

## **Identifikasi Senyawa Aktif Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) sebagai Inhibitor Tirosinase**

*Identification of Active Compound from Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) as Tyrosinase Inhibitor*

**Willy Tirza Eden<sup>1\*</sup>, Clarissa Salshabila<sup>2</sup>, Senda Kartika Rakainsa<sup>1</sup> dan Sri Mursiti<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Negeri Semarang, Semarang, Indonesia

<sup>2</sup>Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Semarang, Indonesia

\*Corresponding author: [willytirzaeden@mail.unnes.ac.id](mailto:willytirzaeden@mail.unnes.ac.id)

**Diterima:** 11 Mei 2023; **Disetujui:** 18 November 2024; **Dipublikasi:** 9 Desember 2024

### **Abstrak**

Produksi melanin yang berlebih dapat menimbulkan bercak-bercak gelap pada kulit yang disebut hiperpigmentasi. Salah satu penanganan hiperpigmentasi melalui penghambatan sintesis melanin dengan mekanisme penghambatan enzim tirosinase. Beberapa senyawa alami yang dapat bertindak sebagai inhibitor tirosinase diantaranya polifenol, turunan *benzaldehyde*, *benzoate*, dan steroid. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa eceng gondok memiliki kandungan senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid dan steroid. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas inhibitor tirosinase dari bagian tumbuhan eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) melalui metode *bioassay-guided isolation* dan mengidentifikasi senyawa yang berperan sebagai inhibitor tirosinase melalui proses kromatografi. Hasil penelitian diperoleh aktivitas inhibitor tertinggi pada bagian daun eceng gondok dengan nilai persen inhibisi sebesar  $23,75 \pm 3,43\%$  dan persen inhibisi tertinggi pada bagian fraksi etil asetat dari ekstrak daun eceng gondok dengan nilai sebesar  $12,29 \pm 4,16\%$ . Ekstrak daun eceng gondok memiliki aktivitas inhibitor tirosinase tertinggi jika dibandingkan dengan ekstrak akar dan batang eceng gondok. Fraksi etil asetat dari ekstrak daun memiliki aktivitas lebih tinggi jika dibandingkan fraksi n-heksan dari ekstrak daun. Senyawa steroid dengan gugus fungsi  $-OH$ ,  $C-O$ ,  $-CH$  dan ikatan  $C=C$  yang terkandung dalam subfraksi etil asetat dari daun eceng gondok diduga merupakan senyawa yang berpotensi sebagai inhibitor tirosinase yang didukung dengan hasil positif terhadap penampak bercak *Liebermann-Burchard* dengan nilai  $R_f$  sebesar 0,54.

**Kata kunci:** *Bioassay-guided isolation*; *Eichhornia crassipes*; Inhibitor tirosinase; Hiperpigmentasi

### **Abstract**

*Excessive production of melanin can cause dark patches on the skin, which is called hyperpigmentation. One of the treatments for hyperpigmentation is inhibiting melanin synthesis with the mechanism of inhibition of the tyrosinase enzyme. Some natural compounds that can act as tyrosinase inhibitors include polyphenols, benzaldehyde derivatives, benzoates, and steroids. Previous research stated that water hyacinth contains flavonoids, alkaloids, tannins, terpenoids, and steroids. This research was conducted to determine the activity of tyrosinase*

*inhibitors from parts of the water hyacinth plant (Eichhornia crassipes (Mart.) Solms) through the bioassay-guided isolation method and to identify compounds that act as tyrosinase inhibitors through a chromatography process. The results showed that the highest inhibitory activity was in the water hyacinth leaf section with a percent inhibition value of  $23.75 \pm 3.43\%$  and the highest inhibition percentage in the ethyl acetate fraction of water hyacinth leaf extract with a value of  $12.29 \pm 4.16\%$ . Water hyacinth leaf extract had the highest tyrosinase inhibitor activity compared to water hyacinth root and stem extracts. The ethyl acetate fraction from the leaf extract had higher activity than the n-hexane fraction from the leaf extract. Steroid compounds with functional groups  $-OH$ ,  $C-O$ ,  $-CH$ , and  $C=C$  bonds contained in the ethyl acetate subfraction of water hyacinth leaves are thought to be compounds that have the potential to act as tyrosinase inhibitors, which are supported by positive results for the Liebermann-Burchard spot appearance with an  $R_f$  value of 0.54.*

**Keywords:** Bioassay-guided isolation; *Eichhornia crassipes*; Hyperpigmentation; Tyrosinase inhibitor

## 1. PENDAHULUAN

Produksi melanin yang berlebihan dapat menyebabkan munculnya bercak-bercak gelap pada kulit, yang dikenal sebagai hiperpigmentasi. Kondisi tersebut, tidak hanya dianggap sebagai masalah estetika tetapi juga meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang mengakibatkan kerusakan kulit (Pannindriya *et al.*, 2021). Salah satu penanganan hiperpigmentasi yaitu melalui penghambatan sintesis melanin menggunakan agen depigmentasi yang bekerja dengan mekanisme penghambatan aktivitas enzim tirosinase (Hindun *et al.*, 2017). Enzim tirosinase berperan sebagai katalis dalam dua reaksi yang berbeda dalam proses pembentukan melanin (melanogenesis) yaitu proses hidroksilasi tirosin menjadi L-DOPA dan oksidasi L-DOPA menjadi DOPA kuinon (Ripaldo & Sagala, 2020) yang selanjutnya akan dikonversi menjadi melanin melalui beberapa tahapan transformasi (Chang, 2009).

