
PENGHAMBATAN AKTIVITAS XANTHINE OXIDASE OLEH FRAKSI BUTANOL
HERBA CEPLUKAN (*Physalis angulata*) SECARA *IN VITRO*

Laili Nailul Muna¹

Fakultas Farmasi, Universitas Alma Ata Yogyakarta

ABSTRAK

Gout merupakan penyakit metabolik yang terjadi akibat tingginya kadar asam urat dalam darah (hiperurisemia). Salah satu obat yang digunakan untuk mengatasi gout adalah allopurinol dengan mekanisme menghambat aktivitas *xanthine oxidase*. Herba ceplukan diketahui mengandung flavonoid dan terbukti secara empiris untuk mengobati keluhan rematik dan asam urat. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk menguji apakah Herba ceplukan mampu menghambat aktivitas *xanthine oxidase*. Sebagai pembanding digunakan allopurinol. Ekstrak etanol dibuat dari serbuk herba ceplukan diekstraksi dengan etanol menggunakan metode penyarian dengan maserasi, kemudian dilanjutkan dengan proses fraksinasi dengan menggunakan pelarut butanol. Flavonoid dalam fraksi butanol dipisah dengan cara Kromatografi Lapis Tipis dan identifikasi bercak dianalisis dengan sinar UV₃₆₆ dengan dan tanpa uap amoniak. Penghambatan aktivitas *xanthine oxidase* oleh fraksi butanol herba ceplukan ditentukan melalui penurunan produksi asam urat yang dimonitor dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 295 nm dengan *xanthine* sebagai substrat. Nilai rate yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai aktivitas. Kemudian ditentukan konsentrasi fraksi yang mampu menghambat aktivitas *xanthine oxidase* sebesar 50% (IC₅₀). Hasil dianalisis dengan menggunakan uji non parametrik yaitu Krukal-Wallis dan dilanjutkan dengan Mann-Whitney. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi butanol herba ceplukan mampu menghambat aktivitas *xanthine oxidase* dengan IC₅₀ 43,55 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan IC₅₀ allopurinol sebesar 3,20 $\mu\text{g/ml}$. Hasil KLT menunjukkan bahwa ekstrak etanol mengandung senyawa flavonoid golongan flavon atau flavonol.

Kata kunci : asam urat, hiperurisemia, *Xanthine Oxidase*, *Physalis angulata*

PENDAHULUAN

Penyakit asam urat (gout) sudah dikenal sejak tahun 2000 tahun yang lalu dan menjadi salah satu penyakit tertua yang dikenal manusia. Diperkirakan bahwa penyakit asam urat terjadi pada 840 orang setiap 100000 orang (Juandy, 2008). Pengobatan gout bertujuan untuk meredakan serangan gout akut dan mencegah masa gout berulang serta batu urat. Salah satu jalur untuk mengatasi gout adalah menurunkan kadar asam urat yang melebihi batas normal dalam darah (Katzung, 1998). Ada dua kelompok obat untuk terapi penyakit gout yaitu obat yang menghentikan proses inflamasi (*uriko surik*) akut dan obat yang menurunkan kadar asam urat (*urikostatik*). Obat golongan uriko statik menghambat kerja enzim *xanthin oxidase* yang mengubah *hipo xanthin* menjadi *xanthin* dan *xanthin* menjadi asam urat. Dengan demikian produksi asam urat berkurang dan produksi *xanthin* maupun *hipo xantin* meningkat. Contoh obatnya adalah Allopurinol. Allopurinol dapat menurunkan konsentrasi asam urat darah secara signifikan dalam beberapa hari atau minggu.

Penelitian penghambat aktivitas XO telah banyak dilakukan pada berbagai

tanaman obat yang berpotensi sebagai obat antigout. Hasil penelitian Iswantini dan Darusman (2003) menunjukkan peran ekstrak kasar flavonoid herba sidaguri sebagai penghambat aktivitas XO dengan daya inhibisi terkuat bila dibandingkan dengan produk jamu komersial antigout lainnya yang beredar di pasaran. Kemampuan ekstrak kasar flavonoid sidaguri sebagai penghambat aktivitas XO mencapai 55.29% melalui mekanisme inhibisi kompetitif (Hidayat, 2007). Herba ciplukan mengandung saponin, flavonoid (luteolin), polifenol, alkaloid, asam palmitat, dan asam tannin (Edeoga *et al*, 2005). Kandungan senyawa flavonoid, tannin, dan alkaloid pada ekstrak kasar herba ciplukan mampu menghambat XO.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan fraksi butanol herba ciplukan dalam menghambat aktivitas *xanthine oxidase* serta membandingkan kemampuan penghambatan aktivitas *xanthine oxidase* antara fraksi butanol herba ciplukan dengan allopurinol sebagai kontrol positif.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Bahan

