



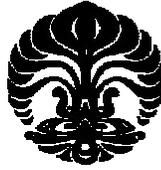
UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS XANTIN OKSIDASE
OLEH EKSTRAK AKAR *Acalypha indica* L. DAN
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA
PADA FRAKSI AKTIF**

SKRIPSI

**NURLAILA FITRIANI
0906601550**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI EKSTENSI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS XANTIN OKSIDASE
OLEH EKSTRAK AKAR *Acalypha indica* L. DAN
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA
PADA FRAKSI AKTIF**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**NURLAILA FITRIANI
0906601550**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI EKSTENSI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Nurlaila Fitriani

NPM : 0906601550

Tanda Tangan : 

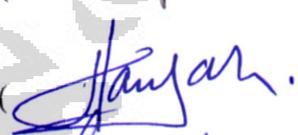
Tanggal : 25 Januari 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Nurlaila Fitriani
NPM : 0906601550
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Judul Skripsi : Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase oleh Ekstrak Akar *Acalypha indica* L. dan Identifikasi Golongan Senyawa pada Fraksi Aktif

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt. ()
Pembimbing II : Dr. Katrin, M.S., Apt. ()
Penguji I : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., Apt. ()
Penguji II : Prof. Dr. Endang Hanani, M.S., Apt. ()
Penguji III : Prof. Dr. Atiek Soemiati, M.S., Apt. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 25 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini;
- (2) Ibu Dr. Katrin, M.S., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini, serta selaku kepala Laboratorium Fitokimia Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (3) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S, Apt. selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (4) Ibu Dra. Azizahwati, M.S., Apt. selaku ketua program sarjana Ekstensi Farmasi FMIPA UI dan selaku evaluator pada praseminar yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penyusunan skripsi ini;
- (4) Ibu Dra. Maryati Kurniadi M.Si., Apt. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (5) Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (6) Para Laboran serta karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu terlaksananya penelitian ini;

- (7) Keluarga dan orang tua yang telah memberikan semangat dan bantuan, serta dukungan baik material maupun moral;
- (8) Rekan-rekan penelitian di laboratorium fitokimia yang selalu membantu selama proses penelitian;
- (9) Sahabat-sahabatku baik di dalam maupun di luar kampus serta teman-teman seperjuangan Farmasi Ekstensi 2009 yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis;
- (10) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangannya pada skripsi ini. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan bermanfaat bagi rekan-rekan Farmasi.

Penulis
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurlaila Fitriani
NPM : 0906601550
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase oleh Ekstrak Akar *Acalypha indica* L. dan Identifikasi Golongan Senyawa pada Fraksi Aktif

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 25 Januari 2012
Yang menyatakan



(Nurlaila Fitriani)

ABSTRAK

Nama : Nurlaila Fitriani
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Judul : Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase oleh Ekstrak Akar *Acalypha indica* L. dan Identifikasi Golongan Senyawa pada Fraksi Aktif

Penyakit *gout* merupakan kelainan metabolik yang ditandai oleh meningkatnya konsentrasi asam urat. Enzim yang memiliki peranan penting dalam pembentukan asam urat adalah xantin oksidase, yang mengkatalisis hipoxantin dan xantin menjadi asam urat. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai penghambat xantin oksidase adalah *Acalypha indica* L. Pada penelitian ini dilakukan uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh ekstrak akar *Acalypha indica* L. dan mengidentifikasi golongan senyawa pada fraksi aktif. Uji Penghambatan aktivitas xantin oksidase dilakukan secara spektrofotometri. Serbuk simplisia dimaserasi dengan menggunakan etanol 80%, kemudian difraksinasi secara berturut-turut dengan petroleum eter, etil asetat dan butanol. Ekstrak yang diperoleh kemudian diujikan sebagai penghambat xantin oksidase. Fraksi teraktif adalah fraksi Butanol dengan IC_{50} 0,38 μ g/mL. Fraksi lain memberikan IC_{50} sebesar 5,54 μ g/mL pada fraksi etil asetat, 6,26 μ g/mL pada fraksi air dan 13,13 μ g/mL pada fraksi petroleum eter. Berdasarkan uji kinetika penghambatan enzim diketahui bahwa ekstrak akar *Acalypha indica* L. fraksi butanol memiliki aktivitas penghambatan kompetitif. Pada identifikasi golongan senyawa, fraksi butanol dan fraksi etil asetat mengandung alkaloid, flavonoid dan glikosida, fraksi air mengandung alkaloid, glikosida dan saponin dan fraksi petroleum eter mengandung terpenoid.

Kata Kunci : *Acalypha indica* L, asam urat, gout, penghambat xantin oksidase
xv+77 halaman ; 28 gambar; 18 tabel; 8 lampiran
Daftar Pustaka : 40(1966-2011)

ABSTRACT

Name : Nurlaila Fitriani
Program Study : Pharmacy Extension
Title : Inhibitory Test of Xanthine Oxidase Activity from Root Extract of *Acalypha indica* L and Identification of Compounds from the Active Fraction

Gout is a metabolic disorder characterized by increased concentrations of uric acid. Enzyme that has an important role in the formation of uric acid is xanthine oxidase which is catalyzed hypoxanthine and xanthine to uric acid. One of the plants that has the potential as inhibitor of xanthine oxidase is *Acalypha indica* L. In this research tested inhibitory of xanthine oxidase activity from the root extracts of *Acalypha indica* L. and identification of compounds from the active fraction. Inhibitory test of xanthine oxidase activity performed by spectrophotometry. The powder of simplisia was maserated used ethanol 80%, and was fractionated with petroleum ether, ethyl acetate and butanol. The extract was tested as an inhibitor of xanthine oxidase. The most active fraction was butanol fraction with IC₅₀ 0.38 µg/mL. Another fraction gave IC₅₀ µg/mL of 5.54 µg/mL at ethyl acetate fraction, 6.26 µg/mL at water fraction and 13,13 µg/mL at petroleum ether fractions. From the test result of the kinetics of inhibition of xanthine oxidase, known that butanol fraction from the root extract of *Acalypha indica* L. has a competitive inhibitory activity. Identification of compounds showed that butanol and ethyl acetate fraction contained alkaloids, flavonoids and glycosides, water fraction contained alkaloids, glycosides, saponins and petroleum ether fraction contained terpenoids.

Key Words : *Acalypha indica* L, gout, uric acid, xanthine oxidase inhibitor
xv+77 pages : 28 pictures; 18 tables; 8 appendices
Bibliography : 40(1966-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
1.3 Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Deskripsi dan Tata Nama.....	4
2.1.1 Klasifikasi.....	4
2.1.2 Nama Lain.....	4
2.1.3 Deskripsi.....	4
2.1.4 Kandungan Kimia.....	5
2.2 Simplisia	5
2.3 Ekstrak dan Ekstraksi.....	6
2.3.1 Ekstrak.....	6
2.3.2 Ekstraksi.....	6
2.3.2.1 Cara Dingin.....	6
2.3.2.2 Cara Panas.....	7
2.4 Enzim.....	7
2.4.1 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Enzim.....	8
2.4.1.1 Suhu.....	8
2.4.1.2 pH.....	8
2.4.1.3 Konsentrasi Substrat.....	9
2.4.2 Persamaan Michaelis-Menten.....	9
2.4.3 Bentuk Linear Persamaan Michaelis-Menten Digunakan Untuk Menentukan nilai Km dan Vmaks	10
2.4.4 Plot Lineweaver Burk.....	11
2.4.5 Penghambatan Aktivitas Enzim.....	12
2.4.5.1 Inhibisi Kompetitif.....	12
2.4.5.2 Inhibisi Non Kompetitif.....	13
2.4.5.3 Inhibisi Unkompetitif.....	14
2.5 Xantin Oksidase.....	14
2.6 Hiperurisemia dan Penyakit Gout.....	15

3.6.6.4 Identifikasi Flavonoid.....	32
3.6.6.5 Identifikasi Tanin	33
3.6.6.6 Identifikasi Antrakuinon.....	33
3.6.7 Identifikasi Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis pada Fraksi Teraktif.....	33
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1 Penyiapan Bahan.....	35
4.2 Ekstraksi Simplisia.....	35
4.3 Fraksinasi.....	36
4.4 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase.....	37
4.4.1 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase.....	37
4.4.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	38
4.4.1.2 Penentuan Suhu Optimum.....	38
4.4.1.3 Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum.....	38
4.4.2 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase oleh Sampel.....	38
4.4.2.1 Pengujian Standar Alopurinol	40
4.4.2.2 Pengujian Sampel.....	40
4.5 Identifikasi Golongan Senyawa	42
4.5.1 Identifikasi Alkaloid	43
4.5.2 Identifikasi Flavonoid	45
4.5.3 Identifikasi Glikosida.....	47
4.5.4 Identifikasi Tanin.....	47
4.5.5 Identifikasi Terpen	48
4.5.6 Identifikasi Saponin	48
4.6 Uji Kinetika Penghambatan Xantin Oksidase.....	48
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	48
5.1 Kesimpulan	48
5.2 Saran	48
DAFTAR ACUAN.....	49

DAFTAR GAMBAR

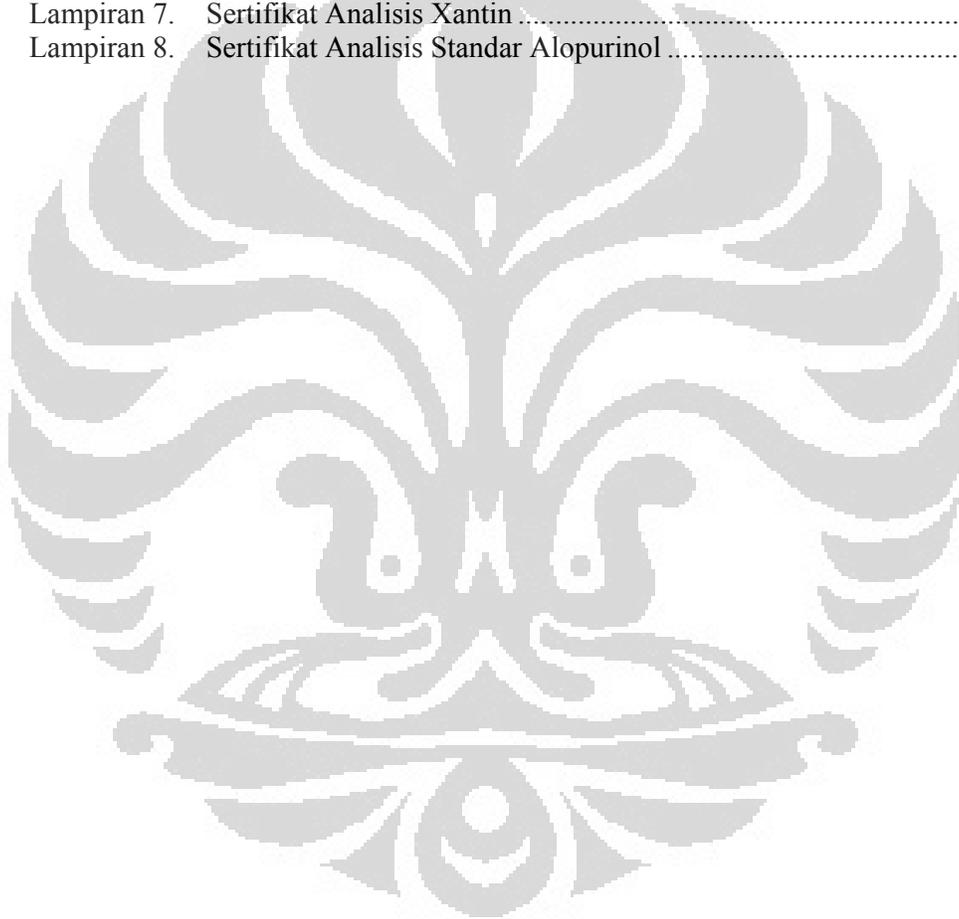
Gambar 2.1.	Pengaruh Konsentrasi Substrat pada Kecepatan Raksi yang Dikatalisis oleh Enzim.....	9
Gambar 2.2.	Plot Lineweaver-Burk dari $1/V_i$ terhadap $1/[S]$	11
Gambar 2.3.	Perbedaan Struktur Antara Inhibitor Kompetitif dan Inhibitor Nonkompetitif.....	12
Gambar 2.4.	Plot Lineweaver-Burk yang Memperlihatkan Inhibisi Kompetitif... ..	13
Gambar 2.5.	Plot Lineweaver-Burk Untuk Inhibisi Nonkompetitif.....	14
Gambar 2.6.	Katalisis Hipoxantin Menjadi Xantin yang Kemudian Menjadi Asam Urat oleh Xantin Oksidase.....	14
Gambar 2.7.	Struktur Kimia Alopurinol.....	15
Gambar 4.1.	Grafik Penentuan Konsentrasi Substrat Xantin pada 0,05mM; 0,1 mM; 0,15mM; 0,2 mM dan 0,25 mM.....	38
Gambar 4.2.	Hasil KLT Fraksi Butanol Menggunakan Fase Gerak Kloroform-Metanol 8 : 3	43
Gambar 4.3.	Hasil KLT Fraksi Butanol Menggunakan Fase Gerak Kloroform-Metanol 4 : 1	44
Gambar 4.4.	Plot Lineaweaver-Burk Ekstrak Kental Fraksi Butanol Konsentrasi 2 $\mu\text{g/ml}$ Dengan Konsentrasi Xantin 0,05 ; 0,1 ;0,15 ; 0,2 dan 0,5 mM.....	47
Gambar 4.5.	Tanaman <i>Acalypha indica</i> L.....	56
Gambar 4.6.	Simplisia Bagian Akar Tanaman <i>Acalypha Indica</i> L	56
Gambar 4.7.	Spektrum Serapan Pada Optimasi Konsentrasi Substrat	56
Gambar 4.8.	Grafik Regresi Linier Alopurinol	57
Gambar 4.9.	Grafik Regresi Linier Ekstrak etanol 80%.....	57
Gambar 4.10.	Grafik Regresi Linier Fraksi Petroleum eter	57
Gambar 4.11.	Grafik Regresi Linier Ekstrak Fraksi Etil asetat.....	58
Gambar 4.12.	Grafik Regresi Linier Ekstrak Fraksi Butanol	58
Gambar 4.13.	Grafik Regresi Linier Ekstrak Fraksi Air	58
Gambar 4.14.	Identifikasi Golongan Senyawa Alkaloid.....	59
Gambar 4.15.	Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid	59
Gambar 4.16.	Identifikasi Golongan Senyawa Glikosida	60
Gambar 4.17.	Identifikasi Golongan Senyawa Fenol.....	60
Gambar 4.18.	Identifikasi Golongan Senyawa Saponin.....	60
Gambar 4.19.	Identifikasi Golongan Senyawa Terpen/Sterol.....	61
Gambar 4.20.	Penguap Putar Vakum	61
Gambar 4.21.	Spektrofotometer UV Vis.....	61

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Reagen dan volume yang dibutuhkan pada uji penghambatan aktivitas xantin oksidase.....	30
Tabel 4.1.	Identifikasi Golongan Senyawa Pada Ekstrak Akar Tanaman <i>Acalypha indica</i> L.....	43
Tabel 4.2.	Nilai Rf KLT Pada Fraksi Butanol Dengan Fase Gerak Kloroform-Metanol 8 : 3	45
Tabel 4.3.	Nilai Rf KLT Pada Fraksi Butanol Dengan Fase Gerak Kloroform-Metanol 4 : 1	47
Tabel 4.4.	Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten Pada Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase	49
Tabel 4.5.	Rendemen Ekstrak.....	62
Tabel 4.6.	Data Serapan Pada Uji Pendahuluan Penentuan Suhu Optimum.....	62
Tabel 4.7.	Data Serapan Pada Uji Pendahuluan Penentuan pH Optimum	63
Tabel 4.8.	Data Serapan Pada Uji Pendahuluan Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum.....	63
Tabel 4.9.	Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Alopurinol	64
Tabel 4.10.	Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Ekstrak Etanol 80%	64
Tabel 4.11.	Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Fraksi Petroleum Eter.....	65
Tabel 4.12.	Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Fraksi Etil Asetat.....	65
Tabel 4.13.	Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Fraksi Butanol	66
Tabel 4.14.	Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Fraksi Air.....	66
Tabel 4.15.	Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Kimia	67
Tabel 4.16.	Data Serapan No Inhibitor Pada Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Ekstrak Fraksi Butanol	67
Tabel 4.17.	Data Serapan Fraksi Butanol Konsentrasi 2 μ g/ml Pada Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Ekstrak Fraksi Butanol	68

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema Kerja Pembuatan Ekstrak Kental dan Fraksinasi Ekstrak Akar Tanaman <i>Acalypha indica</i> L.....	69
Lampiran 2.	Skema Pengujian Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase dan Identikasi Golongan Senyawa Pada Fraksi Aktif Akar Tanaman <i>Acalypha indica</i> L.....	70
Lampiran 3.	Perhitungan dan Pembuatan Larutan Xantin Oksidase 0,1 unit/ml	
Lampiran 4.	Perhitungan dan Pembuatan Larutan Xantin.....	71
Lampiran 5.	Hasil Determinasi Tanaman.....	72
Lampiran 6.	Sertifikat Analisis Xantin Oksidase.....	73
Lampiran 7.	Sertifikat Analisis Xantin.....	75
Lampiran 8.	Sertifikat Analisis Standar Alopurinol.....	77



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit gout merupakan kelainan metabolik yang ditandai oleh meningkatnya konsentrasi asam urat. Gout dapat bersifat primer, yang merupakan akibat langsung pembentukan asam urat tubuh yang berlebihan atau penurunan ekskresi asam urat. Gout sekunder disebabkan karena pembentuk asam urat yang berlebihan atau ekskresi asam urat berkurang akibat penyakit lain atau pemakaian obat tertentu (Price, 2005). Di Indonesia, penyakit gout menduduki urutan kedua terbanyak setelah penyakit osteoarthritis. Penyakit ini berhubungan dengan kadar asam urat pada serum (Dalimartha, 2008).

Enzim yang memiliki peranan penting dalam pembentukan asam urat adalah xantin oksidase. Enzim ini mengkatalisis hipoxantin dan xantin menjadi asam urat, yang merupakan reaksi metabolisme basa purin. Tingginya aktivitas xantin oksidase berhubungan erat dengan hiperurisemia dan penyakit gout (Cos et al., 1998).

Pengobatan pada penyakit gout berupa meningkatkan ekskresi asam urat dan menurunkan produksi asam urat. Alopurinol adalah obat yang digunakan secara klinik sebagai penghambat xantin oksidase, akan tetapi memiliki efek samping seperti sindrom hipersensitivitas, sindrom Stevens Johnson dan keracunan ginjal. Pengembangan senyawa lain yang dapat menghambat xantin oksidase perlu dilakukan agar masyarakat dapat memilih obat alternatif dalam pengobatan penyakit gout. Sumber potensial yang mengandung senyawa tersebut dapat diperoleh dari tanaman (Umamaheswari et al., 2009).

Tanaman yang telah diteliti penghambatannya terhadap aktivitas xantin oksidase antara lain *Apium graveolens* L. (Nadinah, 2008), *Lagerstroemia speciosa* L. (Tomonori, Akio & Takami, 2004), *Piper betle* (Kazuya et al., 2009), *Swietenia mahagoni* (Sahgal et al., 2009). Selain itu penelitian yang dilakukan di Cina terhadap 122 tanaman obat tradisional Cina, menghasilkan bahwa 69 diantaranya menunjukkan penghambatan terhadap xantin oksidase (Kong et al., 2000).

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai penghambat xantin oksidase adalah *Acalypha indica* L. Tanaman ini merupakan tanaman yang tumbuh liar dan dapat ditemui di pinggiran jalan, belukar-belukar, dan di tempat teduh yang terdapat naungan. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa tanaman *Acalypha indica* L. memiliki toksisitas terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* (Kamalakkanan, Murugan & Barnard, 2011) serta memiliki aktivitas antibakteri (Pratiwi, 2009). Rebusan akar tanaman ini memiliki efek penurunan kadar asam urat dalam darah pada tikus putih jantan. Pada penelitian ini disebutkan bahwa potensi penurunan kadar asam urat sama dengan kenaikan dosis yang diberikan, sehingga hasil terbaik yang dapat menurunkan kadar asam urat adalah 10,8 g/200 g (Azizahwati, Wiryowidagdo & Prihandini, 2005). Hasil skrining penghambatan aktivitas xantin oksidase dari beberapa tanaman obat di Indonesia yang berkhasiat sebagai anti hiperurisemia, akar tanaman *Acalypha indica* L. dapat menghambat xantin oksidase sebesar 17,47% pada konsentrasi sampel sebesar 25,255 ppm (Laurens, 2010). Sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai fraksinasi untuk mengetahui aktivitas terbesar penghambatan xantin oksidase.

