

## PRESISI UJI ANTIHIPERURISEMIA *IN VITRO* BERDASARKAN PENGUKURAN SERAPAN PADA DUA PANJANG GELOMBANG

Liliek Nurhidayati, Dian Ratih Laksmiawati, Riska Eka Putri

Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan

Corresponding author email: liliek\_nurhidayati@yahoo.com

### ABSTRAK

Metode yang digunakan dalam skrining obat antihiperurisemia *in vitro* berdasarkan pada kemampuan suatu bahan menghambat enzim xantin oksidase dalam mengubah substrat xantin menjadi asam urat. Para peneliti mengukur aktivitas antihiperurisemia berdasarkan asam urat yang terbentuk atau xantin yang tersisa. Untuk mengetahui presisi kedua pengukuran tersebut, telah dilakukan pengujian aktivitas antihiperurisemia allopurinol berdasarkan pengukuran serapan pada panjang gelombang 291 nm dan 268 nm. Pada kondisi optimum diperoleh simpangan baku relatif persen penghambatan berdasarkan jumlah asam urat yang terbentuk 0,24-1,30%, sedangkan berdasarkan sisa xantin adalah 0,25-2,39%.

**Kata kunci** : penghambatan, xantin oksidase, *in vitro*, allopurinol, presisi

### ABSTRACT

*The method used in in vitro antihiperuricemia drug screening based on the ability of a substance to inhibit the xanthine oxidase enzyme in converting the substrate xanthine to uric acid. The researchers measured the hyperuricemia treatment activity based on the formation of uric acid or the remaining xanthine. To determine the precision of the measurements, antihiperuricemia activity of allopurinol was conducted by measuring absorption at a wavelength of 291 nm and 268 nm. At the optimum conditions, the relative standard deviation of percent inhibition based on the amount of uric acid was 0.24 to 1.30%, while based on the rest of the xanthine was 0.257 to 2.39%.*

**Keywords** : inhibition, xanthine oxidase, *in vitro*, allopurinol, precision

### PENDAHULUAN

Prevalensi penyakit hiperurisemia semakin meningkat dari tahun ke tahun. Penyakit ini memang tidak menyebabkan kematian namun dapat menurunkan produktivitas kerja akibat penderitanya tidak dapat beraktivitas secara maksimal. Prinsip pengobatan arthritis gout adalah menghilangkan gejala inflamasi dan mengurangi kekambuhan. Karena penyebab utamanya adalah kadar asam urat yang tinggi di dalam darah maka untuk mengurangi kekambuhan diperlukan *urate lowering agent*. Alopurinol merupakan satu-satunya obat yang bersifat urikostatik yaitu menghambat terbentuknya asam urat dengan jalan menghambat aktivitas enzim xantin oksidase (XO) (Gunawan, 2007).

Ketersediaan alopurinol masih bergantung pada pasokan impor sehingga

diperlukan bahan obat alternatif yang bekerja sebagai penghambat asam urat. Untuk melakukan pencarian obat tersebut diperlukan serangkaian penelitian baik *in vitro* maupun *in vivo*. Secara *in vitro*, metode yang banyak digunakan adalah metode penghambatan xantin oksidase. Xantin oksidase adalah enzim yang terdapat di semua sel terutama di hati. Metode penetapan aktivitas enzim ini dilakukan dengan penambahan substrat xantin sehingga terbentuk asam urat. Penetapan aktivitas enzim xantin oksidase dapat dilakukan dengan cara langsung mengukur produk ataupun secara tidak langsung yaitu dengan mengukur sisa substrat. Dengan menggunakan prinsip penentuan aktivitas xantin oksidase maka dapat pula ditentukan persentase penghambatan aktivitas xantin oksidase yang ada dalam bahan yang akan diteliti sebagai urikostatik. Beberapa

penelitian menggunakan cara langsung (Umamaheswari, 2009 dan Saputra, 2012) namun beberapa penelitian lain menggunakan cara tidak langsung (Yulianto, 2009; Iswantini, 2012 dan Santi 2014). Oleh sebab itu ingin dibandingkan presisi metode langsung dengan mengukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum asam urat dan tidak langsung dengan mengukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum xantin.

## METODE

**Bahan dan Alat.** Bahan penelitian yang digunakan adalah xantin oksidase bentuk suspensi dalam ammonium sulfat (Sigma), xantin (Sigma), asam urat (Merck), dan bahan kimia lain dengan kualitas proanalisis. Pengukuran serapan dilakukan menggunakan spektrofotometer Shimadzu UV 1800).

**Penentuan panjang gelombang serapan maksimum.** Dibuat spektrum serapan xantin dan asam urat dalam dapar fosfat 50 mM pH 7,5 dengan penambahan HCl 1 N pada panjang gelombang 200-300 nm. Masing-masing dikerjakan pada tiga konsentrasi yang berbeda.