Beberapa agen depigmentasi yang dapat menghambat kerja enzim tirosinase diantaranya hidrokuinon dan asam kojat. Namun, penggunaannya dapat menimbulkan efek samping. Penggunaan hidrokuinon dalam jangka panjang dan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan iritasi kulit, rasa terbakar hingga risiko kanker kulit (Owolabi *et al.*, 2020). Sementara itu, penggunaan asam kojat dilaporkan memiliki potensi sensitisasi yang tinggi dan dapat menyebabkan dermatitis kontak iritan (Soyata & Chaerunisaa, 2021). Oleh karena itu, diperlukan agen depigmentasi kulit yang bersifat alami dengan efek samping rendah. Chang (2009) mengelompokkan inhibitor tirosinase menjadi lima kelas utama, yaitu polifenol, turunan benzaldehida dan benzoat, lipid rantai panjang dan steroid. Inhibitor tirosinase yang bersumber dari tumbuhan diharapkan memiliki toksisitas yang lebih rendah dan meminimalisir efek yang tidak diinginkan terhadap lingkungan.

Eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) merupakan salah satu tumbuhan gulma yang dapat merusak perairan (Sidharta *et al.*, 2021) dan dianggap sebagai tanaman air yang memiliki pertumbuhan dan penyebaran paling cepat di dunia dengan pertumbuhan yang padat (Rufchaei *et al.*, 2021). Pertumbuhan eceng gondok yang sangat cepat dan tidak terkendali dapat mengakibatkan banyak kerugian diantaranya mengurangi produktivitas pada badan air yaitu mengambil ruang dan unsur hara yang dibutuhkan oleh ikan (Nazirah & Marpaung, 2021).

Disamping keberadaan dan populasinya yang dapat mengganggu wilayah perairan, tumbuhan eceng gondok diketahui memiliki beberapa manfaat diantaranya sebagai antiinflamasi, antijamur dan antikanker serta memiliki kandungan senyawa aktif seperti flavonoid, polifenol, saponin dan alkaloid (Djafar *et al.*, 2021). Studi yang dilakukan oleh Tyagi (2017) melaporkan bahwa hampir seluruh bagian dari tumbuhan eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) diketahui memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder diantaranya tanin, steroid, terpenoid, alkaloid, flavonoid dan beberapa senyawa lain pada bagian daun dan tangkai serta senyawa seperti flavonoid. Kuinon, antrakuinon dan polifenol pada bagian akar. Perbedaan kandungan jenis senyawa yang berbeda pada beberapa bagian tumbuhan eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) seperti yang telah ditunjukkan dalam penelitian sebelumnya menghasilkan dugaan bahwa bagian-bagian tumbuhan eceng gondok tersebut dapat berpotensi untuk berperan sebagai inhibitor tirosinase. Penelitian terkait potensi eceng gondok sebagai inhibitor tirosinase belum pernah dilakukan sebelumnya.

Berdasarkan penelitian sebelumnya melaporkan bahwa eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder dengan beragam manfaat. Hal ini menjadi tantangan bagi manusia untuk mengolah eceng gondok, yang dikenal sebagai gulma menjadi sumber daya yang berguna dan memiliki nilai ekonomi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa aktif dari tumbuhan eceng gondok, serta mengevaluasi aktivitasnya sebagai penghambat enzim tirosinase yang berperan dalam sintesis melanin, penyebab utama hiperpigmentasi.

Pengujian aktivitas penghambatan tirosinase dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan *L-Tyrosine* sebagai substrat untuk mendapatkan nilai persentase inhibisi. Nilai persentase inhibisi tersebut menggambarkan kemampuan daya hambat sampel terhadap aktivitas enzim tirosinase. Karakterisasi senyawa dilakukan menggunakan spektroskopi IR atau FTIR untuk mengidentifikasi adanya gugus fungsional seperti hidroksil, aromatik, karbonil dan lain-lain. Data yang dihasilkan digunakan untuk memprediksi senyawa yang dianalisis.

## 2. BAHAN DAN METODE

### 2.1. Alat dan bahan

#### 2.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain instrumen gelas, instrumen Kromatografi Vakum Cair (KVC), lampu UV (254 nm dan 366 nm), *rotary evaporator*, mikropipet, *vortex*, *centrifuge*, cawan porselin, *waterbath*, *multi-well plate*, spektrofotometer UV-Vis dan *Fourier Transform Infrared* (FTIR).

#### 2.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian diantaranya tumbuhan eceng gondok (*Eichhornia crassipes*), etanol 96%, plat silika gel GF<sub>254</sub>, n-heksan, etil asetat, metanol, kloroform, toluena, aseton, pereaksi *dragendorff*, AlCl<sub>3</sub> 10%, feri klorida (FeCl<sub>3</sub>) 5%, anesaldehid-asam sulfat, *liebermann-burchard*, *folin-ciocalteau*, enzim tirosinase (Sigma),

substrat *L-Tyrosine* (Sigma), pelarut dimetil sulfoksida (DMSO), natrium hidroksida (NaOH), monopotassium fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) dan aquabides.

