

UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS ENZIM XANTIN OKSIDASE TERHADAP EKSTRAK KULIT KAYU SECANG (*Caesalpinia sappan* L.)

Pertamawati & Mutia Hardhiyuna

Pusat Teknologi Farmasi dan Medika-LAPTIAB-BPPT

Kawasan PUSPIPTEK Serpong – Banten Selatan

Corresponding author email ; pertamawatikartakusumah@gmail.com

ABSTRAK

Enzim xantin oksidase adalah enzim yang berperan sebagai katalisator dalam proses oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan kemudian menjadi asam urat. Asam urat adalah produk dari metabolisme purin yang mengendap di persendian dan membentuk kristal sehingga menimbulkan rasa nyeri yang hebat dan kaku, menyebabkan pembesaran dan penonjolan sendi. Obat sintetik yang biasa digunakan untuk mengatasi asam urat adalah allopurinol. Allopurinol bekerja menghambat pembentukan asam urat dari prekursornya (xantin dan hipoxantin). Akan tetapi allopurinol memiliki beberapa efek samping, kadang-kadang terjadi toksisitas pada gastrointestinal dan meningkatkan serangan akut gout pada awal terapi. Oleh karena itu, banyak masyarakat memanfaatkan tanaman obat sebagai anti asam urat karena memiliki efek samping yang relatif kecil, mudah didapatkan, dan harganya relatif murah dibandingkan dengan obat sintesis. Kulit kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.), ternyata memiliki kemampuan sebagai anti asam urat. Hasil penelitian yang telah dilakukan memperlihatkan bahwa ekstrak kulit kayu secang mampu menghambat aktivitas enzim xantin oksidase sampai 56,47%, sementara allopurinol mampu menghambat aktivitas enzim xantin oksidase sampai 87,47%. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa kulit kayu secang memiliki aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional anti asam urat.

Kata kunci : xantin oksidase, kulit kayu secang, asam urat

ABSTRACT

*Xanthine oxidase is an enzyme that act as catalyst in the process of oxidizing hypoxanthine to become xanthine and then into uric acid. Uric acid is the product of metabolism of purine that settles in the joints and form crystal that sparks great pain and stiffness, also an enlargement and protrusion of swollen joints. As synthetic drug commonly used to overcome uric acid is allopurinol. Allopurinol work by inhibiting the formation of uric acid precursor (xanthine and hypoxanthine), however allopurinol have few side effects, sometimes occurs in gastrointestinal toxicity and increase gout attack acute at the beginning of therapy. Hence, many people use medicinal plants as anti uric acid because it has less side effects, easy to get and are relatively inexpensive as opposed to synthesis medicine. Bark of secang (*Caesalpinia sappan* L.) have the capability to inhibit of the activity of the xanthine oxidase until 56,473%, while allopurinol capable of inhibiting the activity of the xanthine oxidase until 87,474%. The result of this research proves that bark of secang having activity to inhibit of xanthine oxidase, so that it can be used as traditional medicines for anti uric acid.*

Keywords : xanthine oxidase, bark of secang, inhibitory activity.

PENDAHULUAN

Xantin oksidase adalah enzim yang berperan sebagai katalisator dalam proses oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan kemudian menjadi asam urat xantin oksidase

merupakan enzim yang mereduksi O₂ menjadi H₂O₂ dalam sitosol dan diperkirakan faktor utama dalam cedera iskemia terutama pada sel mukosa usus. Xantin oksidase merupakan homodimer katalitik subunit independent, adalah enzim yang mengkatalisis hipoxantin

menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat, yang merupakan jalur degradasi purin.

Asam urat adalah produk dari metabolisme purin yang mengendap di persendian dan membentuk kristal kecil sehingga menimbulkan rasa nyeri yang hebat dan kaku, juga pembesaran dan penonjolan sendi yang bengkak. Pada kondisi tertentu dapat terjadi peningkatan kadar asam urat dalam darah melebihi batas normal yang disebut hiperurisemia (Walker dan Edward, 2003). Hiperurisemia dapat disebabkan oleh tingkat produksi asam urat yang berlebih, ekskresi asam urat melalui ginjal yang berkurang atau kombinasi keduanya (Wibowo, 2006). Hiperurisemia yang lanjut dapat berkembang menjadi gout. Gout merupakan jenis penyakit metabolik yang keberadaannya cukup populer dikalangan masyarakat dengan sebutan pirai (Price dan Wilson, 2005).