Pada penelitian ini akan dilakukan uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh beberapa fraksi dari ekstrak akar tanaman *Acalypha indica* L. Identifikasi golongan senyawa digunakan untuk mengetahui golongan senyawa yang dapat menghambat aktivitas xantin oksidase pada fraksi aktif yang dapat memberikan informasi dan bukti secara ilmiah dalam pemanfaatannya sebagai penghambat xantin oksidase.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh ekstrak akar tanaman *Acalypha indica* L. dan mengidentifikasi golongan senyawa pada fraksi aktif.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini memiliki manfaat untuk peneliti, akademisi, maupun masyarakat. Manfaat penelitian ini untuk peneliti adalah diperolehnya

pengetahuan mengenai kemampuan ekstrak akar *Acalypha indica* L. dalam menghambat aktivitas xantin oksidase dan diperoleh golongan senyawa yang terkandung di dalam fraksi aktif. Bagi akademisi, penelitian ini bermanfaat sebagai salah satu referensi dalam mengetahui penghambatan aktivitas xantin oksidase pada akar *Acalypha indica* L. serta sebagai landasan penelitian lebih lanjut mengenai penghambatan aktivitas xantin oksidase pada hasil isolasi senyawa pada akar *Acalypha indica* L. Bagi masyarakat, penelitian ini dapat bermanfaat untuk memperoleh tanaman sebagai obat alternatif untuk menghambat pembentukan asam urat.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi dan Tata Nama (Tjitrosoepomo, 1991)

2.1.1 Klasifikasi

Dunia	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Subkelas	: Monochlamydeae
Bangsa	: Euphorbiales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: Acalypha
Jenis	: <i>Acalypha indica</i> L.

2.1.2 Nama Lain (van Valkenbur & Bunyaphatsara, 2002)

Indonesia	: lelatang, kucing-kucingan, kokosongan (Sunda), rumput bolong-bolong, anting-anting (Jawa)
Malaysia	: rumput lislis, tjeka ma
Philipina	: bugos, maraotong, taptapingar
Thailand	: tamyae tuaphuu, tamyae maeo, haan maeo

2.1.3 Deskripsi

Tanaman *Acalypha indica* L. berupa semak, pohon kecil, sebagian besar berumah satu. Daunnya sederhana, berupa daun tunggal dan tersebar, berbentuk belah ketupat, ujung runcing, pangkal membulat, tipis, tepi bergerigi, dan mempunyai tulang daun menyirip. Panjang daun 2,5-8 cm, lebar 1,5-3,5 cm berwarna hijau. Bunganya merupakan bunga majemuk, berbentuk bulir, berkelamin satu, berada di ketiak daun dan ujung cabang. Buahnya berbentuk kotak atau bulat berwarna hitam dengan biji berbentuk bulat panjang dan

berwarna coklat. Akarnya berupa akar tunggang berwarna putih kotor (van Valkenbur & Bunyapraphatsara, 2002)

2.1.4 Kandungan Kimia

Berdasarkan literatur, kandungan kimia pada tanaman *Acalypha indica* L. yang telah diisolasi adalah flavonoid, glukosida sianogenik akalipin, akalipamid, aurantiamida, suksinimid, dan alkaloid piranokuinolinon flindersin, serta flavonoid glikosida kaemferol, mauritianin, clitorin, nicotiflorin, dan biorobin yang diisolasi dari bunga dan daun *Acalypha indica* L. (Nahrstedt, Hungeling & Petereit, 2006). Glikosida piridon sianogenik dan non-sianogenik juga telah diisolasi dari ekstrak metanol dari bunga dan daun *Acalypha indica* L. (Hungeling, 2009).

2.2 Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun, dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan alam yang dikeringkan. Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah berupa simplisia nabati, yaitu simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman tertentu, atau eksudat tanaman. Eksudat tanaman ialah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau isi sel yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya dan belum berupa zat kimia murni.

Nama latin simplisia ditetapkan dengan menyebutkan nama marga (*genus*), atau nama jenis (*specius*), atau petunjuk jenis (*specific epithet*) tanaman asal, diikuti dengan bagian tanaman yang digunakan. Ketentuan ini tidak berlaku untuk simplisia nabati yang diperoleh dari beberapa macam tanaman yang berbeda-beda marganya maupun untuk eksudat tanaman.

Simplisia nabati harus bebas dari serangga, fragmen hewan, atau kotoran hewan; tidak boleh menyimpang bau dan warnanya; tidak boleh mengandung lendir dan cendawan, atau menunjukkan tanda-tanda pengotoran lain; tidak boleh mengandung bahan lain yang beracun atau berbahaya. Jika dalam beberapa hal khusus ada sedikit penyimpangan dari beberapa ketentuan mengenai morfologik dan mikroskopik yang tertera dalam *Materia Medica Indonesia*, sedangkan semua

persyaratan lain dipenuhi, maka simplisia yang bersangkutan dapat dianggap memenuhi persyaratan Materia Medika Indonesia (Depkes RI, 1995).

2.3 Ekstrak dan Ekstraksi

2.3.1 Ekstrak

Dalam buku Farmakope Indonesia Edisi 4, disebutkan bahwa ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan.

2.3.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat, dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Dirjen POM, 2000). Ekstraksi dapat dilakukan dengan cara dingin atau dengan cara panas.

2.3.2.1 Cara Dingin

a. Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan peyarian maserat pertama dan seterusnya.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan

bahan, tahapan maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/ penampungan ekstrak).

2.3.2.2 Cara panas

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur pada titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada ampas serbuk pertama sampai 3-5 kali sehingga proses ekstraksi sempurna.

b. Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi yang menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur kamar, secara umum dilakukan pada temperatur 40-50 °C.

d. Infusa

Infusa adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98 °C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ($\geq 30^{\circ}\text{C}$) dan temperatur sampai titik didih air.

2.4 Enzim

Enzim merupakan katalisator protein yang mengatur kecepatan berlangsungnya berbagai macam proses fisiologis (Murray et al., 2003). Enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia dan tidak mengalami perubahan selama reaksi katalisis (Champe, Harvey & Ferrier, 2005).

Enzim memiliki tempat aktif yang mengandung asam amino pada sisi rantai yang akan membentuk permukaan tiga dimensi yang saling melengkapi

dengan substrat. Tempat aktif pada enzim akan berikatan dengan substrat, membentuk kompleks enzim-substrat (ES). ES akan dirubah menjadi enzim-produk (EP), setelah itu akan berpisah menjadi enzim dan produk (Champe, Harvey & Ferrier, 2005).

Enzim bersifat spesifik dan memiliki efisiensi yang tinggi. Enzim bersifat spesifik karena enzim berinteraksi dengan satu atau beberapa substrat dan mengkatalisis hanya dengan satu jenis reaksi kimia. Reaksi katalitik enzim memiliki efisiensi tinggi, memiliki kecepatan 10³-10⁸ dibandingkan dengan reaksi yang tidak dikatalisis. Setiap molekul enzim dapat merubah 100 sampai 1000 molekul substrat menjadi produk setiap detik (Champe, Harvey & Ferrier, 2005).

2.4.1 Faktor- Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

2.4.1.1 Suhu

Reaksi katalisis enzim sensitif terhadap perubahan suhu (McPherson & Pincus, 2006). Peninggian suhu reaksi dapat meningkatkan jumlah molekul yang bereaksi baik dengan kenaikan energi kinetiknya atau dengan peningkatan benturannya. Peningkatan kecepatan reaksi pada akhirnya akan tercapai suatu suhu dimana molekul yang bereaksi tidak lagi stabil (Murray et al., 2003). Sebagian besar enzim mulai denaturasi dan menjadi tidak aktif saat suhu meningkat (McPherson & Pincus, 2006).

2.4.1.2 pH

Enzim memiliki pH optimum untuk aktivitas maksimalnya. Biasanya pH pada kondisi reaksi dipilih berdasarkan aktivitas enzim terbesar (McPherson & Pincus, 2006). pH dapat mempengaruhi perubahan aktivitas melalui perubahan struktur atau pengubahan muatan pada residu yang berfungsi dalam pengikatan substrat atau katalisis. Bentuk kurva aktivitas-pH dipengaruhi oleh denaturasi enzim pada pH yang tinggi atau rendah dan perubahan status bermuatan pada enzim dan atau substrat (Murray et al., 2003).

2.4.1.3 Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi (V) adalah jumlah molekul substrat yang diubah menjadi produk per unit waktu. Kecepatan biasanya ditunjukkan sebagai μmol produk yang diubah per menit (McPherson & Pincus, 2006). Kecepatan reaksi akan bertambah seiring meningkatnya konsentrasi substrat hingga tercapai suatu keadaan yang enzimnya dikatakan jenuh oleh substrat. Kecepatan awal yang terukur akan mencapai suatu nilai maksimal dan tidak dipengaruhi lagi oleh peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut karena substrat terdapat dalam jumlah yang berlebihan yang melampaui jumlah enzim (Murray et al., 2003).

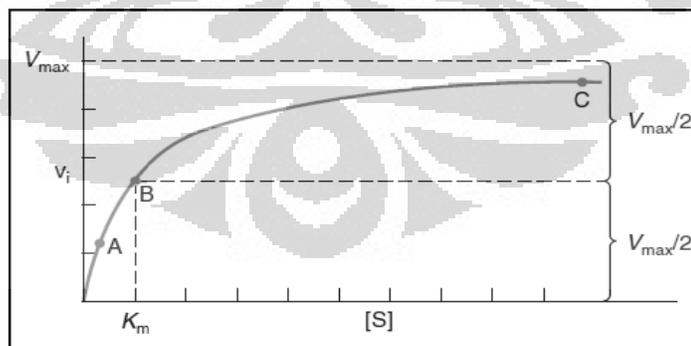
2.4.2 Persamaan Michaelis-Menten

Nilai konstanta Michaelis-Menten (K_m) adalah konsentrasi substrat yang menghasilkan separuh dari kecepatan maksimal. Nilai K_m dapat ditentukan secara eksperimental dengan membuat grafik V_i untuk menunjukkan $[S]$.

$$V_i = \frac{V_{\text{maks}} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

Dimana :

- V_i = Kecepatan reaksi awal
- V_{maks} = Kecepatan maksimal
- K_m = Konstanta Michaelis
- $[S]$ = Konsentrasi substrat



[Sumber : Murray et al., 2003]

Gambar 2.1 Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim

Ketergantungan percepatan awal reaksi (V_i) terhadap nilai $[S]$ dan K_m , dapat dievaluasi sebagai berikut :

- Bila $[S]$ jauh lebih kecil dari K_m atau konsentrasi substrat di bawah konsentrasi yang diperlukan untuk menghasilkan separuh-percepatan maksimal (nilai K_m), maka percepatan awal (V_i), akan bergantung pada konsentrasi substrat $[S]$. Pada gambar 2.1 dapat dilihat sebagai titik A.
- Bila konsentrasi substrat $[S]$ jauh melampaui K_m , maka percepatan awal V_i , merupakan percepatan maksimal (V_{maks}). Pada gambar 2.1 dapat dilihat sebagai titik C.
- Bila konsentrasi substrat sama dengan nilai K_m , maka percepatan awal V_i separuh dari percepatan maksimal. Pada gambar 2.1 dapat dilihat sebagai titik B.

2.4.3 Bentuk Linear Persamaan Michaelis-Menten Digunakan Untuk Menentukan nilai K_m dan V_{maks}

Ketika V_i diplot terhadap $[S]$, tidak selalu bisa digunakan untuk menentukan kapan V_{maks} akan dicapai, karena secara bertahap akan terjadi kurva hiperbola pada konsentrasi substrat yang tinggi. Maka, jika $1/V_i$ diplot terhadap $1/[S]$. Akan diperoleh garis lurus. Garis ini disebut juga plot Lineweaver-Burk, yang dapat digunakan untuk menghitung K_m dan V_{maks} dan dapat menentukan mekanisme inhibisi dari inhibitor enzim (Champe, Harvey & Ferrier, 2005). Persamaan Michaelis-Menten dapat dibalik dan difaktorkan sebaga berikut :

$$V_i = \frac{V_{maks} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.2)$$

Persamaan dibalik

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{maks} [S]} \quad (2.3)$$

Difaktorkan

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_{maks}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V_{maks}[S]} \quad (2.4)$$

Sederhanakan

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_{maks}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2.5)$$

Persamaan pada garis lurus $y = a + bx$ (2.6)

Dengan $y = \frac{1}{v_i}$ dan $x = \frac{1}{[S]}$ (2.7)

Jika y atau $1/v_i$ diplot sebagai fungsi x , atau $1/[S]$, maka titik potong (intersep) y , b , adalah $1/V_{maks}$ dan garis miring a , adalah K_m/V_{maks} . Titik potong x negatif dapat dievaluasi dengan mengatur $y = 0$, kemudian :

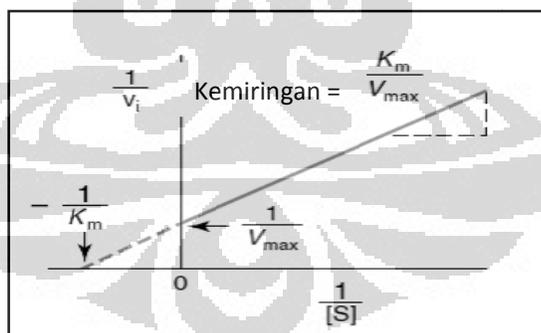
$$x = -\frac{b}{a} = -\frac{1}{K_m} \quad (2.8)$$

2.4.4 Plot Lineweaver Burk

Plot Lineweaver-Burk dapat digunakan untuk menghitung K_m dan V_{maks} , untuk menentukan mekanisme penghambatan enzim (Champe, Harvey & Ferrier, 2005). K_m dapat diperkirakan dengan menggunakan garis miring y dan titik potong y atau titik potong negatif x .

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{maks}[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2.9)$$

Plot $1/v_i$ dengan $1/[S]$ dapat dilihat pada gambar 2.2 dimana perpotongan pada sumbu x sama dengan $-1/K_m$ dan perpotongan pada sumbu y sama dengan $1/V_{maks}$.

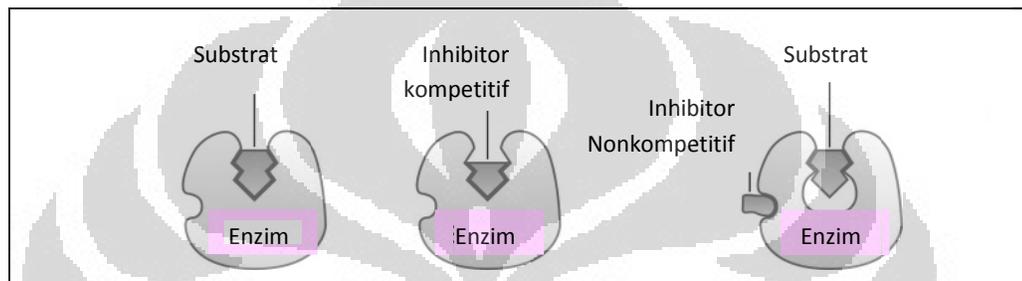


[Sumber : Murray et al., 2003, telah diolah kembali]

Gambar 2.2 Plot Lineweaver Burk dari $1/v_i$ terhadap $1/[S]$

2.4.5 Penghambatan Aktivitas Enzim

Penghambatan enzim dapat terjadi secara reversibel atau ireversibel. Pada penghambatan yang terjadi secara ireversibel, ikatan kovalen terbentuk antara inhibitor dengan enzim dan aktivitas enzim tidak dapat dipulihkan ketika telah berpisah dari inhibitor. Penghambatan yang terjadi secara reversibel, terdapat tiga kemungkinan yaitu kompetitif, nonkompetitif dan unkompetitif (McPherson & Pincus, 2006).

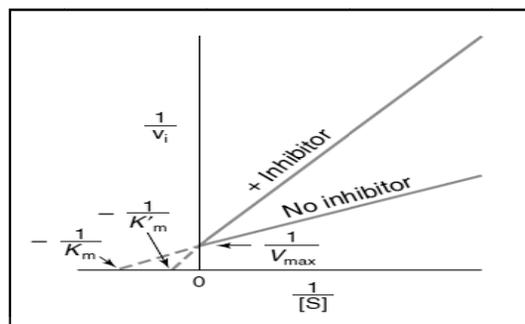


[Sumber : McPherson & Pincus, 2006, telah diolah kembali]

Gambar 2.3 Perbedaan struktur antara inhibitor kompetitif dan inhibitor nonkompetitif.

2.4.5.1 Inhibisi Kompetitif

Inhibisi kompetitif terjadi ketika inhibitor berikatan dengan enzim pada tempat yang sama dengan substrat. Molekul substrat dan inhibitor memiliki struktur yang sama, sehingga berkompetisi untuk dapat berikatan pada tempat aktif enzim (McPherson & Pincus, 2006). Inhibitor dapat berikatan secara reversibel dengan enzim sehingga bukan membentuk kompleks enzim-substrat, melainkan membentuk kompleks enzim-inhibitor.



[Sumber : Murray et al., 2003]

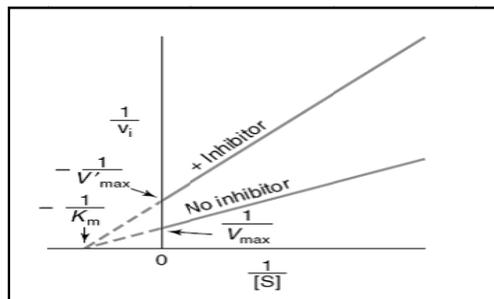
Gambar 2.4 Plot Lineweaver Burk yang memperlihatkan inhibisi kompetitif.

Kecepatan pembentukan produk bergantung pada konsentrasi enzim-substrat. Bila konsentrasi inhibitor tetap, ditambahkan lebih banyak substrat, akan meningkatkan probabilitas bahwa enzim akan lebih banyak berikatan dengan substrat dibandingkan dengan inhibitor (Murray et al., 2003).

2.4.5.2 Inhibisi Nonkompetitif

Inhibisi nonkompetitif terjadi ketika inhibitor berikatan dengan enzim pada tempat yang berbeda dengan tempat berikatannya dengan substrat. Inhibitor dan substrat dapat berikatan dengan enzim secara serempak. Ikatan inhibitor pada tempat yang lain pada sisi enzim dapat menghilangkan aktivitas enzim atau menurunkan sebagian aktivitasnya (McPherson & Pincus, 2006).

Di dalam inhibisi nonkompetitif tidak terjadi persaingan antara substrat dengan inhibitor. Struktur inhibitor biasanya sedikit atau tidak mirip dengan substrat. Karena inhibitor dan substrat dapat berikatan di tempat yang berlainan, pembentukan enzim-inhibitor dan kompleks enzim-substrat (Murray et al., 2003).



[Sumber : Murray et al., 2003]

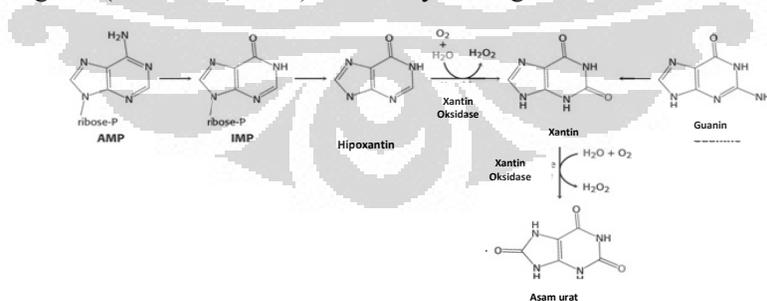
Gambar 2.5 Plot Lineweaver Burk untuk inhibisi nonkompetitif

2.4.5.3 Inhibisi Unkompetitif

Pada Inhibisi unkompetitif, inhibitor hanya berikatan dengan kompleks enzim-substrat, dan bukan dengan enzim bebas. Tidak ada kompleks inhibitor-enzim yang terbentuk (McPherson & Pincus, 2006).

2.5 Xantin Oksidase

Xantin oksidase merupakan enzim flavoprotein yang tersebar luas dan terdapat di dalam susu, usus halus, ginjal serta hati. Enzim ini mengandung molibdenum dan mempunyai peranan penting dalam konversi basa purin menjadi asam urat (Murray et al., 2003). Xantin oksidase merupakan katalis oksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat, yang memiliki peran penting pada penyakit gout. (Cos et al., 1998). Reaksinya sebagai berikut :



[Sumber : Berg, Tymoczko & Stryer, 2002, telah diolah kembali]

Gambar 2.6. Katalisis hipoxantin menjadi xantin, yang kemudian menjadi asam urat oleh xantin oksidase.

