



UJI INHIBITOR ENZIM TIROSINASE EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN KEDABU (*Sonneratia ovata* Backer) SECARA IN-VITRO

Submitted : 01 Desember 2021

Edited : 23 Desember 2022

Accepted : 30 Desember 2022

Mustika Furi*, Ainun Alfatma, Rahma Dona, Armon Fernando, Fina Aryani, Rahayu Utami,
Septi Muharni, Husnawati, Wira Noviana Suhery, Melzi Octaviani

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau Yayasan Univ. Riau

Email : mustikafuri@stifar-riau.ac.id

ABSTRAK

Daun kedabu (*Sonneratia ovata* Backer) diketahui memiliki kandungan metabolit sekunder salah satunya ialah fenolik, flavonoid serta memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa fenolik, flavonoid dan aktivitas antioksidan diketahui dapat menghambat enzim tirosinase. Enzim tirosinase terlibat dalam proses melanogenesis yang menghasilkan melanin. Melanin dapat menyebabkan hiperpigmentasi. Untuk mencegah hiperpigmentasi dibutuhkan inhibitor enzim tirosinase. Penelitian ini bertujuan untuk menguji inhibitor enzim tirosinase pada ekstrak etanol, fraksi *n*-butanol fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksana daun kedabu (*Sonneratia ovata* Backer) dengan menggunakan substrat L-tirosin. Metode yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak etanol ialah metode maserasi dengan pelarut etanol, sedangkan beberapa fraksi didapat dengan menggunakan metode fraksinasi. Pengujian dilakukan dengan menggunakan substrat L-tirosin dan asam kojat sebagai kontrol positif dengan pengukuran serapan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 492 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas inhibisi enzim tirosinase yang paling baik dihasilkan oleh fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} 18,82 μ g/mL, diikuti oleh fraksi *n*-butanol dengan nilai IC_{50} 24,42 μ g/mL, dan fraksi *n*-heksana dengan nilai IC_{50} 28,77 μ g/mL, ekstrak etanol dengan nilai IC_{50} 99,03 dengan kategori kuat untuk semua sampel dibandingkan dengan asam kojat sebagai kontrol positif dengan nilai IC_{50} 30,09 μ g/mL.

Kata kunci: Melanin, *Sonneratia ovata* Backer, Enzim Tyrosinase

ABSTRACT

Kedabu leaves (Sonneratia ovata Backer) are known contain secondary metabolites, one of which is phenolic, flavonoid and antioxidant activity. Phenolic, flavonoids and antioxidant are known to inhibit the tyrosinase enzyme. The tyrosinase enzyme is involved in the process of melanogenesis which produces melanin. Melanin can cause hyperpigmentation. To prevent hyperpigmentation, tyrosinase inhibitors are needed. This study aimed to test the tyrosinase enzyme inhibitor in ethanol extract, n-butanol fraction, ethyl acetate fraction, n-hexane fraction of kedabu leaf (Sonneratia ovata Backer) using L-tyrosine as a substrate. The method used to get ethanol extract using ethanol maceration, while some fractions are obtained using the fractionation method. The test was carried out using L-tyrosine and kojic acid as a positive control with absorption measurements using microplate reader at a wavelength of 492 nm. The results showed that the best tyrosinase inhibitory activity was produced by the ethyl acetate fraction with an IC_{50} value of 18,82 g/mL, followed by the n-butanol fraction with an IC_{50} value of 24,42 g/mL, and the n-hexane fraction with an IC_{50} value. 28,77 g/mL, ethanol extract with an IC_{50} value of 99,09 with a strong category for all samples compared with kojic acid as a positive control with an IC_{50} value of 30,09 g/mL.

Keywords : Melanin, *Sonneratia ovata* Backer, Tyrosinase Enzyme



PENDAHULUAN

Paparan sinar UV dalam waktu yang lama dengan frekuensi yang tinggi dapat menyebabkan gangguan pada kulit. Sinar UV dapat meningkatkan sintesis melanin di kulit dan menyebabkan hiperpigmentasi⁽¹⁾. Hiperpigmentasi merupakan suatu gangguan pigmen pada kulit manusia. Peningkatan sintesis melanin ataupun distribusi melanin yang tidak merata dapat menyebabkan pigmentasi lokal serta menimbulkan masalah estetika kulit. Melanin merupakan pigmen yang melindungi kulit dari paparan sinar UV. Proses pembentukan melanin terjadi dengan adanya bantuan enzim tirosinase dan sinar UV⁽²⁾.

Tirosinase adalah enzim yang berperan dalam pembentukan pigmen kulit atau dikenal dengan proses melanogenesis. Dalam proses melanogenesis, enzim tirosinase akan mengatur biosintesis melanin dengan cara menghidroksilasi L-tirosin menjadi L-DOPA kemudian mengoksidasi L-DOPA menjadi *dopaquinon*. *Dopaquinon* diubah menjadi *dopachrome* melalui reaksi autooksidasi sehingga menjadi *dihydroxy-indole* (DHI) atau *dihydroxy-indole-carboxylic-acid* (DHICA) untuk membentuk melanin⁽³⁾. Kerja enzim tirosinase tergantung pada intensitas sinar UV yang masuk. Semakin banyak sinar UV yang menembus kulit maka semakin besar dan cepat enzim tirosinase bekerja sehingga semakin banyak pula melanin yang dapat terbentuk⁽⁴⁾. Pembentukan melanin dapat dihambat dengan beberapa cara salah satunya ialah menghambat aktivitas enzim tirosinase sehingga tidak dapat memproduksi melanin dan mengurangi terjadinya hiperpigmentasi⁽⁵⁾.

