

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Berdasarkan hasil penelitian Bhaskaran *et al.* (2016) mengemukakan bahwa ekstrak etanol *Azolla* mengandung sejumlah besar fenol, tanin dan flavanoid, alkaloid dan saponin dengan hasil analisis kuantitatif dari ekstrak etanol *azolla* yaitu fenol ($90,2 \pm 2,85$ mg GAE / g), tanin ($82,2 \pm 5,25$ mg TAE / g), flavonoid ($58,5 \pm 1,87$ mg QE / g), saponin ($12,1 \pm 3,78$ mg / g), dan alkaloid ($2,2 \pm 0,55$ mg / g), dan analisis antioksidan secara *in vitro* memiliki antioksidan yang prospektif terhadap radikal bebas. Uji antioksidan secara *in vitro* menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dengan nilai IC_{50} sebesar 59,8 μ g/ml. Uji antioksidan dengan metode *superoxide* dengan nilai IC_{50} 53,25 μ g/ml dibandingkan dengan asam askorbat 49,75 μ g/ml. Hal ini menunjukkan bahawa ekstrak tanaman *Azolla* memiliki kemampuan yang hampir sama dengan asam askorbat dalam menangkal *superoxide*.

Penelitian Selvaraj *et al* (2013) melaporkan ekstrak metanol *Azolla microphylla* mengandung senyawa bioaktif polifenol yang telah diisolasi dan diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis serta telah ditemukan dua senyawa golongan flavonoid yaitu rutin dan kuersetin. Dengan diketahui dua senyawa ini selanjutnya di uji aktivitas sebagai penangkap radikal bebas dengan metode ABTS (2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) dan DPPH (2,2-diphenyl-1-picarylhydrazyl) dan FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*). Dalam ekstrak metanol menunjukkan persentase aktivitas antioksidan menggunakan DPPH sebesar 88,42 %, ABTS 50,3 %, FRAP 55 %. Dalam penelitiannya juga melaporkan ekstrak kloroform *Azolla microphylla* memiliki persentase antioksidan menggunakan metode DPPH sebesar 86,69 %, ABTS 48,2 % dan FRAP 52%. Dan ekstrak etil asetat memiliki persentase aktivitas antioksidan dengan metode DPPH sebesar 92,61 %, ABTS 55,4 %, FRAP 56 %.

Menurut Gerard (2013) pada penelitiannya yang bertujuan untuk mengevaluasi pemanfaatan ekstrak metanol *Azolla microphylla* sebagai sumber yang berpotensi sebagai senyawa antimikroba. Dalam skrining fitokimia dilaporkan sejumlah besar fenolik dan flavonoid ada dalam ekstrak metanol dan hasil penelitian menunjukkan potensi *Azolla microphylla* sebagai antimikroba terhadap bakteri patogen *Xanthomonas* (Gerard, 2013).

Penelitian yang akan dilakukan berbeda dengan penelitian yang terdahulu, kali ini peneliti akan menguji aktivitas *anti aging* dari ekstrak herba *apuh-apuhan* karena dalam penelitian terdahulu dilaporkan ekstrak herba *apuh-apuhan* memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang memiliki potensi sebagai antioksidan. Namun, pada penelitian kali ini peneliti bermaksud menguji apakah senyawa metabolit sekunder pada ekstrak herba *apuh-apuhan* juga memiliki potensi menghambat enzim kolagenase penyebab terbentuknya kerutan pada kulit.

B. LANDASAN TEORI

1. *Azolla microphylla*

Azolla adalah tanaman air yang tumbuh mengapung serta mengambang dipermukaan air kolam, selokan, dan sawah pada daerah beriklim tropis dan sub tropis, genus ini adalah satu-satunya dari keluarga *Azollaceae* dan memiliki enam sampai delapan spesies. Tumbuhan *Azolla* dalam taksonomi tumbuhan mempunyai klasifikasi sebagai berikut (Arifin, 1996):

Kingdom : Palntae (Tumbuhan)

Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)

Divisi : Pteridophyta

Kelas : Leptosporangiopsida (Heterosporous)