**Penentuan kondisi optimum reaksi enzimatis.** Pemilihan kondisi optimum dilakukan melalui reaksi enzimatis dengan variasi konsentrasi xantin (0,1 mM, 0,2 mM dan 0,3 mM), konsentrasi enzim (0,1 U/mL, 0,2 U/mL dan 0,3 U/mL), waktu inkubasi (30 dan 45 menit), dan suhu (25°C dan 37°C)

**Pengujian metode penetapan penghambatan aktivitas XO secara langsung dan tidak langsung.** Digunakan zat penghambat xantin oksidase yaitu alopurinol 0,5 mL dengan konsentrasi 0,1; 0,25; 0,5; 1,0, 2,0, dan 5,0 ppm dan ditambah larutan dapar fosfat 50 mM pH 7,5 sebanyak 1,45 mL. Campuran kemudian ditambah 1 mL larutan substrat xantin 0,3 mM dalam dapar fosfat pH 7,5. Setelah dilakukan prainkubasi pada suhu 25°C selama 15 menit, reaksi dimulai dengan penambahan xantin oksidase 0,3 U/mL sebanyak 0,05 mL lalu diinkubasi pada suhu 25°C selama 45 menit. Setelah diinkubasi, campuran segera ditambahkan HCl 1 N sebanyak 0,5 mL untuk menghentikan reaksinya. Sisa substrat xantin dan asam urat yang terbentuk diukur serapannya

menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum. Dilakukan juga pengujian terhadap blangko dan kontrol blangko. Blangko yang dimaksud dalam penelitian ini adalah substrat xantin dan enzim xantin oksidase tanpa penambahan inhibitor enzim. Kontrol blangko yang dimaksud dalam penelitian ini adalah substrat xantin tanpa penambahan enzim xantin oksidase dan inhibitor enzim. Konsentrasi xantin yang tersisa dan asam urat yang terbentuk ditentukan menggunakan kurva baku. Setiap konsentrasi alopurinol dikerjakan lima kali.

Aktivitas xantin oksidase dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{aktivitas XO} = \frac{\text{xantin yang bereaksi (mM)}}{\text{volume enzim (L) x waktu inkubasi (menit)}}$$

atau

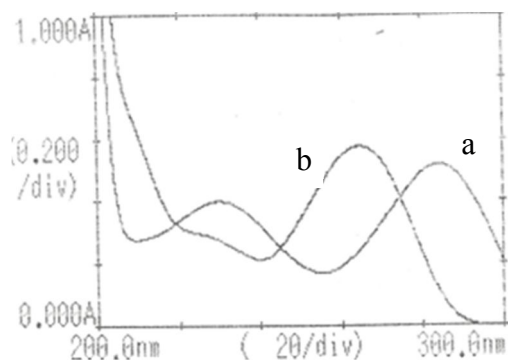
$$\text{aktivitas XO} = \frac{\text{asam urat yang terbentuk (mM)}}{\text{volume enzim (L) x waktu inkubasi (menit)}}$$

$$\text{persen inhibisi} = \frac{(\text{aktivitas XO blangko} - \text{aktivitas XO zat uji})}{\text{aktivitas XO blangko}} \times 100\%$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Asam urat merupakan hasil oksidasi xantin oleh enzim xantin oksidase. Aktivitas enzim bisa dihitung berdasarkan jumlah asam urat yang terbentuk (langsung) maupun berdasarkan sisa substrat xantin (tidak langsung).

Dari spektrum serapan ditemukan bahwa panjang gelombang serapan maksimum untuk asam urat dan xantin berturut-turut adalah 291 nm dan 268 nm. Menurut Umamaheswari (2009), asam urat memiliki panjang gelombang maksimum 290 nm sedangkan menurut Saputra (2012) 281,5 nm. Panjang gelombang serapan maksimum yang diperoleh dari penelitian ini sama dengan Umamaheswari (2009). Panjang gelombang serapan maksimum xantin yang diperoleh berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya yakni 265 nm (Santi, 2014), 264 nm (Yulianto, 2012). Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh serapan satu sama lain dibuat spektrum serapan xantin dan asam urat yang ditumpangtindihkan yang hasilnya disajikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Spektum serapan asam urat dalam dapar fosfat pH 7,5 (a) dan xantin (b) yang ditumpang tindihkan.

