



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI PENGHAMBATAN EKSTRAK DAUN SIDAGURI  
(*Sida rhombifolia* L.) TERHADAP AKTIVITAS  
XANTIN OKSIDASE DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN  
SENYAWA PADA FRAKSI YANG AKTIF**

**SKRIPSI**

**SITI MARWAH LESTARI**

**0906601885**

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



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI PENGHAMBATAN EKSTRAK DAUN SIDAGURI  
(*Sida rhombifolia* L.) TERHADAP AKTIVITAS  
XANTIN OKSIDASE DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN  
SENYAWA PADA FRAKSI YANG AKTIF**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi**

**SITI MARWAH LESTARI**

**0906601885**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI SARJANA 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 : Siti Marwah Lestari**

**NPM : 0906601885**

**Tanda Tangan :** 

**Tanggal : 18 Januari 2012**

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Siti Marwah Lestari  
NPM : 0906601885  
Program Studi : Sarjana Ekstensi Farmasi  
Judul Skripsi : Uji Penghambatan Ekstrak Daun Sidaguri  
(*Sida rhombifolia* L.) terhadap Aktivitas Xantin  
Oksidase dan Identifikasi Golongan Senyawa pada  
Fraksi yang Aktif

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

### DEWAN PENGUJI

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

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 18 Januari 2012

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi yang berjudul “Uji Penghambatan Ekstrak Daun Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) terhadap Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Golongan Senyawa pada Fraksi yang Aktif” 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) Allah SWT yang telah memudahkan jalan saya dalam menyelesaikan tulisan ini;
- (2) Dr. Abdul Mun'im, M. Si., Apt, dan Dr. Berna Elya, M. S., Apt, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini;
- (3) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M. S., selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (4) Dra. Azizahwati, M. S., Apt., selaku ketua Program Sarjana Ekstensi Departemen Farmasi FMIPA UI dan saran, serta ilmu yang diberikan dalam pengerjaan penelitian ini;
- (5) Dr. Katrin M. S., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI, serta selaku kepala Laboratorium Fitokimia Departemen Farmasi FMIPA UI ;
- (6) 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;

- (7) Para laboran dan karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu terlaksananya penelitian ini;
- (8) Orang tua saya Masykur Ar. dan Mahmuddah, serta saudari-saudari saya Lisa, Waddah dan keluarga besar saya yang selalu mendo'akan kelancaran penelitian dan penulisan skripsi ini dan yang telah memberikan bantuan dukungan berupa material dan moral;
- (9) Rekan penelitian, Sahabat-sahabatku, dan teman-teman farmasi ekstensi angkatan 2009 yang telah memberikan do'a dan dukungan kepada saya selama penelitian berlangsung;
- (10) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis

Januari 2012

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

---

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

Nama : Siti Marwah Lestari  
NPM : 0906601885  
Program Studi : Sarjana 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 Ekstrak Daun Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) terhadap Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Golongan Senyawa pada Fraksi yang 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 : 18 Januari 2012  
Yang menyatakan



( Siti Marwah Lestari )

## ABSTRAK

Nama : Siti Marwah Lestari  
Program Studi : Sarjana Ekstensi Farmasi  
Judul : Uji Penghambatan Ekstrak Daun Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) terhadap Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Golongan Senyawa pada Fraksi yang Aktif

Xantin oksidase mengkatalisis oksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat. Kadar asam urat yang meningkat memiliki keterkaitan terhadap penyakit *gout*. *Gout* merupakan kelainan metabolik pada katabolisme purin. Salah satu tumbuhan obat yang telah dilaporkan mempunyai efek terhadap penyakit *gout* dan sebagai anti inflamasi adalah tanaman Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.). Tujuan penelitian ini untuk menguji kemampuan daun Sidaguri dalam menghambat aktivitas xantin oksidase dan identifikasi golongan kandungan kimianya. Serbuk simplisia diekstraksi berturut-turut dengan cara maserasi bertingkat menggunakan empat pelarut berdasarkan tingkat kepolaran, yaitu petroleum eter, etil asetat, n-butanol, dan etanol 96%. Pengujian penghambatan aktivitas xantin oksidase dilakukan dengan metode spektrofotometri. Berdasarkan uji penghambatan aktivitas xantin oksidase, semua ekstrak dapat menghambat aktivitas xantin oksidase dengan nilai  $IC_{50}$  1,71  $\mu\text{g/mL}$  pada ekstrak n-butanol;  $IC_{50}$  2,38  $\mu\text{g/mL}$  pada ekstrak etil asetat;  $IC_{50}$  4,64  $\mu\text{g/mL}$  pada ekstrak etanol; dan  $IC_{50}$  9,52  $\mu\text{g/mL}$  pada ekstrak petroleum eter. Pada plot Lineweaver-Burk menunjukkan jenis penghambatan enzim pada ekstrak n-butanol adalah kompetitif. Hasil uji identifikasi kimia pada ekstrak daun sidaguri menunjukkan adanya alkaloid, glikosida, flavonoida, dan terpen.