Obat sintetik yang biasa digunakan untuk mengatasi asam urat adalah allopurinol. Allopurinol merupakan suatu analog asam urat, bekerja menghambat pembentukan asam urat dari prekursornya (xantin dan hipoxantin) dengan menghambat aktivitas enzim xantin oksidase (Price dan Wilson, 2005). Akan tetapi allopurinol memiliki beberapa efek samping yaitu kemerahan pada kulit, leukopenia, kadang-kadang terjadi toksisitas pada gastrointestinal dan meningkatkan serangan akut gout pada awal terapi (Dipiro dkk., 2005). Oleh karena itu, sekarang masyarakat banyak yang menggunakan tanaman obat sebagai obat tradisional karena memiliki efek samping yang relatif kecil, mudah didapatkan, dan harganya relatif murah dibandingkan dengan obat sintesis.

Kulit kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) secara empiris dimanfaatkan sebagai bahan untuk pengobatan penyakit asam urat. Berbagai macam zat yang terkandung dalam kulit kayu secang antara lain brazilin, alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenil propana dan terpenoid. Selain itu juga mengandung asam galat, brasilein, delta-aphellandrene, oscimene, resin dan resorin. (Xu dkk., 1994.) Penelitian mengenai efek secang sebagai agen anti hiper urisemia masih dirasakan kurang, padahal potensi biologis secang cukup besar, sehingga dirasakan perlu dilakukan penelitian secang sebagai gen anti hiper urisemia.

Tujuan percobaan ini ialah untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim Xantin oksidase terhadap sampel ekstrak kulit kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.). Pengolahan data yang diperoleh dilakukan secara metoda statistik analisis varian dan untuk menguji perbedaan nilai rata-rata antar dua perlakuan digunakan metode Uji Wilayah Berganda Duncan. Hasil percobaan diharapkan dapat memberikan informasi dalam meningkatkan kesehatan dengan mengembangkan Obat Herbal Terstandar (OHT). Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pusat Teknologi Farmasi dan Medika – LAPTIAB – TAB – BPPT.

METODE

Bahan

- Bahan utama simplisia kering kulit kayu secang, dihaluskan menjadi potongan-potongan kecil berukuran sekitar 1 mm.
- Bahan kimia terdiri dari DMSO (Sigma), K₂HPO₄ (Sigma P 0662), NaOH (Sigma 221465), HCl (Merck), xantin (X0626), xantin oksidase (Sigma X4375) pelarut perkolasi etanol 96% allopurinol, aquadest bebas CO₂

Alat. Peralatan ekstraksi perkolasi (perkolator) dari Buchi Pump Controller C-610 dan Buchi Pump Module C-610. Peralatan Spektrofotometer Shimadzu Pharmaspec UV 1700.

Identifikasi Tanaman. Tanaman secang (kulit kayu), dideterminasi di *Research Center for Biology, Indonesian Institute for Science (LIPI)*.

Pembuatan Ekstrak.

- Bahan tanaman dibersihkan, dikeringkan dalam oven pada suhu 55° C dan dihaluskan. Pengerian dihentikan bila kadar air telah mencapai sekitar 3%.
- Simplisia ditimbang sebanyak 20 gram, dibungkus kertas saring sepanjang tabung perkolator bercorong (panjang 28 cm diameter 4 cm). Masukkan bungkus simplisia tersebut dengan cara disumbat (kertas saring pembungkus diikat atau digulung) di bagian bawah supaya simplisia tidak keluar ketika alat perkolasi

dijalankan, selanjutnya alat perkolasi tersebut ditutup.

- Pelarut dimasukkan ke dalam wadah (bejana), pipa palstik kecil dipasang dari bejana ke mesin motor perkolator
- Mesin motor perkolator dinyalakan sampai simplisia terendam larutan, selanjutnya mesin motor dimatikan dan biarkan perendaman berlangsung selama ½ jam.
- Mesin motor dinyalakan kembali dan biarkan perkolator bekerja selama 1½ jam sampai diperoleh ekstrak yang diharapkan.

