

Uji Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase secara *In-Vitro* oleh Isolat 6,4'-Dihidroksi-4-Metoksibenzofenon-2-O-β-D Glukopiranosida (C₂₀H₂₂O₁₀) yang Diisolasi dari Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl)

Aprilita Rina Yanti Eff¹, Sri Teguh Rahayu¹, Resti Dwi Syachfitri²

¹Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Esa Unggul, Jakarta

²Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945, Jakarta

Email: aprilita.rinayanti@esaunggul.ac.id

Abstrak

Hiperurisemia adalah keadaan di mana terjadi peningkatan kadar asam urat di atas normal. Hiperurisemia merupakan faktor utama dalam perkembangan penyakit gout. Gout atau pirai adalah penyakit akibat adanya penumpukan kristal mono sodium urat pada jaringan akibat peningkatan kadar asam urat. Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl) adalah tanaman obat asli Indonesia yang berkhasiat diantaranya menurunkan tekanan darah tinggi, obat kencing manis dan asam urat. Kandungan kimia dari tanaman ini salah satunya adalah senyawa benzopenon yaitu 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida (C₂₀H₂₂O₁₀). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas isolat 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida (C₂₀H₂₂O₁₀) dalam menghambat xantin oksidase secara *in-vitro* dengan alopurinol sebagai kontrol positif. Pengujian aktivitas penghambatan xantin oksidase dilakukan dengan metode spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida (C₂₀H₂₂O₁₀) dari buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) memiliki aktivitas penghambatan terhadap xantin oksidase dengan nilai IC₅₀ sebesar 15,705 mg/mL. Namun, alopurinol masih memiliki aktivitas penghambatan xantin oksidase yang lebih tinggi dibandingkan isolat dengan nilai IC₅₀ sebesar 0,091 mg/mL. Dari plot Lineweaver-Burk menunjukkan bahwa isolat 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida (C₂₀H₂₂O₁₀) memiliki aktivitas penghambatan kompetitif.

Abstract

Hyperuricemia is a condition in which an increasing in uric acid levels abovenormal. Hyperuricemia is a major factor in the development of gout. Gout is adisease caused by the accumulation of monosodium urate crystals in the tissues dueto elevated levels of uric acid. Crown gods (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) is Indonesia native medicinal that has effect such as lowering blood pressure, diabetes mellitus drugand lowering uric acid levels. One of the chemical constituents of this plant is abenzopheneon compound that is 6,4'-dihydroxy-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida (C₂₀H₂₂O₁₀). Research was conducted to determine the activity of 6,4'-dihydroxy-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida (C₂₀H₂₂O₁₀) that isolated from Crown gods in inhibiting xanthine oxidase by in-vitro method using spechtrofotometer with allopurinol as a positive control.The results showed that isolates 6,4'-dihydroxy-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida (C₂₀H₂₂O₁₀) has inhibitory activity against xanthine oxidase with IC₅₀ values 15.705 mg / mL. However, allopurinol has xanthine oxidase inhibitory activity higher than isolates with IC₅₀ value of 0.091 mg/mL. Lineweaver-Burk plot showed that isolates 6,4'-dihydroxy-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida(C₂₀H₂₂O₁₀) has a competitive inhibitory activity.

Keywords: xanthine oxidase, crown god, 6,4'-dihydroxy-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida

PENDAHULUAN

Hiperurisemia adalah keadaan di mana terjadi peningkatan kadar asam urat di atas normal (Hidayat, 2009). Hiperurisemia merupakan faktor utama untuk resiko perkembangan gout (Huang *et al.*, 2011). *Gout* atau pirai adalah penyakit akibat adanya penumpukan kristal monosodium urat pada jaringan akibat peningkatan kadar asam urat (Sudoyo, 2006).

Penyebab tingginya asam urat dalam darah dapat disebabkan oleh beberapa hal, seperti adanya gangguan metabolisme purin bawaan, adanya kelainan pembawa sifat atau gen, kelebihan mengkonsumsi makanan berkadar purin tinggi (seperti daging, jeroan, kerang, kepiting, keju, gorengan, tape, bayam, buncis, kacang tanah, petai, alpukat, dan alkohol), dan efek dari penyakit seperti leukemia, kemoterapi dan radioterapi (Murray, 2006).