Kata kunci : Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.), asam urat, *gout*, xantin oksidase.  
xiv + 78 halaman : 22 gambar; 14 tabel; 9 lampiran  
Daftar referensi : 46 (1961-2011)



## ABSTRACT

Name : Siti Marwah Lestari  
Study Program : Extension Pharmacy  
Title : Inhibition of Sidaguri Leaf Extract (*Sida rhombifolia* L.)  
against Xanthine Oxidase Activity and Identification of  
Chemical Constituents in Active Fraction

The xanthine oxidase catalyses the oxidation of hypoxanthine to xanthine and then to uric acid. Increasing uric acid levels have related to gout. Gout is a metabolic disorder in the catabolism of purines. One of the herbs that has been reported to have effect on gout and as an anti-inflammatory is sidaguri (*Sida rhombifolia* L.). The purpose of this study was to test the ability of leaf Sidaguri in inhibiting xanthine oxidase activity and identification of chemical constituents. The sample was macerated respectively with petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol, and 96% ethanol. Inhibition of xanthine oxidase activity test carried out by spectrophotometric methods. Based on xanthine oxidase inhibitory activity test, all the plant extracts were active in inhibiting xanthine oxidase with  $IC_{50}$  value of 1,71  $\mu\text{g/mL}$  on n-butanol extract;  $IC_{50}$  value of 2,38  $\mu\text{g/mL}$  on ethyl acetate;  $IC_{50}$  value of 4,64  $\mu\text{g/mL}$  on 96% ethanol; and  $IC_{50}$  value of 9,52  $\mu\text{g/mL}$  on petroleum ether extract. The Lineweaver-Burk plots showed that the type of n-butanol extract was a competitive inhibition. The results of chemical identification on a sidaguri leaf extract contain alkaloids, glycoside, flavonoids, and terpenes.

Key Words : Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.), uric acid, gout, xanthine oxidase.

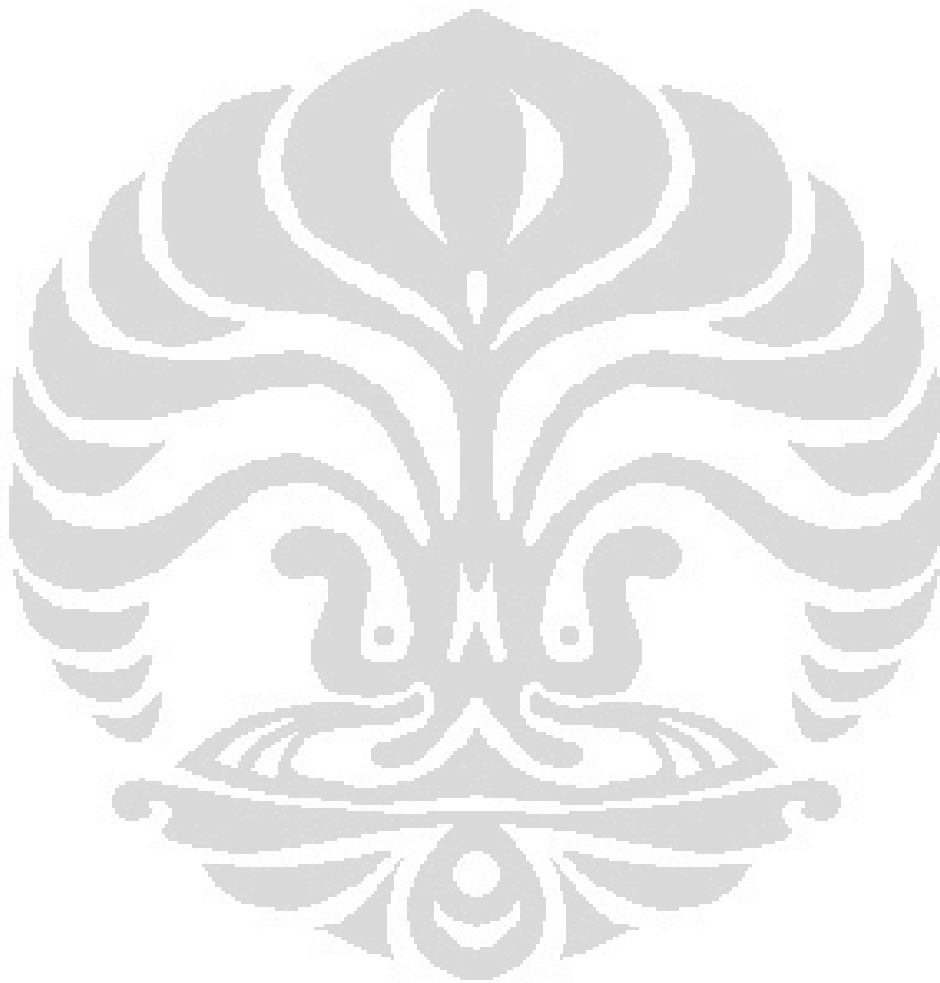
xiv + 78 pages : 22 figures; 14 tables; 9 appendices

Bibliography : 46 (1961-2011 )

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
<b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Sidaguri ( <i>Sida rhombifolia</i> L.).....	4
2.2 Uraian Tanaman.....	4
2.3 Penyakit Asam Urat (Penyakit <i>Gout</i> ).....	5
2.4 Enzim.....	6
2.5 Xantin Oksidase.....	13
2.6 Agen Penghambat Xantin Oksidase.....	14
2.7 Simplisia.....	15
2.8 Ekstraksi.....	16
2.9 Identifikasi Golongan Senyawa.....	17
2.10 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	20
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>21</b>
3.1 Tempat dan Waktu.....	21
3.2 Bahan Uji.....	21
3.3 Bahan Kimia.....	21
3.3 Alat.....	21
3.4 Prosedur Kerja.....	22
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>36</b>
4.1 Ekstraksi Simplisia.....	36
4.2 Uji Pendahuluan.....	36
4.3 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase.....	39