Serbuk herba ceplukan, allopurinol, xanthine oxidase dan xanthine (sigma Chemical Co) petroleum eter (PE), etanol, dimetilsulfoksida (DMSO), n-butanol, asam asetat glasial, kalium dihidrogen fosfat, natrium hidroksida, Aquadestilata (CV. Multi Kimia), Aqua bidestilata (PT. Ikaparmindo Putra mas).

Alat

Spektrofotometer Shimadzu Pharma spec UV 1700, seperangkat alat soxhlet (Scott), PH meter ORION, rotary evaporo rator, neraca analitik(Sartorius), mikro pipet (Soccorec), seperangkat alat Kromatografi Kertas, ultrasonic, millipore, dan alat-alat gelas yang lazim.

Definisi Operasional Penelitian

1. Penyiapan Bahan Uji

a. Pembuatan serbuk

Herba ceplukan dikeringkan di oven kemudian dijadikan serbuk.

b. Pembuatan ekstrak

Ekstrak etanol herba ceplukan dibuat dengan menggunakan metode maserasi. Untuk itu 1 kg ceplukan yang telah ditimbang seksama dimaserasi selama 3 hari.

Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali dan masing-masing selama 3 jam. Ekstrak etanol yang diperoleh disaring dan dievaporasi dengan rota vapor vakum sehingga didapatkan ekstrak kental etanol. Selanjutnya ekstrak ceplukan dilarutkan ke dalam pelarut etanol dan dicampur pelarut butanol yang jenuh air, kemudian akan terbentuk 2 lapisan pelarut. Lapisan atas (butanol) dipisahkan kemudian dievaporasi hingga terbentuk ekstrak kental.

c. Larutan dapar fosfat pH 7,5

Larutan K-fosfat monobasa 0,2 M (27,2 gram dalam 1000,0 ml) sebanyak 50,0 ml ditambah larutan NaOH 0,2 N (8 gram dalam 1000,0 ml) hingga pH 7,5 kemudian diencerkan dengan aqua bidest bebas CO₂ sampai 200,0 ml.

d. Larutan NaOH 0,01 N

NaOH sebanyak 100,0 mg dilarutkan dalam aquabidest bebas CO₂ sampai 250,0 ml.

e. Larutan xanthine 100 µg/ml

Xanthine murni yang telah ditimbang sebanyak 100,0 mg dilarutkan dengan beberapa tetes NaOH 0,01 N, kemudian disoni -

kasi sampai larut (jika perlu ditambahkan beberapa tetes NaOH 0,2 N), dan ditambah dapar fosfat sampai 100,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/ml. Dari larutan xanthine 1 mg/ml diambil 1.0 ml kemudian ditambah dapar fosfat sampai 10,0 ml untuk membuat larutan xanthine konsentrasi 100 µg/ml

f. Larutan *xanthine oxidase* 50 mU/ml

Xanthine oxidase sebanyak 25 unit dilarutkan dalam 10,0 ml dapar fosfat pH 7,5 sehingga diperoleh konsentrasi 2,5 unit/ml (larutan I). Larutan I diambil sebanyak 1,0 ml ditambah dapar fosfat pH 7,5 sampai 25,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 100 mU/ml (larutan II). Untuk membuat larutan xanthine oxidase konsentrasi 50 mU/ml, diambil larutan II sebanyak 5,0 ml kemudian ditambah dapar fosfat pH 7,5 sampai 10.0 ml.

g. Larutan induk dan larutan uji

Ekstrak fraksi butanol dijadikan larutan induk dengan cara melarutkan 100,00 mg ekstrak dengan beberapa tetes DMSO, kemudian ditambah dapar fosfat

pH 7,5 sampai volume 100,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/ml. Dari larutan induk (1 mg/ml) dibuat larutan uji dengan konsentrasi antara 10 µg/ml sampai 100 µg/ml.