Banyak bahan kimia yang digunakan sebagai inhibitor tirosinase diantaranya asam kojat, *hidroquinon*, aleosin, merkuri, dan solano. Namun beberapa senyawa tersebut memiliki efek samping yang berbahaya terkait karsinogenesis dan mutagenesis dengan frekuensi pemakaian yang tinggi⁽⁶⁾. Oleh karena itu eksplorasi senyawa inhibitor enzim

tirosinase yang daya inhibisinya kuat dan aman sangat dibutuhkan.

Senyawa alam yang memiliki kemampuan untuk menghambat enzim tirosinase, salah satunya ialah senyawa flavonoid dan fenolik. Kemampuan flavonoid dalam depigmentasi kulit dengan cara menghambat secara langsung aktivitas tirosinase pada proses melanogenesis. Senyawa flavonoid menghambat enzim tirosinase dengan mekanisme inhibitor kompetitif dengan substratnya⁽⁷⁾. Fenolik diketahui memiliki kemampuan sebagai pengkkelat Cu^{2+} . Cu^{2+} pada enzim tirosinase bersifat sebagai kofaktor yang berfungsi untuk membantu substrat terikat dengan enzim. Hilangnya kofaktor pada enzim mengurangi kemampuan enzim mengikat substratnya sehingga tidak terbentuk melanin⁽⁸⁾. Antioksidan sebagai penangkap radikal bebas dapat menghambat reaksi oksidasi enzim tirosinase⁽⁹⁾.

Salah satu tumbuhan yang dilaporkan memiliki senyawa flavonoid dan fenolik ialah kedabu (*Sonneratia ovata* Backer). Daun kedabu mengandung tiga fenolik baru yaitu *sonnerphenolic A*, *sonnerphenolic B*, dan *sonnerfenolic C*. Ditemukan juga senyawa flavonoid dan sembilan belas senyawa lainnya. Dilaporkan juga aktivitas antioksidan yang sangat kuat dari daun kedabu dengan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol.

METODE PENELITIAN

Uji aktivitas inhibitor enzim tirosinase merupakan hasil modifikasi dari penelitian dilakukan oleh⁽⁵⁾ secara in-vitro menggunakan Microplate reader untuk membaca absorbansi dari melanin yang terbentuk setelah dilakukan penghambatan oleh sampel.

ALAT DAN BAHAN

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas yang terdapat di Laboratorium serta satu set alat *rotary evaporator* (Buchi 461 *Water Bath*),

seperangkat alat destilasi (Eyela OBS-2100), desikator, kertas saring, aluminium foil, pH meter, sonikator (Kudos SK330H), inkubator (Mettler IN55 *Incubator*), *microplate* dan *microplate reader 96* (Epoch BioTek).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kedabu (*Sonneratia ovata* Backer), etanol, etil asetat, *n*-butanol, *n*-heksana, kloroform, kloroform amoniak, aquadest, pereaksi Mayer, pereaksi Liebermann-Burchard, logam magnesium (Mg), asam klorida pekat (HCl), larutan besi (III) klorida (FeCl₃), Norit, asam asetat anhidrat ((CH₃CO)₂O), asam sulfat pekat (H₂SO₄), disodium fosfat (Na₂HPO₄·2H₂O), monosodium fosfat (NaH₂PO₄·H₂O), asam kojat, L-tirosin dan enzim tirosinase.

Pengambilan Sampel Daun Kedabu

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kedabu yang didapat dari Hutan Mangrove Desa Kayu Ara Permai, Kecamatan Sungai Apit, Kabupaten Siak. Daun yang digunakan sebanyak 1 kg.

Identifikasi Sampel Tumbuhan

Sampel tumbuhan diidentifikasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau, Pekanbaru.

Penyiapan Serbuk Simplisia

Daun kedabu sebanyak 1 kg disortasi basah dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada permukaan daun. Setelah itu ditiriskan sampai semua sisa – sisa air pencucian tidak ada lagi pada daun kedabu. Daun kedabu kemudian dikering anginkan pada suhu ruang, setelah itu daun disortasi kering. Bahan yang sudah kering selanjutnya diserbuk dan diayak sehingga diperoleh serbuk simplisia daun kedabu.

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kedabu

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi atau perendaman dengan pelarut

etanol. Serbuk simplisia dimasukan ke dalam botol berwarna gelap kemudian dimaserasi dengan etanol 2,5 L selama 5 hari dalam 3 kali pengulangan. Wadah maserasi disimpan pada suhu kamar dan terlindungi dari cahaya matahari langsung. Sari etanol disaring menggunakan kapas dan ampasnya dimaserasi kembali dengan cara yang sama hingga tiga kali pengulangan. Hasil maserasi dikumpulkan, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Alat diatur pada suhu 40-50°C hingga diperoleh ekstrak kental daun kedabu (*Sonneratia ovata* Backer), kemudian ekstrak dikumpulkan dan ditimbang.

Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Kedabu

Ekstrak kental etanol daun kedabu sebanyak 25 g dilarutkan dengan 50 mL akuades, kemudian diaduk homogen dan dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu tambahkan 50 mL *n*-heksana ke dalam corong pisah tersebut. Campuran larutan dikocok hingga terekstraksi sempurna, didiamkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas (lapisan *n*-heksana) dipisahkan, sedangkan lapisan airnya difraksinasi kembali dengan *n*-heksana di dalam corong pisah dengan prosedur yang sama (3 kali pengulangan). Lapisan *n*-heksana tersebut dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Kemudian berat fraksi *n*-heksana tersebut ditimbang.

Lapisan air kemudian difraksinasi dengan etil asetat sebanyak 50 mL menggunakan corong pisah dan dilakukan prosedur yang sama seperti pada fraksinasi menggunakan *n*-heksana. Lapisan etil asetat dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* kemudian berat fraksi etil asetat yang diperoleh ditimbang.