## 2.2. Metode

### 2.2.1. Preparasi sampel ekstrak eceng gondok

Tumbuhan eceng gondok dicuci dengan air mengalir kemudian dilakukan proses pemisahan antara bagian akar, batang dan daun. Bagian-bagian tersebut diperkecil ukurannya agar mempercepat proses pengeringan. Proses pengeringan dilakukan secara manual di bawah sinar matahari. Bagian-bagian tumbuhan yang telah mengering kemudian dihaluskan menggunakan *grinder blender* dan diperoleh serbuk bagian akar, batang dan daun eceng gondok. Simplisia akar, batang, dan daun masing-masing sebesar 0,2 Kg diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 2 L tiap kali maserasi. Proses ekstraksi dilakukan selama 1x24 jam dengan tiga kali remaserasi. Filtrat yang diperoleh dari proses ekstraksi kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45-50°C. Ekstrak kental dari bagian akar, batang dan daun yang dihasilkan dari proses tersebut kemudian dialiri gas nitrogen agar diperoleh ekstrak kering.

### 2.2.2. Penentuan aktivitas inhibitor tirosinase

Penentuan aktivitas penghambatan tirosinase dilakukan dengan menambahkan 70 µL dari tiap pengenceran ekstrak dan 30 µL larutan enzim tirosinase (Sigma, 850,3 unit/mL dalam dapar fosfat) dalam *96-well plate*. Kemudian, sumuran diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Setelah inkubasi ditambahkan 110 µL substrat *L-Tyrosine* (2 mM) dan dilanjutkan dengan proses inkubasi kembali selama 30 menit pada suhu kamar. Larutan pada tiap sumur (Tabel 1) diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) = 510 nm (Batubara *et al.*, 2010). Nilai persentase inhibisi dihitung dengan Persamaan 1.

$$\text{Persentase Nilai Inhibisi (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100\%$$

**Persamaan 1.** Perhitungan aktivitas penghambatan tyrosinase menggunakan persentase nilai inhibisi. Keterangan: Nilai absorbansi blanko dikurangi kontrol blanko (A), Nilai absorbansi sampel dikurangi kontrol sampel (B)

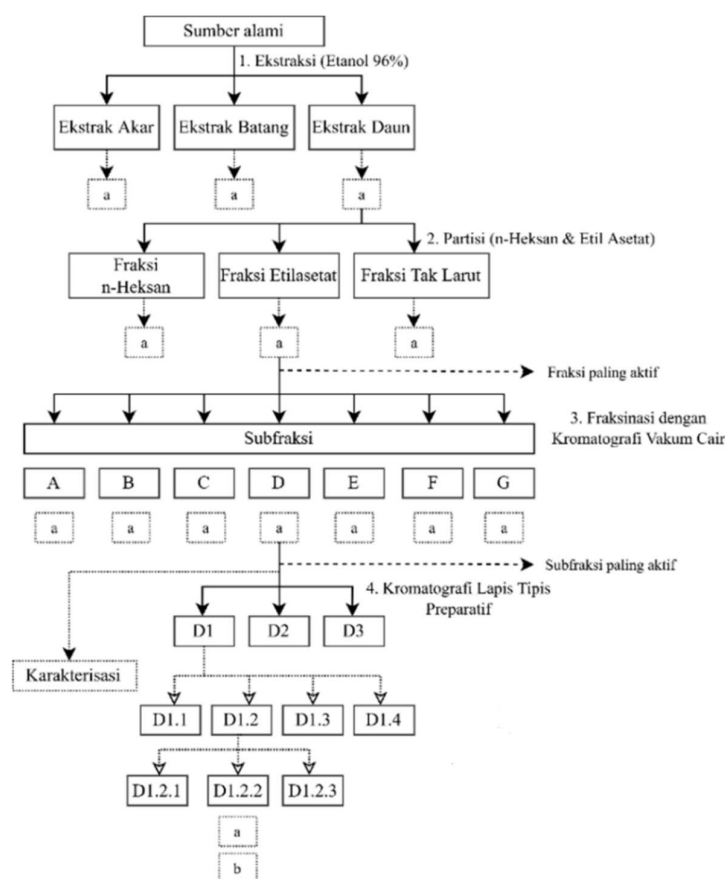
**Tabel 1.** Prosedur penghambatan tirosinase terhadap ekstrak, fraksi dan isolat eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms).

| Bahan                         | Volume (µL) |                |        |                |
|-------------------------------|-------------|----------------|--------|----------------|
|                               | Blanko      | Kontrol Blanko | Sampel | Kontrol Sampel |
| Larutan Dapar Fosfat (pH 6,5) | 70          | 210            | -      | 140            |
| Substrat <i>L-Tyrosine</i>    | 110         | -              | 110    | -              |
| Larutan Uji Sampel            | -           | -              | 70     | 70             |
| Enzim Tirosinase              | 30          | -              | 30     | -              |

### 2.2.3. Bioassay-guided isolation

Prosedur lengkap *bioassay-guided isolation* (Gambar 1), pemisahan dilakukan secara partisi cair-cair terhadap ekstrak dengan nilai persentase inhibisi tertinggi. Ekstrak daun

sejumlah 8 gram secara berurutan difraksinasi dengan n-heksan 80 ml (8x10 ml) dan etil asetat 60 ml (6x10 ml). Pemisahan fraksi dilakukan dengan teknik kromatografi lapis tipis (KLT). Proses KLT dilakukan dengan pelarut hasil optimasi fase gerak yaitu n-heksan:etil asetat menggunakan perbandingan 1:1. Subfraksi dengan nilai % inhibisi tertinggi kemudian dipisahkan kembali secara KLT preparatif dengan fase gerak yang sama. Subfraksi hasil dari KLT preparatif selanjutnya dilakukan uji kemurnian menggunakan tiga jenis kombinasi fase gerak dengan polaritas yang berbeda.