Ordo : Salviniaceae

Genus : *Azolla*

Spesies : *Azolla microphylla*



Gambar 2.1. Tanaman *Azolla microphylla*

Azolla microphylla (*A. microphylla*) merupakan salah satu spesies *Azolla* yang mulai banyak digunakan dan dibudidayakan di Indonesia. Dibanding spesies yang lain, *A. microphylla* lebih toleran terhadap temperatur agak tinggi, sehingga sangat baik bila dibudidayakan pada kondisi iklim tropis seperti Indonesia. Selain itu, jenis ini dapat menghasilkan biomassa dalam jumlah banyak dengan kemampuan memfiksasi N_2 dari udara yang tinggi. Efektivitas asosiasi antara tanaman *A. microphylla* dengan mikrosibion *Anabaena azollae*, terjadi apabila kondisi medium tumbuh yaitu unsur hara terpenuhi seperti N, P, K. Selain unsur makro, *A. microphylla* membutuhkan unsur mikro (Fe, Zn, Co, Mn, dan Mo) dan mikronutrien lain yang biasa terdapat di dalam tanah (Khan, 1998)

A. microphylla adalah tumbuhan air yang tumbuh di permukaan air, tumbuhan ini di Indonesia umumnya untuk pakan ternak dan bahan baku pembuatan pupuk. Berdasarkan penelitian Bhaskaran *et al* (2016) tumbuhan *A. microphylla* ini mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yaitu fenol, flavonoid, alkaloid, steroid, tannin, glikosida jantung, dan saponin yang hanya terdapat dari ekstrak etanol. Analisis kuantitatif dari senyawa fenol $90,2 \pm 2,85$ mg/g, tannin $82,2 \pm 5,25$ mg/g, flavonoid $58,8 \pm 1,87$ mg/g, saponin $12,1 \pm 3,78$ mg/g, dan alkaloid $2,2 \pm 0,55$ mg/g. Metabolit sekunder yang berasal dari tanaman mendapat perhatian beberapa tahun ini karena memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antitumor, antidiabetes dan lain sebagainya. Pada tanaman

A. microphylla menunjukkan jumlah metabolit sekunder yang cukup besar dan diharapkan ekstrak tanaman menghasilkan kandungan antioksidan yang baik.

2. Kandungan Kimia

Tanaman *A. microphylla* menurut Bhaskaran *et al* (2016) memiliki kandungan flavonoid sebesar $58,8 \pm 1,87$ mg GAE/g. Analisis kuantitatif didapat kandungan senyawa fenol sebesar $90,2 \pm 2,85$ mg/g, tannin $82,2 \pm 5,25$ mg/g, saponin $12,1 \pm 3,78$ mg/g, dan alkaloid $2,2 \pm 0,55$ mg/g. Selain itu dalam tumbuhan *A. microphylla* mengandung glikosida jantung dan saponin yang hanya ada pada ekstrak etanol.

Diketahui senyawa fenolik hidroksil merupakan donor hidrogen yang baik. Kelompok hidroksil fenolik adalah donor hidrogen yang baik sebagaimana antioksidan merupakan penyumbang hidrogen. Senyawa fenolik menyumbang hidrogen yang berinteraksi dengan spesies nitrogen reaktif dengan cara menghentikan siklus pembentukan radikal baru. Setelah berinteraksi bentuk radikal antioksidan yang dihasilkan memiliki stabilitas jauh lebih besar dibandingkan radikal awalnya. Interaksi gugus hidroksi fenolat dengan elektron π dari cincin benzene memberi sifat khusus pada molekul, terutama kemampuan untuk menghasilkan radikal bebas dimana radikal distabilisasikan melalui delokalisasi (Pereira *et al.*, 2009).

Penelitian Selvaraj *et al* (2013) melaporkan ekstrak metanol *Azolla microphylla* mengandung senyawa biokaktif polifenol yang telah diisolasi dan diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis telah ditemukan dua senyawa golongan flavonoid yaitu rutin dan kuersetin.

3. Penuaan pada Kulit

Penuaan dini adalah kelemahan dan kegagalan fisik-mental yang berhubungan dengan penuaan normal disebabkan oleh disfungsi fisiologi.