Asam urat merupakan senyawa kimia hasil akhir dari metabolisme asam nukleat atau metabolisme purin dalam tubuh. Berdasarkan penyelidikan bahwa 90% dari asam urat merupakan hasil katabolisme purin yang dibantu oleh enzim guanase dan xantin oksidase (Shamley, 2005). Jadi xantin oksidase mengkatalisis reaksi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat (Pacher *et al.*, 2006).

Pengobatan penyakit asam urat umumnya dilakukan dengan obat yang dapat menghambat aktivitas kerja enzim xantin

oksidase (XO) sehingga mampu mengontrol katabolisme purin dalam tubuh (Nuki, 2006). Salah satu obat sintetis yang digunakan untuk terapi asam urat adalah senyawa alopurinol. Obat ini merupakan jalur utama untuk penyakit gout (Pacher *et al.*, 2006). Namun, penggunaan obat ini memberikan efek samping. Efek samping yang sering terjadi adalah reaksi kulit. Reaksi alergi berupa demam, menggigil, leukopenia atau leukositosis, eosinofilia, artralgia dan pruritus juga pernah dilaporkan. Gangguan saluran pencernaan kadang-kadang juga dapat terjadi (Wilmana, F.W & Gan, S., 2007). Oleh karena itu, perlu obat alternatif yang memiliki aktivitas pengobatan lebih baik dan efek samping rendah yang berasal dari tanaman obat.

Prospek pengembangan produksi tanaman obat semakin pesat saja mengingat perkembangan industri obat modern dan obat tradisional terus meningkat. Salah satu tumbuhan yang berkhasiat obat dan dikenal masyarakat adalah tumbuhan mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) dari suku Thymelaeaceae. Tumbuhan ini mempunyai khasiat diantaranya menurunkan tekanan darah tinggi, obat kencing manis dan asam urat (Rostinawati, 2007). Mahkota dewa mengandung senyawa yang terdiri dari asam lemak, steroid, benzofenon glikosida, dan karbohidrat (Simanjuntak, 2008).

Aktivitas penghambat xantin oksidase diduga berasal dari senyawa benzofenon glikosida yaitu 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-

2-*O*- β -D-glukopiranosida ($C_{20}H_{22}O_{10}$). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas penghambatan xantin oksidase secara *in vitro* oleh isolate 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-*O*- β -D-glukopiranosida ($C_{20}H_{22}O_{10}$) yang diisolasi dari mahkota dewa (*P. macrocarpa* (Scheff.) Boerl) dan mengetahui nilai IC_{50} 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-*O*- β -D-glukopiranosida ($C_{20}H_{22}O_{10}$) terhadap enzim xantin oksida beserta mengetahui kinetika 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-*O*- β -D-glukopiranosida ($C_{20}H_{22}O_{10}$) dalam menghambat enzim xantin oksidase.

METODE

Alat-alat yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis (Hitachi 41), timbangan analitik (Sarton), pH meter, kotakes, *vortex mixer*, *ultrasonics* (Branson), oven (Memert), pipet mikro (Effendorf), tabung reaksi (Pyrex), beaker gelas (Pyrex) dan labu ukur (Pyrex).

Bahan-bahan yang diperlukan yaitu Isolat 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-*O*- β -D-glukopiranosida ($C_{20}H_{22}O_{10}$) bagian buah mahkota dewa yang telah diisolasi oleh Rinayanti, 2014, Aquademin Bebas CO_2 , K_2HPO_4 1 M, KH_2PO_4 1 M, HCl 1 N, dapar fosfat 0,05 M, NaOH 1 M, DMSO, Substrat Xantin (Sigma Aldrich), Alopurinol (Sigma Aldrich), Enzim Xantin Oksidase (Sigma Aldrich).

Pembuatan larutan uji isolat 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-*O*- β -D-glukopiranosida ($C_{20}H_{22}O_{10}$)

Dibuat larutan induk isolate konsentrasi 1000 ppm dengan cara ditimbang seksama \pm 10 mg isolat, kemudian ditambahkan 3 tetes DMSO diaduk hingga larut kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 mL. Setelah itu diencerkan dengan aquademin bebas CO_2 sampai tanda batas. Larutan uji dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga diperoleh konsentrasi 400 mg/mL, 200 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL (Lestari, 2012).