2.6 Hiperurisemia dan Penyakit Gout

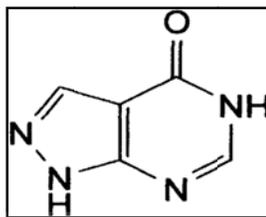
Hiperurisemia adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kadar asam urat serum di atas normal. Secara biokimiawi akan terjadi hipersaturasi, yaitu kelarutan asam urat di serum yang melewati ambang batasnya. Pada sebagian besar penelitian epidemiologi, disebut sebagai hiperurisemia jika kadar asam urat serum orang dewasa lebih dari 7,0 mg/dl dan lebih dari 6,0 mg/dl pada perempuan. Keadaan hiperurisemia akan beresiko timbulnya arthritis gout, nefropati gout atau batu ginjal (Hidayat, 2009)

Kadar asam urat dalam serum merupakan keseimbangan antara produksi dan sekresi. Ketika terjadi ketidakseimbangan dua proses tersebut maka terjadi keadaan hiperurisemia, yang menimbulkan hipersaturasi asam urat, yaitu kelarutan asam urat di serum yang melewati ambang batasnya, sehingga merangsang timbunan urat di berbagai tempat atau jaringan (Hidayat, 2009).

Penyakit asam urat atau sering disebut dengan penyakit arthritis gout merupakan kelainan metabolik akibat deposisi kristal natrium urat pada jaringan atau akibat supersaturasi asam urat di dalam cairan ekstra seluler. Natrium urat adalah kristal yang terbentuk akibat tingginya konsentrasi asam urat di dalam darah. Kristal natrium urat terkumpul pada persendian dan tulang rawan. Natrium urat sukar larut dalam air. Faktor yang mempengaruhi pembentukan natrium urat adalah pH, suhu, kekuatan ionik, dan konsentrasi Na^+ (Rinaudo & Boistelle, 1982).

Pengobatan dan pencegahan asam urat bisa dilakukan dengan menghambat proses sintesis asam urat melalui pemberian alopurinol dan menghambat masuknya leukosit ke dalam sendi yang terkena deposit asam urat dengan kolkisin, atau dengan pemberian obat AINS (anti-inflamasi nonsteroid) (Johnstone, 2005).

2.7 Alopurinol



[Sumber : British Pharmacopeia, 2007]

Gambar 2.7 Struktur kimia alopurinol

Alopurinol mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101% $C_5H_4N_4O$ dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan. Pemerian Alopurinol berupa serbuk halus putih hingga hampir putih; berbau lemah. Alopurinol sangat sukar larut dalam air dan etanol, larut dalam larutan kalium dan natrium hidroksida; praktis tidak larut dalam kloroform dan dalam eter (Depkes, 1995).

Alopurinol berguna untuk mengobati penyakit gout karena menurunkan kadar asam urat. Obat ini bekerja dengan menghambat xantin oksidase, enzim yang mengkatalisis perubahan hipoxantin menjadi xantin dan selanjutnya menjadi asam urat (Wilmana, 2007). Alopurinol hampir 80% diabsorpsi setelah pemberian per oral. Seperti asam urat, alopurinol dimetabolisme sendiri oleh xantin oksidase. Senyawa hasilnya, aloxantin mempertahankan kemampuan menghambat xantin oksidase dan mempunyai masa kerja yang cukup lama, sehingga alopurinol cukup diberikan hanya sekali sehari (Katzung, 1995).

Efek samping yang sering terjadi adalah reaksi kulit. Reaksi alergi berupa demam, menggigil, leukopenia atau leukositosis, eosinifilia, artralgia dan pruritus juga pernah dilaporkan. Gangguan saluran pencernaan cerna kadang-kadang juga dapat terjadi (Wilmana, 2007).

2.8 Golongan Senyawa Fitokimia

2.8.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai gabungan dari sistem siklik. Alkaloid biasanya tanpa warna, sering kali bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotin) pada suhu kamar (Harborne, 1987).

2.8.2 Tanin

Tanin terdapat secara luas dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus di dalam jaringan kayu. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air. Dalam industri, tanin adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mampu mengubah kulit hewan yang mentah menjadi kulit siap pakai karena kemampuannya menyambung silang protein.

Secara kimia, terdapat dua jenis utama tanin., yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi hampir terdapat semesta di dalam paku-pakuan dan gimnospermae, serta tersebar luas dalam angiospermae, terutama pada tumbuhan berkayu. Sedangkan tanin terhidrolisis penyebarannya terbatas pada tumbuhan berkeping dua (Harborne, 1987).

2.8.3 Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa hasil biosintesis dari satuan fenilpropana (C₆-C₃), diperoleh melalui asam shikimat dan fenilalanin dan unit C₆ tiga molekul malonyl-CoA (Barnes, Anderson, & Philipson, 2007). Terdapat sepuluh golongan flavonoid, yaitu antosianin, proantosianidin, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavonil, khalkon dan auron, flavanon dan isoflavon. Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air, mengandung sistem senyawa aromatik yang terkonyugasi dan karena itu menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak (Harborne, 1987).

2.8.4 Terpenoid

Terpenoid merupakan senyawa yang berasal dari molekul isoprena $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$. Dan kerangka karbonnya dibangun oleh dua penyambungan dua atau lebih satuan isoprena. Terpenoid terdiri atas beberapasenyawa, mulai dari komponen minyak atsiri, yaitu monoterpena dan seskuiterpena yang mudah menguap, diterpena yang lebih sukar menguap, sampai ke senyawa yang tidak menguap, yaitu triterpenoid dan sterol serta pigmen karotenoid (Harborne, 1987).

2.8.5 Glikosida

Glikosida terdiri dari dua komponen, bagian aglikon (non-gula) dan bagian gula. Bagian aglikon dapat berupa beberapa jenis metabolit sekunder, termasuk kumarin, flavonoid (misalnya Rutin dari buchu), atau hidroksiantrasena (misalnya cascaroside Dari Cascara). Bagian gula berhubungan dengan aglikon dengan ikatan karbon karbon-langsung (C-glikosida), atau melalui ikatan dari karbon oksigen (O-glukosida) (Barnes, Anderson, & Philipson, 2007).

2.8.6 Kuinon

Kuinon adalah senyawa berwarna dan mempunyai kromofor dasar seperti kromofor pada benzokuinon, yang terdiri atas dua gugus karbonil, yang berkonyugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbon. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dapat dipilah menjadi empat kelompok, yaitu benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon, dan kuinon isoprenoid. Tiga kelompok pertama biasanya terhidroksilasi dan bersifat senyawa fenol serta mungkin terdapat in vivo dalam bentuk gabungan dengan gula sebagai glikosida atau dalam bentuk kuinol tanpa warna, kadang-kadang juga bentuk dimer. Dalam hal demikian, diperlukan hidrolisis asam untuk melepaskan kuinon bebasnya (Harborne 1987).

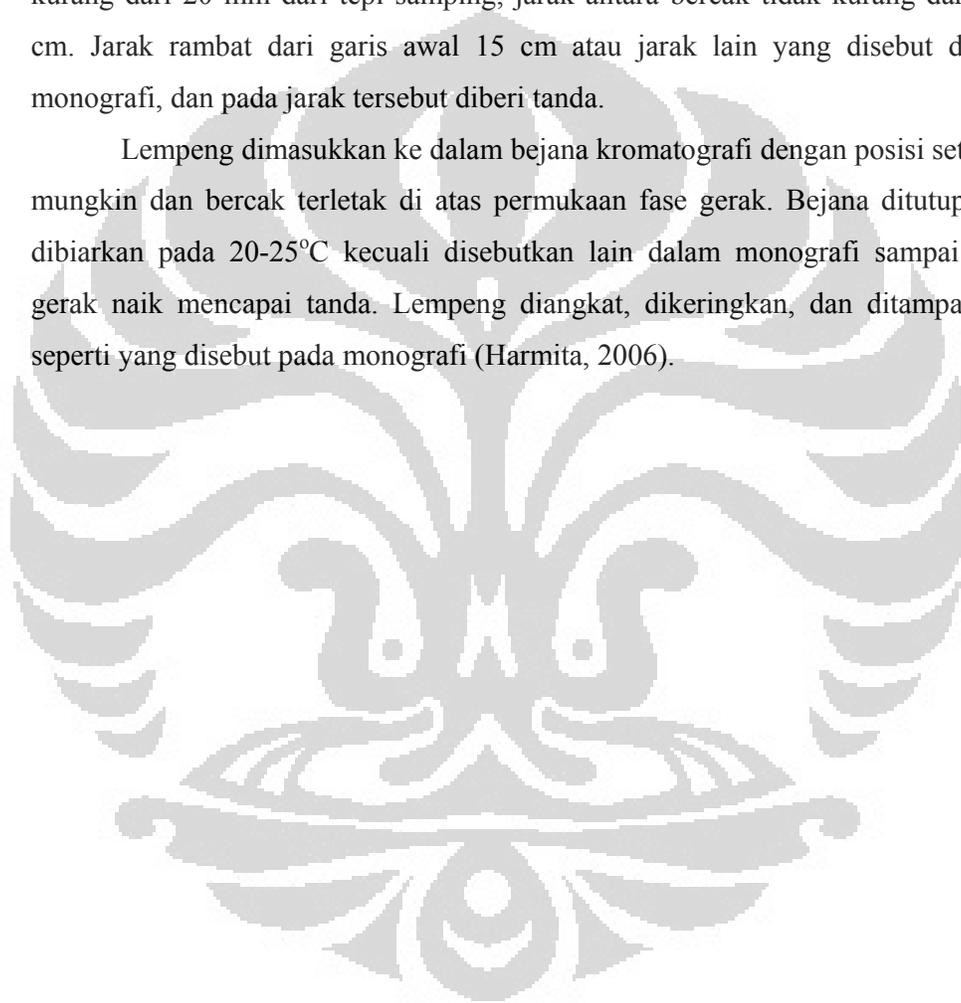
2.9 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi (p;embagian) atau penggabungannya. Lempeng tipis yang terdiri dari butir penyerap atau pendukung dilapiskan pada

lempeng kaca, logam, dan lain-lain. Untuk mendapatkan kondisi jenuh bejana kromatografi, dinding bejana dilapisi dengan lembaran kertas saring basah dan dalam bejana terdapat fase gerak setinggi 5-10 mm. Bejana ditutup dan dibiarkan.

Larutan yang akan diperiksa ditotolkan dalam bentuk bercak bundar dengan garis tengah 2-6 mm atau dalam bentuk pita 20 mm x 2-6 mm (kecuali disebutkan lain), pada garis sejajar dengan dan 20 mm dari tepi bawah, tidak kurang dari 20 mm dari tepi samping, jarak antara bercak tidak kurang dari 1,5 cm. Jarak rambat dari garis awal 15 cm atau jarak lain yang disebut dalam monografi, dan pada jarak tersebut diberi tanda.

Lempeng dimasukkan ke dalam bejana kromatografi dengan posisi setegak mungkin dan bercak terletak di atas permukaan fase gerak. Bejana ditutup dan dibiarkan pada 20-25°C kecuali disebutkan lain dalam monografi sampai fase gerak naik mencapai tanda. Lempeng diangkat, dikeringkan, dan ditampakkan seperti yang disebut pada monografi (Harmita, 2006).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia Depok. Penelitian dilakukan pada bulan Agustus sampai dengan bulan Desember 2011.

3.2 Bahan Uji

Pada penelitian ini bahan yang digunakan adalah bagian akar dari tanaman *Acalypha indica* L. yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik dan telah dideterminasi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Cibinong, Bogor.

3.3 Bahan Kimia

Etanol, petroleum eter, etil asetat, butanol, air suling demineral (Bratachem), lempeng kromatografi lapis tipis silica gel 60 F₂₄₅ (Merck, Jerman), Alopurinol yang berasal dari Pyridam Farma, xantin (Sigma Aldrich), xantin oksidase (Sigma Aldrich), dimetil sulfoksida (Merck, Jerman), HCl, natrium sulfat anhidrat (Merck, Jerman), asam sulfat P, asam asetat anhidrat, serbuk seng (Merck, Jerman), serbuk magnesium (Merck, Jerman), natrium karbonat (Merck, Jerman), kalium dihidrogen fosfat (Analar), NaCl, benzen (Merck, Jerman).

3.4 Alat

Mechanical shaker, *freezer* (Sanyo), termometer, pipet volume, pipet mikro 100-1000 μ l (Eppendorf) dan 10-100 μ l (Thermo), inkubator, spektrofotometer UV Vis (PG Instruments Ltd. T80), kuvet kuarsa (Quartz cell) penguap putar vakum (Janke & Kunkel IKA), pHmeter (Eutech pH-510), bejana kromatografi, vortex mixer (Health), timbangan digital (And), penangas air (Imperial IV) dan alat gelas lainnya.

3.5 Pembuatan Pelarut dan Larutan untuk Reaksi

3.5.1 Pelarut Untuk Ekstraksi (Pembuatan Etanol 80%)

Etanol 96% sebanyak 833 mL ditambahkan air suling sampai dengan 1000 mL. Setelah itu diuji konsentrasinya menggunakan alkoholmeter sampai diperoleh dicapai konsentrasi etanol sebesar 80%.

3.5.2 Larutan Untuk Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

3.5.2.1 Pembuatan Dapar Fosfat 0,05 M pH 7,5

Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) sebanyak 0,6805 gram dilarutkan dalam 60 mL air suling demineral bebas CO_2 , kemudian tambahkan dengan larutan NaOH 2 N sebanyak 1,8 mL, kemudian encerkan sampai dengan 100 mL. Cek pH menggunakan pHmeter kemudian adjust pH dengan NaOH 0,2 N atau HCl 0,2 N sampai dengan pH 7,5.

3.5.2.2 Pembuatan Dapar Fosfat 0,05 M pH 7,8

Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) ditimbang sebanyak 1,3609 gram lalu dilarutkan dalam 200 mL air suling demineral bebas CO_2 . Dapar fosfat dibuat dengan mencampur 25 mL kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) 0,05 M dengan 22,25 mL NaOH 0,2 N dan diencerkan dengan air suling demineral bebas CO_2 secukupnya hingga 100,0 mL. Cek pH menggunakan pHmeter kemudian adjust pH dengan NaOH 0,2 N atau HCl 0,2 N sampai dengan pH 7,8.

3.5.2.3 Pembuatan Dapar Fosfat 0,05 M pH 8

Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) ditimbang sebanyak 1,3609 gram lalu dilarutkan dalam 200 mL air suling demineral bebas CO_2 . Dapar fosfat dibuat dengan mencampur 25 mL kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) 0,05 M dengan 23,05 mL NaOH 0,2 N dan diencerkan dengan air suling demineral bebas CO_2 secukupnya hingga 100,0 mL. Cek pH menggunakan pHmeter kemudian adjust pH dengan NaOH 0,2 N atau HCl 0,2 N sampai dengan pH 8.

3.5.2.4 Pembuatan Dapar Fosfat 0,05 M pH 8,3

Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) ditimbang sebanyak 1,3609 gram lalu dilarutkan dalam 200 mL air suling demineral bebas CO_2 . Dapar fosfat dibuat dengan mencampur 25 mL kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) 0,05 M dengan 25 mL NaOH 0,2 N dan diencerkan dengan air suling demineral bebas CO_2 secukupnya hingga 100,0 mL. Cek pH menggunakan pHmeter kemudian adjust pH dengan NaOH 0,2 N atau HCl 0,2 N sampai dengan pH 8,3.

3.5.2.5 Pembuatan Dapar Fosfat 0,05 M pH 8,5

Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) ditimbang sebanyak 1,3609 gram lalu dilarutkan dalam 200 mL air suling demineral bebas CO_2 . Dapar fosfat dibuat dengan mencampur 25 mL kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) 0,05 M dengan 26,5 mL NaOH 0,2 N dan diencerkan dengan air suling demineral bebas CO_2 secukupnya hingga 100,0 mL. Cek pH menggunakan pHmeter kemudian adjust pH dengan NaOH 0,2 N atau HCl 0,2 N sampai dengan pH 8,5.

3.5.2.6 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Akar *Acalypha indica* L.

Ekstrak kental sebanyak 10 mg ditambahkan 5 tetes DMSO hingga larut kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Setelah itu diencerkan dengan air suling demineral bebas CO_2 sampai batas dan diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan uji dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga diperoleh konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$.

3.5.2.7 Pembuatan Larutan Xantin

Sebanyak 15,21 mg xantin ditimbang dan ditambahkan dengan lima tetes NaOH 1 M hingga larut, setelah itu diencerkan dengan air suling demineral bebas CO_2 sampai dengan 100 mL (konsentrasi 1 mM). Larutan xantin dibuat dengan mengencerkan larutan induk sampai diperoleh larutan xantin dengan konsentrasi 0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM dan 0,25 mM.

3.5.2.8 Pembuatan Larutan Standar Alopurinol

Standar alopurinol sebanyak 10 mg ditambahkan NaOH 1 N beberapa tetes hingga larut lalu diencerkan dengan air suling demineral bebas CO₂ di dalam labu ukur 100,0 mL, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas dan diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Larutan standar alopurinol dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga diperoleh larutan standar alopurinol dengan konsentrasi 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50 dan 100 µg/mL.

3.5.2.9 Pembuatan Larutan Xantin Oksidase

Perhitungan yang diperoleh dari keterangan pada label kemasan xantin oksidase diperoleh : 1 mg protein ~ 7,27 mg solid ~ 0,8 unit. Konsentrasi larutan enzim yang dibuat adalah 0,1 unit/mL. Ditimbang 9,09 mg xantin oksidase, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur dan dilarutkan ke dalam dapar fosfat sampai dengan 10,0 mL.

3.5.3 Pereaksi Untuk Identifikasi Golongan Senyawa

3.5.3.1 Pereaksi Bouchardat

Larutan pereaksi Bouchardat dibuat dari campuran iodium dan kalium iodida. Sebanyak 2 g iodium P dan 4 g kalium iodida P dilarutkan dalam 100 mL air suling.

3.5.3.2 Pereaksi Mayer

Pereaksi Mayer dibuat dari campuran larutan raksa (II) klorida P 2,266% b/v dan kalium iodida P 50% b/v . Larutan raksa (II) klorida dibuat dengan cara 1,3596 g raksa (II) klorida P dilarutkan dalam 60 mL air suling dan larutan kalium iodida dibuat dengan cara 5 g kalium iodida P dilarutkan dalam 10 mL air suling. Kedua larutan dicampur dan dicukupkan dengan air suling hingga 100 mL.

3.5.3.3 Pereaksi Dragendorff

Pereaksi Dragendorff dibuat dari campuran bismuth nitrat P 40% b/v dalam asam nitrat dan kalium iodida P 54,4% b/v . Larutan bismuth nitrat dibuat dengan cara 8 g bismuth nitrat P dilarutkan dalam 20 mL asam nitrat dan larutan

kalium iodida dibuat dengan cara 27,2 g kalium iodida P dilarutkan dalam 50 mL air suling. Kedua larutan dicampur, dan didiamkan hingga memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan dicukupkan dengan air suling hingga 100 mL.

3.5.3.4 Pereaksi Molisch

Pereaksi Molisch merupakan larutan α -naftol P 3% b/v dalam asam nitrat 0,5 N. Pembuatan dilakukan dengan cara 1,5 g α -naftol P dilarutkan dalam 50 mL asam nitrat 0,5 N.

3.6 Cara Kerja

3.6.1 Penyiapan Bahan

Pertama-tama bagian akar tanaman *Acalypha indica* L. dikumpulkan. Selanjutnya dilakukan sortasi basah dengan memisahkan kotoran atau tanah yang masih menempel pada bagian akar tanaman, pencucian untuk membersihkan kotoran yang masih menempel pada akar tanaman yang telah disortasi basah, perajangan untuk memperkecil ukuran akar sehingga mempermudah proses pengeringan dan penggilingan. Pengeringan dilakukan di bawah paparan sinar matahari di dalam tampah yang ditutup kain hitam pada pukul 08.00-11.00 dan ditempatkan di tempat yang teduh dan diangin-anginkan. Setelah pengeringan, bagian akar tanaman *Acalypha indica* L. dihaluskan menggunakan penggiling.