i. Larutan pembanding allopurinol

Larutan pembanding allopurinol dibuat dengan cara melarutkan 100,00 mg allopurinol dengan aquadest bebas CO₂ sampai volume 100,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/ml (larutan I). Dari larutan I diambil sebanyak 1,0 ml kemudian ditambah dapar fosfat pH 7.5 sampai 10,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 100 µg/ml (Larutan II). Dari larutan II dibuat larutan pembanding allopurinol dengan konsentrasi antara 10 µg/ml sampai 100 µg/ml.

2. Identifikasi flavonoid dalam fraksi butanol herba ceplukan

a) Uji pendahuluan adanya flavonoid

Uji pendahuluan dilakukan dengan cara memberi uap amoniak pada tetesan kering larutan fraksi butanol dalam

etanol pada kertas Whatman. Bercak berwarna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

b) Pemeriksaan Kromatografi Kertas

Pemisahan flavonoid yang terdapat pada larutan fraksi butanol dilakukan dengan cara kromatografi kertas dengan fase gerak nbutanol-asam asetat-air (4:1:5). Warna dan perubahan warna bercak dengan dan tanpa uap amoniak diperiksa menggunakan lampu UV₃₆₆

3. Penentuan aktivitas *xanthine oxidase*

Aktivitas *xanthine oxidase* ditentukan dengan menambahkan 200 µl substrat (*xanthine*) 100 µg/ml ke dalam campuran 100 µl *xanthine oxidase* 50 U/ml dan 724 µl bufer fosfat Ph 7,5. Aktivitas *xanthine oxidase* ditentukan dengan mengamati kecepatan pembentukan asam urat dari *xanthine* secara spektrofotometer pada panjang gelombang (λ)295 nm dari menit ke-0 sampai menit ke-6 pada suhu 25°C. Data yang diperoleh adalah berupa rate (ΔA_{295} /menit).

4. Penentang penghambatan aktivitas *xanthine oxidase*

Penghambatan aktivitas *xanthine oxidase* ditentukan seperti pada point 3 di atas. Bedanya, pada tahap ini dilakukan penambahan 200 µl larutan uji (dilakukan orientasi menggunakan konsentrasi 10 µg/ml sampai 100 µg/ml) kedalam campuran bufer fosfat dan *xanthine oxidase*. Dengan cara yang sama, ditentukan pula penghambatan aktivitas *xanthine oxidase* oleh 200 µl allopurinol (dilakukan orientasi menggunakan konsentrasi 10 µg/ml sampai 100 µg/ml). Selama 3 menit dalam range pada menit dimana aktivitas *xanthine oxidase* berjalan linier.

5. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa hasil pengukuran serapan secara spektrofotometri UV yaitu ΔA /menit. Data ΔA_{295} /menit ini digunakan untuk menghitung aktivitas *xanthine oxidase* dengan rumus (Anonim, 1995):

$$\text{Aktivitas (unit/ml enzim)} = \frac{(\text{rate} \times 1,024)}{(12,2 \times 0,100)}$$

Keterangan:

1,024 = volume total campuran

12,2 = koefisien ekstingsi asam urat (Mm)

0,100 = volume enzim yang digunakan (ml)

Rate = Δ absorbansi /menit

Data yang diperoleh (unit/ ml enzim) digunakan untuk menghitung aktivitas dalam unit/mg solid.

$$\text{Aktivitas (unit/mg solid)} = \frac{(\text{unit/ml enzim})}{(0,0062 \text{ mg solid/ml})}$$

Keterangan :

0,0062 = mg solid *xanthine oxidase* yang digunakan (mg solid/ml)

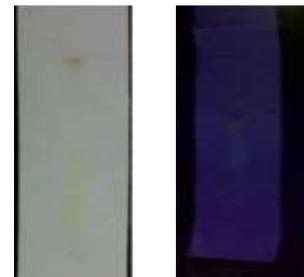
Data digunakan untuk menghitung persentase penghambatan *xanthine oxidase* dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{akt tanpa bahan uji} - \text{akt bahan uji}}{\text{aktivitas tanpa bahan uji}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ (konsentrasi inhibitor yang menghasilkan penghambatan aktivitas *xanthine oxidase* sebesar (50%) dapat ditentukan dengan analisis regresi linier antara konsentrasi senyawa uji terhadap persentase penghambatan aktivitas *xanthine oxidase*, kemudian dilanjutkan dengan uji statistik. Analisis data dilakukan dengan menguji normalitas dan homogenitas dengan taraf kepercayaan 95%. Uji normalitas dilakukan dengan uji Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak.