Pembuatan larutan substrat xantin

Larutan induk substrat xantin dibuat dengan cara ditimbang seksama 15,21 mg substrat xantin lalu dimasukkan ke dalam labu ukur. Kemudian ditambahkan lima tetes NaOH 1 M, digoyang hingga larut. Setelah itu diencerkan dengan aquademin bebas CO_2 sampai dengan 100,0 mL (konsentrasi 1 mM). Larutan substrat xantin dibuat dengan mengencerkan larutan induk sampai diperoleh larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 dan 0,25 mM (Lestari, 2012).

Pembuatan larutan alopurinol sebagai pembanding

Larutan induk alopurinol dibuat dengan cara ditimbang seksama \pm 10 mg alopurinol lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Kemudian ditambahkan NaOH 1 M beberapa tetes hingga larut lalu diencerkan dengan aquademin bebas CO_2 di dalam labu ukur, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas dan diperoleh larutan induk dengan

konsentrasi 1000 ppm (1000 µg/mL). Larutan uji alopurinol dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga diperoleh larutan standar alopurinol dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 dan 2,0 µg/mL (Lestari, 2012).

Pembuatan larutan enzim xantin oksidase

Ditimbang seksama 22,17 mg enzim xantin oksidase dengan menggunakan botol timbang dan sendok tanduk, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar fosfat di dalam labu ukur, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas dan diperoleh larutan enzim xantin oksidase 0,1 unit/mL dan dilakukan pada kotak es (Lestari, 2012).

Optimasi uji aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase

Optimasi uji aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase meliputi panjang gelombang maksimum, optimasi konsentrasi substrat, suhu, dan pH optimum. Kondisi optimum dapat ditentukan dengan menentukan aktivitas enzim yang dihitung dengan menggunakan :

$$\text{Aktivitas} = \frac{(\text{serapan blanko-serapan kontrol}) \times \text{vol} \times \text{df}}{12,2 \times 0,1}$$

Keterangan :

Vol : Total volume saat pengujian

df : Faktor pengenceran

12,2 : Koefisien ekstrinsik asam urat pada 290 nm (mM)

0,1 : Volume enzim xantin oksidase yang digunakan (unit/mL)

Satu unit enzim xantin oksidase akan mengkonversi 1,0 µmol substrat xantin menjadi asam urat per menit pada pH 7,5 dan suhu 25°C .

Uji aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase

Pengujian sampel dan alopurinol. Larutan sampel atau alopurinol diukur aktivitas penghambatannya terhadap enzim xantin oksidase. Pengujian dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis di bawah kondisi aerob. Larutan uji sebanyak 1 mL ditambahkan 2,9 mL larutan dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum kemudian dilakukan pra inkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah pra inkubasi selesai 0,1 mL larutan enzim xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL larutan HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Pengujian kontrol sampel dan kontrol alopurinol.

Larutan uji atau alopurinol sebanyak 1 mL ditambahkan 3,0 mL larutan dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum. Larutan dilakukan pra inkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan 1 mL larutan HCl 1 N. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

Pengujian blanko. Larutan dapar fosfat 0,05 M pH optimum sebanyak 3,9 mL dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum kemudian dilakukan prainkubasi pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan enzim xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL larutan HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Pengujian kontrol blanko. Larutan dapar fosfat 0,05 M pH optimum sebanyak 4,0 mL dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum. Larutan dilakukan prainkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan 1 mL larutan HCl 1 N. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

Perhitungan aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase (IC₅₀)

$$\% \text{ inhibisi} = \left\{ \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \right\} \times 100 \%$$

Keterangan :

- A = Absorbansi larutan uji blanko
- B = Absorbansi larutan uji kontrol blanko
- C = Absorbansi larutan uji sampel
- D = Absorbansi larutan uji kontrol sampel

Sebagai kontrol positif digunakan alopurinol dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; dan 2,0 µg/mL. Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan rumus persamaan regresi : $y = a + bx$. Sebagai variabel x adalah konsentrasi sampel dan sebagai variabel y adalah % inhibisi. Setelah diketahui rumus persamaan regresi, nilai IC₅₀ dicari dengan cara mensubstitusi nilai y dengan 50, kemudian dicari nilai x (µg/mL) (Tamta *et al.*, 2006).