Penuaan dapat dibagi menjadi dua konsep yang berbeda, yaitu konsep penuaan intrinsik dan penuaan ekstrinsik.

a. Penuaan Intrinsik

Penuaan intrinsik atau penuaan alamiah merupakan penuaan yang terus berlangsung, dimulai pada usia pertengahan 20-an. Penuaan intrinsik terjadi karena akumulasi kerusakan endogen akibat pembentukan senyawa oksigen reaktif selama metabolisme oksidasi seluler. Pemendekan telomere pada pembelahan sel juga dikatakan salah satu penyebab penuaan intrinsik kulit, selain karena penurunan faktor pertumbuhan dan hormon. Manifestasi klinis penuaan kronologis kulit dapat berupa serosis, kelemahan, kerutan dan gambaran tumor jinak seperti keratosis seboroik dan angioma buah *cherry*.

b. Penuaan Ekstrinsik

Penuaan ekstrinsik dikarenakan radiasi UV. Radiasi UV (dengan panjang gelombang 100-400 nm) merupakan 5% dari seluruh kisaran radiasi sinar matahari. Secara umum dibagi menjadi 3, yaitu UV A (320-400 nm), UV B (28-320 nm) dan UV C (100-280 nm). UV C terabsorpsi langsung oleh lapisan ozon di atmosfer. Radiasi UV mengaktifasi reseptor permukaan sel yang mengakibatkan propagasi sinyal intraseluler dan sintesis faktor transkripsi, protein inti yang berikatan dengan DNA untuk meningkatkan dan menekan gen transkripsi. Satu faktor transkripsi yang secara cepat dan prominen terinduksi oleh radiasi UV adalah *Activator Protein-1* (AP-1). AP-1 mempengaruhi gen transkripsi kolagen pada fibroblast, menurunkan level prokolagen I dan III, selain itu AP-1 merangsang gen transkripsi yang mengkode *matrix-degrading enzyme* seperti metalloproteinase. Pada kulit mengalami *photoaging* tersebut dapat melibatkan gambaran klinis dan kasar, bercak kuning, kering dan talangiectasis (Wahyuningsih., 2011)

Selain konsep tentang penuaan, para ahli juga mengemukakan teori-teori yang berkaitan dengan penuaan kulit dibagi menjadi 4 teori yaitu (Pagkahila., 2013) :

a. Teori *Wear and Tear*

Teori ini menyatakan bahwa organ akan mengalami kerusakan bila dipakai secara berlebihan dan makin sering dipakai berlebihan akan makin banyak yang rusak sehingga tubuh tidak mampu memperbaiki.

b. Teori Neuroendokrin

Teori ini menyatakan ketidakmampuan produksi hormon untuk mengimbangi fungsi yang berlebihan sehingga tubuh akan mengalami kekurangan hormon secara menyeluruh sehingga terjadi proses penuaan. Walaupun mekanisme hipotalamus, hipofise, dan organ sasaran masih bekerja tetapi berhubung kerjanya berlebihan sehingga poros hipotalamus hipofise dan organ sasaran tetap tidak mampu mengimbangnya dan akhirnya proses penuaan akan terjadi.

c. Teori Genetika

Teori genetik berupa kontrol genetik mengatur manusia sesuai dengan apa yang telah diatur di dalam DNA seseorang, namun sekarang berbagai kemajuan ilmu kedokteran anti penuaan telah mulai dijajaki untuk memutus rantai DNA untuk mencegah kerusakan dan memperbaiki DNA.

d. Teori Radikal Bebas

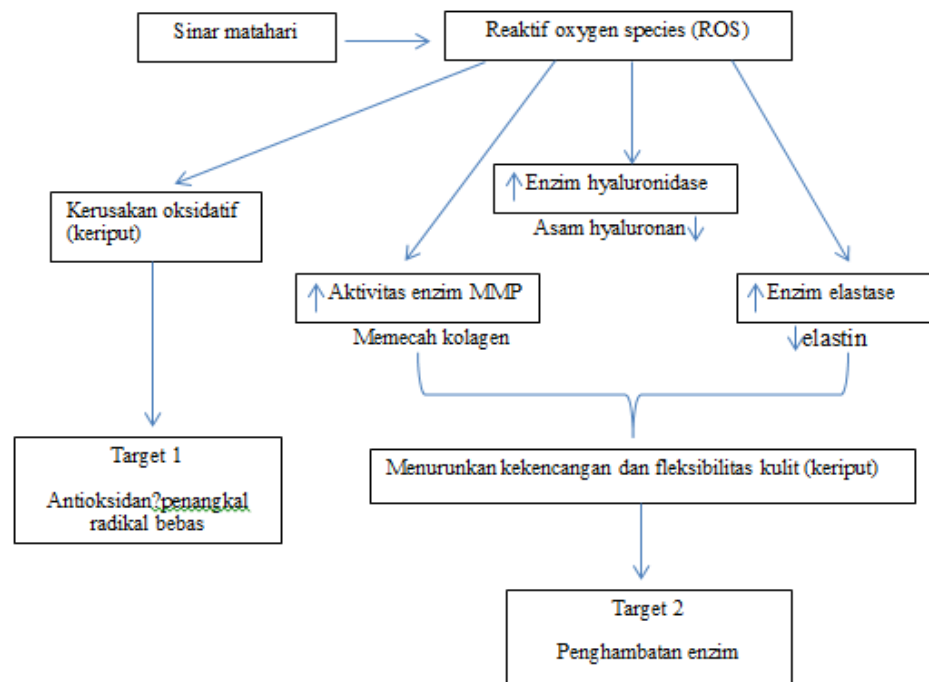
Teori ini diyakini sebagai salah satu unsur yang mempercepat proses penuaan sehingga berdasarkan teori ini maka terbentuknya radikal bebas yang berlebihan harus segera dihindari.