4.4 Kinetika Penghambatan Enzim.....	41
4.5 Identifikasi Kandungan Kimia.....	43
4.6 Kromatografi Lapis Tipis.....	44
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>46</b>
5.1 Kesimpulan.....	46
5.2 Saran.....	46
<b>DAFTAR ACUAN.....</b>	<b>47</b>



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.4.2.1	Pengaruh Konsentrasi Substrat pada Kecepatan Reaksi yang Dikatalisis Enzim..... 7
Gambar 2.4.2.2	Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim..... 8
Gambar 2.4.3.2	Grafik Persamaan <i>Lineweaver-Burk</i> ..... 10
Gambar 2.4.3.3(1)	Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> Plot untuk Penghambat Kompetitif..... 12
Gambar 2.4.3.3(2)	Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> Plot untuk Penghambat Nonkompetitif..... 13
Gambar 2.5	Pembentukan Asam Urat dari Nukleosida Purin Lewat Basa Purin Hipoxantin dan Guanin..... 14
Gambar 2.6	Struktur Kimia Alopurinol..... 15
Gambar 4.2	Aktivitas Enzim pada Berbagai Konsentrasi Substrat..... 38
Gambar 4.4	Plot <i>Lineweaver-Burk</i> Ekstrak Butanol Daun Sidaguri Konsentrasi 0,5 µg/ml dengan Konsentrasi Substrat Xantin 0,25 mM; 0,2 mM; 0,15 mM; 0,1 mM, dan 0,05 mM..... 42
Gambar 4.5	Tanaman Sidaguri ( <i>Sida rhombifolia</i> L.)..... 53
Gambar 4.6	Daun Sidaguri ( <i>Sida rhombifolia</i> L.)..... 53
Gambar 4.7	Spektrofotometer UV-Vis ( <i>PG Instruments Ltd</i> )..... 54
Gambar 4.8	Identifikasi Alkaloid pada Kontrol Positif <i>Chinae Cortex</i> dan pada Ekstrak n-Butanol, serta Ekstrak Etanol 96% Daun Sidaguri..... 54
Gambar 4.9	Reaksi Molish pada Identifikasi Glikosida..... 55
Gambar 4.10	Identifikasi Flavonoida pada REaksi Menggunakan Serbuk Seng dan Serbuk Magnesium..... 55
Gambar 4.11	Identifikasi Terpen dengan Menggunakan Reaksi <i>Liebermann-Burchard</i> ..... 56
Gambar 4.12	Identifikasi Tanin pada Kontrol Positif Daun Teh dan Ekstrak Etanol 96%..... 56
Gambar 4.13	Kontrol Positif <i>Rhei Radix</i> pada Identifikasi Antrakuinon..... 57
Gambar 4.14	Kontrol Positif <i>Liquiritae Radix</i> pada Identifikasi Saponin..... 57
Gambar 5.1	Kromatogram Terpen pada Ekstrak Butanol dengan Eluen Kloroform : Metanol (8:3)..... 58
Gambar 5.2	Kromatogram Alkaloid pada Ekstrak Butanol dengan Eluen Kloroform : Metanol (8:3)..... 59
Gambar 5.3	Kromatogram Flavonoid pada Ekstrak Butanol dengan Eluen Kloroform : Metanol (8:4)..... 60

## DAFTAR TABEL

	Halaman	
Tabel 3.5.4.6	Prosedur Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase pada Semua Ekstrak Daun Sidaguri (sebagai Sampel) dan pada Pembanding Alopurinol.....	30
Tabel 3.5.5.4	Prosedur Uji Kinetika Penghambatan Enzim pada Ekstrak n-Butanol (sebagai Inhibitor) dan Tanpa Penambahan Ekstrak n-Butanol (Tanpa Inhibitor).....	32
Tabel 4.1 (1)	Susut Pengerangan.....	62
Tabel 4.1 (2)	Rendemen Ekstrak.....	62
Tabel 4.2 (1)	Hasil Optimasi Suhu.....	63
Tabel 4.2 (2)	Hasil Optimasi pH.....	63
Tabel 4.2 (3)	Hasil Optimasi Konsentrasi Substrat.....	64
Tabel 4.3 (1)	Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Alopurinol (Sebagai Pembanding).....	64
Tabel 4.3 (2)	Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Petroleum Eter Daun Sidaguri.....	65
Tabel 4.3 (3)	Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Etil Asetat Daun Sidaguri.....	66
Tabel 4.3 (4)	Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Butanol Daun Sidaguri.....	67
Tabel 4.3 (5)	Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Etanol 96% Daun Sidaguri.....	68
Tabel 4.4	Hasil Uji Kinetika Penghambatan Enzim.....	69
Tabel 4.5	Hasil Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Tanaman.....	70

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Skema Kerja..... 72
Lampiran 2	Pembuatan Larutan Uji..... 73
Lampiran 3	Pembuatan Larutan Alopurinol..... 74
Lampiran 4	Perhitungan Xantin Oksidase..... 75
Lampiran 5	Pembuatan Larutan xantin Oksidase..... 75
Lampiran 6	Perhitungan Substrat Xantin..... 76
Lampiran 7	Pembuatan Larutan Substrat Xantin..... 76
Lampiran 8	Hasil Identifikasi/Determinasi Tanaman..... 77
Lampiran 9	Sertifikat Alopurinol..... 78



# BAB 1 PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Nukleosida purin yang utama, yaitu adenosin dan guanin dapat diubah menjadi produk akhir asam urat yang diekskresikan keluar. Pada reaksi tersebut terjadi reaksi pembentukan xantin dari hipoxantin yang dikatalisis oleh xantin oksidase. Selanjutnya xantin teroksidasi menjadi asam urat dalam reaksi kedua yang dikatalisis oleh xantin oksidase (Murray et al., 2003). Jadi xantin oksidase (XO) mengkatalisis reaksi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat (Pacher; Nivorozhkin; dan Szabo, 2006).