Lapisan air kemudian difraksinasi kembali dengan *n*-butanol sebanyak 50 mL menggunakan corong pisah dan dilakukan prosedur yang sama seperti pada fraksinasi menggunakan *n*-heksana. Lapisan *n*-butanol dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary*

evaporator kemudian berat fraksi *n*-butanol yang diperoleh ditimbang.

Uji Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan pada daun segar, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol.

1. Uji Fenolik.

Daun segar yang sudah dipotong kecil/ekstrak maupun fraksi dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan etanol hingga sampel di dalam tabung reaksi terendam seluruhnya, dipanaskan kemudian disaring ke dalam tabung reaksi lain. Filtrat dipanaskan kembali untuk menguapkan etanol. Tambahkan 5 mL air suling dan 5 mL kloroform (1:1) di dalam tabung reaksi tersebut, lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan yakni lapisan air dan lapisan kloroform. Kedua lapisan tersebut dipisahkan. Lapisan air digunakan untuk uji senyawa fenolik dengan mengambil 3-4 tetes lapisan air dan dimasukkan ke dalam plat tetes ditambahkan 1-2 tetes larutan besi (III) klorida (FeCl_3) 1%. Bila terbentuk warna biru menunjukkan adanya senyawa fenolik.

2. Uji Flavonoid

Sebanyak 1-2 tetes lapisan air diambil dan dimasukkan ke dalam plat tetes ditambahkan sedikit logam Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Bila terbentuk warna kuning-jingga sampai merah menandakan adanya senyawa flavonoid.

3. Uji Saponin

Lapisan air dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok kuat selama beberapa saat. Apabila terbentuk busa yang bertahan selama 5 menit, berarti menunjukkan adanya saponin.

4. Uji Steroid dan Terpenoid

Lapisan kloroform disaring melalui pipet yang diberi kapas dan norit, kemudian hasil saringan dipipet sebanyak 2-3 tetes ke dalam 3 lubang plat tetes dan dibiarkan mengering. Setelah kering pada lubang 1 ditambahkan

asam asetat anhidrat, lubang 2 ditambahkan asam sulfat pekat dan lubang 3 ditambahkan pereaksi *Liebermann-Burchard* (2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat). Jika terbentuk warna merah menandakan adanya senyawa terpenoid dan jika terbentuk warna hijau atau biru pada lubang menandakan adanya senyawa steroid.

5. Uji Alkaloid

Daun segar yang telah dipotong kecil-kecil/ekstrak maupun fraksi ditambahkan 5 mL kloroform, digerus dalam lumpang dan ditambahkan 5 mL kloroform amoniak, diaduk kemudian disaring. Ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1 mL asam sulfat 2 N, kocok, biarkan hingga terbentuk 2 lapisan. Ambil lapisan asam (atas) lalu tambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi Mayer. Apabila terbentuk endapan putih dengan pereaksi Mayer, menandakan adanya senyawa alkaloid.

Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase Penyiapan Larutan Pereaksi

1. Larutan Dapar Fosfat 0,05 M pH 6,5

Sebanyak 0,6 g NaH_2PO_4 dilarutkan ke dalam aquadest 100 mL dan sebanyak 0,715 g Na_2HPO_4 dilarutkan ke dalam aquadest 100 mL. Kedua larutan dicampurkan dan diukur pHnya dengan pH meter.

2. Larutan Enzim Tirosinase 333 unit/ml Enzim dalam kemasan sebanyak 50.000 unit (tirosinase sigma T3824).

Serbuk enzim tirosinase 50.000 unit dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat pH 6,5 sehingga didapatkan konsentrasi enzim sebesar 5.000 unit/mL. Kemudian diambil 1,332 mL dari larutan enzim 5.000 unit/mL dipindahkan ke dalam vial gelap dan dicukupkan volumenya hingga 20 mL dengan dapar fosfat pH 6,5. Didapatkan konsentrasi 333 unit/mL enzim tirosinase dalam dapar fosfat pH 6,5.

3. Larutan Substrat L-tirosin

Pembuatan larutan substrat L-tirosin 2 mM dengan melarutkan L-tirosin sebanyak 18,1 mg ke dalam 50 mL dapar fosfat.

4. Larutan Asam Kojat

Pembuatan larutan asam kojat dengan mengambil 10 mg asam kojat dan dilarutkan ke dalam 10 mL dapar fosfat pH 6,5 sehingga didapatkan konsentrasi 1.000 ppm. Kemudian larutan tersebut diencerkan menjadi konsentrasi 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 dan 7,8125 ppm.

5. Penyiapan Larutan sampel

Masing-masing ekstrak dan fraksi ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan DMSO 5 mL sehingga didapatkan konsentrasi 2.000 ppm. Fraksi *n*-heksana dan ekstrak etanol diencerkan menjadi konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; 62,5 dan 31,25, sementara fraksi *n*-butanol dan fraksi etil asetat diencerkan menjadi konsentrasi 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 dan 3,90625 ppm.

Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase

1. Blanko (B_1) dan Blanko Kontrol (B_0)

Blanko yang digunakan pada *microplate* 96 well yaitu 70 μ L dapar fosfat pH 6,5 dan dicampurkan dengan enzim tirosinase sebanyak 30 μ L, substrat L-tirosin sebanyak 110 μ L. Blanko kontrol diuji dengan prosedur yang sama dengan pengujian pada blanko tetapi 110 μ L substrat L-tirosin digantikan dengan 110 μ L dapar fosfat pH 6,5.

2. Sampel (S_1) dan Sampel Kontrol (S_0)

Sampel dibuat dalam konsentrasi 2000 ppm dan kemudian untuk fraksi *n*-heksana dan ekstrak etanol diencerkan menjadi berbagai konsentrasi yaitu 1.000; 500; 250; 125; 62,5 dan 31,25 ppm sementara untuk fraksi *n*-

butanol dan fraksi etil asetat diencerkan menjadi konsentrasi 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 dan 3,90625 ppm. Kemudian masing - masing konsentrasi dicampurkan dengan 30 μ L enzim tirosinase dan 110 μ L L-tirosin. Untuk pengujian sampel kontrol dilakukan dengan cara yang sama dengan pengujian sampel tetapi 110 μ L dapar fosfat pH 6,5 yang digunakan untuk menggantikan 110 μ L L-tirosin.