**Gambar 1.** Tahapan *Bioassay-guided isolation* Eceng Gondok (*Erichornia crassipes* (Mart.) Solms). Keterangan: Jalur Pemisahan (→), Jalur *Bio-assay* (----->), Jalur Pemisahan melalui Pendekatan Fitokimia (----->), Uji Aktivitas Inhibitor Tirosinase (a) dan Uji Fitokimia (b).

#### 2.2.4. Uji fitokimia

Uji fitokimia dilakukan terhadap subfraksi hasil KLT preparatif yang mengandung senyawa target yang diidentifikasi. Identifikasi senyawa target dilakukan dengan menggunakan KLT analitik untuk mengetahui profil kromatogram dari senyawa tersebut. Uji fitokimia dilakukan dengan menggunakan fase gerak hasil optimasi dan penyemprotan berbagai pereaksi penampak noda diantaranya  $\text{AlCl}_3$ , *folin-ciocalteau*,  $\text{FeCl}_3$ , *dragendorff*, *liebermann-burchard* dan *anisaldehyde*.

### 2.2.5. Fourier Transform Infrared (FTIR)

Gugus fungsi dari subfraksi atau isolat dengan nilai % inhibisi tertinggi diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer FTIR. Intensitas serapan senyawa hasil isolasi diukur pada bilangan gelombang  $4000\text{ cm}^{-1}$  sampai  $600\text{ cm}^{-1}$ . Kemudian hasil pengukuran akan diperoleh puncak-puncak spesifik dari gugus fungsi dari senyawa yang diisolasi.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1. Uji Inhibitor tirosinase ekstrak eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms)

Pengujian aktivitas inhibitor tirosinase dari bagian ekstrak akar, batang dan daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara ketiganya (Tabel 2). Hal tersebut dibuktikan melalui uji statistika *one-way ANOVA* dengan nilai *P-value* 0,19 dimana  $<0,05$ . Rendemen yang dihasilkan pada bagian daun memiliki jumlah lebih tinggi dari dua bagian lainnya yaitu akar dan batang. Nilai rendemen daun yang lebih tinggi tersebut memungkinkan lebih banyaknya senyawa yang larut. Hal tersebut selaras dengan penelitian oleh Hasanah *et al* (2016) yang menyebutkan bahwa hasil uji fitokimia dari bagian daun eceng gondok dan ekstrak etanolnya memiliki kandungan beberapa senyawa metabolit sekunder diantaranya flavonoid, fenolik, saponin dan steroid.

**Tabel 2.** Penghambatan tirosinase ekstrak akar, batang dan daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) 100 ppm. Keterangan: huruf yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan hasil yang bermakna.

| Ekstrak Eceng Gondok | Inhibisi (%)       |
|----------------------|--------------------|
| Akar                 | $22,17 \pm 3,71^a$ |
| Batang               | $18,77 \pm 1,08^a$ |
| Daun                 | $23,75 \pm 3,43^a$ |

### 3.2. Uji inhibitor tirosinase fraksi eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms)

Ekstrak daun eceng gondok yang memiliki nilai persen inhibisi tertinggi pada tahap uji aktivitas inhibitor tirosinase dilakukan fraksinasi bertingkat dengan pelarut n-heksan dan etil asetat. Uji aktivitas inhibitor terhadap fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi tak larut dari ekstrak daun menunjukkan hasil uji aktivitas inhibitor tirosinase tertinggi pada fraksi etil asetat dengan nilai sebesar  $12,29 \pm 4,16\%$ . Jika dibandingkan dengan dua fraksi lainnya yaitu fraksi n-heksan dan fraksi tak larut dengan nilai % inhibisi sebesar  $9,39 \pm 3,21$  dan  $5,96 \pm 0,97\%$  (Tabel 3). Hasil penelitian tersebut sejalan dengan penelitian yang pernah dilaporkan oleh Indrisari *et al* (2021) menggunakan daun *Terminalia catappa* L. Fraksi etil asetat pada daun tanaman tersebut mampu menghambat enzim tyrosinase dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $50,54 \pm 2,37$  ppm. Nilai  $IC_{50}$  tersebut lebih rendah dibandingkan fraksi heksan dan fraksi air. Diketahui bahwa semakin rendah nilai  $IC_{50}$  menunjukkan semakin besar aktivitas penghambatannya.

### 3.3. Uji inhibitor tirosinase subfraksi eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms)

Fraksi etil asetat sebagai fraksi dengan nilai persen inhibisi tertinggi dipisahkan menggunakan kromatografi vakum cair (KVC) dengan metode elusi gradien. Proses pemisahan ini menghasilkan tujuh subfraksi, yaitu subfraksi A, B, C, D, E, F dan G. Hasil uji aktivitas

inhibitor tirosinase pada ketujuh subfraksi (Tabel 4) 100 ppm dari fraksi etil asetat ekstrak daun enceng gondok.