Peningkatan produksi asam urat dapat menyebabkan terjadinya serangan *gout* pada orang yang mempunyai kelainan bawaan dalam metabolisme purin (Price dan Wilson, 2005).

Dewasa ini, obat modern yang digunakan untuk pengobatan penyakit *gout* adalah alopurinol (Connor, 2009). Obat ini bereaksi pada xantin oksidase dan bertindak sebagai substrat analog yang bereaksi sebagai inhibitor kompetitif bagi enzim (Astari, 2008). Obat ini merupakan pengobatan jalur utama untuk penyakit *gout* (Pacher; Nivorozhkin; dan Szabo, 2006). Walaupun alopurinol merupakan obat yang efektif untuk mengobati penyakit *gout*, tetapi tidak dapat dihindari bahwa obat ini memiliki beberapa efek samping yang merugikan, yaitu reaksi kulit (kulit menjadi kemerahan), reaksi alergi, gangguan saluran cerna, depresi sumsum tulang, anemia aplastik, trombositopenia, agranulositosis, dan retinopati (Ganiswarna, 1995). Oleh karena itu, dicari senyawa yang memiliki penghambatan terhadap aktivitas xantin oksidase dan memberikan efek samping yang rendah yang berasal dari tumbuhan.

Salah satu tumbuhan obat tersebut adalah tanaman Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) yang telah banyak digunakan secara tradisional untuk mengatasi berbagai penyakit dan telah dilaporkan mempunyai efek terhadap penyakit *gout* dan sebagai anti-inflamasi (Iswantini; Darusman; dan Hidayat, 2009).

Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa flavonoida dari ekstrak metanol-air (9:1) herba *Sida rhombifolia* L. menunjukkan penghambatan aktivitas xantin oksidase yang dilakukan secara *in vitro*, yaitu sampai 55% dan dapat menurunkan kadar asam urat (Iswantini; Darusman; dan Hidayat, 2009). Ekstrak etanol 80% akar sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) berpotensi menghambat aktivitas xantin oksidase dengan persentase penghambatan 33,42% (Laurens, 2010), sedangkan penelitian terhadap ekstrak daun sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) masih terbatas, sehingga peneliti ingin mengetahui efek penghambatan daun *Sida rhombifolia* L. terhadap aktivitas xantin oksidase.

Pada penelitian ini akan dilakukan uji penghambatan aktivitas xantin oksidase pada beberapa ekstrak daun sidaguri dan identifikasi kandungan senyawa pada fraksi yang aktif. Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase dilakukan secara spektrofotometri (Owen dan Johns, 1999). Pembanding yang akan digunakan adalah Alopurinol. Reaksi penghambatan enzimatik tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang 290 nm. Nilai penghambatan ditetapkan dengan menggunakan nilai  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi yang dapat menghambat 50% aktivitas xantin oksidase dalam kondisi pengujian (Umamaheswari et al., 2007). Identifikasi kandungan senyawa dilakukan untuk memeriksa kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalam daun *Sida rhombifolia* L. yang mungkin berperan dalam kemampuan yang ditunjukkan oleh beberapa ekstrak daun *Sida rhombifolia* L. tersebut (Harborne, 1987).

## 1.2 Perumusan Masalah

Alopurinol merupakan obat yang digunakan untuk pengobatan penyakit *gout*, tetapi obat ini memiliki beberapa efek samping yang merugikan, sehingga dicari suatu senyawa yang memiliki kerja yang mirip/sama dengan alopurinol yang berasal dari tumbuhan dan diharapkan memberikan efek samping yang rendah. Salah satunya adalah tanaman sidaguri (*Sida rhombifolia* L.). Pada penelitian terdahulu dilaporkan bahwa flavonoida dari ekstrak metanol-air (9:1) herba dan ekstrak etanol 80% akar *Sida rhombifolia* L. dapat menghambat aktivitas xantin oksidase, sedangkan penelitian pada ekstrak daun



*Sida rhombifolia* L. masih terbatas, sehingga peneliti ingin mengetahui efek penghambatan beberapa ekstrak daun sidaguri terhadap aktivitas xantin oksidase dan dilakukan identifikasi kandungan senyawa pada ekstrak tersebut untuk melihat golongan senyawa yang berperan dalam penghambatan aktivitas xantin oksidase.

### **1.3 Tujuan Penelitian**

- 1.1.1 Untuk menguji penghambatan beberapa ekstrak daun sidaguri terhadap aktivitas xantin oksidase.
- 1.1.2 Untuk mengidentifikasi golongan senyawa dari beberapa ekstrak daun sidaguri pada fraksi yang aktif.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

- a. Menambah data bahan alam yang memiliki potensi sebagai anti-*gout*.
- b. Diperolehnya pengetahuan mengenai kemampuan penghambatan beberapa ekstrak daun sidaguri terhadap aktivitas xantin oksidase.
- c. Diperoleh informasi mengenai golongan senyawa yang terkandung didalam beberapa ekstrak daun sidaguri.
- d. Sebagai salah satu referensi/perbandingan dalam penelitian lebih lanjut.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.)