3. Asam Kojat (A_1) dan Asam Kojat Kontrol (A_0)

Asam kojat dibuat dalam konsentrasi 500 ppm kemudian diencerkan menjadi berbagai konsentrasi yaitu 250, 125, 62,5; 31,25; 15,625 dan 7,8125 ppm. Selanjutnya masing – masing konsentrasi dicampurkan dengan enzim tirosinase sebanyak 30 μ L dan 110 μ L L-tirosin. Pengujian asam kojat kontrol dilakukan dengan cara yang sama dengan pengujian asam kojat tetapi 110 μ L dapar fosfat pH 6,5 yang digunakan untuk menggantikan 110 μ L L-tirosin.

Semua sampel diinkubasi selama 30 menit pada inkubator dengan suhu 37°C dan diukur pada panjang gelombang 492 nm dengan menggunakan microplate reader.

Analisis Data

Data yang didapatkan adalah aktivitas enzim yang diukur berdasarkan hasil absorbansi. Apabila aktivitas tirosinase dalam memproduksi melanin terhambat maka ekstrak mengandung senyawa inhibitor tirosinase. Terbentuknya produk *dopachrome* ditandai dengan timbulnya warna coklat. Reaksi antara enzim tirosinase dan substrat L-tirosin terhambat karena adanya inhibitor tirosinase sehingga berkurangnya produk *dopachrome* yang disertai dengan berkurangnya intensitas warna coklat pada larutan⁽¹⁸⁾.

Tabel 1. Perlakuan Sampel Uji

Komposisi	Perlakuan					
	B ₁ (μL)	B ₀ (μL)	S ₁ (μL)	S ₀ (μL)	A ₁ (μL)	A ₀ (μL)
Sampel			70	70		
Dapar Fosfat	70	70				
Enzim Tirosinase	30	30	30	30	30	30
L-tirosin	110		110		110	
Dapar Fosfat		110		110		110
Asam Kojat					70	70

Data absorbansi yang didapat digunakan untuk mencari persen inhibisi. Persen inhibisi sampel dapat dihitung dengan rumus:

$$I = \frac{(B_1 - B_0) - (S_1 - S_0)}{(B_1 - B_0)} \times 100\%$$

Persen inhibisi asam kojat dapat dihitung dengan rumus :

$$I = \frac{(B_1 - B_0) - (A_1 - A_0)}{(B_1 - B_0)} \times 100\%$$

Aktivitas penghambatan dari sampel uji ditentukan dengan IC₅₀ yaitu konsentrasi dimana sampel uji menghambat aktivitas tirosinase sebesar 50%. IC₅₀ dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear, log konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan probit % inhibisi sebagai sumbu y, dari persamaan $y = bx \pm a$ dapat dihitung nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$y = ax \pm b$$

$$x = \frac{(50 \pm b)}{a}$$

Keterangan :

a = slope

b = intersep

Nilai IC₅₀ di bawah 100 ppm menunjukkan potensi penghambatan aktivitas tirosinase yang paling kuat, nilai IC₅₀ 100-450 ppm menunjukkan potensi penghambatan yang sedang, dan 450-700 ppm menunjukkan potensi penghambatan aktivitas tirosinase sangat lemah.

Tabel 2. Kategori Potensi Penghambatan Aktivitas Enzim Tirosinase

Kategori	Konsentrasi (ppm)
Kuat	< 100
Sedang	100 – 450
Lemah	451 – 700
Tidak Beraktivitas	> 700

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aktivitas inhibitor enzim tirosinase dilakukan menggunakan alat *microplate reader*. Pemilihan alat ini dikarenakan *microplate reader* dapat mengukur sampel lebih banyak secara bersamaan sehingga dapat menghemat waktu. Selain itu, sampel dan reagen yang digunakan untuk pengujian hanya dalam skala mikro sehingga dapat menghindari pemborosan bahan atau reagen⁽¹⁰⁾.

Sampel segar dari daun kedabu disortasi basah yang bertujuan untuk memisahkan pengotor atau bahan asing lainnya yang terdapat pada sampel dan memisahkan bagian sampel yang ingin digunakan. Kemudian daun kedabu dicuci dengan air mengalir. Proses pencucian bertujuan untuk menghilangkan pengotor-pengotor yang masih melekat pada sampel. Selanjutnya sampel dikering anginkan dengan tujuan untuk mengurangi kadar air yang terdapat dalam sampel agar sampel tidak ditumbuhi jamur. Setelah sampel daun kering, dilakukan sortasi kering agar benda asing yang tidak diinginkan dan

pengotor yang masih tertinggal selama pengeringan dapat dipisahkan. Sampel daun kering yang diperoleh sebanyak 300 g dirajang untuk memperluas permukaan sampel agar kontak antara sampel dengan pelarut menjadi lebih luas sehingga senyawa yang berada dalam sampel lebih mudah tersari oleh pelarut yang digunakan⁽¹¹⁾.

Dari proses pembuatan simplisia didapat sebanyak 300 g serbuk simplisia. Selanjutnya simplisia diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Pemilihan proses maserasi dikarenakan metode ini merupakan penyarian yang sederhana dan dapat menarik zat yang terdapat di dalam simplisia baik simplisia yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan serta tidak membutuhkan perlakuan khusus dalam pengerjaannya. Pemilihan pelarut etanol dikarenakan pelarut etanol merupakan pelarut yang bersifat universal yaitu pelarut yang dapat menarik senyawa yang bersifat polar hingga nonpolar⁽¹¹⁾. Selanjutnya dilakukan penyaringan untuk memisahkan maserat dari residu. Maserat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Proses pemekatan tersebut menghasilkan ekstrak kental etanol berwarna coklat kehitaman sebanyak 48,095 g dengan persen rendemen sebesar 16,03%.