Penentuan kinetika aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase

Uji kinetika dilakukan dengan menggunakan beberapa konsentrasi substrat xantin. Kinetika penghambatan enzim dilakukan pada konsentrasi isolat yang memiliki nilai IC₅₀. Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten. Tetapan kinetika Michaelis-Menten (Km) dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + b x$, dimana x adalah konsentrasi substrat [S] dan y adalah absorbansi sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi panjang gelombang maksimum dilakukan sebelum uji aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase. Tujuannya yaitu untuk penentuan kondisi optimum dan uji aktivitas xantin oksidase terhadap sampel. Dari hasil optimasi panjang gelombang maksimum dengan menggunakan alat spektrofotometer ultraviolet-visibel (UV-Vis) pada panjang gelombang 200-400 nm,

diperoleh panjang gelombang maksimum 283 nm. Panjang gelombang yang didapat sesuai dengan pengukuran produk akhir yaitu asam urat, karena asam urat merupakan senyawa yang memiliki gugus kromofor kuat. Gugus kromofor adalah semua gugus atau atom dalam senyawa organik yang mampu menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak (Gandjar, I.G & Rohman, A., 2008).

Pada optimasi suhu, masing-masing larutan uji dilakukan prainkubasi dan inkubasi pada berbagai tingkat suhu, yaitu 20, 25, 30, 35, dan 40°C. Tujuan prainkubasi selama 10 menit adalah untuk menyesuaikan suhu larutan uji dengan suhu inkubasi, di mana enzim dapat bekerja optimum. Hasil optimasi suhu menunjukkan, kondisi optimum adalah pada suhu 30°C dengan serapan terbesar, yaitu 0,495. Hal ini menunjukkan produk asam urat yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan pada suhu 20°C dan 25°C dengan nilai serapan 0,259 dan 0,434. Sedangkan pada suhu 35°C dan 45°C dengan nilai serapan 0,236 dan 0,196, menunjukkan produk asam urat yang dihasilkan sedikit. Nilai serapan menggambarkan produk yang dihasilkan. Jika produk yang dihasilkan lebih banyak maka akan menunjukkan aktivitas paling optimum. Penurunan serapan terjadi karena adanya penguraian dan denaturasi rantai polipeptida pada enzim sehingga kemampuan kinetika dari enzim mengalami pengurangan (Murray *et al.*, 2006). Suhu optimum yang diperoleh digunakan pada prainkubasi dan inkubasi pada pengujian sampel. Pada optimasi pH, variasi yang digunakan adalah pH 7; 7,2; 7,5;

7,8 dan 8.

Hasil optimasi pH menunjukkan pH 7,8 merupakan pH optimum dengan nilai serapan paling tinggi, yaitu 0,355 yang artinya produk akhir asam urat yang dihasilkan paling banyak dibandingkan dengan pH 7; 7,2; 7,5 dan 8. Pada pH 8 terjadi penurunan serapan yang menunjukkan bahwa produk akhir asam urat semakin berkurang. Hal ini juga disebabkan karena pH dapat mempengaruhi aktivitas melalui perubahan struktur atau muatan pada residu yang berfungsi dalam pengikatan substrat atau katalisis (Murray, 2006).

Optimasi konsentrasi substrat xantin dilakukan untuk mengetahui konsentrasi substrat optimum yang sesuai dengan enzim yang digunakan. Konsentrasi xantin yang digunakan adalah 0,05; 0,5; 0,15; 0,2; dan 0,25 mM. Hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi substrat xantin optimum yaitu 0,15 mM dengan nilai serapan 0,275 yang menunjukkan produk asam urat yang dihasilkan paling banyak. Sedangkan pada konsentrasi 0,05; 0,5; 0,2; dan 0,25 mM, produk asam urat yang dihasilkan lebih sedikit dimana ditunjukkan pada nilai serapan yang lebih kecil dibandingkan pada konsentrasi 0,15 mM. Aktivitas enzim meningkat sebanding dengan kenaikan konsentrasi substrat dan mencapai aktivitas maksimum. Peningkatan tersebut meningkatkan jumlah enzim-substrat, namun pada konsentrasi tertentu akan berada pada kondisi jenuh ketika tidak ada lagi enzim bebas yang tersedia. Peningkatan konsentrasi substrat akan

meningkatkan laju reaksi hingga tercapai nilai maksimal V_{max} . Peningkatan lebih lanjut konsentrasi substrat tidak meningkatkan laju reaksi karena enzim telah jenuh oleh substrat. Setelah konsentrasi optimum diperoleh, aktivitas enzim mengalami penurunan yang disebabkan oleh penghambatan aktivitas enzim (Murray, 2006).