3.6.2 Ekstraksi

Serbuk akar *Acalypha indica* L. ditimbang sebanyak 1,005 kg dan dimasukkan ke dalam bejana maserasi, masing-masing 600 gram dan 405 gram. kemudian ditambahkan etanol 80% dengan volume 3 liter dan 2 liter. Setelah itu dikocok menggunakan *mechanical shaker* selama 6 jam dan dibiarkan di dalam bejana maserasi selama 10 jam pada suhu ruangan. Jumlah etanol 80% yang digunakan pada maserasi adalah 19 liter. Larutan penyari dipisahkan dengan serbuk ampas menggunakan kertas saring dan ditampung di dalam wadah penampung. Proses yang sama diulangi sampai diperoleh larutan penyari etanol 80% menjadi hampir tidak berwarna. Seluruh larutan penyari dikumpulkan dan dipekatan dengan penguap putar vakum pada suhu 50 °C, kemudian diuapkan di

atas penangas air pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental (ekstrak tidak dapat mengalir). Ekstrak yang diperoleh kemudian ditimbang untuk mengetahui rendemen yang dihasilkan.

3.6.3 Fraksinasi Ekstrak

Fraksinasi ekstrak dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Ekstrak etanol 80% sebanyak 70 gram didispersikan terlebih dahulu menggunakan air suling panas sebanyak 200 mL kemudian difraksinasi dengan petroleum eter sebanyak 200 mL. Jumlah petroleum eter yang digunakan adalah 1 liter dan fraksinasi dilakukan sebanyak lima kali hingga lapisan petroleum eter hampir tidak berwarna. Lapisan petroleum eter dipisahkan dari lapisan air dan diuapkan diatas penangas air dengan suhu 50°C hingga kental (ekstrak tidak dapat mengalir). Ekstrak kental hasil fraksinasi menggunakan petroleum eter kemudian disebut dengan fraksi petroleum eter.

Lapisan air difraksinasi dengan etil asetat sebanyak 200 mL. Jumlah etil asetat yang digunakan pada fraksinasi adalah 2,6 liter. Fraksinasi dilakukan sebanyak tiga belas kali hingga terekstraksi sempurna dan lapisan etil asetat hampir tidak berwarna. Lapisan etil asetat dipisahkan dan diuapkan diatas penangas air dengan suhu 50°C hingga kental (ekstrak tidak dapat mengalir). Ekstrak kental hasil fraksinasi menggunakan etil asetat kemudian disebut dengan fraksi etil asetat.

Fraksinasi kemudian dilanjutkan dengan pemberian butanol sebanyak 200 mL. Jumlah butanol yang digunakan pada fraksinasi adalah sebanyak 2,8 liter. Fraksinasi dilakukan sebanyak empat belas kali hingga terekstraksi sempurna dan lapisan butanol hampir tidak berwarna. Lapisan butanol dipisahkan dari lapisan air dan diuapkan diatas penangas air dengan suhu 50°C hingga kental (ekstrak tidak dapat mengalir). Ekstrak kental hasil fraksinasi menggunakan butanol kemudian disebut dengan fraksi butanol.

Lapisan air yang tidak bercampur dengan butanol kemudian diuapkan diuapkan diatas penangas air dengan suhu 50°C hingga kental (ekstrak tidak dapat mengalir). Ekstrak kental yang berasal dari lapisan air kemudian disebut dengan fraksi air.

3.6.4 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

Pada uji penghambatan aktivitas xantin oksidase digunakan metode yang digunakan oleh Umamaheswari (2009) dan Owen & Jhones (1999). Penghambatan aktivitas xantin oksidase diuji dengan spektrofotometri dengan mengukur jumlah asam urat yang terbentuk.

3.6.4.1 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebelum dilakukan optimasi suhu, pH dan konsentrasi substrat optimum, terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum untuk menentukan panjang gelombang pengukuran yang digunakan pada pengujian selanjutnya. Pada penentuan panjang gelombang maksimum digunakan pH dan 7,5 dan suhu 25°C yang terdapat pada prosedur pengerjaan yang berasal dari Sigma (Sigma Aldrich, 1994).

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,5 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,15 mM kemudian dilakukan prainkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Campuran diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer untuk memperoleh panjang gelombang maksimum pengukuran. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 284 nm dan digunakan pada pengukuran selanjutnya.

b. Suhu Optimum

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,5 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,15 kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu 20, 25, 30, 35 dan 40°C selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan

menggunakan vortex mixer. Campuran diinkubasi pada suhu 20, 25, 30, 35 dan 40 °C selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 284 nm.

a. Penentuan pH Optimum

Larutan dapar fosfat 0,05 M pada pH 7,5, pH 7,8, pH 8, pH 8,3 dan pH 8,5 sebanyak 2,9 mL, masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,15 mM dan dilakukan prainkubasi pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Campuran diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 284 nm.

b. Penentuan Konsentrasi Substrat Xantin Optimum

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH optimum sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 dan 0,2 mM kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Campuran diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 284 nm.

c. Perhitungan Aktivitas Enzim

Kondisi optimum dapat ditentukan dengan menentukan aktivitas enzim yang dihitung dengan menggunakan :

$$\text{Aktivitas} = \frac{(\text{Serapan blangko} - \text{serapan kontrol blangko}) \times \text{vol} \times \text{df}}{12,2 \times 0,1} \quad (3.1)$$

Keterangan vol : Total volume saat pengujian
 df : faktor pengenceran
 12,2 : Koefisien asam urat (mM)
 0,1 : Volume xantin oksidase yang digunakan

Satu unit xantin oksidase akan mengkonversi 1,0 μmol xantin menjadi asam urat per menit (Sigma Aldrich, 1994).

3.6.4.2 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

a. Pengujian Sampel

Ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, fraksi etil asetat, fraksi butanol dan fraksi air diukur penghambatannya terhadap aktivitas xantin oksidase. Pengujian dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer di bawah kondisi aerob. Larutan uji sebanyak 1 mL (konsentrasi 10,20,50 dan 100 $\mu\text{g/mL}$) dtambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan 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 HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer.

b. Pengujian Kontrol Sampel

Larutan uji sebanyak 1 mL (konsentrasi 10,20,50 dan 100 $\mu\text{g/mL}$) ditambahkan 3,0 mL dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum. Larutan dilakukan prainkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan larutan HCL 1 N. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai

Universitas Indonesia

larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 284 nm.

c. Pengujian Standar

Larutan standar alopurinol sebanyak 1 mL (konsentrasi 0,1 ; 0,25 ; 0,5 dan 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dtambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum, kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan 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 HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer.

d. Pengujian Kontrol Standar

Larutan standar alopurinol sebanyak 1 mL (konsentrasi 0,1 ; 0,25 ; 0,5 dan 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dtambahkan 3,0 mL dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum. Larutan dilakukan prainkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan larutan HCL 1 N . Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai, larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 284 nm.

e. Pengujian Blanko

Dapar fosfat 0,05 M pH optimum sebanyak 2,9 mL dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan 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 HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer.

f. Pengujian Kontrol Blanko

Dapar fosfat 0,05 M pH optimum sebanyak 3,0 mL dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum. Larutan dilakukan prainkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan larutan HCL 1 N. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 284 nm.

Tabel 3.1. Reagen dan volume yang dibutuhkan pada uji penghambatan aktivitas xantin oksidase

Reagen	Volume			
	Blanko (A ₁)	Kontrol Blanko (A ₂)	Sampel (B ₁)	Kontrol Sampel (B ₂)
Sampel ekstrak(inhibitor)	-	-	1 mL	1 mL
Dapar	2,9 mL	3,0 mL	2,9 mL	3,0 mL
Substrat Xantin	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Pra inkubasi (suhu optimum)	10 menit			
Enzim	0,1 mL	-	0,1 mL	-
HCl 1 N	-	1 mL	-	1 mL
Inkubasi (suhu optimum)	30 menit			
HCl 1N	1 mL	-	1 mL	
Serapan diukur menggunakan spektrofotometer λ 284 nm				

3.6.4.3 Perhitungan Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase (IC₅₀)

$$\% \text{ inhibisi} = \left(1 - \frac{B}{A}\right) \times 100\% \quad (3.2)$$

Dimana A : Perubahan absorbansi larutan uji tanpa ekstrak akar *A.indica*

Blanko (abs dengan enzim) – Kontrol blanko (abs tanpa enzim)

B : Perubahan absorbansi larutan uji dengan ekstrak akar *A. Indica*

Sampel (abs dengan enzim) – Kontrol sampel (abs tanpa enzim)

Sebagai kontrol positif digunakan Alopurinol dengan konsentrasi 0,1; 0,25; 0,5 dan 1 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan rumus persamaan

regresi : $y = a + bx$. Sebagai variabel x adalah konsentrasi sampel dan sebagai variabel y adalah % inhibisi.

3. 6.5 Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim

Uji kinetika dilakukan dengan menggunakan beberapa konsentrasi xantin sebagai substrat. Kinetika penghambatan enzim dilakukan pada fraksi aktif yang memiliki IC_{50} terbaik. Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten. Tetapan kinetika Michaelis-Menten (K_m) dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + b x$, dimana x adalah konsentrasi substrat $[S]$ dan y adalah absorbansi sampel (Murray et al., 2003).

3.6.6 Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi Aktif

Ekstrak yang memiliki aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase pada fraksi aktif kemudian diidentifikasi golongan senyawa yang terkandung didalamnya. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang memiliki aktivitas sebagai penghambat enzim xantin oksidase. Identifikasi tersebut meliputi identifikasi alkaloid, glikosida, saponin, flavonoid, tanin dan antrakuinon.

3.6.6.1 Identifikasi Alkaloid (Depkes RI, 1995)

Ekstrak sejumlah 500 mg dilarutkan dengan 10 mL campuran air suling dan HCl 2N (9:1), kemudian panaskan selama 2 menit. Selanjutnya disaring dan 1 mL filtrat digunakan sebagai larutan percobaan yang selanjutnya dilakukan sebagai berikut :

- a. Tambahkan 2 tetes Bouchardat LP. Hasil positif dengan terbentuk endapan coklat hitam.
- b. Tambahkan 2 tetes Mayer LP. Hasil positif dengan terbentuk endapan putih
- c. Tambahkan 2 tetes Dragendorff LP. Hasil positif terbentuk endapan jingga coklat.
- d. Tambahkan 2 tetes larutan Iodii. Hasil positif dengan terbentuk endapan coklat.

3.6.6.2 Identifikasi Glikosida (Depkes RI, 1995)

Pembuatan larutan percobaan dengan menambahkan 15 mL HCl 10% pada sejumlah 300 mg ekstrak. Selanjutnya dipanaskan hingga mendidih, dinginkan kemudian saring. Cuci filtrat dengan 10 mL eter lakukan sebanyak 3 kali. Kemudian kumpulkan filtrat dan uapkan, tambahkan natrium sulfat anhidrat, saring dan uapkan. Tambahkan 2 mL metanol P dan larutan ini digunakan sebagai larutan percobaan.

- a. Larutan percobaan sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya ditambahkan 20 tetes asam asetat anhidrat P dan 1 tetes asam sulfat P. Hasil positif terbentuknya warna biru atau hijau.
- b. Larutan percobaan sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya dilarutkan dengan 2 mL air dan 5 tetes Molisch LP. Kemudian ditambahkan dengan hati-hati 2 mL asam sulfat P. Hasil positif terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan

3.6.6.3 Identifikasi Saponin (Depkes RI, 1995)

Ekstrak seberat 500 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL air suling panas, dinginkan, kocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 19 cm, pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N, buih tidak hilang.

3.6.6.4 Identifikasi Flavonoid (Depkes RI, 1995)

- a. Sejumlah 500 mg ekstrak dilarutkan dalam 1-2 mL etanol (95%), kemudian ditambahkan 0,5 gram serbuk seng P dan 2 mL asam klorida 2 N dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian tambahkan 10 tetes asam klorida pekat P, jika dalam waktu 2 sampai 5 menit terjadi warna merah intensif, menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol).
- b. Sejumlah 500 mg ekstrak dilarutkan dalam 1 mL etanol (95%) P. kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium P dan 10 tetes asam klorida pekat. Jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya

flavonoid. Jika warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron.

3.6.6.5 Identifikasi Tanin (Farnsworth, 1966)

Sejumlah 200 mg ekstrak kental dilarutkan dalam 5 mL air suling panas dan diaduk. Setelah dingin disentrifugasi dan bagian cairan didekantir dan diberi larutan NaCl 10% kemudian disaring. Filtrat sebanyak masing-masing 1 mL dikerjakan sebagai berikut :

- a. Ditambahkan 3 mL larutan gelatin 10% dan diperhatikan adanya endapan.
- b. Ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 3% dan diperhatikan terjadinya perubahan warna menjadi hijau violet.
- c. Ditambahkan 3 mL larutan NaCl-gelatin (larutan gelatin 1% dalam larutan NaCl 10%) dan diperhatikan adanya endapan.

3.6.6.6 Identifikasi Terpen (Farnsworth, 1966)

Sejumlah 200 mg ekstrak kental ditambahkan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1). Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna merah hijau atau hijau biru.

3.6.6.7 Identifikasi Antrakuinon (Depkes RI,1995)

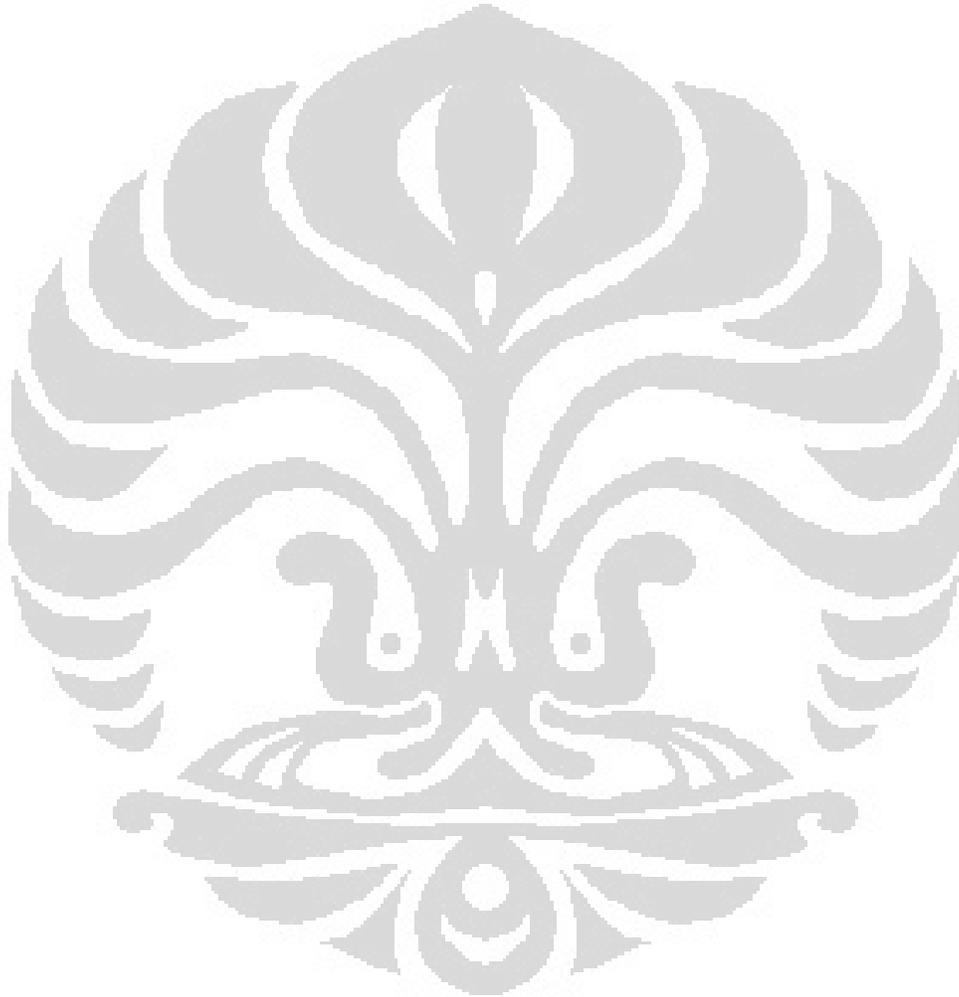
Sejumlah 200 mg ekstrak dilarutkan dengan 5 mL asam sulfat 2 N, panaskan sebentar kemudian dinginkan. Tambahkan 10 mL benzen P, kocok, diamkan. Pisahkan lapisan benzen, saring, filtrat berwarna kuning menunjukkan adanya antrakuinon. Kocok lapisan benzen dengan 1 mL sampai 2 mL natrium hidroksida 2 N, diamkan, lapisan air berwarna merah intensif dan lapisan benzen tidak berwarna.

3.6.7 Identifikasi Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis pada Fraksi Teraktif

Fraksi ekstrak yang paling aktif terhadap penghambatan aktivitas xantin oksidase ditegaskan kembali identifikasinya menggunakan kromatografi lapis tipis. Pengembang yang digunakan adalah kloroform-metanol dengan perbandingan 8 : 3 dan 4 : 1. Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan

menggunakan lempeng silika gel 60 F₂₅₄ dengan jarak rambat 5 cm. Kromatografi lapis tipis yang telah dielusi diidentifikasi menggunakan pereaksi semprot Dragendroff untuk mengidentifikasi adanya golongan senyawa alkaloid dan pereaksi semprot AlCl₃ untuk mengidentifikasi adanya golongan senyawa flavonoid. Bercak yang diperoleh kemudian dihitung nilai Rfnya.

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh zat}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh eluen}} \quad (3.3)$$



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Bahan

Simplisia yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian akar dari tanaman *Acalypha indica* L. yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik dan dideterminasi oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (Lampiran 5). Tanaman *Acalypha indica* L. yang digunakan adalah tanaman yang sedang berbunga, kemudian diambil bagian akarnya, kemudian disortasi basah untuk memisahkan kotoran setelah itu dilakukan pencucian. Bagian akar tanaman dilakukan perajangan untuk memperkecil ukuran. Pengeringan dilakukan di bawah paparan sinar matahari di dalam tampah yang ditutupi kain hitam pada pukul delapan sampai dengan pukul sebelas pagi, setelah itu diangin-anginkan di pada tempat yang teduh. Setelah pengeringan, akar tanaman dijadikan serbuk menggunakan mesin penggiling sehingga luas permukaan simplisia menjadi lebih besar agar kandungan kimia yang dapat diekstraksi menjadi lebih banyak. Tanaman dan simplisia akar *Acalypha indica* L. dapat dilihat pada Gambar 4.5 dan 4.6.

4.2 Ekstraksi Simplisia

Ekstraksi serbuk simplisia dilakukan dengan cara dingin, yaitu dengan cara maserasi untuk menghindari pemanasan yang berlebihan agar kandungan senyawa yang terdapat pada akar tanaman *Acalypha indica* L tidak rusak. Selain itu keuntungan dari maserasi adalah menggunakan peralatan sederhana, namun memiliki kerugian berupa penggunaan banyak pelarut dan memerlukan waktu yang lama.

Banyaknya serbuk simplisia *Acalypha indica* L. yang diekstraksi adalah 1,005 kg dan pelarut yang digunakan pada maserasi adalah etanol 80% sebanyak 19 liter. Serbuk simplisia dibagi menjadi dua bagian kemudian dimasukkan ke dalam botol coklat. Maserasi dilakukan selama 6 jam dengan menggoyangkan botol coklat menggunakan *mechanical shaker*, setelah itu didiamkan selama 10

jam, agar kandungan senyawa pada serbuk simplisia dapat terekstraksi sempurna. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dengan ampas menggunakan penyaringan, kemudian ampas ditambahkan pelarut dan proses maserasi diulangi kembali sampai larutan hasil maserasi hampir tidak berwarna. Proses maserasi dilakukan sebanyak sembilan kali. Larutan hasil maserasi dikumpulkan dan diuapkan menggunakan penguap putar vakum (Gambar 4.12), setelah itu dipekatkan di atas penangas air hingga kental sampai dengan ekstrak tidak dapat mengalir. Ekstrak kental etanol 80% diperoleh sebanyak 77,29 gram dengan rendemen 7,69%.

4.3 Fraksinasi

Ekstrak kental etanol 80% yang telah diperoleh kemudian difraksinasi menggunakan pelarut yang masing-masing berbeda kepolarannya. Fraksinasi dilakukan dengan pelarut yang bersifat non polar, kemudian disusul dengan pelarut yang bersifat semipolar, setelah itu menggunakan pelarut yang lebih polar. Pelarut yang digunakan pada fraksinasi secara berurutan adalah petroleum eter, etil asetat, dan butanol.

Sebelum dilakukan proses fraksinasi, ekstrak kental etanol 80% ditambahkan air suling panas sebanyak 200 mL kemudian diaduk hingga bercampur homogen. Tujuan penambahan ini adalah agar ekstrak etanol 80% dapat terdispersi di dalam air suling sehingga mempermudah distribusi senyawa berdasarkan kelarutannya yang terjadi selama fraksinasi.