Ekstrak difraksinasi untuk menyederhanakan komponen-komponen metabolit yang terdapat pada ekstrak. Fraksinasi dilakukan menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda berdasarkan derajat kepolaran pelarutnya. Fraksinasi dimulai dari pelarut *n*-heksana untuk menarik senyawa-senyawa non polar yang terdapat pada ekstrak. Kemudian fraksinasi dilanjutkan dengan etil asetat yang bersifat semi polar untuk menarik senyawa-senyawa semi polar yang terkandung dalam

ekstrak dan *n*-butanol yang bersifat polar untuk menarik senyawa-senyawa yang lebih polar yang terkandung dalam ekstrak⁽¹⁹⁾. Hasil fraksinasi ekstrak etanol daun kedabu diperoleh fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol berturut-turut sebesar 1,6301 g; 1,1792 g dan 1,2905 g. Persen rendemen berturut-turut sebesar 6,25% ; 4,716 % dan 5,162 %. Hasil % rendemen fraksi *n*-heksana lebih besar dibanding pelarut lainnya diduga disebabkan oleh banyaknya zat klorofil yang tertarik oleh pelarut tersebut.

Tabel 3. Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Kedabu (*Sonneratia ovata* Backer).

Jenis Sampel	Berat (gram)	% Rendemen
Ekstraksi Etanol	48,095	16,03%
Fraksi <i>n</i> -Heksana	1,63	6, 25 %
Fraksi Etil Asetat	1,17	4, 71 %
Fraksi <i>n</i> -butanol	1,29	5, 16 %

Skrining fitokimia dilakukan terhadap daun segar, ekstrak dan fraksi agar diketahui gambaran secara kualitatif tentang golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam masing – masing sampel tersebut. Hasil skrining fitokimia pada sampel segar dan ekstrak etanol daun kedabu menunjukkan adanya senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid dan steroid. Pada fraksi *n*-heksana menunjukkan adanya senyawa fenolik, flavonoid dan terpenoid. Fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol positif mengandung senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, terpenoid, steroid dan saponin.

Tabel 4. Hasil Skrining Fitokimia Sampel

No.	Kandungan Kimia	Sampel Segar	Ekstrak Etanol	Fraksi <i>n</i> -Heksana	Fraksi Etil Asetat	Fraksi <i>n</i> -Butanol
1.	Fenolik	+	+	+	+	+
2.	Flavonoid	+	+	+	+	+
3.	Terpenoid	+	+	+	+	+
4.	Steroid	+	+	-	+	+
5.	Alkaloid	+	+	-	+	+
6.	Saponin	+	+	-	+	+

Pengujian aktivitas inhibitor enzim tirosinase terhadap ekstrak dan fraksi daun kedabu menggunakan enzim tirosinase dan L-tirosin sebagai substratnya. Enzim tirosinase dan substrat L-tirosin akan menghasilkan *dopaquinon*, *dopaquinon* diubah menjadi *dopachrome* melalui autooksidasi sehingga menjadi *dihydroxy-indole* (DHI) atau *dihydroxy-indole-carboxylic-acid* (DHICA) untuk membentuk melanin (pigmen berwarna coklat). Melanin yang terbentuk dapat terukur intensitasnya pada panjang gelombang 492 nm⁽¹²⁾. Melanin di dalam tubuh dapat menyebabkan hiperpigmentasi. Hiperpigmentasi merupakan suatu gangguan pigmen pada kulit manusia yang disebabkan adanya peningkatan melanin ataupun distribusi melanin yang tidak merata. Pembentukan melanin dapat dicegah dengan menghambat enzim tirosinase. Penghambatan enzim ini memerlukan suatu senyawa yang bersifat sebagai inhibitor enzim tirosinase. Apabila ekstrak maupun fraksi mengandung senyawa inhibitor enzim tirosinase maka akan dapat menghambat pembentukan melanin. Pembentukan melanin ditandai dengan munculnya warna coklat, apabila sampel bersifat sebagai inhibitor enzim tirosinase maka pembentukan melanin akan terhambat sehingga akan menurunkan intensitas warna coklat.

Serapan yang diperoleh (absorbansi) dari hasil pengujian digunakan untuk mengetahui seberapa besar aktivitas sampel dalam menghambat reaksi substrat L-tirosin dan enzim tirosinase. Nilai absorbansi yang

didapat pada pengujian dapat digunakan sebagai data untuk menghitung persen inhibisi sampel. Nilai persen inhibisi dapat menggambarkan seberapa besar daya hambat aktivitas enzim tirosinase yang dimiliki sampel pada tiap – tiap konsentrasi. Semakin besar persen inhibisi sampel maka akan semakin tinggi daya hambat sampel terhadap enzim tirosinase sehingga sampel memiliki kemampuan yang tinggi dalam menghambat pembentukannya melanin. Hal ini juga dapat ditandai dengan semakin berkurangnya intensitas warna coklat yang terjadi.

Penghambatan aktivitas enzim tirosinase juga digambarkan dengan nilai IC₅₀. IC₅₀ merupakan nilai konsentrasi inhibitor yang dapat menghambat 50% aktivitas enzim tirosinase. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin baik aktivitas penghambatannya, karena hanya dengan konsentrasi kecil sudah bisa menghambat 50% aktivitas enzim tirosinase.