#### 2.1.1 Klasifikasi Tanaman

Kerajaan	: Plantae
Subkerajaan	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dilleniidae
Bangsa	: Malvales
Suku	: <a href="#">Malvaceae</a>
Marga	: Sida
Jenis	: <i>Sida rhombifolia</i> L.

[Sumber : Jones, 1987; Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991; Tjitrosoopomo, 1991]

### 2.2 Uraian Tanaman

#### 2.2.1 Morfologi

Sidaguri tumbuh liar di tepi jalan, halaman berumput, hutan, ladang, dan tempat-tempat dengan sinar matahari cerah atau sedikit terlindung. Tanaman ini tersebar pada daerah tropis di seluruh dunia dari dataran rendah sampai 1.450 meter di atas permukaan laut. Perdu tegak bercabang ini tingginya dapat mencapai 2 meter dengan cabang kecil berambut rapat. Daun tunggal; letak berseling; bentuknya bulat telur atau lanset; tepi bergerigi; ujung runcing; pertulangan menyirip; bagian bawah berambut pendek warnanya abu-abu; panjang 1,5-4 cm; dan lebar 1–1,5 cm. Bunga tunggal berwarna kuning cerah yang keluar dari ketiak daun, mekar sekitar pukul 12 siang dan layu sekitar tiga jam kemudian. Buah dengan 8–10 kendaga, diameter 6–7 mm (Dalimartha, 2003). Bentuk daun bagian ujung membulat dan panjang, bawah daun meruncing, tepi

daun tidak rata (bergerigi), daun umumnya berbentuk jajaran genjang, bagian bawah hijau pucat atau hijau abu-abu, ibu tulang daun membagi daun menjadi sama besar, anak tulang daun pertama mencapai tulang daun, pada bagian atas daun, tulang daun tampak seperti alur, sedangkan pada bagian bawah daun anak tulang daun menonjol keluar (Depkes RI, 1995).

## 2.2.2 Nama Daerah dan Sinonim

### 2.2.2.1 Nama Daerah

*Sumatera* : Saliguri (Minangkabau), Sidaguri (Melayu). *Jawa* : Sidaguri (Jawa Tengah), Sidagori (Sunda), Taghuri (Madura). *Nusa Tenggara* : Katundu (Sumba). *Maluku* : Hutu gamo (Halmahera), Digo (Ternate).

[Sumber : Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991]

### 2.2.2.2 Sinonim

*S. ainifolia* Lour., *S. philippica* DC., *S. retusa* L., *S. semicrenata* Link., dan *S. spinosa* L.

[Sumber : van Valkenburg dan Bunyapraphatsara, 2002; Dalimartha, 2003]

### 2.2.3 Bagian Tanaman yang Digunakan

Bagian yang digunakan sebagai obat adalah akar, daun dan bunga. Seluruh tumbuhan di atas tanah (herba) dan akar dapat digunakan sebagai obat. Bisa digunakan segar atau yang telah dikeringkan (Dalimartha, 2003).

### 2.2.4 Kandungan Kimia Daun *Sida rhombifolia* L.

Daun *Sida rhombifolia* L. mengandung flavonoid, alkaloida, leukoantosianidin, dan steroid/triterpenoid (Depkes RI, 1995).

## 2.3 Penyakit Asam Urat (Penyakit *Gout*)

*Gout* berasal dari Bahasa Latin yaitu *gutta*, yang berarti tetesan. Menurut kepercayaan bahwa racun menetes ke dalam tulang sendi dan menyebabkan *gout*. Pada tahun 1848, Sir Alfred Garrod menghubungkan *gout* dengan hiperurisemia (Pande, 2006). McCarty dan Hollander (1961) mengidentifikasi kristal mono-

natrium urat monohidrat dalam cairan sinovial pada pasien yang memiliki penyakit *gout* akut. *Gout* merupakan istilah yang dipakai untuk sekelompok gangguan metabolik yang ditandai oleh meningkatnya konsentrasi asam urat (hiperurisemia). *Gout* dapat bersifat primer maupun sekunder. *Gout* primer merupakan akibat langsung pembentukan asam urat tubuh yang berlebihan atau akibat penurunan ekskresi asam urat. *Gout* sekunder disebabkan karena pembentukan asam urat yang berlebihan atau ekskresi asam urat yang berkurang akibat proses penyakit lain atau pemakaian obat-obat tertentu. Apabila terbentuk kristal-kristal mono-natrium urat monohidrat pada sendi-sendi dan jaringan sekitarnya, maka akan mengakibatkan reaksi peradangan yang jika berlanjut akan menimbulkan nyeri hebat yang sering menyertai serangan *gout*. Jika tidak diobati, endapan kristal akan menyebabkan kerusakan yang hebat pada sendi dan jaringan lunak (Price dan Wilson, 2005). Ekskresi netto keseluruhan asam urat pada manusia yang normal berkisar rata-rata 400-600 mg/24 jam (Murray et al., 2003).

## **2.4 Enzim**

### **2.4.1 Definisi enzim, tempat aktif (*active site*), dan inhibitor**

Enzim adalah protein yang mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia (Kuchel dan Ralston, 2006). Enzim adalah katalisis protein yang meningkatkan kecepatan reaksi kimia (Champe; Harvey; dan Ferrier, 2005). Enzim berikatan dengan substrat dan mengarahkannya dengan tepat untuk bereaksi. Enzim kemudian berpartisipasi dalam membentuk dan menguraikan ikatan yang diperlukan untuk membuat produk, membebaskan produk, dan mengembalikan produk ke keadaan semula setelah reaksi selesai (Marks dan Smith, 2000). Substrat adalah suatu molekul atau struktur yang transformasinya dikatalisis oleh enzim (Smith, et al., 2000).