Persiapan Larutan

a. Pembuatan larutan dapar kalium fosfat pH 7,5 (50 mM)

- Timbang K_2HPO_4 (40,6 mL) = 40,6 mL x 174,18 g/1000 mL = 7,071 g
- Timbang K_2HPO_4 (9,4 mL) = 9,4 mL x 136,09 g/1000 mL = 1,279 g
- Kedalam beaker gelas 1 L, masukkan kedua bahan kimia tersebut, tambah dengan 900 mL aqua bidestilata (yang sudah dipanaskan bebas O_2 dan CO_2). Aduk hingga larut.
- Tetapkan pH hingga 7,5 dengan penambahan NaOH 0,1 M/HCl 0,1 M.
- Baru di tambahkan dengan aqua bidestilata hingga 1 L.

Catatan: untuk membuat 500 mL

berat K_2HPO_4 = 3,536 g (=7,071:2)

berat KH_2PO_4 = 0,639 g (=1,279 : 2).

K_2HPO_4 (BM=174,18)

KH_2PO_4 (BM=136,09)

b. Pembuatan larutan substrat 0,75 mM (xantin, BM 152,11) (dibuat fresh). Ditimbang sejumlah 22,8 mg + 300 μ L NaOH encer. Kocok hingga larut dalam tabung eppendorf. Tambahkan dengan aquadest hingga 18 mL, tentukan pH hingga 7,5 dengan menggunakan larutan HCl/NaOH encer. Tambahkan dengan aquadest hingga 20 mL. Larutan kerja dibuat dengan mengencerkan stok menjadi 1/10x-nya.

c. Pembuatan larutan enzim

- Pembuatan larutan stok enzim
Ditimbang sejumlah 10 mg (~0,12 unit per mg padatan) enzim kemudian dilarutkan dalam 1 mL dapar fosfat pH 7,5, suhu kamar. Kocok hingga homogen dan dibagi dalam 10 *microtube* (1,2 unit/ml), simpan dalam *freezer*. Yang sudah dicairkan tidak boleh dimasukkan ke dalam *freezer* kembali.
- Pembuatan larutan kerja enzim 0,3 unit/ml
Larutan kerja adalah mengencerkan larutan stok dengan perbandingan 1:4 dengan dapar fosfat pH 7,5.

d. Pembuatan larutan sampel

- Larutan Stok (LS): Ditimbang sejumlah 10 mg ekstrak, tambahkan 200 μ L DMSO (20xberat ekstrak) → vortex hingga larut. Kemudian tambahkan 300 μ L dapar fosfat (30x berat extract) → vortex hingga larut, diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 20.000 ppm (LS=larutan stok1).
- Larutan kerja (LK). LS diencerkan 1/20x dengan dapar fosfat pH 7,5 hingga diperoleh larutan kerja (LK) dengan konsentrasi 1000 ppm. 0,05 mL LS1 + 0,95 mL dapar fosfat pH 7,5 → konsentrasi 1.000 ppm

e. Pembuatan larutan pembanding (Allopurinol)

- Satu tablet allopurinol (100 mg) digerus hingga halus, kemudian dimasukan ke dalam labu ukur 5 mL dan ditambah dengan dapar fosfat hingga batas.
- Disonikasi selama 5 menit pada suhu kamar → dipindahkan dalam ependrof 1 mL → disentrifuse hingga didapatkan supernatant, konsentrasi larutan ialah 2×10^4 ppm.
- Diencerkan 1/20 x → 0,05 mL stok + 0,95 mL dapar fosfat → 1.000 ppm.

f. Pelaksanaan pengujian

Proses pengujian inhibisi xantin oksidase dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan kuvet

kuarsa 3 mL pada panjang gelombang 290 nm dengan prosedur sebagai berikut :

- Ke dalam kuvet kuarsa 3 mL dimasukkan secara berturut-turut sampel uji, dapar fosfat dan substrat xantin. Kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 5 menit.
- Selanjutnya reaksi dimulai dengan penambahan larutan enzim xantin oksidase dan dikocok hingga homogen. Inkubasi tetap dilakukan pada suhu 37 °C.
- Tambahkan larutan untuk menghentikan reaksi, yakni larutan HCL 0,5 M
- Dilakukan pengukuran kadar asam urat yang terbentuk selama 4 menit.