Radikal bebas didefinisikan sebagai suatu molekul, atom atau beberapa grup atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Molekul atau atom tersebut sangat labil dan mudah terbentuk senyawa baru. Terdapat berbagai macam radikal bebas sebagai turunan dari karbon (C) dan nitrogen (N), akan tetapi yang paling banyak dipelajari adalah radikal oksigen (Deddy, 2013)

Radikal yang terdapat dalam tubuh dapat berasal dari dalam (endogen) atau dari luar tubuh (eksogen). Secara endogen, radikal bebas terbentuk sebagai respon normal dari rantai reaksi respirasi (pernafasan)

di dalam tubuh. Sumber terbentuknya radikal bebas dalam bahan biologis adalah enzim-enzim, lipoksinase, siklo-oksigenase, enzim-enzim pentranspor elektron dan kuinon. Radikal bebas diproduksi di dalam sel oleh mitokondria, membran plasma, lisosom, peroksisom, retikulum endoplasmik dan inti sel. Secara eksogen, radikal bebas diperoleh dari bermacam-macam sumber antara lain polutan, makanan dan minuman, radiasi, ozon dan pestisida (residu pestisida) (Deddy., 2013)

Radikal bebas yang mengambil elektron dari DNA dapat menyebabkan perubahan struktur DNA sehingga timbulah sel-sel mutan. Bila mutasi ini terjadi berlangsung lama dapat menjadi kanker. Radikal bebas juga berperan dalam proses menua, dimana reaksi inisiasi radikal bebas di mitokondria menyebabkan diproduksinya *reactive oxygen species* (ROS) yang bersifat reaktif. Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultraviolet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lain (Asri, 2014).



Gambar 2.2. Mekanisme sinar UV dalam menyebabkan penuaan dini dan mengaktifasi enzim kolagenase.

4. Enzim Pendegradasi Kolagen dan Elastin

Enzim elastase merupakan enzim yang mampu mendegradasi elastin, elastin ini berada dibawah jaringan ikat kulit. Keberadaannya mampu menghidrolisis komponen protein yang ada di bawah jaringan ikat termasuk kolagen dan elastin. Elastin adalah komponen utama dari serat elastis dari jaringan dan tendon. Serat elastis pada kulit, bersama dengan serat kolagen membentuk jaringan di bawah epidermis. Elastase juga berperan dalam proses inflamasi. Enzim ini memiliki sifat reaktivitas dan nonspesifitas yang mampu menyerang semua protein matriks pada jaringan ikat, termasuk elastin, kolagen, proteoglikan dan keratin. Serat elastis ini juga mudah terdekomposisi oleh sekresi dan aktivasi elastase yang disebabkan oleh paparan sinar UV dan *reactive oxygen species* (ROS) (Kim *et al*,2008).