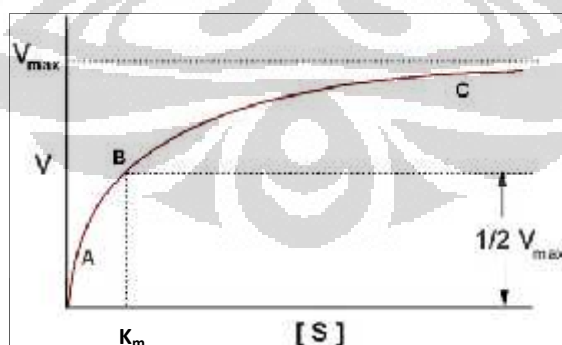
Tempat aktif (*active site*) adalah molekul enzim yang memiliki kantung khusus atau celah. Tempat aktif terdiri dari rantai samping asam amino yang membentuk permukaan tiga dimensi dan sesuai dengan substrat. Apabila tempat aktif berikatan dengan substrat, akan membentuk kompleks enzim-substrat (ES). ES diubah menjadi enzim-produk (EP) yang kemudian terpecah menjadi enzim dan produk (Champe; Harvey; dan Ferrier, 2005).

Inhibitor adalah senyawa yang menurunkan kecepatan reaksi enzimatik (Marks dan Smith, 2000).

## 2.4.2 Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi enzim

### 2.4.2.1 Konsentrasi substrat

Laju atau kecepatan reaksi ( $V$ ) adalah jumlah molekul substrat yang diubah menjadi produk per unit waktu (Champe; Harvey; dan Ferrier, 2005). Jadi, kecepatan semua enzim bergantung pada konsentrasi substrat (Marks dan Smith, 2000). Kecepatan biasanya dinyatakan sebagai  $\mu\text{mol}$  produk yang terbentuk per menit. Laju reaksi enzim yang dikatalisis meningkat oleh konsentrasi substrat selama kecepatan maksimal ( $V_{\text{maks}}$ ) tercapai (Champe; Harvey; dan Ferrier, 2005). Jika konsentrasi substrat meningkat sementara semua kondisi lainnya dipertahankan tetap tak berubah (konstan), percepatan awal yang terukur, maka nilai  $V_i$  (percepatan yang diukur kalau substrat yang sudah bereaksi jumlahnya sedikit sekali) akan meningkat hingga mencapai nilai maksimum ( $V_{\text{maks}}$ ) dan tidak berlanjut. Percepatan reaksi meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat hingga mencapai suatu keadaan di mana enzim tersebut dikatakan sudah “jenuh” oleh substrat. Percepatan awal yang terukur selanjutnya akan meningkatkan konsentrasi substrat, karena substrat terdapat dalam jumlah molar yang berlebihan sehingga melampaui jumlah molar enzim (Murray et al., 2003).



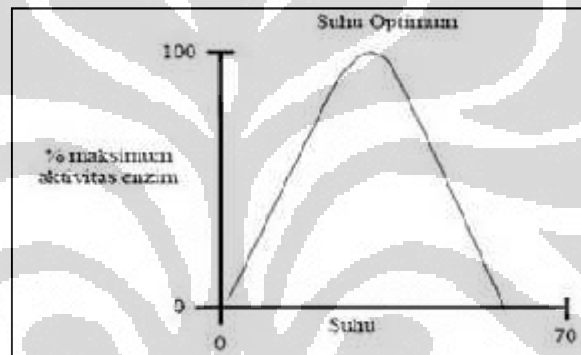
**Gambar 2.4.2.1** Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim

[Sumber : Murray et al., 2003]

### 2.4.2.2 Suhu

Kecepatan reaksi mula-mula meningkat dengan kenaikan suhu dan peningkatan kecepatan reaksi ini disebabkan oleh peningkatan energi kinetik pada molekul-molekul yang bereaksi (Murray et al., 2003). Suhu di atas 35°C atau 40°C akan menyebabkan sebagian besar enzim tumbuhan terdenaturasi sangat cepat, sehingga pada suhu tinggi tidak ada katalis yang efektif untuk menurunkan energi pengaktifan, dan tidak tersedia cukup molekul substrat yang mempunyai energi memadai untuk bereaksi tanpa katalis (Salisbury dan Ross, 1995).

Suhu optimal bergantung pada lamanya pengukuran kadar untuk menentukannya, yaitu semakin lama suatu enzim dipertahankan pada suhu di mana strukturnya tidak begitu stabil, semakin besar kemungkinan enzim tersebut mengalami denaturasi (Murray et al., 2003).



**Gambar 2.4.2.2** Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

[Sumber : Murray et al., 2003]

#### 2.4.2.3 pH

Kalau aktivitas enzim diukur pada beberapa nilai pH, maka aktivitas optimal secara khas terlihat di antara nilai-nilai pH 5 dan 9. Bentuk kurva aktivitas-pH ditentukan oleh : denaturasi enzim pada pH yang tinggi atau rendah dan perubahan status bermuatan pada enzim dan atau substrat. Pada enzim, pH dapat mempengaruhi aktivitas melalui perubahan struktur atau pengubahan muatan pada residu yang berfungsi dalam pengikatan substrat atau katalisis. Nilai pH yang ekstrim akan menurunkan konsentrasi efektif enzim dan substrat, sehingga dapat menurunkan percepatan reaksi (Murray et al., 2003).