- Dibuat kontrol enzim dimana sampel diganti dengan dapar fosfat.
- Blanko dibuat sebagai berikut: blanko sampel dibuat dengan menambahkan sampel+xantin+ dapar fosfat tanpa enzim. Blanko kontrol enzim digunakan xantin+dapar fosfat.
- % inhibisi xantin oksidase dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(1 - \text{slope sampel})}{\text{Slope kontrol enzim}} \times 100\%$$

Komposisi pereaksi pada pengukuran inhibisi xantin oksidase dituliskan dalam Tabel 1 sebagai berikut :

Tabel 1. Komposisi Pereaksi Pada Pengukuran Inhibisi Xantin Oksidase

	Kontrol Enzim	Blanko Enzim	Sampel/Allopurinol	Blanko Sampel
Sampel/allopurinol	--		100	100
bp	800	840	700	740
Xantin	160	160	160	160
----- inkubasi pada 37°C selama 5 menit				
XO	40	--	40	--
-----inkubasi pada 37°C dan ukur absorbansinya setiap menit selama 4 menit pada λ maks 290 nM				

Analisis data. Data yang diperoleh berupa hasil pengukuran serapan secara spektrofotometri UV Data yang diperoleh (unit/ml enzim) digunakan untuk menghitung aktivitas dalam unit/mg solid. Data digunakan untuk menghitung persentase penghambatan xantin oksidase dengan rumus: Nilai IC50 (konsentrasi inhibitor yang menghasilkan penghambatan aktivitas xantin oksidase sebesar (50%) dapat ditentukan dengan analisis regresi linier antara konsentrasi senyawa uji terhadap persentase penghambatan aktivitas xantin oksidase, kemudian dilanjutkan dengan uji statistik dengan uji t dengan taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum analisis dilakukan, terlebih dahulu dicari berapa panjang gelombang yang sesuai untuk analisis dengan alat spektrofotometer. Pencarian panjang gelombang yang sesuai dilakukan dengan mengukur panjang gelombang salah satu ekstrak dan dihitung berapa besar nilai spektrofotometri-nya berdasarkan panjang

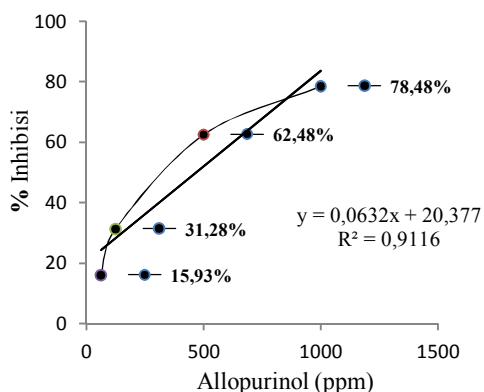
gelombang yang diberikan (300 nm, 295 nm, 290 nm, 285 nm dan 280 nm). Hasil yang diperoleh tertulis dalam Tabel 2.

Tabel 2. Nilai Spektrofotometri

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
300	0,280
295	0,280
290	0,392
285	0,312
280	0,158

Selanjutnya semua larutan ekstrak diukur nilai spektrofotometrinya pada panjang gelombang 290 nm.

Penelitian untuk mengetahui persentase penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase oleh allopurinol (sebagai kontrol positif) dilakukan untuk mengetahui nilai kepercayaan yang dihitung secara statistik. Hasil yang diperoleh terlihat dalam Grafik 1.



Grafik 1. Presentasi Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin oksidase oleh Kontrol Positif (Allopurinol) pada Variasi Konsentrasi

Dari Grafik 1 terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi allopurinol semakin meningkat pula grafik yang terjadi. Presentasi penghambatan (% inhibisi) aktivitas enzim Xantin oksidase oleh kontrol positif allopurinol (1000 ppm) adalah yang tertinggi (78,48%). Semakin tinggi konsentrasi (dalam ppm) semakin tinggi pula presentasi penghambatan aktivitas enzim Xantin oksidase, namun peningkatannya tidak setajam pada konsentrasi 100 ppm sampai 500 ppm.