**Tabel 3.** Penghambatan tirosinase fraksi heksan, etil asetat, dan tak larut dari ekstrak daun enceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) 100 ppm.

| Fraksi Daun Eceng Gondok | Inhibisi (%) |
|--------------------------|--------------|
| Fraksi Heksan (FH)       | 9.39 ± 3.21  |
| Fraksi Etil Asetat (FEA) | 12.29 ± 4.16 |
| Fraksi Tak Larut (FTL)   | 5.96 ± 0.97  |

Hasil pengujian aktivitas inhibitor tirosinase subfraksi D yang merupakan subfraksi dengan aktivitas inhibitor tertinggi dilakukan pemisahan beberapa bagian diantaranya subfraksi D1, D2 dan D3 (Tabel 5). Pengembangan metode *bioassay guided isolation* telah terbukti mampu menemukan senyawa aktif sebagai kandidat obat antihiperpigmentasi. Hal tersebut relevan dengan penelitian yang telah dilaporkan oleh Salsabila *et al* (2022) yang mengidentifikasi tiga isolat fraksi heksan daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) yakni *phyllanthin*, *phyltetralin*, dan *hypophyllanthin*. Diketahui bahwa hanya senyawa *phyllanthin* yang mampu menghambat enzim *tyrosinase* dengan nilai  $IC_{50}$  264,57 ± 3,74 ppm.

**Tabel 4.** Penghambatan tirosinase subfraksi A-G 100 ppm dari fraksi etil asetat pada ekstrak daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms).

| Subfraksi Daun Eceng Gondok | Inhibisi (%)    |
|-----------------------------|-----------------|
| Subfraksi A                 | 20.20 ± 1.39    |
| Subfraksi B                 | 15.94 ± 7.00    |
| Subfraksi C                 | 17.03 ± 8.36    |
| Subfraksi D                 | 38.43 ± 3.00    |
| Subfraksi E                 | 19.65 ± 1.51    |
| Subfraksi F                 | <i>Inactive</i> |
| Subfraksi G                 | <i>Inactive</i> |

### 3.4. Pemurnian subfraksi D1

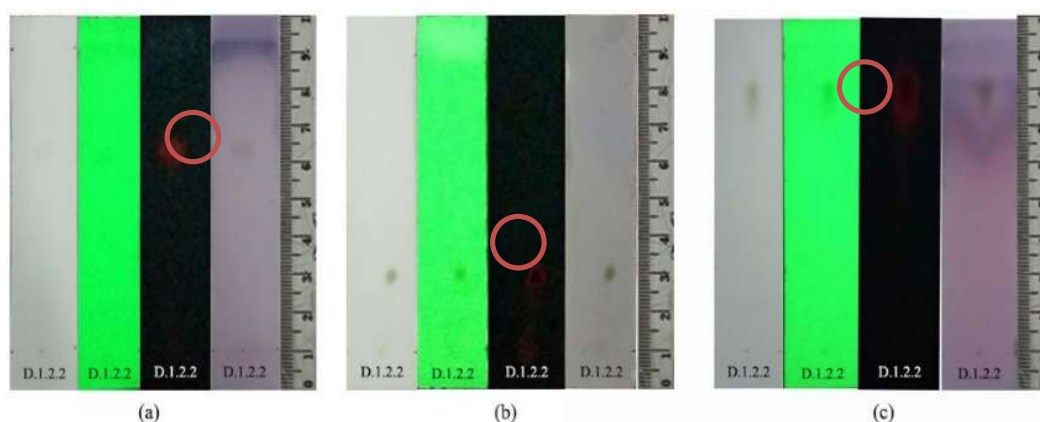
Pemisahan subfraksi D dengan menggunakan KLT preparatif menghasilkan senyawa tunggal yang diidentifikasi melalui KLT analitik dengan munculnya satu noda yang diduga merupakan senyawa murni. Uji kemurnian dilakukan terhadap subfraksi hasil KLT preparatif yang mengandung senyawa target dengan menggunakan tiga sistem eluen diantaranya n-heksana:etil asetat (1:1) dengan nilai  $R_f$  sebesar 0,7, toluena:metanol (8:0,5) dengan nilai  $R_f$  sebesar 0,37 dan petroleum eter:aseton (1:1) dengan nilai  $R_f$  sebesar 0,9. Berdasarkan uji kemurnian yang dilakukan diketahui bahwa subfraksi menunjukkan pola noda tunggal. Hasil uji kemurnian terhadap subfraksi tersebut ditunjukkan pada Gambar 2. Hasil pemurnian subfraksi D1 (D1.2.2) pada konsentrasi 100 ppm dilakukan uji aktivitas inhibitor tirosinase menghasilkan penghambatan sebesar 27,32 ± 6,30 %.

**Tabel 5.** Penghambatan tirosinase subfraksi D1, D2, dan D3 100 ppm dari fraksi etil asetat pada ekstrak daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms).

| Subfraksi D  | Inhibisi (%) |
|--------------|--------------|
| Subfraksi D1 | 7,67 ± 5.82  |
| Subfraksi D2 | 9,35 ± 4.07  |
| Subfraksi D3 | 15,08 ± 5.23 |

### 3.5. Uji fitokimia D1.2.2

Subfraksi yang mengandung senyawa target, selanjutnya dilakukan uji fitokimia menggunakan berbagai pereaksi penampak noda. Hasil uji fitokimia terhadap D1.2.2 dari fraksi etil asetat pada ekstrak daun eceng gondok (Tabel 6).



**Gambar 2.** Uji kemurnian D1.2.2 dari fraksi etil asetat pada ekstrak daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms). Keterangan: (a) n-heksana:etilasetat (1:1), (b) toluen:metanol (8:0.5), (c) petroleum eter:aseton (1:1).