HASIL

1. Identifikasi flavonoid dalam fraksi butanol herba ceplukan

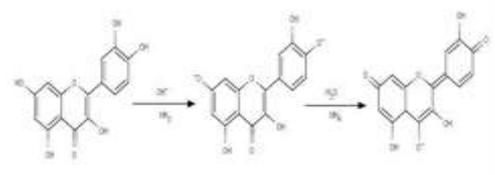


A

B

Gambar 1. Hasil Kromatografi fraksi butanolik ceplukan, A= Bercak dengan uap amoniak tidak di bawah sinar UV₃₆₆, B = Bercak dengan uap amoniak di bawah sinar UV₃₆₆

Tetes kering larutan fraksi butanol herba ceplukan, setelah diberi amoniak ternyata berwarna kuning. Menurut Robinson (1995) bercak berwarna kuning dapat dijadikan informasi awal keberadaan flavonoid. Timbulnya warna kuning ini disebabkan oleh pembentukan garam dan terbentuknya struktur kuinoid yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi lebih panjang dapat dilihat pada Gambar 2

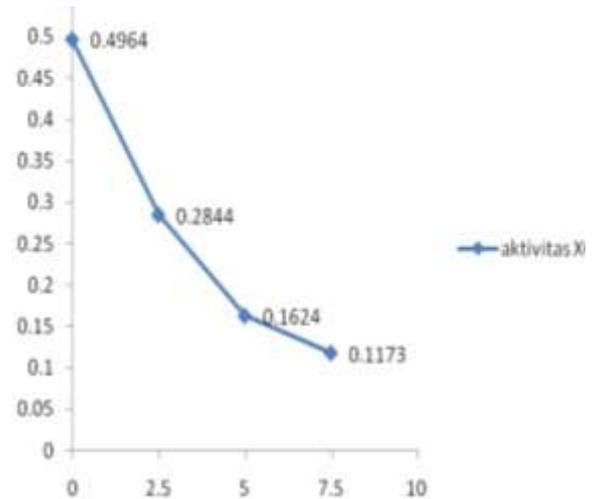


Gambar 2. Reaksi pembentukan struktur kuinoid pada flavonoid (Robinson, 1995)

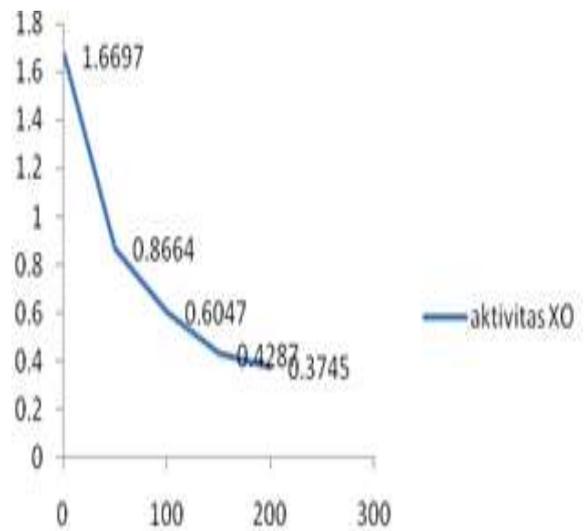
Berdasarkan fluoresensi yang diberikan bercak sebelum dan sesudah diuapikan amonia dapat pula diduga bahwa bercak adalah flavonoid golongan flavon atau flavonol tersulih pada 3-O mampu menyai 5-OH tetapi tanpa 4'-OH bebas; beberapa 6- atau 8-OH flavon dan flavonol tersulih pada 3-O serta mengandung 5-OH; Isoflavon, dihidro flavonol, biflavonil dan beberapa flavanon yang mengandung 5-OH; Khalkon yang mengandung 2'-atau 6'-OH tetapi tidak mengandung 2- atau 4-OH bebas (Markham, 1988).