Spektum serapan xantin tunggal dengan konsentrasi yang berbeda-beda menunjukkan maksimum pada panjang gelombang yang sama yakni 268 nm, begitu pula asam urat dengan panjang gelombang serapan maksimum 291 nm. Gambar 1 menunjukkan bahwa pada panjang gelombang serapan maksimum xantin, yakni 268 nm, asam urat juga memberikan serapan. Ada kemungkinan pada pengujian aktivitas antihiperurisemia serapan pada 268 nm bukan hanya serapan dari xantin tetapi juga ada tambahan serapan dari asam urat produk reaksi enzimatis. Pada panjang gelombang serapan maksimum asam urat yakni 291 nm, gangguan serapan dari xantin relatif sedikit.

Untuk membandingkan presisi penentuan aktivitas penghambatan xantin oksidase berdasarkan pengukuran serapan pada panjang gelombang 268 nm dan 291 nm, dilakukan penentuan aktivitas penghambatan xantin oksidase menggunakan alopurinol enam konsentrasi. Setiap konsentrasi dikerjakan lima kali. Pengujian dilakukan pada kondisi optimum yakni menggunakan xantin dengan konsentrasi 0,3 mM, konsentrasi enzim 0,3 U/mL, suhu inkubasi 25°C selama 45 menit. Aktivitas enzim yang dihitung berdasarkan jumlah asam urat yang terbentuk ditentukan pada panjang gelombang 291 nm. Jumlah mol asam urat akan sama dengan xantin yang bereaksi, sehingga bila berdasarkan jumlah mol xantin yang bereaksi bisa dicari dengan menghitung selisih xantin mula-mula dengan sisa xantin. Jumlah xantin yang tersisa bisa ditentukan pada panjang gelombang 268 nm

Hasil pengukuran aktivitas penghambatan yang ditetapkan pada panjang gelombang 268 nm dan 291 nm disajikan pada Tabel 1.

Rentang standar baku relatif (SBR) pada pengukuran berdasarkan serapan sisa xantin (tidak langsung) adalah 0,25-2,39 % sedangkan pada pengukuran berdasarkan asam urat yang terbentuk (langsung) sebesar 0,24-1,18%. Dengan membandingkan rentang SBR bisa diketahui bahwa presisi kedua metode hampir sama. Rentang SBR yang lebih besar pada penentuan berdasarkan pengukuran sisa xantin kemungkinan disebabkan oleh asam urat yang juga memberikan serapan pada panjang gelombang 268 nm.

**Tabel 1.** Hasil uji penghambatan xantin oksidase berdasarkan pengukuran serapan

Kons. alopurinol (bpj)	$\lambda_{268m}$		$\lambda_{291nm}$	
	Pengham-batan rata-rata (%)	SBR (%)	Pengham-batan rata-rata (%)	SBR (%)
0,1	19,12	2,39	19,01	1,18
0,25	26,28	1,58	27,05	0,62
0,50	40,38	1,89	35,96	0,97
1,00	51,03	0,25	46,29	1,30
2,00	61,08	0,35	61,62	0,36
5,00	94,86	0,36	91,69	0,24

## KESIMPULAN

Presisi penentuan persen penghambatan berdasarkan pengukuran serapan pada 268 nm dan 291 nm hampir sama dengan rentang standar baku relatif berturut-turut 0,25-2,39% dan 0,24-1,30%

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan Fakultas Farmasi Universitas Pancasila atas dana yang diberikan melalui penelitian insentif tahun anggaran 2015.

## DAFTAR PUSTAKA

- Gunawan SG. 2007: *Farmakologi dan terapi*. Edisi V. Jakarta: Balai Penerbit FKUI, 243-44.
- Iswantini,D, Ramdhani TH, Darusman LK, 2012: In vitro inhibition of celery (*Apium graveolens L.*) extract on the activity of xanthine oxidase and determination of its compound. *Indo. J. Chem.* 12(3) 247-254

- Santi. 2014: Aktivitas penghambatan xantin oksidase dari lima fase ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) secara in vitro. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Pancasila
- Saputra KA, 2012: Uji penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase secara InVitro pada The Celup Kombinasi Daun Gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm) dan Kaliks Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn).*Skripsi*. FMIPA Prodi Farmasi UI
- Umamaheswari,M, Asokkumar K, Subhadradevi V, Shivashanmugam AT, 2009: *In vitro Xantine Oxidase Inhibitory Activity of The Fraction of Erytrina stricta Roxb*, India: Departemen Farmakologi Institut Ilmu Paramedikal Sri Ramakrishna.
- Yulianto D. 2009: Inhibisi xantin oksidase secara in vitro oleh ekstrak rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dan ciplukan (*Physalis angulata*). *Skripsi*. Bogor: Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor; h. 3-4, 37-41.
- Yumita A, Suganda AG, Sukandar EY. 2013: Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indonesian medicinal plants and active fraction of selected plants. *Int J Pharm Pharm Sci*;5(2):293-96.