Setelah didispersikan menggunakan air suling panas, ekstrak etanol 80% difraksinasi menggunakan petroleum eter sebanyak 200 mL di dalam corong pisah kemudian dilakukan pengocokan. Fraksinasi dilakukan sebanyak lima kali sampai dengan lapisan petroleum eter hampir tidak berwarna. Setelah kedua lapisan berpisah, lapisan air dipisahkan dengan lapisan petroleum eter. Hasil fraksinasi berupa larutan berwarna hijau dan dipekatkan di atas penangas air pada suhu 50°C sampai kental dan ekstrak tidak dapat mengalir.

Lapisan air yang telah dipisahkan dengan petroleum eter kemudian difraksinasi kembali menggunakan etil asetat sebanyak 200 mL. Fraksinasi dilakukan sebanyak tiga belas kali sampai dengan lapisan etil asetat hampir tidak berwarna. Setelah dilakukan pengocokan dan kedua lapisan terpisah, lapisan etil

asetat dipisahkan dengan lapisan air. Hasil fraksinasi berupa larutan yang berwarna kekuningan dan dipekatkan di atas penangas air pada suhu 50°C sampai kental dan ekstrak tidak dapat mengalir.

Lapisan air yang telah difraksinasi dengan etil asetat difraksinasi kembali menggunakan butanol di dalam corong pisah. Fraksinasi dilakukan sebanyak empat belas kali sampai dengan lapisan butanol hampir tidak berwarna. Setelah dilakukan pengocokan dan kedua lapisan terpisah, lapisan butanol dipisahkan dengan lapisan air. Baik lapisan air maupun lapisan butanol dipekatkan di atas penangas air hingga kental dan ekstrak tidak dapat mengalir. Masing-masing ekstrak kental yang diperoleh dan rendemennya dapat dilihat pada Tabel 4.5.

4.4 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

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 secara spektrofotometri pada panjang gelombang maksimum. Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase terdiri dari uji pendahuluan penghambatan aktivitas xantin oksidase dan pengujian sampel terhadap penghambatan aktivitas xantin oksidase.

4.4.1 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

Uji pendahuluan penghambatan aktivitas xantin oksidase bertujuan untuk menentukan kondisi optimum aktivitas enzim sehingga dapat berlangsung optimal. Pada uji pendahuluan ditentukan suhu yang akan digunakan pada saat pra inkubasi dan inkubasi, kondisi pH saat pengujian sampel, serta konsentrasi substrat yang akan digunakan pada saat pengujian. Pada uji pendahuluan, tidak dilakukan optimasi waktu inkubasi karena pada literatur waktu inkubasi yang digunakan pada pengujian adalah 30 menit (Cos et al., 1998; Owen & Jhones, 1995 ; Umamaheswari et al., 2009). Semakin besar serapan yang diperoleh, maka semakin banyak produk yang dihasilkan, sehingga aktivitas enzim menjadi semakin besar.

4.4.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk menentukan panjang gelombang pengukuran serapan pada pengujian selanjutnya, termasuk penentuan kondisi optimum dan uji sampel terhadap penghambatan aktivitas xantin oksidase. Panjang gelombang maksimum terdapat pada panjang gelombang 284 nm.

4.4.1.2 Penentuan Suhu Optimum

Pada penentuan suhu optimum, masing-masing larutan uji dilakukan prainkubasi dan inkubasi pada suhu 20, 25, 30, 35 dan 40°C. Prainkubasi dilakukan selama 10 menit di dalam inkubator dan bertujuan untuk menyesuaikan suhu larutan uji dengan suhu inkubasi, dimana enzim dapat bekerja dengan optimum. Setelah dilakukan pengukuran, kondisi optimum ditunjukkan pada suhu 30°C, dimana serapan dan aktivitas yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan pada suhu 20, 25, 30 dan 35°C. Suhu optimum yang diperoleh digunakan pada prainkubasi dan inkubasi pada saat pengujian sampel. Data serapan penentuan suhu optimum dapat dilihat pada Tabel 4.6.

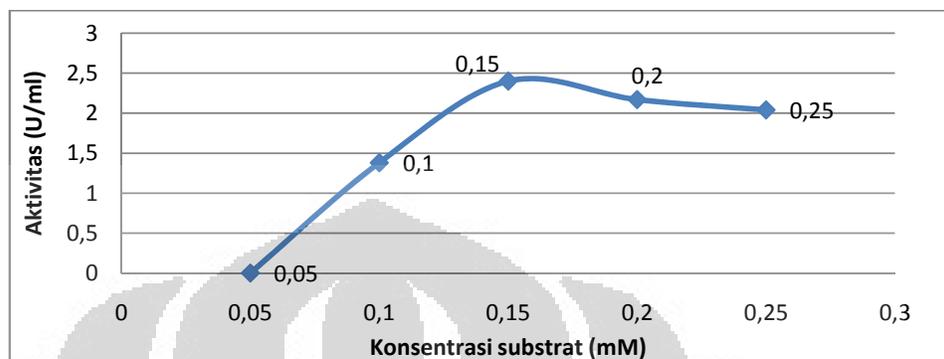
4.4.1.3 Penentuan pH Optimum

Pada uji optimasi pH, variasi yang digunakan adalah pada pH 7,5 ; 7,8; 8; 8,3 dan 8,5. Kondisi optimum ditunjukkan pada pH 7,8 dengan serapan dan nilai aktivitas yang lebih besar dibandingkan dengan pada pH 7,5 , pH 8, pH 8,3 dan pH 8,5. Nilai pH yang diperoleh pada uji pendahuluan akan digunakan pada saat pengujian selanjutnya, yaitu pada saat pengujian sampel. Data serapan penentuan pH optimum dapat dilihat pada Tabel 4.7.

4.4.1.4 Penentuan konsentrasi substrat Optimum

Uji konsentrasi substrat dilakukan untuk mengetahui konsentrasi substrat optimum yang sesuai dengan unit enzim yang digunakan. Substrat yang digunakan adalah xantin. Konsentrasi xantin pada penentuan konsentrasi substrat optimum adalah 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 dan 0,25 mM. Grafik serapan dan

konsentrasi substrat pada penentuan konsentrasi substrat optimum adalah sebagai berikut.



Gambar 4.1. Grafik penentuan konsentrasi substrat xantin pada 0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM dan 0,25 mM.

Berdasarkan hasil pengukuran secara spektrofotometri, serapan yang diperoleh akan meningkat seiring dengan kenaikan konsentrasi substrat, sehingga aktivitas enzim meningkat. Tetapi, serapan mencapai serapan maksimum pada konsentrasi xantin 0,15 mM dan mengalami penurunan ketika konsentrasi substrat 0,2 mM, sehingga aktivitas enzim optimum terdapat pada konsentrasi substrat 0,15 mM, yaitu sebesar 2,4 Unit/ml. Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan jumlah enzim-substrat. Namun, pada konsentrasi tertentu, ketika jumlah enzim-substrat sudah jenuh dan tidak ada lagi enzim bebas yang tersedia, peningkatan laju konsentrasi substrat tidak lagi meningkatkan laju pembentukan enzim-substrat (Murray et al., 2003).

Pada Gambar 4.1 setelah konsentrasi substrat optimum diperoleh, terjadi penurunan aktivitas pada konsentrasi substrat 0,2 mM dan terjadi penurunan kembali pada penambahan substrat dengan konsentrasi 0,25 mM. Penurunan aktivitas ini disebabkan oleh penghambatan aktivitas enzim oleh produk, yaitu asam urat. Penghambatan oleh produk tidak selalu konstan, tetapi penghambatannya dapat meningkat seiring dengan meningkatnya pembentukan produk (Bisswanger, 2002).

Data konsentrasi, serapan dan aktivitas yang diperoleh dari penentuan konsentrasi substrat optimum dapat dilihat pada Tabel 4.8 dan spektrum serapan dapat dilihat pada Gambar 4.7.

4.4.2 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase oleh Sampel

Pada uji penghambatan aktivitas xantin oksidase, dilakukan pengujian terhadap standar alopurinol dan sampel ekstrak akar *Acalypha indica* L. Berdasarkan hasil yang didapat dari uji pendahuluan, diperoleh bahwa kondisi optimum xantin oksidase adalah pada suhu 30°C, menggunakan dapar fosfat pH 7,8 dan konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,15 mM. Serapan diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 284 nm. Kondisi optimum yang telah diperoleh digunakan pada pengujian sampel.

4.4.2.1 Pengujian Standar Alopurinol

Pada penelitian ini, yang digunakan sebagai standar adalah alopurinol. Konsentrasi yang digunakan pada penghambatan aktivitas xantin oksidase adalah 7, 21, 35 dan 70 µg/mL yang diencerkan dari larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Persentase inhibisi yang diperoleh cukup besar, sehingga nilai IC₅₀ yang diperoleh menjadi negatif. Pengujian selanjutnya dilakukan penurunan konsentrasi menjadi 0,1; 0,25; 0,5 dan 1 µg/mL dan diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 0,018 µg/mL. Data serapan, persen inhibisi masing-masing serapan dapat dilihat pada Tabel 4.10.

Terdapat beberapa perbedaan pada nilai IC₅₀ Alopurinol pada penelitian yang telah dilakukan. Nilai IC₅₀ tersebut adalah 24,4 µM (Kong, Zhang, Pan, Tan & Cheng, 2000); 30,7 µM (Kazuya et al., 2009), 6,75 µg/mL (Umamaheswari et al., 2007). Kemungkinan penyebabnya adalah perbedaan perhitungan satuan konsentrasi, variasi konsentrasi pengujian dan asal standar tersebut.

4.4.2.2 Pengujian Sampel

Pengujian sampel terdiri dari pengukuran penghambatan ekstrak terhadap aktivitas xantin oksidase, pengukuran kontrol sampel, blangko, dan kontrol blangko yang dilakukan secara spektrofotometri. Pengukuran kontrol sampel

dilakukan sebagai faktor koreksi apabila ekstrak yang diuji memberikan serapan yang dihasilkan pada panjang gelombang maksimum pengukuran.

Ekstrak etanol 80% dan masing-masing ekstrak yang dihasilkan dari fraksinasi diukur penghambatannya terhadap aktivitas xantin oksidase. Ekstrak tersebut adalah fraksi petroleum eter, fraksi etil asetat, fraksi butanol dan fraksi air. Masing-masing ekstrak kental ditimbang 10 mg dan ditambahkan satu hingga lima tetes DMSO hingga larut dan dicukupkan volumenya menggunakan air suling demineral bebas CO₂ sebanyak 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 1000 µg/mL. Penggunaan DMSO sampai dengan 5% pada konsentrasi akhir tidak mengganggu pengukuran penghambatan aktivitas xantin oksidase (Kong et al.,2000).

Masing-masing fraksi ekstrak dibuat konsentrasi 10, 20, 50, dan 100 µg/mL yang diencerkan dari larutan induk 1000 µg/mL. Larutan yang akan diencerkan dipipet dengan menggunakan pipet volume atau pipet mikro 100-1000 dan 10-100 µL. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan air suling demineral bebas CO₂ dan dicukupkan volumenya di dalam labu ukur 10,0 mL.

Pada ekstrak etanol 80%, persentase penghambatan terhadap aktivitas xantin oksidase masing-masing konsentrasi cukup tinggi. Persentase yang diperoleh diatas 100% sehingga konsentrasi pengukuran diturunkan dengan melakukan pengenceran menjadi 0,05; 0,1 ; 0,25 0,5 dan 1 µg/mL. Persentase penghambatan ekstrak etanol 80% terhadap aktivitas xantin oksidase masih menunjukkan nilai yang cukup tinggi, sehingga IC₅₀ yang diperoleh menjadi negatif. Hal ini mungkin disebabkan oleh banyaknya kandungan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak etanol 80%, sehingga menyebabkan penghambatan yang besar terhadap aktivitas xantin oksidase, karena ekstrak etanol 80% adalah ekstrak hasil maserasi yang belum mengalami proses fraksinasi. Konsentrasi, serapan, dan nilai IC₅₀ ekstrak etanol dapat dilihat pada Tabel 4.10.

Pengujian pada fraksi petroleum eter dan etil asetat dilakukan pada konsentrasi 10, 20, 50 dan 100 µg/mL. Pada uji penghambatan fraksi petroleum eter diperoleh IC₅₀ sebesar 13,13 µg/mL, sedangkan pada uji penghambatan fraksi etil asetat diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 5,54 µg/mL. Serapan dan persen inhibisi

masing-masing konsentrasi fraksi petroleumeter dan etil asetat dapat dilihat pada Tabel 4.11 dan Tabel 4.12.

Pada fraksi butanol, pengujian dilakukan pada konsentrasi 10, 20, 50 dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Pengujian pada konsentrasi tersebut menghasilkan persentase inhibisi yang besar, sehingga dilakukan penurunan konsentrasi menjadi 1, 2, 5, dan 10 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} yang diperoleh dari penghambatan fraksi butanol terhadap aktivitas xantin oksidase adalah 0,38 $\mu\text{g/mL}$. Serapan dan persen inhibisi masing-masing konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 4.13.

Pengujian pada fraksi air dilakukan pada konsentrasi 10, 20, 50 dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Pada uji penghambatan fraksi air diperoleh nilai IC_{50} sebesar 6,26 $\mu\text{g/mL}$. Serapan dan persen inhibisi masing-masing konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 4.14.

Setelah dilakukan pengujian ekstrak kental masing-masing fraksi terhadap aktivitas xantin oksidase, diperoleh hasil bahwa masing-masing fraksi dapat menghambat xantin oksidase. Nilai IC_{50} secara berurutan adalah fraksi butanol dengan nilai IC_{50} 0,38 $\mu\text{g/mL}$, fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} 5,54 $\mu\text{g/mL}$, fraksi air dengan nilai IC_{50} 6,26 dan fraksi petroleum eter dengan nilai IC_{50} 13,13 $\mu\text{g/mL}$.

4.5 Identifikasi Golongan Senyawa

Identifikasi kandungan golongan senyawa dilakukan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa berdasarkan golongannya sebagai informasi awal kandungan senyawa yang terdapat pada masing-masing fraksi. Identifikasi dilakukan menggunakan kontrol positif berupa simplisia yang telah diketahui memiliki kandungan golongan senyawa. Kontrol positif tersebut antara lain kulit batang Kina untuk kontrol positif golongan senyawa alkaloid, Rhei Radix untuk golongan senyawa antrakuinon, daun benalu mangga untuk golongan senyawa flavonoid, Nerii Folium untuk golongan senyawa glikosida, daun teh untuk golongan senyawa tanin, Herba Patikan Kebo untuk golongan senyawa terpen, dan Liquiritae Radix untuk golongan senyawa saponin. Hasil identifikasi golongan senyawa masing-masing fraksi ekstrak akar tanaman *Acalypha indica* L. dapat dilihat pada Tabel 4.1.

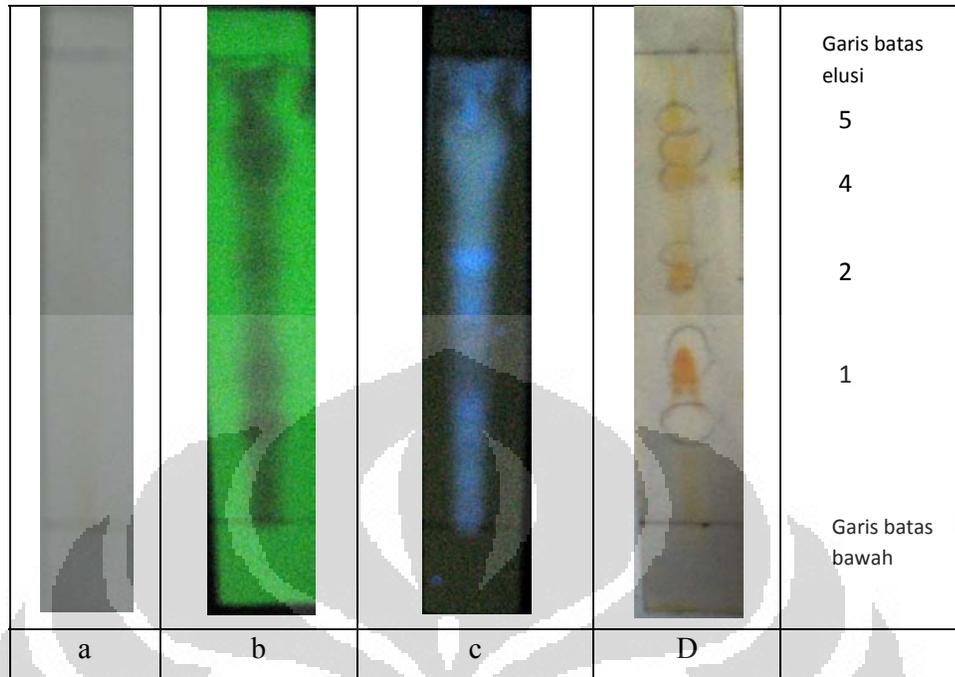
Tabel 4.1 Identifikasi golongan senyawa pada ekstrak akar tanaman *Acalypha indica* L.

Golongan Senyawa	Ekstrak Etanol	Ekstrak Petroleum Eter	Ekstrak Etil Asetat	Ekstrak Butanol	Ekstrak Air
Alkaloid	+	-	+	+	+
Antrakuinon	-	-	-	-	-
Fenol	+	-	+	+	+
Flavonoid	+	-	+	+	-
Glikosida	+	-	+	+	+
Tanin	-	-	-	-	-
Terpen	+	+	-	-	-
Saponin	+	-	-	-	+

4.5.1 Identifikasi Alkaloid

Senyawa alkaloid merupakan senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih nitrogen, biasanya dalam bentuk gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik. Pada identifikasi golongan senyawa alkaloid, masing-masing ekstrak ditambahkan campuran air suling dan larutan HCl 2N. Dengan penambahan asam, alkaloid yang bersifat basa akan membentuk garam yang larut di dalam air suling. Masing-masing ekstrak kemudian ditambahkan pereaksi Mayer, Dragendorff dan Bouchardat yang kemudian dibandingkan dengan kontrol positif kulit batang Kina (Gambar 4.14). Ekstrak yang memberikan hasil positif dengan penambahan pereaksi tersebut adalah ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi butanol dan fraksi air.

Identifikasi golongan senyawa alkaloid menggunakan kromatografi lapis tipis dilakukan pada fraksi teraktif, yaitu fraksi butanol. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform-metanol dengan perbandingan 8 : 3 dan penampak noda yang digunakan adalah Dragendorff. Hasil positif ditandai dengan bercak coklat jingga dengan latar belakang kuning (Harborne, 1987).



Keterangan : Kromatografi lapis tipis yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄ dengan jarak rambat 5 cm. Elusi dilakukan dengan menggunakan fase gerak kloroform-metanol 8 : 3.
 a. lempeng KLT setelah dielusi, b. Pengamatan dibawah sinar UV 254 nm, c. Pengamatan di bawah sinar UV 366 nm, d. Lempeng setelah disemprot dengan Dragendorff.

Gambar 4.2 Hasil KLT fraksi butanol menggunakan fase gerak kloroform-etanol 8 : 3.

Pada Gambar 4.2 pemisahan pada fraksi butanol dapat terlihat di bawah sinar UV 366 nm dan 254 nm namun setelah lempeng KLT disemprot menggunakan Dragendorff, terdapat 5 bercak berwarna coklat jingga dengan latar belakang kuning. Nilai Rf masing-masing bercak dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Nilai Rf KLT masing-masing bercak pada ekstrak fraksi butanol dengan fase gerak kloroform-metanol 8 : 3.

