8. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.12>
- [11]. Candra Eka Setiawan N, Febriyanti A. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi-fraksi umbi *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr dengan metode DPPH. 2017;1(1):1–5.
- [12]. Harborne JB. *Phytochemical methods*. First. New York: Chapman and Hall; 1973. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7>
- [13]. Salazar-Aranda R, Pérez-López LA, López-Arroyo J, Alanís-Garza BA, Waksman De Torres N. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2011;1–6. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep127>
- [14]. Chandra B, Sari RP, Misfadhila S, Azizah Z, Asra R. Skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kemangi (*Ocimum tenuiflorum* L.) dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *J Pharm Sci*. 2019;2(2):1–8. <https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v2i2.20>
- [15]. Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T, Rahminiawati M, Djauhari E. Potency of Indonesian medicinal plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. *J Biol Sci*. 2010;10(2):138–44. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.138.144>
- [16]. Azis T, Febrizky S, Mario AD. Pengaruh jenis pelarut terhadap persen yield alkaloid dari daun dalam India (*Murraya Koenigii*). *Tek Kim*. 2014;20(2):1–6.
- [17]. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Parameter standar umum ekstrak tanaman obat. Vol. 1, Departemen Kesehatan RI. Hal. Jakarta; 2000.
- [18]. Arifin B, Ibrahim S. Struktur, bioaktivitas dan antioksidan flavonoid. *J Zarah*. 2018;6(1):21–9. <https://doi.org/10.31629/zarah.v6i1.313>
- [19]. Thiripurasundari B PE. Preliminary Phytochemical Screening and Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Azolla pinnata*. *Int J Recent Sci Res*. 2018;9(5):26924–30. <https://doi.org/10.24327/IJRSR>
- [20]. Phongpaichit S, Nikom J, Rungjindamai N, Sakayaroj J. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;51:517–25. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00331.x>
- [21]. Widyawati PS, Budianta TDW, Werdani YDW, Halim MO. Aktivitas antioksidan minuman daun beluntas teh hitam (*Pluchea indica* Less-Camelia sinensis). *AgriTech*. 2018;38(2):200–7. <https://doi.org/10.22146/agritech.25699>
- [22]. Pratama DA. Pengaruh fermentasi terhadap kandungan senyawa bioaktif dan aktivitas antioksidan buah baka merah (*Rhizophora stylosa* Griff.). Institut Pertanian Bogor; 2014.
- [23]. Nayak N, Padhy RN, Singh PK. Evaluation of antibacterial and antioxidant efficacy of the fern *Azolla caroliniana* symbiotic with the Cyanobacterium *Anabaena azollae*. *Proc Natl Acad Sci India Sect B-Biol Sci*. 2015;85(2):555–69. <https://doi.org/10.1007/s40011-014-0370-3>
- [24]. Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T, Aoki H, Rahminiawati M, Djauhari E, et al. Batubara et al. 2011.pdf. *J Biol Sci*. 2011;11(8):475–80. <https://doi.org/10.3923/jbs.2011.475.480>
- [25]. Hindun S, Rusdiana T, Abdasah M, Hindritiani R. Potensi limbah kulit jeruk nipis (*Citrus auronfolia*) sebagai inhibitor tirosinase. *Indones J Pharm Sci Technol*. 2017;4(2):64. <https://doi.org/10.15416/ijpst.v4i2.12642>

- [26]. Safithri M, Setyaningsih I, Tarman K, Yuhendri VM, Meydia M. Potensi kolagen teripang emas sebagai inhibitor tirosinase. *J Pengolah Has Perikan Indones*. 2018;21(2):295–303. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v21i2.23085>
- [27]. Charissa M, Djajadisastra J, Elya B. Uji Aktivitas Antioksidan dan Penghambatan Tirosinase serta Uji Manfaat Gel Ekstrak Kulit Batang Taya (*Nauclea subdita*) terhadap Kulit. *J Kefarmasian Indones*. 2017;6(2):98–107. <https://doi.org/10.22435/jki.v6i2.6224.98-107>
- [28]. Gazali M, P. Zamani N, Batubara I. Potensi limbah kulit buah nyirih *Xylocarpus granatum* sebagai inhibitor tirosinase. *Depik*. 2014;3(3):187–94. <https://doi.org/10.13170/depik.3.3.2153>



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