Senyawa D1.1.2 (isolat aktif) memiliki hasil positif yang ditunjukkan pada penyemprotan penampak noda *liebermann-burchard* dengan terbentuknya warna hijau pada nilai Rf 0,54. Warna hijau yang muncul setelah penyemprotan pereaksi *liebermann-burchard* merupakan indikator positif adanya kandungan senyawa steroid. Senyawa seperti steroid diketahui memiliki kemampuan dalam reaksi penghambatan enzim tirosinase disebabkan adanya interaksi oleh gugus -OH yang ada pada senyawa tersebut dengan radikal bebas yang ada pada sisi aktif enzim atau pada ion tembaga (Cu) sebagai sisi aktif enzim (*active site*) enzim tirosinase (Jayantie *et al.*, 2022). Mustika *et al* (2020) dalam Jayantie *et al* (2022) juga menyebutkan bahwa jumlah gugus hidroksil pada senyawa diketahui memiliki peran penting dalam proses penghambatan enzim tirosinase. Chang (2009) menyatakan bahwa pada umumnya satu molekul enzim tirosinase terkandung dua buah atom Cu yaitu CuA dan CuB yang terikat pada tiga asam amino histidin. Atom Cu dalam enzim tirosinase berperan sebagai kofaktor pada aktivitas enzim tirosinase. Kemampuan katalitik enzim tirosinase dapat berkurang dengan hilangnya Cu dari situs aktif enzim tirosinase, sehingga pembentukan dopakrom tidak terbentuk (Sagala *et al.*, 2019).



Senyawa D1.1.2 (isolat aktif) memiliki hasil positif yang ditunjukkan pada penyemprotan penampak noda *liebermann-burchard* dengan terbentuknya warna hijau pada nilai Rf 0,54. Warna hijau yang muncul setelah penyemprotan pereaksi *liebermann-burchard* merupakan indikator positif adanya kandungan senyawa steroid. Senyawa seperti steroid diketahui memiliki kemampuan dalam reaksi penghambatan enzim tirosinase disebabkan adanya interaksi oleh gugus –OH yang ada pada senyawa tersebut dengan radikal bebas yang ada pada sisi aktif enzim atau pada ion tembaga (Cu) sebagai sisi aktif enzim (*active site*) enzim tirosinase (Jayantie *et al.*, 2022). Mustika *et al* (2020) dalam Jayantie *et al* (2022) juga menyebutkan bahwa jumlah gugus hidroksil pada senyawa diketahui memiliki peran penting dalam proses penghambatan enzim tirosinase. Chang (2009) menyatakan bahwa pada umumnya satu molekul enzim tirosinase terkandung dua buah atom Cu yaitu CuA dan CuB yang terikat pada tiga asam amino histidin. Atom Cu dalam enzim tirosinase berperan sebagai kofaktor pada aktivitas enzim tirosinase. Kemampuan katalitik enzim tirosinase dapat berkurang dengan hilangnya Cu dari situs aktif enzim tirosinase, sehingga pembentukan dopakrom tidak terbentuk (Sagala *et al.*, 2019).

Salah satu senyawa steroid yang telah diisolasi dari tanaman eceng gondok yaitu stigmasterol yang merupakan senyawa steroid alkohol. Penelitian tersebut dilakukan oleh Singh *et al* (2015) yang melakukan isolasi terhadap stigmasterol pada ekstrak kloroform eceng gondok menggunakan kromatografi kolom silika. Penelitian lain oleh Banakar & Jayaraj (2018) yang melakukan analisis GC-MS terhadap ekstrak daun eceng gondok juga menunjukkan kandungan stigmasterol pada ekstrak daun eceng gondok. Potensi senyawa steroid sebagai penghambat tirosinase ditunjukkan oleh Sabudak *et al* (2006) dalam penelitiannya yang melakukan isolasi terhadap tiga jenis steroid dari bagian aerial *Trifolium balansae* yang menunjukkan aktivitas penghambatan difenolase terhadap tirosinase. Stigmast-5-ene-3 $\beta$ ,26-diol menunjukkan potensi penghambatan terbaik dari ketiga senyawa yang diisolasi ( $IC_{50} = 2,39 \mu M$ ) jika dibandingkan dengan penghambat tirosinase standar yaitu asam kojat (KA,  $IC_{50} = 16,67 \mu M$ ).

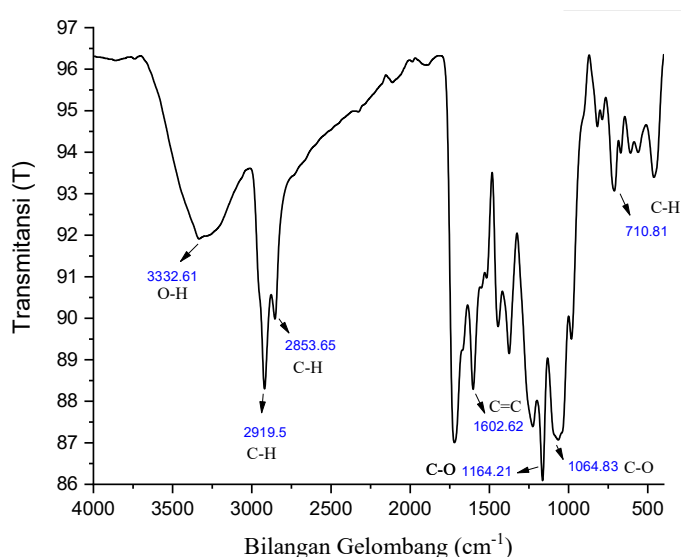
**Tabel 6.** Hasil uji fitokimia subfraksi D1.2.2 dari fraksi etil asetat pada ekstrak daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms). Keterangan: Hasil uji fitokimia positif (+), Hasil uji fitokimia negatif (-).