### 2.4.3 Kinetika enzim

#### 2.4.3.1 Persamaan Michaelis-Menten

Persamaan Michaelis-Menten menghubungkan kecepatan awal reaksi yang dikatalisis enzim ( $V_i$ ), dengan konsentrasi substrat ( $S$ ), dan dua tolok ukur ( $K_m$  dan  $V_{maks}$ ).  $V_{maks}$  adalah kecepatan reaksi yang diekstrapolasikan ke konsentrasi substrat tak terhingga dan  $K_m$  adalah konsentrasi substrat sewaktu kecepatan awal setara dengan separuh  $V_{maks}$ . Jika  $[S]$  diplotkan dalam grafik terhadap  $V_i$ , maka kurva saturasinya akan berbentuk sigmoid (Murray et al., 2003). Pada model kinetika enzim Michaelis-Menten, kecepatan reaksi sebanding dengan konsentrasi kompleks enzim-substrat. Model ini berlaku bagi reaksi yang paling sederhana, perubahan substrat tunggal menjadi produk tunggal (Marks dan Smith, 2000).

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

Persamaan Michaelis-Menten dapat ditransformasi secara aljabar menjadi bentuk lain yang lebih bermanfaat di dalam pemetaan data percobaan. Suatu transformasi yang umum dilakukan diturunkan secara sederhana dengan membuat kebalikan dari kedua sisi persamaan Michaelis-Menten, yaitu

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m + [S]}{V_{maks} [S]} \quad (2.2)$$

Keterangan :  $V_i$  = kecepatan reaksi awal;  $V_{maks}$  = kecepatan maksimal;  $[S]$  = konsentrasi substrat (molaritas atau mol per liter); dan  $K_m$  = tetapan *Michaelis-Menten* (molaritas atau mol per liter)

#### 2.4.3.2 Transformasi Lineweaver-Burk

$K_m$  dan  $V_{maks}$  untuk suatu enzim dapat ditentukan secara visual dari gambar grafik  $1/V$  terhadap  $1/S$  yang disebut gambar grafik Lineweaver-Burk atau gambar grafik timbal balik ganda (*double reciprocal plot*). Pembalikan kedua sisi persamaan Michaelis-Menten menghasilkan suatu persamaan yang memiliki bentuk garis lurus,  $y = mx + b$ .  $K_m$  dan  $V_{maks}$  masing-masing dapat ditentukan dari garis potong pada absis dan ordinat (Marks dan Smith, 2000). Perlakuan *double reciprocal plot*, memerlukan relatif beberapa titik untuk menyatakan  $K_m$  dan

merupakan metode yang paling sering digunakan untuk menentukan  $K_m$  (Murray et al., 2003).

Persamaan *Lineweaver-Burk* dapat dijelaskan dengan rumus berikut (Murray et al., 2003) :

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

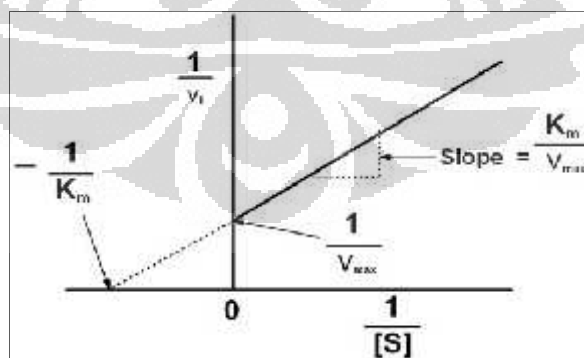
Keterangan :  $V_i$  = kecepatan reaksi awal;  $V_{maks}$  = kecepatan maksimal;  $[S]$  = konsentrasi substrat (molaritas atau mol per liter); dan  $K_m$  = tetapan *Michaelis-Menten* (molaritas atau mol per liter)

Satuan untuk kecepatan reaksi ( $V_i$ ) dapat dinyatakan dalam satuan (unit) apa pun karena  $K_m$  tidak bergantung pada konsentrasi enzim.

Persamaan di atas merupakan persamaan untuk garis lurus  $y = a x + b$ , dimana  $y = 1/V_i$  dan  $x = 1/[S]$ . Jika  $y$  atau  $1/V_i$  diplotkan dalam grafik yang menunjukkan  $x$  atau  $1/[S]$ , maka titik potong  $y$ , yaitu  $b$ , adalah  $1/V_{maks}$ , dan garis potong  $a$ , adalah  $K_m/V_{maks}$ . Titik potong negatif  $x$  dapat dievaluasi dengan mengatur agar  $y = 0$ . Jadi persamaannya :

$$x = -\frac{b}{a} = -\frac{1}{K_m} \quad (2.4)$$

Persamaan 2.1 dapat ditunjukkan dengan grafik berikut:



**Gambar 2.4.3.2** Grafik persamaan *Lineweaver-Burk*

[Sumber : Murray et al., 2003]

$K_m$  dapat diperkirakan dari plot *Lineweaver-Burk* dengan menggunakan garis miring dan titik potong  $y$  atau titik potong negatif  $x$  (Murray et al., 2003).