Prinsip pengukuran uji penghambatan aktivitas xantin oksidase adalah mengukur jumlah asam urat yang terbentuk pada reaksi yang dikatalisis oleh xantin oksidase. Pengujian ini merupakan model pengujian secara *in-vitro* yang dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

Pada uji penghambatan xantin oksidase, dilakukan pengujian terhadap alopurinol dan sampel isolat dari *Phaleria macrocarpa* Scheff. Pengujian dilakukan berdasarkan hasil yang didapat dari uji optimasi, yaitu kondisi optimum xantin oksidase pada suhu 30°C, menggunakan dapar fosfat pH 7,8, dan

konsentrasi substrat pada 0,15 mM. Serapan diukur pada panjang gelombang 283 nm dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Hasil uji aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase oleh alopurinol

Pada pengujian aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase oleh alopurinol menggunakan variasi konsentrasi, yaitu 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; dan 2,0 µg/mL yang diencerkan dari larutan induk 1000 µg/mL. Hasil uji aktivitas tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan data dari tabel 1, didapatkan nilai IC_{50} sebesar 0,091 µg/mL yang berarti bahwa dengan konsentrasi alopurinol sebesar 0,091 µg/mL dapat memberikan 50% efek penghambatan terhadap aktivitas enzim xantin oksidase. Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Xantin Oksidase oleh Isolat 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida ($C_{20}H_{22}O_{10}$) dapat dilihat pada Tabel 2 diperoleh nilai IC_{50} sebesar

Tabel 1. Hasil rata-rata uji aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase oleh alopurinol

| Konsentrasi (µg/mL) | Serapan (A) | | % inhibisi |
|---------------------|-------------|---------------------|------------|
| | Sampel (K) | Kontrol Sampel (KS) | |
| 0.1 | 0.13 | 0.02 | 23.611 |
| 0.2 | 0.115 | 0.02 | 34.028 |
| 0.5 | 0.103 | 0.022 | 43.75 |
| 1 | 0.083 | 0.024 | 59.028 |
| 2 | 0.052 | 0.003 | 65.972 |
| Blanko | 0.161 | 0.017 | |

Tabel 2. Hasil rata-rata uji aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase oleh isolat 6,4'-dihidroksi-4- metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida (C₂₀H₂₂O₁₀)

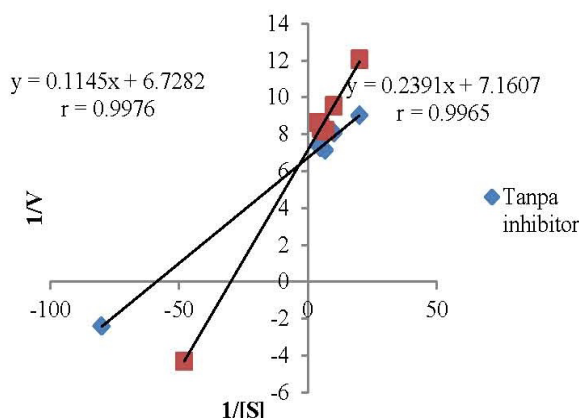
| Konsentrasi (µg/mL) | Serapan (A) | | % inhibisi |
|------------------------|-------------|---------------------|------------|
| | Sampel (K) | Kontrol Sampel (KS) | |
| 25 | 0.218 | 0.096 | 15.278 |
| 50 | 0.295 | 0.178 | 18.750 |
| 100 | 0.484 | 0.375 | 24.305 |
| 150 | 0.602 | 0.531 | 50.690 |
| 200 | 0.674 | 0.635 | 72.917 |
| 250 | 0.698 | 0.678 | 86.111 |
| 300 | 0.712 | 0.704 | 94.444 |
| Blanko | 0.161 | 0.017 | |

15,705 µg/mL yang berarti bahwa dengan konsentrasi Isolat sebesar 15,705 µg/mL dapat memberikan 50% efek penghambatan terhadap aktivitas enzim xantin oksidase.