| Golongan Senyawa | Pereaksi Penampak Noda                           | Indikator Positif | Hasil Uji |
|------------------|--------------------------------------------------|-------------------|-----------|
| Flavonoid        | AlCl <sub>3</sub> 10%                            | Kuning kehijauan  | -         |
| Fenolik          | Folin-ciocalteau                                 | Biru abu-abu      | -         |
| Fenolik/Tanin    | FeCl <sub>3</sub> 5%                             | Biru/Hitam        | -         |
| Alkaloid         | Dragendorff                                      | Merah-coklat      | -         |
| Steroid          | Liebermann-Burchard<br>(Pemanasan $\pm$ 5 menit) | Hijau Biru        | +         |
| Triterpenoid     | Liebermann-Burchard<br>(Pemanasan $\pm$ 5 menit) | Merah-Ungu        | -         |
| Terpenoid        | Anesaldehid-asamsulfat<br>(Pemanasan 110 C)      | Ungu (Violet)     | -         |

### 3.5. Karakterisasi FTIR

Karakterisasi FTIR isolate aktif dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui gugus fungsi yang mendukung informasi mengenai metabolit sekunder yang diduga merupakan golongan steroid. Spektrum FTIR isolat aktif eceng gondok ditunjukkan pada Gambar 3.

Spektrum FTIR (Gambar 3) menunjukkan adanya vibrasi pada bilangan gelombang 3332,61 yang mengindikasikan adanya gugus  $\text{-OH}$ . Gugus  $\text{-OH}$  yang muncul diduga merupakan gugus alkohol. Hal tersebut didukung dengan adanya vibrasi pada bilangan gelombang 1164,21 dan 1064,83  $\text{cm}^{-1}$  merupakan indikasi adanya gugus C-O alkohol yang menguatkan dugaan bahwa senyawa steroid tersebut memiliki gugus fungsi hidroksi ( $\text{-OH}$ ). Analisis ini mengacu pada penelitian Suryelita *et al* (2017) yang melakukan karakterisasi pada senyawa yang diduga steroid. Vibrasi pada bilangan gelombang 2919,5 dan 710,81  $\text{cm}^{-1}$  mengindikasikan gugus  $\text{-CH}$  dari sistem alkana (Suryelita *et al.*, 2017). Adanya vibrasi pada bilangan gelombang 2853 dan 2919,5  $\text{cm}^{-1}$  dengan intensitas sangat kuat menunjukkan vibrasi ulur C-H alifatik. Selain itu, vibrasi tajam dengan intensitas kuat yang terbentuk pada panjang gelombang 1602,62  $\text{cm}^{-1}$  mengindikasikan adanya ikatan  $\text{C=C}$ . Analisis tersebut memiliki kesesuaian dengan penelitian yang dilakukan oleh Widiyantoro & Destiarti (2018) yang melakukan karakterisasi pada isolat yang diduga merupakan steroid.



**Gambar 3.** Spektrum FTIR isolat aktif eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms).

## 4. KESIMPULAN

Ekstrak daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) memiliki aktivitas tertinggi sebagai inhibitor tirosinase dengan nilai sebesar  $23,75 \pm 3,43$  %. Fraksi etil asetat daun eceng gondok memiliki aktivitas terbaik dalam menghambat enzim tirosinase sebesar  $12,29 \pm 4,16$  %. Senyawa steroid yang dikonfirmasi dengan spektrum IR memiliki gugus fungsi  $\text{-OH}$ , C-O,  $\text{-CH}$  dan ikatan  $\text{C=C}$ . Isolat aktif tersebut berpotensi kuat sebagai inhibitor tirosinase dengan nilai persen inhibisi sebesar  $27,32 \pm 6,30$  %.