Uji penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase terhadap ekstrak kulit kayu secang, (hasil validasi = pengujian ulang 3 kali) dilakukan dengan menggunakan peralatan spektrofotometri UV – Vis seperti yang terlihat dalam bab Bahan dan Metode (pelaksanaan penelitian). Hasil yang diperoleh tertulis dalam Tabel 3 sebagai berikut:

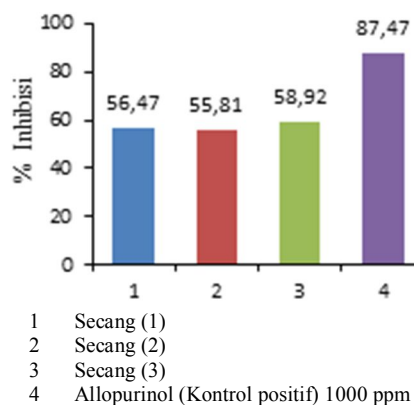
Tabel 3. Hasil uji penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase terhadap ekstrak secang (hasil validasi)

Jenis ekstrak	% Inhibisi
Secang (1)	56,47
Secang (2)	55,81
Secang (3)	58,92
Allopurinol (Kontrol positif) 1000 ppm	87,47

Dari Tabel 3 terlihat bahwa penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase terhadap ekstrak secang adalah 58,92%, sedangkan terhadap allopurinol adalah 87,47%. Dari hasil pengujian tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak secang mempunyai daya

inhibisi terhadap enzim xantin oksidase yang cukup tinggi. Daya inhibisi ekstrak allopurinol yang lebih tinggi karena allopurinol merupakan obat sintetis untuk menanggulangi asam urat.

Hasil pengujian hambatan aktivitas enzim xantin oksidase terhadap ekstrak secang tersebut digambarkan dalam Grafik 2 sebagai berikut :



Grafik 2. Persentase (%) inhibisi aktivitas enzim xantin oksidase terhadap ekstrak kulit kayu secang

Dari Grafik 2 terlihat bahwa ekstrak kulit kayu secang mampu menghambat aktivitas enzim xantin oksidase yang cukup tinggi, sedangkan allopurinol sebagai obat sintetis untuk anti asam urat memiliki daya inhibisi yang lebih tinggi (87,47%). Hasil yang diperoleh ini memungkinkan untuk menjadikan secang sebagai obat herbal anti asam urat.

Dengan penelitian lebih lanjut diusahakan agar daya inhibisi penghambatan terhadap enzim xantin oksidase dapat lebih meningkat, sehingga dapat diterapkan dalam usaha memajukan industri obat herbal, produk yang dihasilkan dapat diperoleh dengan harga yang relatif lebih murah dan terjangkau.

KESIMPULAN

1. Ekstrak kulit kayu secang bermanfaat sebagai anti asam urat dengan persentase (%) inhibisi sebesar 58,922%, sementara persentase inhibisi allopurinol sebesar 87,47%.
2. Penelitian ini merupakan uji penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase terhadap ekstrak kulit kayu secang dalam taraf awal.

Diharapkan penelitian selanjutnya dapat mengidentifikasi metabolisme senyawa bioaktif ekstrak secang yang berperan dalam pengujian ini.

DAFTAR PUSTAKA

http://tyasistiqomah.blogspot.co.id/2011_02_01_archive.html xantin oksidase diakses pada tanggal 10 September 2015.

Joseph T. DiPiro, Robert L. Talbert, Gary C. Yee, Gary R. Matzke, Barbara G. Wells, L. Michael Posey. 2005. *Pharmacotherapy: A Pathophysiological Approach* (Eds). 7th edition. Chapter 100. Acne Vulgaris : Treatment : Acne Vulgaris

Accesspharmacy.

<http://www.accesspharmacy.com/content.aspx?aID=3212123>

Price, S & Wilson, L, 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi 6. EGC, Jakarta

Walker, R. dan Edward, C. (2003). *Clinical Pharmacy And Therapeutics*. Edisi 3. USA: Churchill Livingstone

Wibowo, S. 2006. Asam Urat, http://suryo_wibowo.blogspot.com.

Diakses pada tanggal 9 September 2015

Xu, H., Zhou, Z., Yang, J., 1994. Chemical Constituents of *Caesalpinia sappan* L., *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 19, (8) 485-486