Pengujian dilakukan pada blanko (B1), blanko kontrol (B0), sampel (S1), sampel kontrol (S0) dan sebagai pembanding asam kojat (A1) dan asam kojat kontrol (A0). Asam kojat dipilih sebagai kontrol positif dikarenakan asam kojat memiliki kestabilan yang tinggi (Chang, 2009). Mekanisme asam kojat dalam menghambat enzim tirosinase adalah dengan membentuk khelat tembaga (Cu²⁺) pada sisi aktif enzim sehingga sisi aktif enzim tidak dapat berikatan dengan substratnya dan tidak menghasilkan melanin⁽⁷⁾. Pengujian asam kojat sebagai kontrol positif dilakukan untuk

memastikan bahwa metode yang dipakai sudah benar dengan cara membandingkan nilai IC_{50} sampel yang didapat dengan nilai IC_{50} dari pembandingnya yaitu asam kojat.

Pengujian larutan blanko (B1) dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim tanpa adanya sampel sementara pengujian blanko kontrol (B0) digunakan sebagai faktor koreksi terhadap blanko (B1). Pengujian larutan sampel (S1) dilakukan untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim tirosinase oleh ekstrak, sedangkan pengujian larutan sampel kontrol (S0) dilakukan sebagai faktor koreksi terhadap larutan sampel.

Pengujian ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol daun kedabu dilakukan pada konsentrasi 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 dan 31,25 $\mu\text{g/mL}$ dikarenakan pada konsentrasi yang lebih besar larutan sampel masih berwarna pekat pada beberapa konsentrasi, sehingga apabila dilakukan pembacaan pada alat dikhawatirkan warna sampel akan mengganggu pembacaan intensitas *dopachrome* pada panjang gelombang 492 ppm. Pengujian fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol daun kedabu dilakukan kembali pada konsentrasi yang lebih kecil yaitu pada konsentrasi 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 dan 3,90625 $\mu\text{g/mL}$ dikarenakan nilai persen inhibisi yang diperoleh melalui pengujian pada konsentrasi sebelumnya berada di atas 50%. Sehingga nilai IC_{50} tidak dapat ditentukan berdasarkan pengujian tersebut. Pengujian ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana daun kedabu tetap dilakukan pada konsentrasi 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 dan 31,25 $\mu\text{g/mL}$ dikarenakan nilai persen inhibisi yang diperoleh berada di rentang 100% hingga 36% sehingga nilai IC_{50} dapat ditentukan berdasarkan pengujian tersebut. Pengujian asam kojat dilakukan pada konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 dan 7,8125 $\mu\text{g/mL}$ dikarenakan asam kojat merupakan senyawa murni yang sudah diketahui bersifat sebagai inhibitor enzim tirosinase.

Pengujian dilakukan dengan 2 perlakuan. Perlakuan pertama ialah mereaksikan sampel, enzim tirosinase dan substrat L-tirosin (S1). Perlakuan kedua atau perlakuan sampel kontrol (S0) adalah mereaksikan sampel dan enzim tirosinase tanpa substrat. Enzim tirosinase yang digunakan pada pengujian merupakan enzim yang disimpan pada suhu rendah. Penyimpanan enzim tirosinase yang optimal dilakukan pada suhu -20°C agar reaksi katalis enzim terhenti. Enzim tirosinase kembali aktif pada kisaran suhu $35-37^{\circ}\text{C}$ ⁽¹³⁾. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Suhu 37°C dipilih sebagai perlakuan sampel dikarenakan suhu tersebut sesuai dengan suhu tubuh dan suhu optimal enzim bekerja, sementara waktu 30 menit adalah waktu yang cukup agar enzim tirosinase, substrat dan ekstrak saling bereaksi⁽¹⁴⁾.

Hasil pengujian aktivitas inhibitor enzim tirosinase diperoleh nilai IC_{50} asam kojat sebesar 30,09 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai $y=32,261x - 59,819$ dan $R^2=0,9968$. Nilai IC_{50} ekstrak etanol daun kedabu adalah sebesar 99,03 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai $y=12,355x - 6,7769$ dan $R^2=0,9904$. Nilai IC_{50} fraksi *n*-heksana sebesar 28,77 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai $y=11,812x + 10,32$ dan $R^2=0,9986$. Fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} sebesar 18,82 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai $y=8,9021x + 23,872$ dan $R^2=0,9904$. Fraksi *n*-butanol dengan nilai IC_{50} sebesar 24,42 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai $y=16,393x - 2,3861$ dan $R^2=0,9936$.

Nilai absorbansi dari asam kojat, ekstrak etanol dan fraksi kedabu mendapatkan nilai yang semakin kecil pada konsentrasi yang semakin besar. Semakin besar konsentrasi larutan sampel maka semakin kecil absorbansi yang didapatkan dan semakin berkurang intensitas warna coklat. Hal ini dapat diartikan bahwa pada konsentrasi yang lebih besar, sampel uji memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menghambat enzim tirosinase membentuk melanin sehingga melanin yang terbentuk sedikit dan terjadi pengurangan

intensitas warna coklat yang menyebabkan nilai absorbansi yang kecil. Semakin kecil nilai absorbansi yang didapatkan maka semakin besar pula persen inhibisi atau daya hambat yang dimiliki larutan uji, semakin besar konsentrasi sampel maka semakin besar pula persen inhibisi atau daya hambat yang dimiliki larutan uji.

Berdasarkan kategori potensi kekuatan inhibitor enzim tirosinase maka didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol daun kedabu memiliki aktivitas inhibitor enzim tirosinase yang kuat. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas inhibitor enzim tirosinase terbaik dengan nilai IC_{50} 18,82 μ g/mL diikuti oleh fraksi *n*-butanol dengan nilai IC_{50} 24,42 μ g/mL, fraksi *n*-heksana dengan nilai IC_{50} 28,77 μ g/mL dan ekstrak etanol dengan nilai IC_{50} 99,03 μ g/mL. Fraksi etil asetat, fraksi butanol dan fraksi *n*-heksana daun kedabu memiliki aktivitas inhibitor enzim tirosinase yang lebih kuat dibandingkan asam kojat dengan nilai IC_{50} 30,09 μ g/mL. Sedangkan ekstrak etanol daun kedabu memiliki aktivitas inhibitor enzim tirosinase yang lebih lemah dibandingkan dengan asam kojat sebagai pembanding.