Xantin oksidase adalah enzim yang berperan dalam mengkatalisis oksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat (Murray *et al.*, 2006). Dari hasil uji aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase oleh isolat 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida (C₂₀H₂₂O₁₀) dapat diketahui bahwa isolat tersebut mempunyai potensi dalam menghambat aktivitas enzim xantin oksidase dimana ditunjukkan dari nilai serapan yang semakin kecil dengan meningkatnya konsentrasi. Serapan yang kecil menunjukkan produk akhir yang terbentuk yaitu asam urat semakin sedikit yang artinya isolat dapat menghambat enzim xantin oksidase. Pengujian kinetika penghambatan enzim xantin oksidase pada isolat dilakukan dengan menggunakan plot Lineweaver-

Burk untuk melihat jenis penghambatannya. Konsentrasi substrat xantin pada uji kinetika penghambatan enzim xantin oksidase adalah 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; dan 0,25 mM.

Berdasarkan hasil plot Lineweaver-Burk pada gambar 1, perpotongan regresi linear tanpa inhibitor dan dengan inhibitor (isolat) terletak mendekati sumbu y, sehingga dapat disimpulkan bahwa jenis kinetika penghambatan isolat terhadap aktivitas xantin oksidase adalah inhibisi kompetitif. Pada penghambatan jenis ini, inhibitor yang memiliki mekanisme penghambatan kompetitif adalah senyawa yang memiliki struktur menyerupai struktur substrat (Murray, 2006). Senyawa tersebut akan berkompetisi dengan substrat xantin untuk menduduki posisi aktif enzim yang akan mengakibatkan aktivitas enzim menurun atau berhenti, sehingga produksi enzim xantin oksidase berupa asam urat tidak terbentuk (Ahmad, 2012).



Gambar 1. Plot Lineweaver-Burk kinetika enzim

Berdasarkan persamaan yang diperoleh, maka nilai V_{max} dan K_m dapat ditentukan. Pada sistem tanpa inhibitor diperoleh persamaan $y = 0,1145x + 6,7282$ dengan nilai konstanta Michaelis-Menten K_m yaitu $0,017$ dan V_{max} $0,149$. Sedangkan pada sistem dengan inhibitor diperoleh persamaan $y = 0,2391x + 7,1607$ dengan nilai konstanta Michaelis-Menten K_m yaitu $0,033$ dan V_{max} $0,140$.

Hasil perhitungan Michaelis-Menten menunjukkan bahwa nilai V_{max} pada sistem tanpa inhibitor dan sistem dengan inhibitor (isolat) hampir sama. Kecepatan pembentukan produk yaitu asam urat hanya bergantung pada konsentrasi enzim substrat. Pada isolat nilai K_m yang diperoleh lebih besar, karena berikatan kurang erat dengan enzim dalam konsentrasi yang sama, sehingga tidak akan menurunkan kecepatan reaksi yang dikatalisis (Murray, 2006).

Isolat 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida ($C_{20}H_{22}O_{10}$) merupakan senyawa xanton yang mempunyai struktur polifenol aktif mirip

dengan struktur dasar flavonoid. Hal ini yang menyebabkan isolat tersebut mempunyai aktivitas dalam menghambat enzim xantin oksidase. Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai inhibitor enzim xantin oksidase dan memiliki kemiripan struktur dengan xantin. (Wulandari *et al.*, 2013). Kemiripan struktur dengan xantin dikarenakan oleh adanya dua cincin aromatik yang memiliki gugus hidroksil sebagai akseptor elektron dari enzim xantin oksidase (Surahman *et al.*, 2013). Flavonoid menghambat aktivitas enzim xantin oksidase melalui interaksi dengan enzim pada gugus samping dan mekanisme inhibisi kompetitif (Yulianto, 2009). Selain senyawa golongan flavonoid, polifenol dan saponin juga mampu menghambat kerja enzim xantin oksidase (Azmi *et al.*, 2012).

KESIMPULAN

Isolat 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida ($C_{20}H_{22}O_{10}$) yang diisolasi dari buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) memiliki potensi untuk menghambat aktivitas enzim xantin oksidase pada konsentrasi di atas 110 mg/mL dengan nilai IC_{50} sebesar $15,705 \text{ } \mu\text{g/mL}$. mekanisme penghambatan Isolat 6,4'-dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida ($C_{20}H_{22}O_{10}$) terhadap enzim xantin oksidase bersifat kompetitif.

Saran

Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas isolat 6,4'-

dihidroksi-4-metoksi benzofenon-2-*O*- β -D-glukopiranosida ($C_{20}H_{22}O_{10}$) untuk mengetahui batas konsentrasi aman agar dapat dikonsumsi sebagai obat, sehingga dapat diuji lebih lanjut secara *in-vivo*.