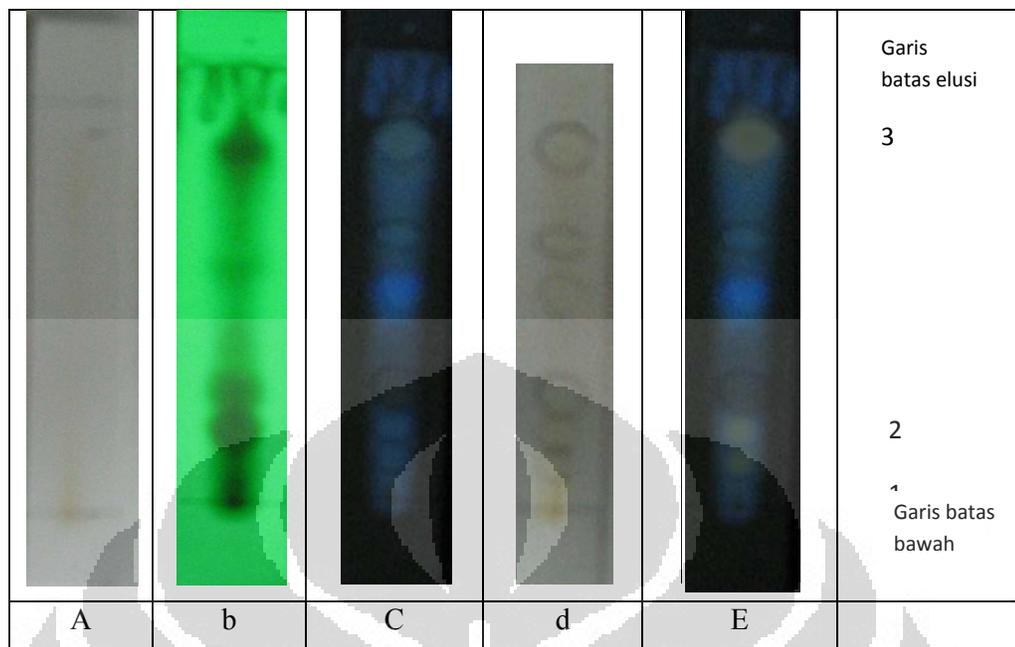
Bercak	Rf
1	0,32
2	0,50
3	0,72
4	0,80
5	0,86

Berdasarkan literatur, alkaloid yang terdapat pada tanaman *Acalypha indica* L. adalah akalipin, akalipamid, aurantinamid dan alkaloid piranikuinolinon flindersin.

4.5.2 Identifikasi Flavonoid

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan membandingkan kontrol positif, yaitu daun benalu mangga. Ekstrak yang menunjukkan hasil positif pada identifikasi flavonoid adalah ekstrak etanol 80%, fraksi etil asetat dan fraksi butanol. Pada ekstrak tersebut masing-masing menghasilkan warna kemerahan ketika direaksikan dengan serbuk zink dan kekuningan ketika direaksikan dengan magnesium dalam asam klorida (Gambar 4.15)

Identifikasi golongan senyawa flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis dilakukan pada fraksi teraktif, yaitu fraksi butanol. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform-metanol dengan perbandingan 4 : 1 dan penampak noda yang digunakan adalah $AlCl_3$. Hasil positif ditandai dengan bercak kuning yang berfluorosensi kuning kehijauan (Harborne, 1987).



Keterangan : Kromatografi lapis tipis yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄ dengan jarak rambat 5 cm. Elusi dilakukan dengan menggunakan fase gerak kloroform-metanol 4 : 1
 a. lempeng KLT setelah dielusi, b. Pengamatan dibawah sinar UV 254 nm, c. Pengamatan di bawah sinar UV 366 nm, d. Lempeng setelah disemprot dengan AlCl₃, e. Pengamatan di bawah sinar UV 366 nm setelah disemprot AlCl₃

Gambar 4.3 Hasil KLT fraksi butanol menggunakan fase gerak kloroform-etanol 4:1

Pada Gambar 4.3 pemisahan pada fraksi butanol dapat terlihat di bawah sinar UV 366 nm dan 254 nm namun setelah lempeng KLT disemprot menggunakan AlCl₃, dan diamati di bawah sinar UV 366 nm terdapat 3 bercak berwarna kekuningan. Nilai Rf masing-masing bercak dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Nilai Rf KLT masing-masing bercak pada ekstrak fraksi butanol dengan fase gerak kloroform-metanol 4 : 1.

Bercak	Rf
1	0,1
2	0,2
3	0,8

Berdasarkan literatur, *Acalypha indica* L. memiliki kandungan flavonoid seperti kaempferol, biorobin, clitorin, nicotiflorin, dan mauritianin (Nahrstedt, Hungeling & Petereit, 2006). Terdapat literatur yang menyebutkan bahwa flavonoid yang memiliki penghambatan terhadap xantin oksidase adalah flavonoid golongan flavon, seperti apigenin, luteolin dan golongan flavonol seperti kaempferol, quercetin, dan myricetin (van Horn et al., 2002).

Salah satu tanaman yang telah diteliti memiliki kandungan flavonoid yang dapat menghambat aktivitas xantin oksidase adalah tanaman *Sinofranchetia chinensis*. Flavonoid liquiritigenin dan isoliquiritigenin yang telah diisolasi dari tanaman ini dapat menghambat aktivitas xantin oksidase (Kong et al., 2000).

4.5.3 Identifikasi Glikosida

Glikosida mengandung dua komponen, yaitu bagian aglikon atau bagian bukan gula dan bagian gula. Identifikasi golongan senyawa glikosida dibandingkan dengan kontrol positif yaitu *Nerii Folium* (Gambar 4.16). Ekstrak yang memberikan hasil positif adalah ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi butanol dan fraksi air.

4.5.4 Identifikasi Tanin

Identifikasi tanin meliputi penambahan FeCl_3 , larutan NaCl-gelatin dan larutan gelatin 10%. Pada penambahan FeCl_3 , ekstrak etanol, etil asetat, butanol dan air memberikan hasil positif dengan terbentuknya warna hijau tua segera setelah penambahan. Namun, ketika ditambahkan larutan NaCl-gelatin, dan larutan gelatin pada masing-masing ekstrak, hasil yang diberikan negatif karena

tidak terbentuk endapan pada larutan. Hasil positif pada penambahan FeCl_3 , bukan menunjukkan adanya golongan senyawa tanin pada ekstrak, namun menunjukkan adanya golongan senyawa fenol pada ekstrak (Gambar 4.17).

4.5.5 Identifikasi Terpen

Identifikasi golongan senyawa terpen dilakukan dengan menggunakan penambahan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat dan dibandingkan dengan kontrol positif yaitu Herba Patikan Kebo, jika positif terdapat golongan senyawa terpen maka akan terbentuk warna merah hijau atau hijau biru (Farnsworth, 1966 ; Harborne, 1987). Hasil positif ditunjukkan oleh ekstrak etanol 80% dan fraksi petroleum eter dengan terbentuknya warna hijau (Gambar 4.19).

Golongan senyawa terpen yang telah diteliti memiliki penghambatan terhadap aktivitas xantin oksidase adalah eugenol dari tanaman *Piper betle* dengan IC_{50} sebesar 16,67 $\mu\text{g/mL}$ (Kazuya et al., 2009). Pada hasil uji penghambatan ekstrak petroleum eter IC_{50} yang dihasilkan adalah sebesar 13,13 $\mu\text{g/mL}$ sehingga kemungkinan terdapat golongan senyawa terpen pada ekstrak akar *Acalypha indica* L. yang berpotensi menghambat aktivitas xantin oksidase.

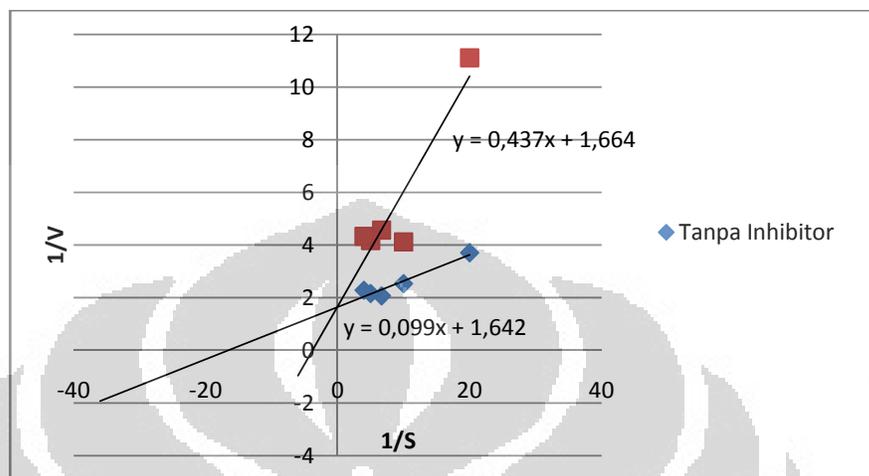
4.5.6 Identifikasi Saponin

Pada identifikasi golongan senyawa saponin dibandingkan dengan kontrol positif, yaitu dengan akar Liquiritae, hasil positif ditunjukkan oleh ekstrak etanol 80% dan fraksi air (Gambar 4.18). Buih mantap terbentuk setelah ekstrak etanol 80% dan fraksi air ditambahkan air suling panas dan dikocok selama 10 detik. Buih tidak hilang kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N.

4.6 Uji Kinetika Penghambatan Xantin Oksidase

Analisis kinetika penghambatan xantin oksidase dilakukan menggunakan plot Lineweaver-Burk. Sampel ekstrak yang digunakan adalah ekstrak kental fraksi butanol, karena memiliki penghambatan yang paling baik dengan IC_{50} terendah dibandingkan dengan fraksi lainnya. Konsentrasi substrat xantin pada uji

kinetika penghambatan xantin oksidase adalah 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; dan 0,25 mM.



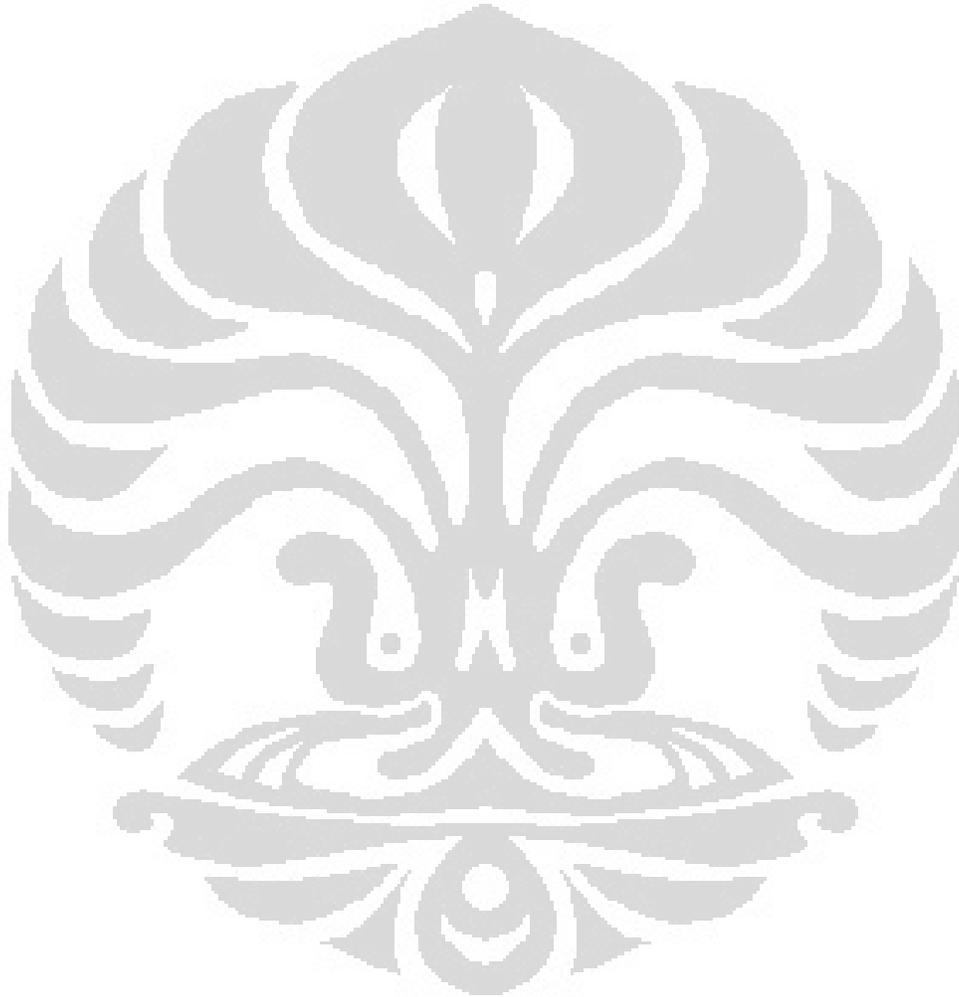
Gambar 4.4 Plot Lineaweaver-Burk ekstrak kental fraksi butanol konsentrasi 2 µg/mL dengan konsentrasi xantin 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 dan 0,25 mM.

Tabel 4.4 Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten pada Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

Sampel	Tanpa inhibitor	Fraksi butanol 2µg/mL
a	1,642	1,664
b	0,099	0,437
r	0,962	0,928
Km	0,060	0,263
Vmaks	0,609	0,601

Perpotongan garis regresi linier tanpa inhibitor dan fraksi butanol terletak pada sumbu y (Gambar 4.5), sehingga dapat disimpulkan bahwa jenis kinetika penghambatan ekstrak butanol 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 et al., 2003).

Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten menunjukkan bahwa nilai V_{maks} fraksi butanol dan tanpa inhibitor hampir sama, sedangkan nilai K_m berbeda. Kecepatan pembentukan produk hanya bergantung pada konsentrasi enzim-substrat. Fraksi butanol memiliki nilai K_m yang lebih besar, karena berikatan kurang erat dengan enzim dalam konsentrasi yang sama, sehingga tidak akan menurunkan kecepatan reaksi yang dikatalisis (Murray et al., 2003).



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan pengujian penghambatan terhadap aktivitas xantin oksidase oleh akar tanaman *Acalypha indica* L. semua fraksi merupakan fraksi aktif. Fraksi butanol merupakan fraksi teraktif dengan nilai IC_{50} 0,38 $\mu\text{g/mL}$, disusul oleh fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} 5,54 $\mu\text{g/mL}$, fraksi air dengan nilai IC_{50} 6,26 $\mu\text{g/mL}$ dan fraksi petroleum eter dengan nilai IC_{50} 13,13 $\mu\text{g/mL}$. Golongan senyawa yang terkandung pada fraksi butanol dan etil asetat adalah alkaloid, flavonoid dan glikosida sedangkan pada fraksi air golongan senyawa yang terkandung adalah alkaloid, glikosida dan saponin. Pada fraksi petroleum eter golongan senyawa yang terkandung adalah terpen.

5.2 Saran

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi dan karakterisasi senyawa yang terdapat pada fraksi butanol akar tanaman *Acalypha indica* L. sehingga diperoleh senyawa tunggal yang dapat menghambat aktivitas xantin oksidase.

DAFTAR ACUAN

- Azizahwati., Wiryowidagdo, S., Prihandini, K. (2005). Efek penurunan kadar asam urat dalam darah pada tikus putih jantan dari rebusan akar tanaman akar kucing (*Acalypha indica* L.). *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, Vol 4, No.1, 213-218.
- Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (2007). *Herbal Medicines Third edition*. London : Pharmaceutical Press.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002). *Biochemistry 5th Edition*. W.H Freeman : New York.
- Bisswanger, H. (2002). *Enzyme Kinetics Principles and Methods*. Jerman : Wiley-VCH.
- British Pharmacopoeia. (2007). London : Crown.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., dan Ferrier, D.R. (2005). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., dan Berghe, D.V. (1998). Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *J. Nat. Prod*, 61, 71-76.
- Dalimartha, S. (2008). *Resep tumbuhan Obat Untuk Asam Urat Edisi Revisi*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Fransworth, N.R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science*, 55, 3, 226-276.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode Fitokimia*. Terjemahan dari Phytochemical Methods oleh Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro. Bandung: Penerbit ITB.
- Harmita. (2006). *Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Hidayat, R. (2009). Gout dan Hiperurisemia. *Medicinus*, 22, 1, 47-49.
- Hungeling, M., Lechtenberg., Fronczek, F.R., dan Nahrstedt, A. (2009). Cyanogenic and non-cyanogenic pyridone glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry*, 70, 270-277.
- Johnstone, A. (2005). Gout; The Disease and Non-drug Treatment. *Hospital Pharmacist*, 12, 391-393.
- Kamalakkannan, S., Murugan, K., dan Barnard, D, R. (2011). Toxicity of *Acalypha indica* (Euphorbiaceae) and *Achyranthes aspera* (Amaranthaceae) leaf extracts to *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *J. Of Asia-Pacific Entomology*, 14, 41-45.
- Katzung, B.G. (1995). *Farmakologi dasar dan klinik*. Jakarta : Penerbit buku kedokteran EGC, Hal 578.
- Kazuya, M., Kikuyo, N., Noriko, H., Kensuke, N., Takao, N., Yoshihisa, K., Kenzo, M., Takahiro, S, Munekazu, I., dan Hideaki, M. (2009). Hydroxychavicol : a potent xanthine oxidase inhibitor obtained from the leaves of betel, *Piper betle*. *J. Nat. Med*, 63, 355-359.
- Kong, L.D., Cai.Y., Huang, W.W., Cheng, C.H.K., dan Tan, R.X. (2000). Inhibition of Xanthine Oxidase by Some Chinese Medicinal Plants Used to Treat Gout. *J.of Ethnopharmacology*, 73, 199-207.
- Kong, L.D., Zhang, Y., Pan, X., Tan, X., Cheng, C.H.K. (2000). Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. *CMLS*, 57, 500-505.

- Laurens, D.R. (2010). *Skrining dan Identifikasi Aktivitas Penghambatan Enzim Xantin Oksidase oleh Beberapa Tanaman Obat di Indonesia yang Berkhasiat Sebagai Anti Hiperurisemia*. Skripsi. Depok : Program Studi Ekstensi Farmasi, Universitas Indonesia.
- McPherson, R.A., dan Pincus, M.R. (2006). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods Twenty-First edition*. Elsevier, 245-255.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes P.A., dan Rodwell, V.W. (2003). *Biokimia Harper Edisi.25*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Nadinah. (2008). *Kinetika Inhibisi Ekstrak Etanol Seledri (Apium graveolens L.) dan Fraksinya Terhadap Enzim Xantin Oksidase Serta Penentuan Senyawa Aktifnya*. Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Nahrsted, A., Hungeling, M., dan Petereit, F. (2006). Flavonoids from *Acalypha indica*. *Fitoterapia*, 77, 484-486.
- Owen, P.L., dan Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of norteanine North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 149-160.
- Pratiwi, I. (2009). *Uji Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Acalypha indica Linn. Terhadap Bakteri Salmonella choleraesuis dan Salmonella typhimurium*. Skripsi. Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Price, S.A. (2005). *Patofisiologi : Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC .
- Rinaudo C, dan Boistelle R. (1982). Theoretical and experimental growth morphologies of sodium urate crystals. *J. Cryst. Growth*, 57, 432-442.
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, M.N., Ismail, S., dan Mansor, M.S. (2009). In Vitro Antioxidant and Xanthine Oxidase Inhibitory Activities oh Methanolic *Swietenia mahagoni* Seed Extracts. *Molecules*, 14, 4476-4485.
- Sigma Aldrich. (1994). Sigma Quality Control Test Procedure. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/xanthine_oxidase.Par.0001.File.tmp/xanthine_oxidase.pdf. September 23, 2011 pukul 10.05.

- Tomonori, U., Akio, S., dan Takami, K. (2004). Xanthine Oxidase Inhibitors from the Leave of *Lagerstroemia speciosa* (L.)Pers. *J.of Ethnopharmacology*, 93, 391-395.
- Tjitrosoepomo, Gembong. (1991). Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, 152-155.
- Umamaheswari, M., AsokKumar, K., Sivashanmugam, A.T., Remyaraju, A., Subhadradevi, V., dan Ravi, T.K. (2007). Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 547-551.
- Umamaheswari, M., AsokKumar, K., Sivashanmugam, A.T., Remyaraju, A., Subhadradevi, V., dan Ravi, T.K. (2009). In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 646–648.
- Van, Hoorn, D.E.C., Nijveldt, R.J., Van, Leeuwen, P.A.M., Hofman, Z., M'Rabet, L., De Bont, D.B.A., dan Van, Norren, K. (2002). Accurate prediction of xanthine oxidase based on the structure of flavonoids. *Eropean Journal of Pharmacology*, 451, 111-118.
- Van, Valkenbur., J.L.C.H., dan Bunyaphatsara, N. (Editor). (2002). *Plant Resources of South-East Asia No. 12(2). Medicinal and Poisonous Plants 2*. Bogor: PROSEA Foundation, 31-33.
- Wilmana, F.W., dan 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 Univesitas Indonesia, 243.