Aktivitas inhibitor enzim tirosinase fraksi etil asetat, fraksi *n*-butanol, fraksi *n*-

heksana dan ekstrak etanol daun kedabu yang kuat diduga karena banyaknya kandungan senyawa fenolik. Hasil skrining fitokimia yang diujikan pada keempat sampel positif mengandung fenolik. Sesuai dengan pernyataan⁽¹⁵⁾, daun kedabu mengandung banyak senyawa fenolik yang telah berhasil diisolasi seperti *sonnerphenolic* A, *sonnerphenolic* B, *sonnerfenolic* C, tiga turunan asam galat serta dua turunan fenolik lainnya. Fenolik diketahui memiliki kemampuan untuk menghambat enzim tirosinase dengan cara sebagai pengkkelat Cu^{2+} . Cu^{2+} pada enzim tirosinase bersifat sebagai kofaktor yang berfungsi untuk membantu substrat terikat dengan enzim. Hilangnya kofaktor pada enzim mengurangi kemampuan enzim mengikat substratnya sehingga mengurangi aktivitasnya dalam membentuk melanin⁽¹⁸⁾.

Aktivitas inhibitor enzim tirosinase yang kuat diduga juga disebabkan oleh adanya kandungan flavonoid. Berdasarkan hasil skrining fitokimia, keseluruhan sampel positif memiliki senyawa golongan flavonoid. Senyawa flavonoid memiliki kemampuan untuk menghambat enzim tirosinase.

Tabel 4. Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase oleh Asam Kojat

Konsentrasi (μ g/mL)	Abs. Sampel (S ₁)	Abs. Sampel (S ₀)	% Inhibisi	Persamaan Linear	IC_{50}
500	0,003	0,002	99,84	y = 32,261x – 59,819 R ² = 0,9968	30,19
250	0,009	0,002	98,89		
125	0,059	0,003	91,16		
*62,5	0,162	0,004	74,96		
*31,25	0,323	0,006	49,92		
*15,625	0,468	0,007	27,35		
*7,8125	0,598	0,015	7,94		

Tabel 5. Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase oleh Ekstrak Etanol Daun Kedabu

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Abs. Sampel (S_1)	Abs. Sampel (S_0)	% Inhibisi	Persamaan Linear	IC ₅₀
2000	0,316	0,313	99,53	$y = 12,355x - 6,7769$ $R^2 = 0,9904$	99,03
1000	0,325	0,269	91,27		
*500	0,332	0,153	71,75		
*250	0,358	0,090	57,65		
*125	0,370	0,063	51,60		
*62,5	0,382	0,025	43,71		
*31,25	0,416	0,022	37,82		

Tabel 6. Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase oleh Fraksi *n*-Heksana Daun Kedabu

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Abs. Sampel (S_1)	Abs. Sampel (S_0)	% Inhibisi	Persamaan Linear	IC ₅₀
*2000	0,392	0,391	99,74	$y = 11,812x + 10,32$ $R^2 = 0,9986$	28,77
*1000	0,409	0,357	91,90		
500	0,412	0,292	81,11		
*250	0,422	0,273	76,49		
125	0,442	0,258	71,01		
*62,5	0,510	0,248	58,60		
*2000	0,392	0,391	99,74		

Tabel 7. Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase oleh Fraksi Etil Asetat Daun Kedabu

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Abs. Sampel (S_1)	Abs. Sampel (S_0)	% Inhibisi	Persamaan Linear	IC ₅₀
250	0,133	0,047	86,48	$y = 8,9021x + 23,872$ $R^2 = 0,9921$	18,82
125	0,257	0,034	64,75		
*62,5	0,314	0,020	59,65		
*31,25	0,330	0,012	55,86		
15,625	0,400	0,012	44,87		
*7,8125	0,417	0,012	42,24		
*3,90625	0,464	0,017	35,61		

Tabel 8. Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Tirosinase oleh Fraksi *n*-Butanol Daun Kedabu

Konsentrasi (µg/mL)	Abs. Sampel (S ₁)	Abs. Sampel (S ₀)	% Inhibisi	Persamaan Linear	IC ₅₀
*250	0,069	0,001	89,16	y = 16,393x - 2,3861 R ² = 0,9936	24,42
125	0,206	0,006	68,33		
62,5	0,285	0,003	55,60		
*31,25	0,307	0,003	52,13		
*15,625	0,374	0,002	41,29		
*7,8125	0,421	0,000	33,56		
3,90625	0,434	-0,004	30,88		

Kemampuan flavonoid dalam menghambat terjadinya pigmentasi kulit adalah dengan cara menghambat langsung aktivitas enzim tirosinase pada proses melanogenesis. Senyawa flavonoid menghambat enzim tirosinase dengan mekanisme inhibitor kompetitif dengan substratnya⁽⁷⁾. Posisi gugus hidroksil dan jumlah gugusnya pada senyawa flavonoid memiliki peranan penting dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase. Semakin banyak jumlah gugus OH pada cincin benzena, maka semakin berfungsi dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase, sedangkan adanya konjugat gula pada cincin benzena dapat menurunkan aktivitas penghambatan⁽¹⁶⁾.