**DEKLARASI KONFLIK KEPENTINGAN**

Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan terhadap naskah ini.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Banakar, P., & Jayaraj, M. (2018). Gc-MS Analysis of Bioactive Compounds From Ethanolic Leaves Extract of *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. and Their Pharmacological Activities. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(5), 2005–2010. <http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9>
- Batubara, I., Darusman, L. K., Mitsunaga, T., Rahminiwati, M., & Djauhari, E. (2010). Potency of Indonesian medicinal plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. In *Journal of Biological Sciences* (Vol. 10, Issue 2, pp. 138–144). <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.138.144>
- Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2440–2475. <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>
- Djafar, F., Yamlean, P. V. Y., & Siampa, J. P. (2021). Mouthwash Formulation of Water Hyacinth Extract (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) as An Antibiotics For Dental Caries (*Streptococcus mutans*). *Pharmakon*, 10(4), 1169–1177.
- Hasanah, M., P, M., & Amelia, K. (2016). Potensi Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Eceng Gondok (*Eichhornia Crassipes* (Mart.) Solms) yang Berasal dari Salah Satu Rawa di Palembang, Indonesia. *Jurnal Penelitian Sains*, 18(3), 168247.
- Hindun, S., Rusdiana, T., Abdasah, M., & Hindritiani, R. (2017). Potensi Limbah Kulit Jeruk Nipis (*Citrus auronfolia*) sebagai Inhibitor Tirosinase. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 4(2), 64. <https://doi.org/10.15416/ijpst.v4i2.12642>
- Indrisari, M., Sartini, Miskad, U.A., Djawad K., Tahir, K.A., Nurkhairi, Muslimin, L. (2021). Photoprotective and Inhibitory Activity of Tyrosinase in Extract and Fractions of *Terminalia catappa* L. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, 15, 9(A), 263-270.
- Jayantie, D. D., Farida, Y., & Taurhesia, S. (2022). Aktivitas Antioksidan dan Inhibisi Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol Buah Gandaria (*Bouea macrophylla* Griff.) secara *In Vitro*. *Jayantie et Al./Pharmacoscript*, 5(1), 62–70.
- Mustika, R., Hindun, S., & Auliasari, N. (2020). Potensi Tanaman Sebagai Pencerah Wajah Alami. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 2(4), 558–562. <https://jsk.farmasi.unmul.ac.id>
- Nazirah, L., & Marpaung, A. I. S. (2021). Pertumbuhan dan Hasil Beberapa Jagung (*Zea Mays* L) Akibat Pemberian Pupuk Organik Eceng Gondok (*Eichornia crassipes*). *Jurnal Agrotek Indonesia*, 21(6), 15–21. <https://doi.org/10.33661/jai.v6i2.5432>
- Owolabi, J. O., Fabiyi, O. S., Adelakin, L. A., & Ekwerike, M. C. (2020). Effects of skin lightening cream agents - hydroquinone and kojic acid, on the skin of adult female experimental rats. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 13, 283–289. <https://doi.org/10.2147/CCID.S233185>
- Pannindriya, P., Safithri, M., & Tarman, K. (2021). Analisis In Silico Senyawa Aktif Spirulina platensis sebagai Inhibitor Tirosinase. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 24(1), 70–77. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v24i1.33122>
- Ripaldo, F., & Sagala, Z. (2020). Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase dan Uji Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Harendong (*Melastoma malabathricum* L.) secara *In Vitro*. *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal*, 5(1), 114–129. <https://doi.org/10.52447/inspj.v5i1.1800>
- Rufchaei, R., Abbas-Mohammadi, M., Mirzajani, A., & Nedaei, S. (2021). Evaluation of the Chemical Compounds and Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Leaves of

- Eichhornia Crassipes (Water Hyacinth). *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, In Press*(In Press). <https://doi.org/10.5812/jjnpp.101436>
- Sabudak, T., Khan, M. T. H., Iqbal Choudhary, M., & Oksuz, S. (2006). Potent tyrosinase inhibitors from *Trifolium balansae*. *Natural Product Research*, 20(7), 665–670. <https://doi.org/10.1080/14786410500196821>
- Sagala, Z., Pratiwi, R. W., Azmi, N. U., & Maap. (2019). Uji Aktivitas Inhibisi terhadap Enzim Tirosinase dari Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Secara In Vitro. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, 7(2), 34–38.
- Salsabila, S., Haniffadli, A., Hartati, R., Al Muqarrabun, L.M.R., Qomaladewi, N.P., Rosandy, A.R., Chahyadi, A., Elfahmi. (2022). Isolation of bioactive compounds with tyrosinase inhibitory activity from the methanol extract of meniran herb (*Phyllanthus niruri* Linn.). *Current Research on Biosciences and Biotechnology*, 3(2), 196-201.
- Sidharta, R., Santi, A. N., Sutanti, V., & Diah, D. (2021). Efektivitas Ekstrak Daun Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) terhadap Viabilitas *Porphyromonas gingivalis* secara In Vitro. *E-Prodenta Journal of Dentistry*, 5(1), 403–413.
- Singh, K. S., Sawant, S. G., Devi, P., & Kaminsky, W. (2015). Stigmasterol from *Eichhornia crassipes* (water hyacinth): Isolation, characterization and X-ray structure. *Asian Journal of Chemistry*, 27(8), 3028–3030. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2015.18832>
- Soyata, A., & Chaerunisaa, A. Y. (2021). Whitening Agent : Mekanisme, Sumber dari Alam dan Teknologi Formulasinya. *Majalah Farmasetika*, 6(2), 169. <https://doi.org/10.24198/mfarmasetika.v6i2.28139>
- Suryelita, Etika, S. B., & Kurnia, N. S. (2017). Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid dari Daun Cemara Natal (*Cupressis funebris* Endl.). *Eksakta: Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, 18(01), 86–94. [http://clpsy.journals.pnu.ac.ir/article\\_3887.html](http://clpsy.journals.pnu.ac.ir/article_3887.html)
- Tyagi, T. (2017). Phytochemical Screening of Active Metabolites present in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms and *Pistia stratiotes* (L.): Role in Ethanomedicine. *Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 6(4), 40–56.
- Widiyantoro, A., & Destiarti, L. (2018). Karakterisasi Senyawa Steroid Dari Fraksi Diklorometana Batang Tanaman Andong (*Cordyline Fruticosa*) Dan Aktivitas Sitotoksiknya Terhadap Sel Hela. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 7(Vol 7, No 1 (2018): Jurnal Kimia Khatulistiwa), 48–52. <http://jurnal.untan.ac.id/index.php/jkkmpa/article/view/23588>