Tabel 3. Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten pada uji kinetika aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase

| Nilai | Tanpa Inhibitor | Dengan Inhibitor |
|-----------|-----------------|------------------|
| A | 6,7282 | 7,1607 |
| B | 0,1145 | 0,2391 |
| R | 0,9976 | 0,9965 |
| K_m | 0,017 | 0,033 |
| V_{max} | 0,149 | 0,140 |

Keterangan :

Tanpa inhibitor : Substrat xantin + Enzim xantin oksidase

Dengan inhibitor : Substrat xantin + Enzim xantin oksidase + Isolat

DAFTAR ACUAN

- Ahmad, A.R. (2012). Isolasi dan elusidasi struktur antioksidan dan penghambat enzim xantin oksidase ekstrak daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L). *Tesis*. Depok: Universitas Indonesia. 10
- Azmi, S.M.N., Jamal, P. & Amid, A. (2012). Xanthine oxidase inhibitory activity from potential malaysian medicinal plant as remedie for gout. *International Food Research Journal*, 19 (1), 159-165
- Gandjar, I.G. & Rohman, A. (2008). *Kimia Farmasi Analitik*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Hidayat, R. (2009). *Gout dan Hiperurisemia*. Jakarta: Divisi Reumatologi, Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia: 47-50
- Huang, J., Wang, S., Zhu, M., Chen, J., Zhu, X. (2011). Effects of Genistein, Apigenin, Quercetin, Rutin and Astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 70, 270-277
- Lestari, S. M. (2012). Uji penghambatan ekstrak daun sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) terhadap aktivitas xantin oksidase dan identifikasi golongan senyawa pada fraksi yang aktif. *Skripsi*. Depok : Universitas Indonesia
- Murray, R. (2006). Terjemahan oleh dr. Brahm U: Pendit. *Biokimia Harper* edisi 27. Jakarta: Buku Kedokteran EGC
- Murray, R.K., Granner, D.K. & Rodwell, V.W. (2006). *Biokimia Harper* (Brahm U & Nanda Wulandari, Penerjemah). Jakarta : EGC
- Nuki, G. (2006). Gout. *Medicine*, 34: 417-423
- Pacher, P., Nivorozhkin, A. & Szabo, C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological Reviews*, 58 (1), 87-114
- Rostinawati, T. (2007). Uji aktivitas hasil penyarian biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* [scheff]) terhadap beberapa mikroba penyebab infeksi kulit . *Karya Ilmiah*. Bandung : Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran

- Shamley, D. (2005). *Pathophysiology an Essential Text for the Allied Health Professions*. USA : Elsevier Limited
- Simanjuntak, P. (2008). Identifikasi senyawa kimia dalam buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*), Thymelaceae. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 6(1), 23-28
- Sudoyo, A.W., Bambang S., Idrus A., Marcellus S.K. & Siti S. (2006). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 1213-1214
- Surahman, A., Subandi & Muntholib. (2013). Uji fitokimia dan daya inhibisi ekstrak daun sendok (*Plantago major*) dan buah srikaya (*Annona squamosa* L.) terhadap aktivitas xantin oksidase. *Skripsi*. Malang: FMIPA Universitas Negeri Malang.
- Tamta, H., Kalra, S., & Mukhopadhyay, A.K. (2005). Biochemical characterization of some Pyrazolopyrimidine-based inhibitors of xanthin oxidase. *Biochemistry*, 71, S49-S54
- Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashammugam, A.T. & Kemyaraju, A. (2007). Xanthine oksidase inhibitory activity of some indian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 109
- Wilmana, F.W. & Gan, S. 2007. *Analgesik-antipiretik analgesik-antiinflamasi nonsteroid dan obat gangguan sendi lainnya*. Dalam Gunawan, G.S. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Jakarta : Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 242-246
- Wulandari, S., Subandi & Muntholib. (2013). Inhibisi xantin oksidase oleh ekstrak etanol kulit melinjo (*Gnetum gnemon*) relatif terhadap allopurinol. Malang : Universitas Negeri Malang
- Yulianto, D. (2009). Inhibisi xantin oksidase secara *in vitro* oleh ekstrak rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dan ciplukan (*Physalis angulata*). *Skripsi tidak diterbitkan*. Bogor: MIPA Institut Pertanian Bogor.