Kemampuan sampel dalam menginhibisi enzim tirosinase juga dipengaruhi oleh tingginya kemampuan antioksidan yang dimiliki oleh sampel. Antioksidan dapat menghambat reaksi oksidasi enzim sehingga enzim tidak dapat mengoksidasi reaksi L-tirosin menjadi L-DOPA dan reaksi L-DOPA menjadi *dopaquinon* sehingga proses melanogenesis terhambat dan tidak terbentuk melanin⁽⁹⁾. Penentuan aktivitas antioksidan yang telah dilakukan oleh⁽¹⁷⁾ terhadap sampel ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol daun kedabu (*Sonneratia ovata* Backer) memiliki kemampuan antioksidan yang sangat kuat. Perbandingan

antara nilai IC₅₀ aktivitas antioksidan sampel dan nilai IC₅₀ pengujian enzim tirosinase didapatkan suatu hubungan yang linear, dimana semakin kecil nilai IC₅₀ aktivitas antioksidan sampel maka semakin kecil pula nilai IC₅₀ aktivitas inhibitor enzim tirosinase dari sampel tersebut. Dapat diartikan bahwa semakin besar potensi antioksidan suatu sampel maka semakin besar pula potensi inhibisi enzim tirosinase.

Jumlah kandungan flavonoid, fenolik, steroid dan terpenoid serta kekuatan aktivitas antioksidan menjadi alasan mengapa fraksi etil asetat, fraksi *n*-butanol, fraksi *n*-heksana dan ekstrak etanol memiliki kemampuan aktivitas inhibitor enzim tirosinase yang kuat.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa inhibitor aktivitas enzim tirosinase yang paling baik dihasilkan oleh fraksi etil asetat dengan nilai IC₅₀ sebesar 18,82 µg/mL diikuti oleh fraksi *n*-butanol dengan nilai IC₅₀ 24,42 µg/mL, fraksi *n*-heksana dengan nilai IC₅₀ sebesar 28,77 µg/mL dan ekstrak etanol dengan nilai IC₅₀ 99,03 µg/mL. Baik ekstrak maupun fraksi-fraksi daun kedabu memiliki aktivitas inhibitor enzim tirosinase dengan kategori kuat yang dibandingkan dengan asam kojat dengan nilai IC₅₀ 30,09 µg/mL.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Lembaga P3M STIFAR Riau atas pendanaan penelitian ini pada skema Hibah Dosen Pemula.

DAFTAR PUSTAKA

1. Isfardiyana SI, dan Safitri SR. Pentingnya Melindungi Kulit dari Sinar Ultraviolet dan Cara Melindungi Kulit dengan *Sunblock* Buatan, *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*. 2014,3(2): 126-133.
2. Erdmann VA, and Barciszewski J. *RNA Technologies and Their Applications*, Springer-Verlag. Heidelberg. 2010.
3. Halaban R, Hebert DN and Fisher ED. Tyrosinase Maturation and Oligomerization in the Endoplasmic Reticulum Require a Melanocyte Specific Factor, *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278(28): 25607-25617.
4. Fais A, Corda M, Era B, Fadda MB, Quezada E, Santana L, Picciau C. Tyrosinase Inhibitor Activity of Coumarin-Resveratrol Hybrid Molecules, *Journal molecules*. 2009, 1(1): 2514-2520.
5. Himawan R. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% dan Etil Asetat Daun Sukun (*Artocarpus altilis* Park.) Fosberg) sebagai Inhibitor Tيروسinase, *Jurnal Farmamedika*. 2016, 1(2): 63-69.
6. Lin JW, Chiang HM, Lin YC, Wen KC. Natural Products with Skin-Whitening Effects, *Journal Food and Drugs analysis*. 2008, 16(2): 1-10.
7. Chang TS. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors, *International Journal of Molecular Sciences*. 2009, 1(1): 2440- 2475.
8. Karadeniz F, Burdurlu HS, Koca N, & Soyer Y. Antioxidant Activity of Selected Fruits and Vegetables Grown in Turkey, *Turk J Agric*. 2005, 29(25): 297-303.
9. Maack A and Pegard A. *Populus nigra* (Salicaceae) Absolute Rich in Phenolic Acids, Phenylpropanoids and Flavonoids as a New Potent Tyrosinase Inhibitor, *Journal Fitoterapia*. 2016, 111(3): 95–101.
10. Dhianawaty D dan Ruslin H. Kandungan Total Polifenol dan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Metanol Akar *Imperata cylindrica* (L) Beauv (Alang-alang), *Jurnal Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran*. 2015, 47(1): 2338-6223.
11. Harbone JB. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Penerjemah: Kosasih P, Soediro Iwang, Penerbit ITB Bandung. 2006.
12. Baumann L, & Saghari S. *Basic Science of The Dermis; Cosmetic Dermatology. Second Edition*, Mc Graw Hill. New York. 2009.
13. Zaidi K, Alia A, Ali S. Purification and Characterization of Melanogenic Enzyme Tyrosinase From Button Mushroom. *Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research*. 2016, 2014(6): 1-6
14. Sari AP. Aktivitas Antioksidan dan Inhibisi Enzim Tيروسinase dari Ekstrak Daun Petai Belalang (*Archidendron Clypearia* (Jack) Nielson), *Skripsi. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru*. 2016.
15. Nguyen T, Pham H, Pham N, Quach N, Pudhom K, Hansen PE, et al. Chemical Constituents from *Sonneratia ovata* Backer and Their In Vitro Cytotoxicity and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015, 25(11): 2366-2371.
16. Sanjeewa KKA, Kim EA, Son KT, Jeon YJ. Bioactive Properties and Potentials Cosmeceutical Applications of Phlorotannins Isolated from Brown

- Seaweeds: A Review. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2016, 16(5): 100–105.
17. Basit AN. Penentuan Total Fenolik, Flavonoid, dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Kedabu (*Sonneratia ovata* Backer), *Jurnal Farmasi Indonesia*, 2020, Vol 12 (1), 1-12.
18. Zolghadri S, Bahrami A, Hassan Khan MT, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, *et al.* A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2019.34(1), 279–309.
19. Hanani E. *Analisis Fitokimia*, Penerbit: EGC, Jakarta. 2016.