Enzim kolagenase merupakan enzim dari keluarga metaloprotease peptidase yang bekerja pada substrat kolagen. Pengaturan dari enzim kolagenase merupakan proses yang kompleks namun enzim kolagenase disintesis dan dieksresikan pada jaringan ikat (Hagen *et al*. 2008). Enzim kolagenase mampu mendegradasi ikatan polipeptida. Enzim ini memiliki dua tipe yang berbeda berdasarkan fungsi fisiologisnya. Sering kolagenase berkaitan dengan produksi hormon dan farmakologi-peptida aktif sebagai fungsi seluler. Fungsi tersebut meliputi pencernaan protein, penggumpalan darah, fibrinolisis, aktivasi kompleks dan fertilisasi. Tipe yang kedua yaitu metalokolagenase yang terdiri dari seng (Zn) yang membutuhkan kalsium untuk kestabilan. Metalokolagenase termasuk ke dalam enzim ekstraseluler (Kim *et al*. 2002). Selama proses penuaan, kolagen, elastin, dan asam hyaluronan menurun. Hal itu menyebabkan kekuatan dan fleksibilitas kulit menurun sehingga timbul kerutan yang nampak pada permukaan kulit. Selain itu yang menyebabkan kulit mengerut adanya peningkatan aktivitas enzim seperti kolagenase, elastase dan hyaluronidase. Kolagenase merupakan enzim yang mampu mendegradasi kolagen. Dalam kulit manusia kolagen merupakan komponen utama dengan presentase 70-80 % dari total berat kulit.

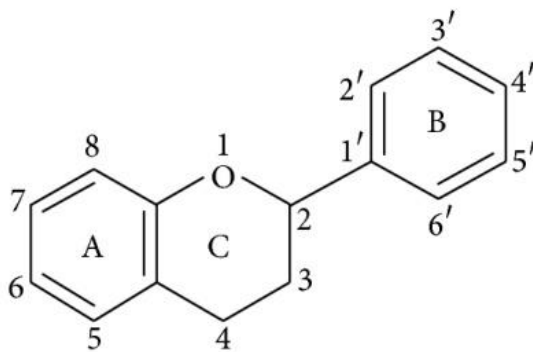
Peningkatan degradasi kolagen sangat signifikan dalam proses *photo aging*. Asam hyaluronan juga merupakan komponen penyusun substansi jaringan matriks dan memiliki peran dalam pengembangan, pertumbuhan, dan perbaikan jaringan yang rusak. Sementara itu, elastin berperan dalam menjaga elastisitas kulit sehingga elastase bisa menurunkannya (Widowati *et al.*, 2016).

5. Komponen Fenolik

Senyawa fenolik merupakan komponen dari metabolit sekunder, yang mana dihasilkan dari asam shikimik, fosfat pentose melalui metabolisme fenilpropanoid. Senyawa tersebut mengandung cincin benzene dengan satu atau lebih substitusi hidroksil dan membentuk molekul fenolik sederhana hingga senyawa yang terpolimerasi. Fenolik adalah senyawa yang banyak ditemukan pada tumbuhan, dan fenol ini didistribusi sepanjang proses metabolisme tumbuhan. Fenolik atau polifenol memiliki banyak varietas seperti flavonoids sederhana, asam fenolat, flavonoid kompleks dan antosianin. Komponen fenolik ini berperan dalam respon pertahanan pada tumbuhan. Selain itu, metabolit fenolik berperan penting dalam proses yang lainnya seperti membuat senyawa yang dapat menarik serangga atau hewan lain untuk membantu penyerbukan, memberi warna pada tumbuhan dan untuk berkamuflase dalam pertahanan terhadap herbivora, serta aktivitas antibakteri dan antijamur.

Senyawa fenolik juga memiliki keuntungan terhadap kesehatan tubuh. Beberapa penelitian senyawa fenolik mampu menghambat penyerapan amilase dalam penyakit diabetes. Senyawa ini didapatkan dari buah dan sayur. Senyawa fenolik, misalnya asam fenolat dan flavonoid dapat meningkatkan manfaat kesehatan dengan mengurangi risiko sindrom metabolik dan komplikasi terkait diabetes tipe 2 dan banyak peneliti telah melaporkan keuntungan dari senyawa fenolik sebagai *anti aging*, antiinflamasi, antioksidan dan antiproliferatif (Shashank & Pandey, 2013).

Flavonoid merupakan sekelompok senyawa fenolik yang ditemukan pada tumbuhan, Sudah lebih dari 4.000 jenis flavonoid yang telah diidentifikasi. Secara kimiawi flavonoid tersusun atas lima belas atom karbon dan memiliki dua cincin benzene yang dihubungkan melalui cincin piramida heterosiklik. Flavonoid dibagi menjadi beberapa kelas seperti flavon (misalnya, flavon, apigenin, dan luteolin), flavonol (misalnya kuersetin, kaempferol, myricetin, dan fisetin), flavanon (misalnya, flavanon, hesperetin, dan naringenin). Struktur umum mereka seperti ada pada Gambar 2.3. Berbagai kelas flavonoid berbeda dalam tingkat oksidasi dan pola substitusi cincin C, sedangkan ada senyawa yang berbeda dalam pola substitusi cincin A dan B.