2. Penentuan aktivitas *xanthine oxidase*

Berdasarkan data-data pada gambar 3 dan 4 dihitung persentase penghambatan (% inhibisi) untuk tiap-tiap bahan uji dan diperoleh data-data sebagaimana tertera pada tabel I. Nilai-nilai inhibisi pada tabel I menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi bahan uji, semakin besar pula persentase penghambatannya sehingga aktivitas *xanthine oxidase* semakin menurun.



Gambar 3. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Allopurinol Terhadap Aktivitas *Xanthine Oxidase*



Gambar 4. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Fraksi buta nol herba ceplukan Terhadap Aktivitas *Xanthine Oxidase*

3. Penentuan penghambatan aktivitas *Xanthine Oxidase*

Tabel 1. Nilai Inhibisi dari Fraksi Butanol Herba Ceplukan dan Allopurinol

Bahan Uji	Konsentrasi (µg/ml)	Inhibisi (%)	Rata-Rata Inhibisi (%)	Allopurinol 1 (Kontrol Positif)			
Tanpa bahan uji	-	0					
Allopurinol	2,5	45,45	42,72		0,0020	0,2708	0,2844 ± 0,0136
		42,71			0,0021	0,2844	
		39,99			0,0022	0,2979	
	5,0	67,28	67,28		0,0012	0,1624	
		67,28			0,0012	0,1624	0,1624 ± 0
		67,28			0,0012	0,1624	
7,5	72,72	76,36		0,0010	0,1354		
	78,18			0,0008	0,1083	0,1173 ± 0,0156	
	78,18			0,0008	0,1083		
50	51,35	48,11					
	47,30						
	45,68						
Fraksi Butanol Herba Ceplukan	100	60,27	63,78				
		65,13					
		65,95					
	150	69,19	74,33				
		75,68					
		78,11					
200	76,49	77,57					
	84,60						
		71,62					

Berdasarkan data pada tabel I dibuat persamaan regresi linier untuk tiap-tiap bahan uji untuk menentukan nilai IC₅₀. Harga IC₅₀ menunjukkan besarnya konsentrasi bahan uji yang dapat menghambat aktivitas *xanthine oxidase* sebesar 50 %. Nilai IC₅₀ diperoleh dari persamaan regresi linier antara konsentrasi bahan uji (sumbu x) dengan persentase penghambatan aktivitas *xanthine oxidase* oleh bahan uji sumbu y).

Tabel 3. Nilai IC₅₀ Allopurinol dan Fraksi Butanol Herba Ceplukan

Bahan Uji	IC ₅₀ (µg/ml)	Rata-rata IC ₅₀ (µg/ml)
Allopurinol	2,8333	
	3,2051	3.16
	3,4524	
Fraksi butanol herba ceplukan	40.0753	
	50.7714	43.55
	39.7894	

Nilai IC₅₀ allopurinol dan Fraksi butanol herba ceplukan yang diperoleh masing-masing sebagaimana tertera pada tabel III. Berdasarkan nilai IC₅₀ pada tabel III diketahui bahwa nilai IC₅₀ Fraksi butanol herba ceplukan adalah 14 kali lebih besar dibandingkan dengan nilai

Tabel 2. Hasil Uji Penghambatan Aktivitas *Xanthine Oxidase*

Bahan Uji	Konsentrasi (µg/ml)	Aktivitas (abs/menit)	Aktivitas (unit/mg solid)	Aktivitas ± SD (unit/mg solid)
Kontrol negatif	0	0.0105	1.4215	1.6697± 0.2234
		0.0128	1.7328	
		0.0137	1.8547	
Fraksi butanol herba ceplukan	50	0.006	0.8123	0.8664± 0.0488
		0.0065	0.88	
		0.0067	0.907	
	100	0.0049	0.6634	0.6047± 0.0513
		0.0043	0.5821	
		0.0042	0.5686	
150	0.0038	0.5144	0.4287±0.0770	
	0.003	0.4061		
	0.0027	0.3655		
200	0.0029	0.3926	0.3745± 0.1094	
	0.0019	0.2572		
	0,0035	0.4738		
Kontrol negatif	0	0.0038	0,5145	0,4964 ± 0,0313
		0.0034	0,4603	
		0.0038	0,5145	

IC₅₀ allopurinol. Hal ini menunjukkan bahwa daya hambat aktivitas *xanthine oxidase* oleh Fraksi butanol herba ceplukan lebih rendah dibandingkan dengan allopurinol.