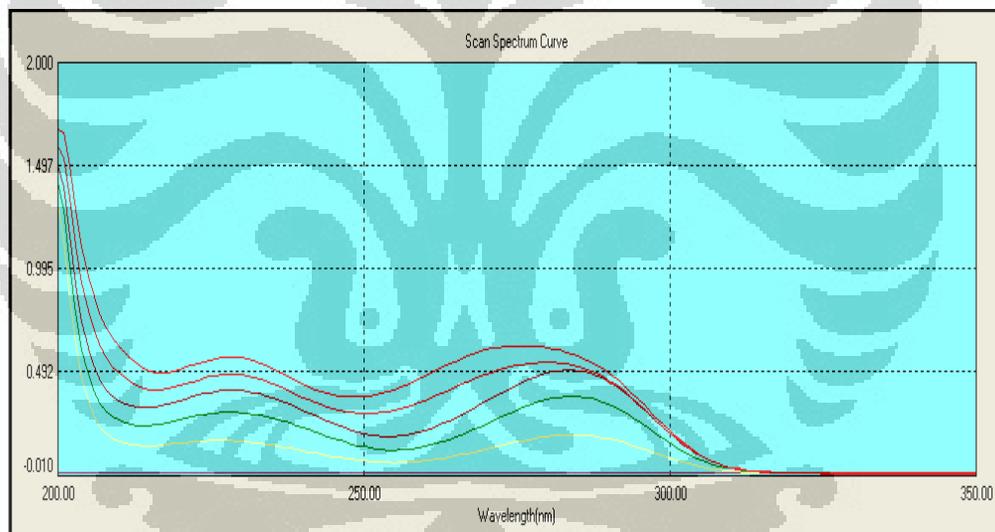




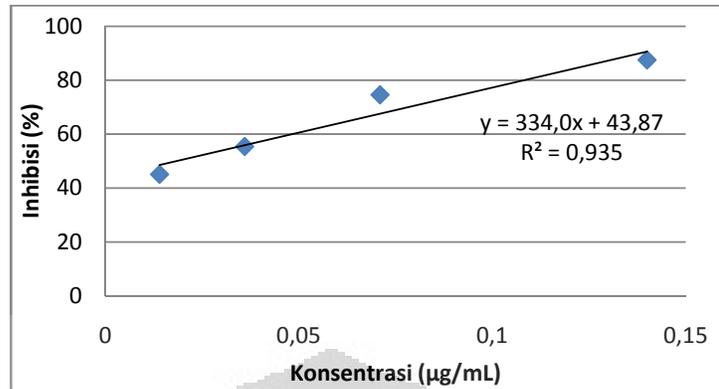
Gambar 4.5 Tanaman *Acalypha Indica* L.



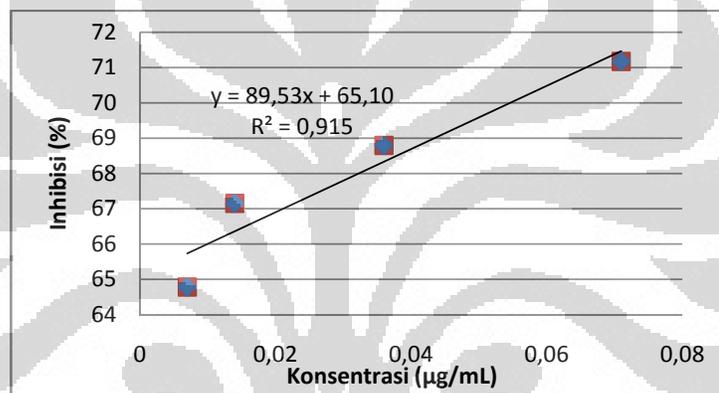
Gambar 4.6 Simplisia bagian akar tanaman *Acalypha Indica* L.



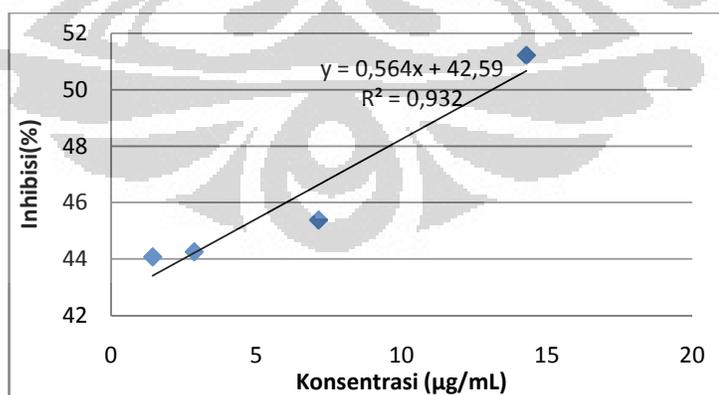
Gambar 4.7 Spektrum serapan pada optimasi konsentrasi substrat.



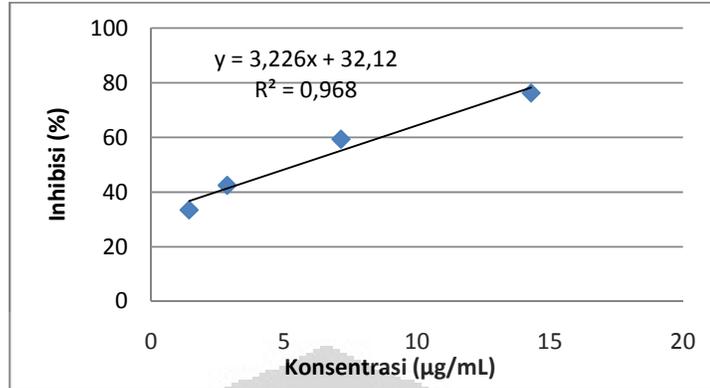
Gambar 4.8 Grafik regresi linier alopurinol



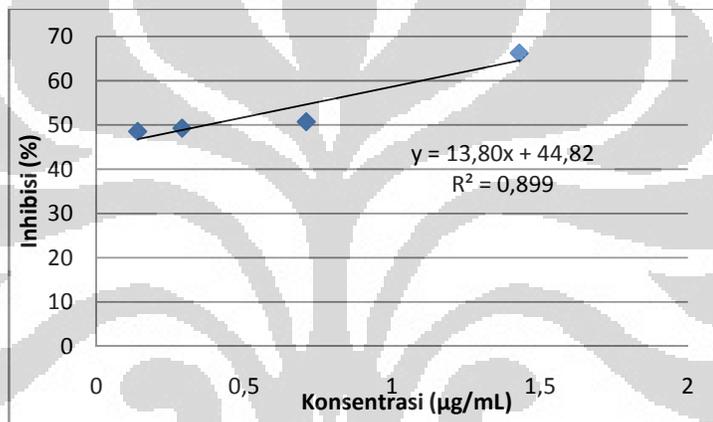
Gambar 4.9 Grafik regresi linier ekstrak etanol 80%



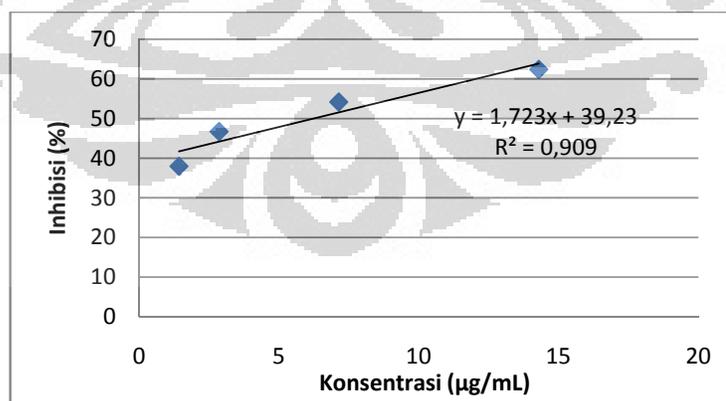
Gambar 4.10 Grafik regresi linier fraksi petroleum eter



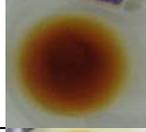
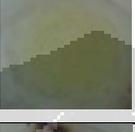
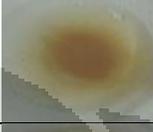
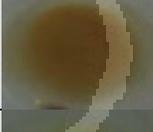
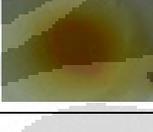
Gambar 4.11 Grafik regresi linier fraksi etil asetat



Gambar 4.12 Grafik regresi linier fraksi butanol



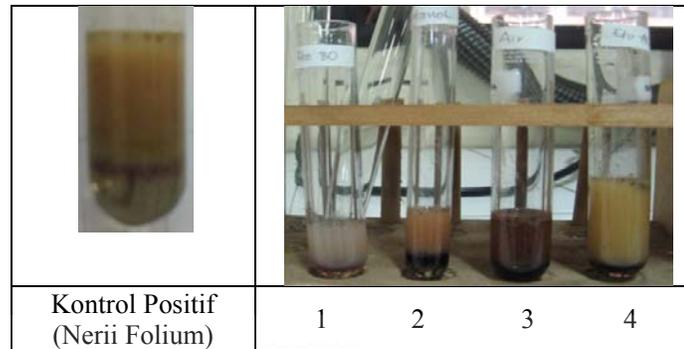
Gambar 4.13 Grafik regresi linier fraksi air

Ekstrak	Mayer	Dragendorff	Bouchardat
Kontrol positif (Kulit batang Kina)			
Ekstrak etanol 80%			
Fraksi etil asetat			
Fraksi Butanol			
Fraksi Air			

Gambar 4.14 Hasil positif pada identifikasi golongan senyawa alkaloid

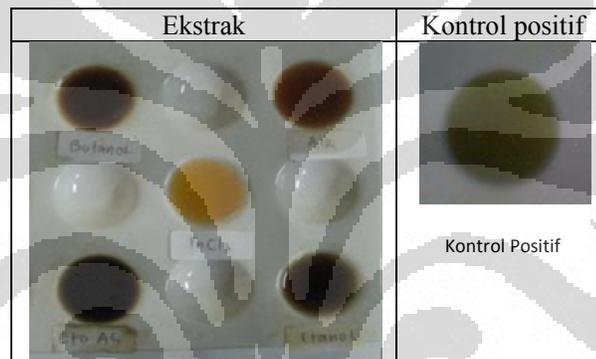
Ekstrak	Zn	Mg
Kontrol positif (Daun benalu mangga)		
Ekstrak etanol 80%		
Fraksi etil asetat		
Fraksi butanol		

Gambar 4.15 Hasil positif pada identifikasi golongan senyawa flavonoid



Keterangan : 1. Ekstrak etanol 80%, 2. Fraksi Butanol, 3. Fraksi air, 4. Fraksi etil asetat

Gambar 4.16 Hasil positif pada identifikasi golongan senyawa glikosida



Keterangan : 1. Fraksi etanol 80%, 2. Fraksi etil asetat, 3. Fraksi butanol, 4. Fraksi air ,
5. $FeCl_3$ (Kontrol negatif)

Gambar 4.17 Hasil positif pada dentifikasi golongan senyawa fenol



Gambar 4.18 Hasil positif pada identifikasi golongan senyawa saponin

Kontrol Positif (Herba Patikan Kebo)	Ekstrak etanol 80%	Fraksi petroleum eter
		

Gambar 4.19 Hasil positif pada identifikasi golongan senyawa terpen



Gambar 4.20 Penguap putar vakum



Gambar 4.21 Spektrofotometer UV Vis



Tabel 4.5 Rendemen ekstrak

Ekstrak	Berat Ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
Etanol 80%	77,25	7,69
Petroleum eter	4,64	0,46
Etil asetat	5,54	0,55
Butanol	16,77	1,67
Air	29,75	2,98

Keterangan : Berat serbuk simplisia akar *Acalypha indica* L. adalah 1005 gram

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak (gram)}}{\text{Berat simplisia (gram)}} \times 100\%$$

Tabel 4.6 Data serapan pada uji pendahuluan penentuan suhu optimum

Suhu	Absorbansi					Aktivitas (Unit/ml)
	Blangko (B)	Blangko rata-rata	Kontrol Blangko (KB)	Kontrol blangko rata-rata	B-KB	
20°C	0,340	0,340	0,099	0,099	0,241	0,98
	0,340		0,099			
25°C	0,490	0,500	0,099	0,099	0,391	1,97
	0,510		0,099			
30°C	0,556	0,557	0,099	0,099	0,458	2,25
	0,558		0,099			
35°C	0,222	0,212	0,075	0,074	0,138	0,68
	0,202		0,073			
40°C	0,200	0,200	0,071	0,072	0,128	0,63
	0,200		0,073			

Tabel 4.7 Data serapan pada uji pendahuluan penentuan pH optimum

pH	Absorbansi					Aktivitas (Unit/ml)
	Blangko (B)	Blangko rata-rata	Kontrol Blangko (KB)	Kontrol blangko rata-rata	B-KB	
7,5	0,555	0,555	0,099	0,099	0,456	2,24
	0,555		0,099			
7,8	0,605	0,605	0,101	0,102	0,503	2,47
	0,605		0,103			
8,0	0,320	0,320	0,094	0,094	0,226	1,11
	0,320		0,094			
8,3	0,272	0,274	0,085	0,086	0,188	0,92
	0,276		0,087			
8,5	0,211	0,212	0,074	0,074	0,137	0,68
	0,213		0,074			

Tabel 4.8 Data serapan pada uji pendahuluan penentuan konsentrasi substrat optimum

Konsentrasi Xantin (mM)	Absorbansi					Aktivitas (Unit/ml)
	Blangko (B)	Blangko rata-rata	Kontrol Blangko (KB)	Kontrol blangko rata-rata	B-KB	
0,05	0,188	0,187	0,034	0,035	0,152	0,75
	0,186		0,035			
0,1	0,383	0,379	0,098	0,099	0,280	1,38
	0,374		0,100			
0,15	0,637	0,610	0,113	0,112	0,498	2,40
	0,583		0,111			
0,2	0,600	0,594	0,150	0,153	0,441	2,17
	0,588		0,156			
0,25	0,620	0,615	0,202	0,201	0,414	2,04
	0,610		0,200			

Tabel 4.9 Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh Alopurinol

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)		Serapan				Sr-Kr	Inhibisi %	IC ₅₀
Sampel	Akhir	Sampel	Sampel rata-rata (Sr)	Kontrol	Kontrol rata- rata (Kr)			
0,1	0,014	0,331	0,333	0,028	0,024	0,309	45,11	0,018
		0,335		0,020				
0,25	0,036	0,250	0,275	0,026	0,024	0,251	55,42	
		0,300		0,022				
0,5	0,071	0,168	0,171	0,027	0,028	0,143	74,6	
		0,174		0,029				
1	0,14	0,103	0,104	0,033	0,034	0,070	87,56	
		0,105		0,034				
Blangko		0,660		Kontrol blangko		0,097		
Persamaan regresi linier $y = 43,87 + 334,0 x$								

Tabel 4.10 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh ekstrak etanol 80%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)		Serapan				Sr-Kr	Inhibisi %	IC ₅₀
Sampel	Akhir	Sampel	Sampel rata-rata (Sr)	Kontrol	Kontrol rata- rata (Kr)			
0,05	0,007	0,246	0,248	0,054	0,055	0,193	64,78	-0,17
		0,250		0,055				
0,1	0,014	0,231	0,233	0,053	0,053	0,180	67,15	
		0,235		0,052				
0,25	0,036	0,230	0,227	0,052	0,056	0,171	68,79	
		0,223		0,060				
0,5	0,071	0,204	0,210	0,050	0,052	0,158	71,17	
		0,217		0,060				
Blangko		0,619		Kontrol blangko		0,071		
Persamaan regresi linier $y = 65,10 + 89,53x$								

Tabel 4.11 Data Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi petroleum eter

Konsentrasi (µg/ml)		Serapan				Sr-Kr	Inhibisi %	IC ₅₀
Sampel	Akhir	Sampel	Sampel rata-rata (Sr)	Kontrol	Kontrol rata-rata (Kr)			
10	1,43	0,308	0,311	0,016	0,014	0,297	44,07	
		0,313		0,012				
20	2,86	0,336	0,339	0,037	0,043	0,296	44,25	
		0,342		0,048				
50	7,14	0,369	0,347	0,050	0,057	0,290	45,38	
		0,325		0,063				
100	14,29	0,400	0,380	0,124	0,121	0,259	51,22	
		0,360		0,118				
Blangko		0,620		Kontrol blangko		0,089		
Persamaan regresi linier $y = 42,59 + 0,564x$								

Tabel 4.12 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi etil asetat

Konsentrasi (µg/ml)		Serapan				Sr-Kr	Inhibisi %	IC ₅₀
Sampel	Akhir	Sampel	Sampel rata-rata (Sr)	Kontrol	Kontrol rata-rata (Kr)			
10	1,43	0,388	0,379	0,007	0,009	0,370	33,45	
		0,370		0,010				
20	2,86	0,364	0,342	0,015	0,022	0,320	42,44	
		0,320		0,028				
50	7,14	0,330	0,315	0,090	0,089	0,226	59,35	
		0,300		0,087				
100	14,29	0,289	0,269	0,130	0,137	0,132	76,25	
		0,250		0,143				
Blangko		0,639		Kontrol blangko		0,083		
Persamaan regresi linier $y = 32,12 + 3,226 x$								

Tabel 4.13 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi butanol

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)		Serapan				Sr-Kr	Inhibisi %	IC ₅₀
Sampel	Akhir	Sampel	Sampel rata-rata (Sr)	Kontrol	Kontrol rata- rata (Kr)			
1	0,14	0,381	0,388	0,104	0,106	0,282	48,54	
		0,376		0,107				
2	0,29	0,379	0,382	0,105	0,104	0,278	49,27	
		0,385		0,103				
5	0,71	0,374	0,377	0,105	0,107	0,270	50,73	
		0,380		0,109				
10	1,43	0,317	0,326	0,135	0,141	0,185	66,24	
		0,360		0,147				
Blangko		0,647		Kontrol blangko		0,099		
Persamaan regresi linier $y = 44,82 + 13,80 x$								

Tabel 4.14 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi air

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)		Serapan				Sr-Kr	Inhibisi %	IC ₅₀
Sampel	Akhir	Sampel	Sampel rata-rata (Sr)	Kontrol	Kontrol rata- rata (Kr)			
10	1,43	0,369	0,305	0,028	0,029	0,276	37,96	
		0,241		0,030				
20	2,86	0,354	0,322	0,031	0,030	0,292	46,72	
		0,290		0,028				
50	7,14	0,334	0,280	0,033	0,029	0,251	54,19	
		0,226		0,025				
100	14,29	0,340	0,277	0,068	0,071	0,206	62,41	
		0,214		0,073				
Blangko		0,601		Kontrol Blangko		0,053		
Persamaan regresi linier $y = 39,23 + 1,723 x$								

Tabel 4.15 Hasil identifikasi golongan senyawa kimia

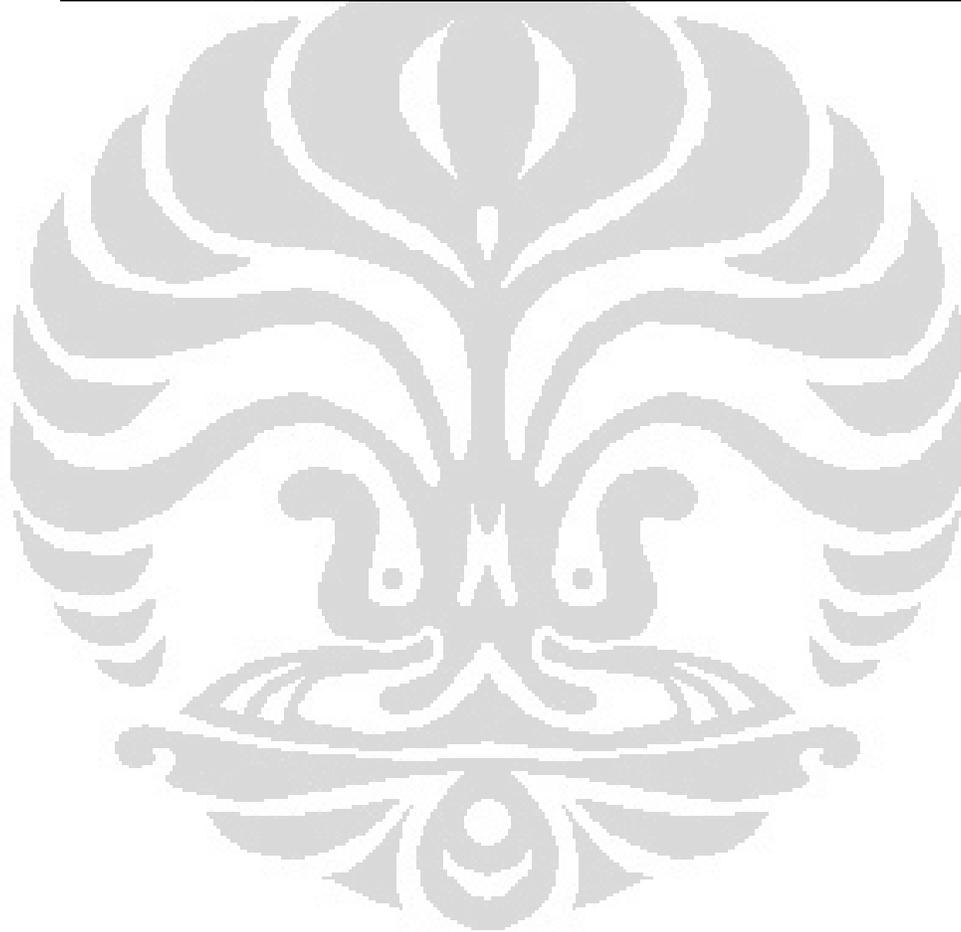
Golongan Senyawa	Pereaksi Kimia	Ekstrak				
		Etanol	Petroleum eter	Etil asetat	Butanol	Air
Alkaloid	Mayer	+	-	+	+	+
	Bouchardat	+	-	+	+	+
	Dragendorf	+	-	+	+	+
Antrakuinon	Benzen dan NaOH 2 N	-	-	-	-	-
Flavonoid	Serbuk Zn + HCl 2N + HCl (p)	+	-	+	+	-
	Serbuk Mg + HCl (p)	+	-	+	+	-
Glikosida	Reksi Molisch	+	-	+	+	+
Saponin	Air Panas	+	-	-	-	+
Fenol	FeCl ₃	+	-	+	+	+
Tanin	Gelatin-NaCl	-	-	-	-	-
	Gelatin 10%	-	-	-	-	-
Terpen	Lieberman-Bouchard	+	+	-	-	-