Gambar 2.3. Struktur umum senyawa flavonoid

Flavonoid terjadi sebagai aglikon, glikosida, dan turunan alkohol. Struktur flavonoid dasar adalah aglikon (gambar). Cincin enam anggota yang dikondensasikan dengan cincin benzen adalah α -pyrone (flavonols dan flavanones) atau dihidroderivatif (flavonol dan flavanon). Flavonol berbeda dari flavanon oleh gugus hidroksil pada ikatan 3-posisi dan C2-C3 [40]. Flavonoid sering dihidroksilasi pada posisi 3, 5, 7, 2, 3', 4', dan 5'. Metil eter dan ester asetil dari kelompok alkohol diketahui terjadi di alam. Ketika glikosida terbentuk, hubungan glikosidik biasanya terletak di posisi 3 atau 7 dan karbohidrat dapat berupa L-rhamnose, D-glukosa, glucorhamnose, galaktosa, atau arabinose (Shashank & Pandey, 2013)

6. Mekanisme Inhibitor Kolagenase

Penghambatan enzim kolagenase adalah efek yang berlawanan dengan memodulasi aktivitas enzim kolagenase dalam organisme

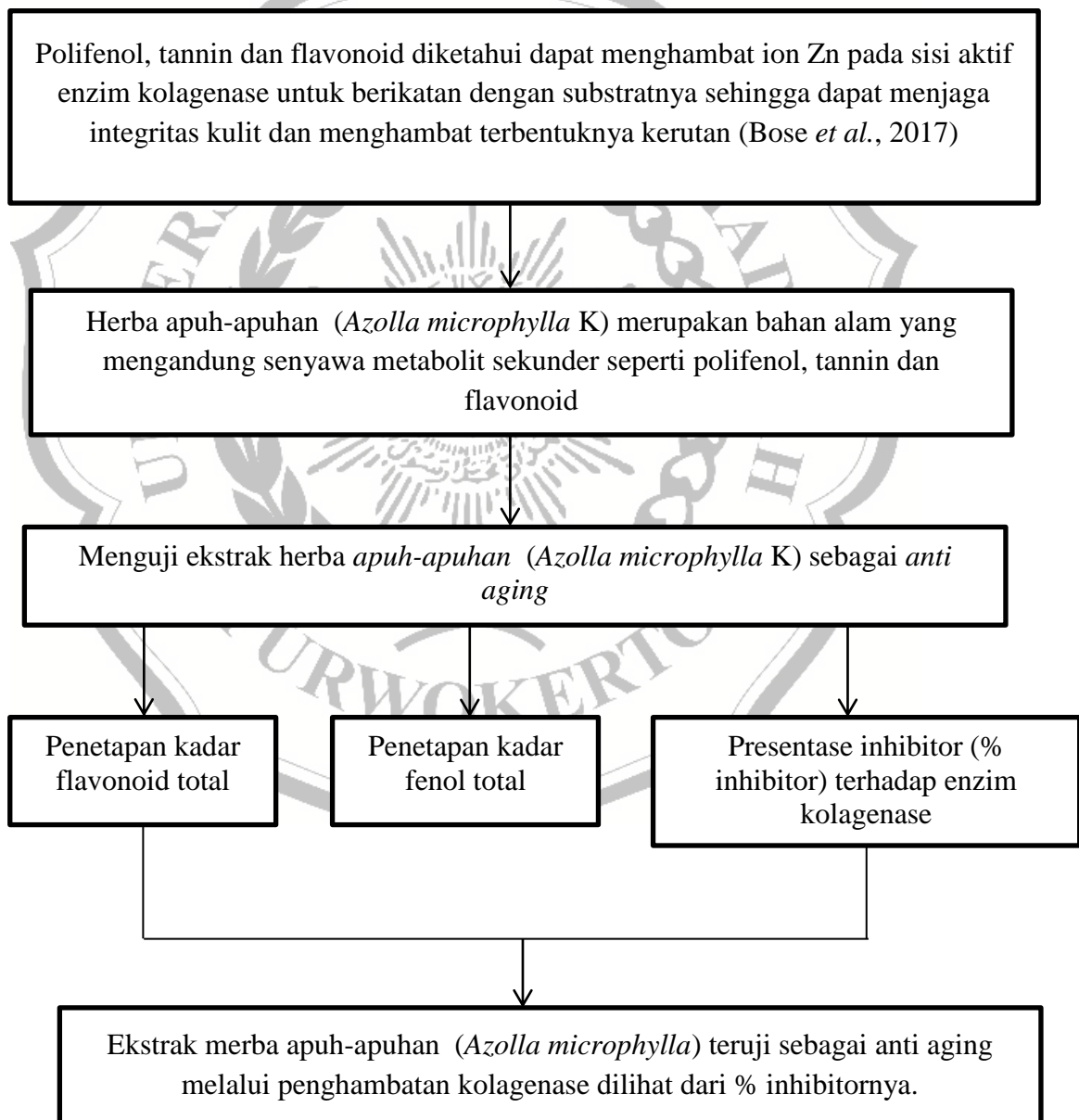
normal. Di alam, peran ini dimainkan oleh keluarga inhibitor yang dikenal sebagai inhibitor jaringan metalloproteinase, TIMP, yaitu protein yang terkait dengan beberapa matriks, dan tidak terlalu selektif dalam mengekangnya. Selain plasma manusia α 2-makroglobulin dan protein terkait dari plasma mamalia lain (Vijayakumar *et al.*, 2017)