Nilai IC₅₀ fraksi butanol herba ceplukan yang besar mungkin disebabkan oleh pemakaian etanol 96% pada proses penyarian. Etanol 96 % merupakan pelarut dengan kandungan air yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan etanol yang konsentrasinya lebih rendah dari etanol 95% (misalnya etanol 70 %). Hal ini menyebabkan bentuk glikosida flavonoid yang terkandung di dalam sarang semut tersari dalam jumlah yang sedikit, padahal bentuk glikosida flavonoid dalam tanaman umumnya lebih banyak dibandingkan dengan bentuk aglikonnya. Selain itu, dapat pula disebabkan ekstrak yang mengandung senyawa lain yang tidak mempunyai aktivitas sebagai penghambat enzim *xanthine oxidase*. Berdasarkan data-data aktivitas (tabel I), besar inhibisi (tabel II), dan nilai IC₅₀ (tabel III), dapat dikatakan bahwa fraksi butanol herba ceplukan mampu menghambat aktivitas *xanthine oxidase* terkait dengan adanya senyawa flavonoid yang terkandung di dalamnya (hasil uji pendahuluan adanya flavonoid dan pemeriksaan Kromatografi

Lapis Tipis). Penurunan aktivitas *xanthine oxidase* terjadi jika larutan uji mengandung flavonoid terutama yang mempunyai gugus 5,7-dihidroksi pada cincin A (misalnya flavon) yang mirip dengan the six membered ring of xanthine (dalam bentuk enol) (Van Hoorn dkk., 2002). Jika dibandingkan dengan allopurinol, penurunan aktivitas *xanthine oxidase* yang terjadi karena allopurinol merupakan inhibitor allosterik *xanthine oxidase* (Lam dkk., 2006) yang mereduksi gugus reaktif oksidasi-reduksi *xanthine oxidase* (Massey dkk., 1970).

KESIMPULAN

1. Fraksi butanol herba ceplukan mempunyai kemampuan menghambat aktivitas *xanthine oxidase*.
2. Fraksi butanol herba ceplukan menghambat aktivitas *xanthine oxidase* dengan nilai IC₅₀ 43,55 µg/ml dan allopurinol adalah 3,20 µg/ml.
3. Fraksi butanol herba ceplukan diduga mengandung flavonoid golongan flavon atau flavonol.

DAFTAR PUSTAKA

- Edeoga HO, Okwu DE, Mbabie BO, 2005, *Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants*. African journal of Biotechnology 7:685-688.

- Iswantini D, Darusman LK, 2003, *Effect of Sidaguri extract as an Uric Acid Lowering agent On the Activity of Xanthine Oxidase Enzyme*. Proceedings of International Symposium On Biomedicines. Biopharma Research, Bogor agricultural University.
- Juandy, 2008, *Gout dan Diet*, <http://www.depkes.go.id/index.php?option=article&task=viewarticle&artid=184&Itemid=3>.
- Katzung, B.G., 1998, *Farmakologi dasar dan Klinik*, diterjemahkan oleh Kutoalubun, B.H., Indrawasih B., dan Sanjaya, C., Edisi IV, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Lam, L.H., Sakaguchi, K., Ukeda, H., and Sawamura, M., 2006, Flow Injection Determination of Xanthine Oxidase Inhibitory Activity and Its Application to Food Samples, *Anal. Sci.*, (22): 105-109.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh Kasasih Padmawinata, hal.1-15, Bandung:ITB.
- Massey, V., Komai, H., dan Palmer, G., 1970, On the Mechanism of Inactivation of Xanthine Oxidase by Allopurinol and Other Pyrazolo(3,4-d) pyrimidine, *J. Biol. Chem.*, 245(11): 2837-2844.
- Robinson T, 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, edisi 6, hal 191-193, Bandung:ITB.
- Van Hoorn, D.E.C., Nijveldt, R.J., van Leeuwen, P.A.M., Hofman, Z., M'Rabet, De Bont, D.B.A., and van Norren K., 2002, Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids, *Eur. J. Pharmacol.*, 451:111-118.