Tabel 4.16 Data serapan tanpa inhibitor pada uji kinetika penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh ekstrak fraksi butanol

Konsentrasi xantin (S)	Serapan			1/S	1/V
	Blangko (B)	Kontrol Blangko (KB)	B-KB		
0,05 mM	0,295	0,025	0,27	20	3,704
0,1 mM	0,475	0,080	0,395	10	2,532
0,15 mM	0,507	0,023	0,484	6,6667	2,066
0,2 mM	0,529	0,066	0,463	5	2,259
0,25 mM	0,645	0,207	0,438	4	2,283

Tabel 4.17 Data serapan fraksi butanol konsentrasi $2\mu\text{g/ml}$ pada uji kinetika penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh ekstrak fraksi butanol

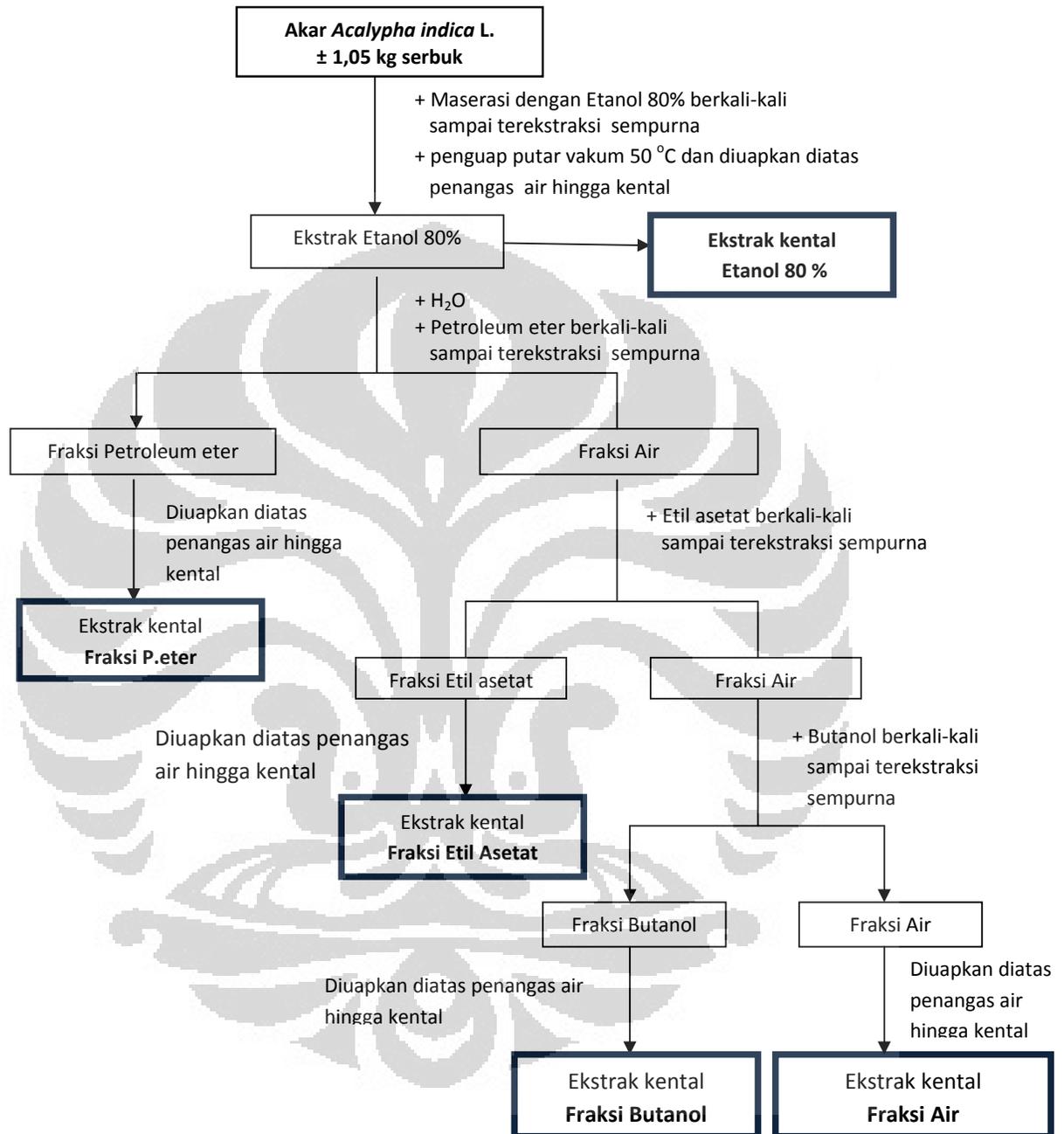
Konsentrasi xantin (S)	Serapan			1/S	1/V
	Blangko (B)	Kontrol Blangko (KB)	B-KB		
0,05 mM	0,107	0,017	0,09	20	11,111
0,1 mM	0,290	0,047	0,243	10	4,115
0,15 mM	0,270	0,051	0,219	6,6667	4,566
0,2 mM	0,318	0,078	0,24	5	4,166
0,25 mM	0,349	0,118	0,231	4	4,329



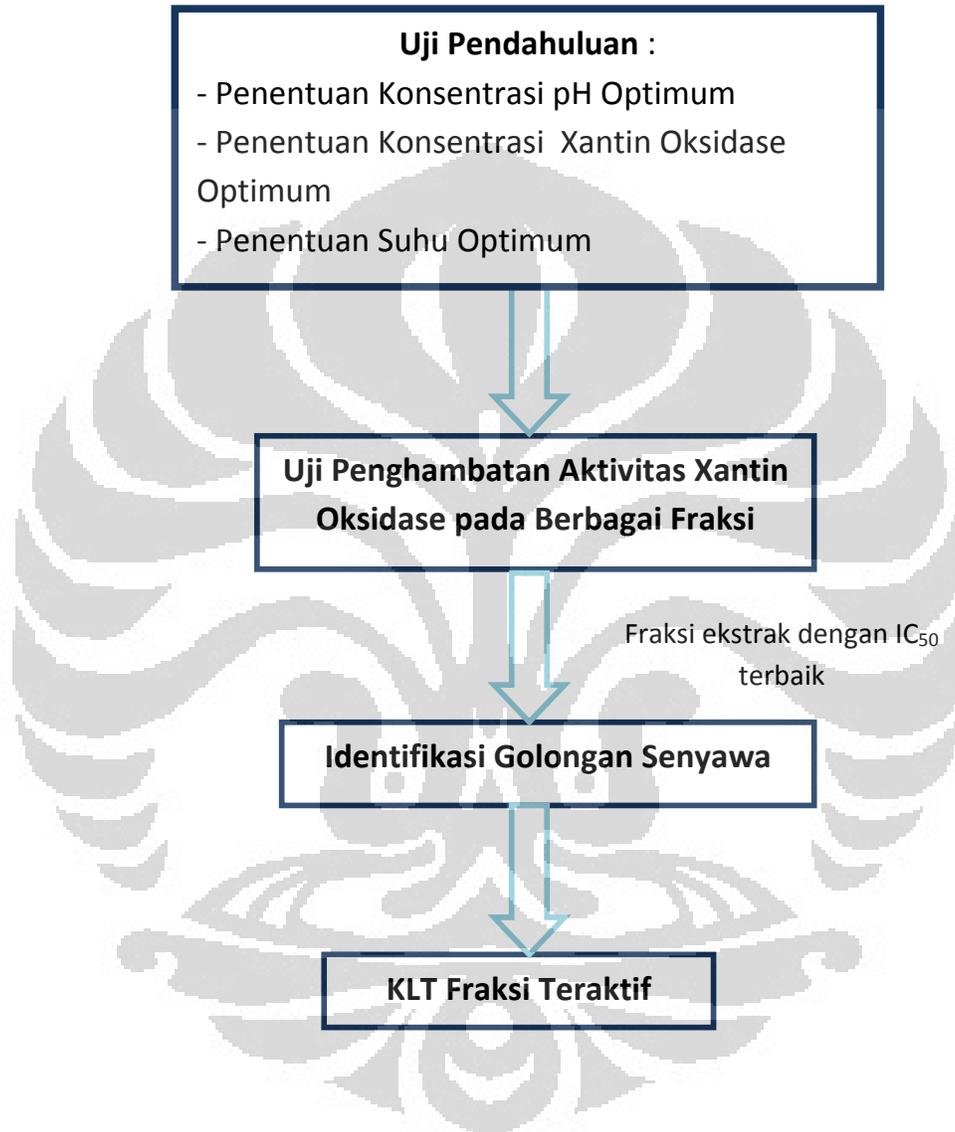


LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja pembuatan ekstrak kental dan fraksinasi ekstrak akar tanaman *Acalypha indica* L.



Lampiran 2. Skema pengujian penghambatan aktivitas xantin oksidase dan identifikasi golongan senyawa pada fraksi aktif akar tanaman *Acalypha indica* L.



Lampiran 3. Perhitungan dan pembuatan larutan xantin oksidase 0,1 unit/ml.

Pada label kemasan dituliskan :

0,4-1 unit/mg protein
 45,45 mg solid 0,11 unit/mg solid
 0,8 unit/ mg protein

- a. Perhitungan kesetaraan miligram protein, miligram solid dan unit xantin oksidase.

$$45,45 \text{ mg solid} \times 0,11 \text{ unit/mg solid} = 4,9995 \text{ unit}$$

$$\frac{4,9995 \text{ unit}}{0,8 \frac{\text{unit}}{\text{mg}} \text{ protein}} = 6,249375 \text{ mg} \approx 6,25 \text{ mg protein}$$

$$\frac{45,45 \text{ mg solid}}{6,25 \text{ mg protein}} = \frac{7,27 \text{ mg solid}}{1 \text{ mg protein}} = 7,27 \text{ mg solid/ 1 mg protein}$$

$$1 \text{ mg protein} \approx 7,27 \text{ mg solid} \approx 0,8 \text{ unit}$$

- b. Perhitungan jumlah miligram yang ditimbang :

Pembuatan larutan enzim xantin oksidase 0,1 unit/ ml :

$$\text{Dibuat dalam larutan 1 ml} = 7,27 \text{ mg} \times \frac{0,1 \text{ unit}}{0,8 \text{ unit}} = 0,90875 \text{ mg}$$

$$\text{Dilarutkan dalam 10 ml} = 10 \text{ ml} \times 0,90875 \text{ mg} = 9,0875 \text{ mg}$$

Ditimbang 9,0875 ml enzim xantin oksidase kemudian dilarutkan dalam 10 ml dapar fosfat

Lampiran 4. Perhitungan dan pembuatan larutan xantin

Perhitungan larutan substrat xantin

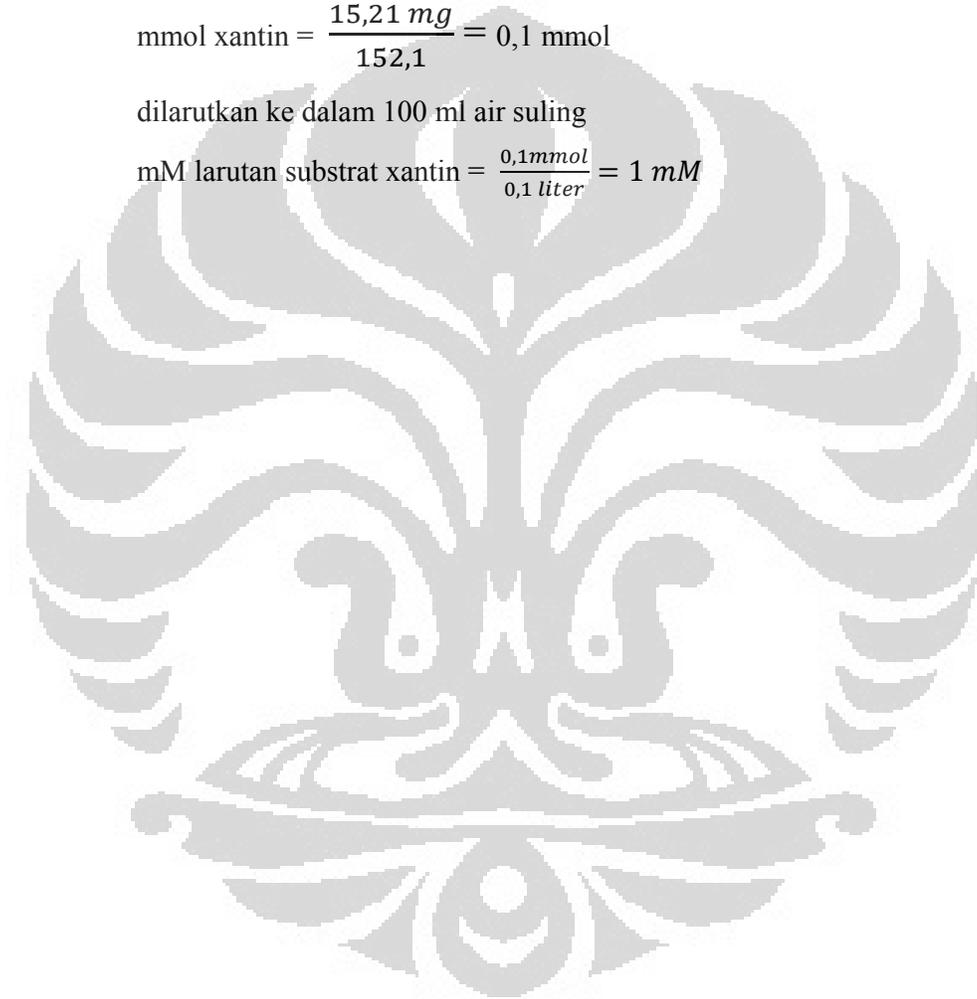
Xantin , BM = 152,1 (Sigma Aldrich)

Substrat xantin yang ditimbang = 15,21 mg

$$\text{mmol xantin} = \frac{15,21 \text{ mg}}{152,1} = 0,1 \text{ mmol}$$

dilarutkan ke dalam 100 ml air suling

$$\text{mM larutan substrat xantin} = \frac{0,1 \text{ mmol}}{0,1 \text{ liter}} = 1 \text{ mM}$$



Lampiran 5. Hasil determinasi tanaman



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 27 September 2011

Nomor : 1288/IPH.1.02/If.8/IX/2011
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). Nurlaila Fitriani
Mhs. Univ. Indonesia
Fak. MIPA
Kampus UI Depok, 16424

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Akar Kucing	<i>Acalypha indica</i> L.	Euphorbiaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

Dr. Joeni Setiyo Rahajoe
NIP. 196706241993032004

D:\Ident 2011\Nurlaila Fitriani.doc\JJA-DG

Page 1 of 1

Lampiran 6. Sertifikat analisis xantin oksidase

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
XANTHINE OXIDASE FROM BOVINE MILK

Product Number: X4376
Lot Number: 110M7023
Brand: SIGMA
CAS Number: 9002-17-9
MDL Number: MFCD00082145
Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
Quality Release Date: 21 DEC 2010
Recommended Retest Date: DEC 2012

Test	Specification	Result
Protein by Biuret units/mg protein	10.0 - 25.0 % 0.4 - 1.0	14.1 % 0.8
One unit will convert 1.0 micromole of xanthine to uric acid per minute at pH 7.5 at 25 deg C		
Activity Uricase	≤ 0.2 %	0.2 %
Recommended Retest Period 2 years		



Rodney Burbach, Manager
Analytical Services
St. Louis, Missouri US

Universitas Indonesia

Lampiran 7. Sertifikat analisis xantin

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of AnalysisProduct Name:
Xanthine - BioUltra, ≥99%Product Number: X4002
Lot Number: 077K53071V
Brand: SIGMA
CAS Number: 69-89-6
MDL Number: MFCD00078453
Formula: C₅H₄N₄O₂
Formula Weight: 152.11 g/mol
Quality Release Date: 25 NOV 2008
Date Retested: 01 JUN 2011
Recommended Retest Date: JUN 2015

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Light Yellow	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless to Light Yellow	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
0.1 M solution in 1 M NaOH		
Residue on Ignition	Pass	Pass
< or = 0.1%		
Aluminum (Al)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		
Phosphorus (P)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		
Lead (Pb)	Pass	Pass
< or = 0.001%		
Calcium (Ca)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		
Magnesium (Mg)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		
Sodium (Na)	Pass	Pass
< or = 0.005%		
Iron (Fe)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		
Copper (Cu)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Universitas Indonesia

Product Number: X4376
 Lot Number: 110M7023
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 9002-17-9
 MDL Number: MFCD00082145
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
 Quality Release Date: 21 DEC 2010
 Recommended Retest Date: DEC 2012

Test	Specification	Result
Protein by Biuret units/mg protein	10.0 - 25.0 % 0.4 - 1.0	14.1 % 0.8
Activity	One unit will convert 1.0 micromole of xanthine to uric acid per minute at pH 7.5 at 25 deg C ≤ 0.2 %	0.2 %
Uricase		
Recommended Retest Period		
2 years		



Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Lampiran 8. Sertifikat analisis alopurinol

771 P / V 1110

ANJING PHARMA CHEMICAL PLANT

CERTIFICATE OF ANALYSIS

NAME OF THE MATERIAL:ALLOPURINOL USP28/BP2003

Batch Number:20091001 ✓ Date of Mfg :OCT.10,2009

Batch Quantity:1000kgs Date of Exp. :OCT.09,2013

No	TESTS	SPECIFICATION	RESULTS
1.0	DESCRIPTION	A White or almost white powder	A white powder
2.0	SOLUBILITY	Very slightly soluble in water and alcohol Practically insoluble in Ether.It dissolves in dilute solutions of the alkali hydroxide.	Complies
3.0	IDENTIFICATION	As per USP	Complies
4.0	APPEARANCE OF SOLUTION	The solution is clear and not more intense Colored than reference solution Y6 or GY6	<Y6 and GY6
5.0	LOSS ON DRYING	Not more than 0.5%	0.12%
6.0	HEAVY METALS	Not more than 10ppm	Less than 10ppm
7.0	SULPHATED ASH	Not more than 0.1%	0.06%
8.0	RELATED SUBSTANCES BY TLC	As per USP	<0.2%
9.0	RELATED SUBSTANCES BY HPLC	Impurity A not more than 0.2%	0.07%
		Impurity B&C not more than 0.2%	0.14%
		Impurity D or E not more than 0.1%	Not detected
		Individual unknown impurity not more than 0.1%	0.06%
		Total unknown impurities not more than 0.3%	0.12%
10.0	Assay	98.0%-101.0%On dried basis	99.83%
11.0	PARTICLE SIZE	95% < 50 um	Complies
12.0	DENSITY OF SLOP	0.3 +/- 0.05 g / ml	Complies
13.0	DENSITY OF STAMPED	0.40 +/- 0.05 g / ml	Complies
14.0	Residual solvents	Ethanol NMT 1000ppm	Complies
		Other solvent NMT200ppm	Complies
	Organic volatile impurite	Conform with USP28	Complies
	Total bacteria	NMT 1000cfu/g	Complies

REMARKS:The Product confirms to USP28/BP2003Specification with respect to above tests

Universitas Indonesia