Metalloproteinase atau yang dikenal dengan kolagenase memiliki dua ion seng (Zn) yang sama, satu terletak di sisi aktif enzim yang terlibat dalam proses katalitik dan fungsi struktural. Ion Zn juga mengkatalis ikatan dengan tiga residu histidin dalam sisi aktif. Seng (Zn) pada sisi aktif enzim bertindak sebagai asam Lewis yang merupakan akseptor elektron yang baik. Maka dari itu, mampu mempolarisasi gugus yang terikat pada substrat sehingga jika kelompok ini adalah basa akan meningkatkan kekuatan nukleofilik. Selain bertindak sebagai asam, Ion Zn disini dapat meningkatkan gugus penghubung untuk mendapat serangan dari basa. Misalkan ada suatu molekul yang mengikat pada Zn di sisi aktif enzim akan berdisosiasi dibawah efek polarisasi Zn^{2+} , bahkan di lingkungan dengan nilai pH yang tidak terlalu tinggi menghasilkan hidroksil yang mampu menyerang molekul lain. Ini adalah mekanisme yang ditunjukkan oleh karbonat anhidrase, dan enzim lain yang memiliki ion Zn, yang mana oksigen hidrosilik terikat pada Zn^{2+} menyerang karbon dari CO_2 dan menghasilkan bikarbonat setelah penataan ulang dan dekomposisi antara spesies. Di sisi lain, mekanisme katalisis oleh matriks metalloproteinase dengan cara menghidrolisis amida (ikatan peptidik) dimulai dengan serangan Zn sebagai asam Lewis pada oksigen karbonil serta mempolarisasi karbonil dan memfasilitasi serangan dari karbon oleh hidroksi dihubungkan dengan Zn sehingga bermuatan negative kemudian terurai menjadi karboksilat dan amina (De Andrade Leite, 2009).

Metode yang digunakan untuk mengetahui adanya aktivitas *anti aging* menggunakan instrument spektrofotometri UV-Vis,. Prinsip dari

metode ini yaitu kolagenase mampu memotong ikatan X-Gly (glisin) dari kolagen dan peptida di ikatan yang mengandung urutan Pro-X-Gly-Pro (prolin, glisin, prolin) yang merupakan asam amino penyusun kolagen. FLGPA merupakan substrat yang digunakan, adanya penurunan absorbansi substrat setelah penambahan enzim diukur secara spektrofotometri pada 345 nm (Vijayakumar *et al.*, 2017).

C. Kerangka Konsep



D. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

Diduga senyawa metabolit sekunder yang ada pada ekstrak herba *apuh-
apuhan* (*Azolla microphylla* K) berpotensi sebagai *anti aging* melalui
penghambatan enzim kolagenase secara *in vitro*. Hal tersebut didasarkan bahwa
adanya senyawa polifenol, tannin dan flavonoid diketahui dapat menghambat ion
Zn pada sisi aktif enzim kolagenase untuk berikatan dengan substratnya sehingga
dapat menjaga integritas kulit dan menghambat terbentuknya kerutan.