### 2.4.3.3 Penghambatan aktivitas enzim

#### a. Inhibitor ireversibel

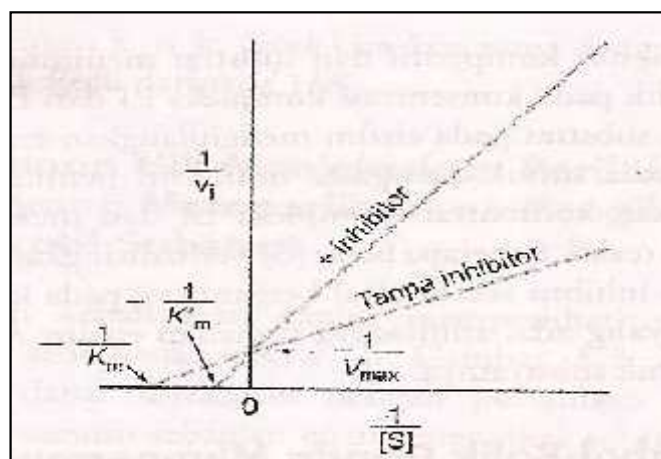
Inhibitor ireversibel membentuk ikatan kovalen atau ikatan yang sangat erat dengan gugus fungsional di tempat aktif. Gugus fungsional ini menjadi aktif apabila berinteraksi dengan residu asam amino pada enzim dan jauh lebih mudah membentuk ikatan kovalen ireversibel dengan obat atau toksin daripada dengan rantai asam amino di bagian lain enzim. Ikatan kovalen yang terbentuk akan terurai dengan sangat lambat sehingga pada dasarnya penghambatan tersebut bersifat ireversibel dan aktivitas hanya dapat pulih melalui sintesis enzim baru (Marks dan Smith, 2000).

#### b. Inhibitor reversibel

Inhibitor reversibel yang berikatan dengan tempat aktif enzim dapat bersifat kompetitif, nonkompetitif, atau *uncompetitive* dalam kaitannya dengan substrat reaksi.

Inhibitor kompetitif “berkompetisi” dengan substrat untuk menempati tempat pengikatan substrat, dan berikatan dengan bentuk enzim yang sama dengan yang dilakukan substrat. Inhibitor ini biasanya adalah analog struktural yang erat dari substrat yang disaingi. Peningkatan konsentrasi substrat dapat mengatasi inhibisi kompetitif sewaktu konsentrasi substrat ditingkatkan ke kadar yang cukup tinggi, tempat pengikatan substrat ditempati oleh substrat dan tidak ada molekul inhibitor yang dapat terikat. Oleh karena itu, inhibitor kompetitif meningkatkan  $K_m$  enzim, tetapi tidak  $V_{maks}$  (Marks dan Smith, 2000).

Penghambatan kompetitif dapat ditunjukkan dengan grafik berikut.



Uji penghambatan..., Siti Marwah Lestari, FMIPA UI, 2012

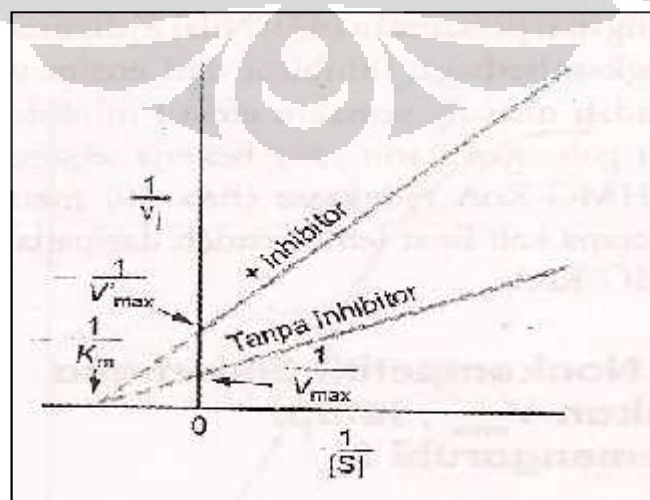
**Gambar 2.4.3.3 (1)** Grafik Lineweaver-Burk plot untuk inhibitor kompetitif

[Sumber : Murray et al., 2003]

Pada konsentrasi inhibitor (I) yang tetap, ditambahkan lebih banyak substrat (S), penambahan ini akan meningkatkan probabilitas bahwa enzim akan lebih banyak berikatan dengan S ketimbang dengan I. Rasio enzim-substrat terhadap enzim-inhibitor dan juga kecepatan reaksi akan naik. Pada konsentrasi S yang cukup tinggi, konsentrasi enzim-inhibitor seharusnya berkurang dan menjadi kecil. Jika demikian, kecepatan reaksi yang dikatalisis akan sama seperti keadaan tanpa adanya I (Murray et al., 2003).

Inhibisi nonkompetitif dalam kaitannya dengan substrat terjadi apabila inhibitor tidak bersaing dengan substrat untuk menempati tempat pengikatan yang sama pada enzim. Inhibitor dapat berikatan dengan enzim dengan atau tanpa keberadaan substrat, dan peningkatan konsentrasi substrat tidak dapat mencegah pengikatan inhibitor. Inhibitor mengakibatkan penurunan konsentrasi enzim aktif. Inhibitor nonkompetitif akan selalu mengubah  $V_{maks}$  enzim, dan dapat mengubah  $K_m$  melalui pengikatan dengan afinitas berbeda dengan bentuk enzim yang berbeda pula (Marks dan Smith, 2000).

Penghambatan nonkompetitif dapat ditunjukkan dengan grafik berikut.



**Gambar 2.4.3.3 (2)** Grafik Lineweaver-Burk plot untuk inhibitor nonkompetitif

[Sumber : Murray et al., 2003]

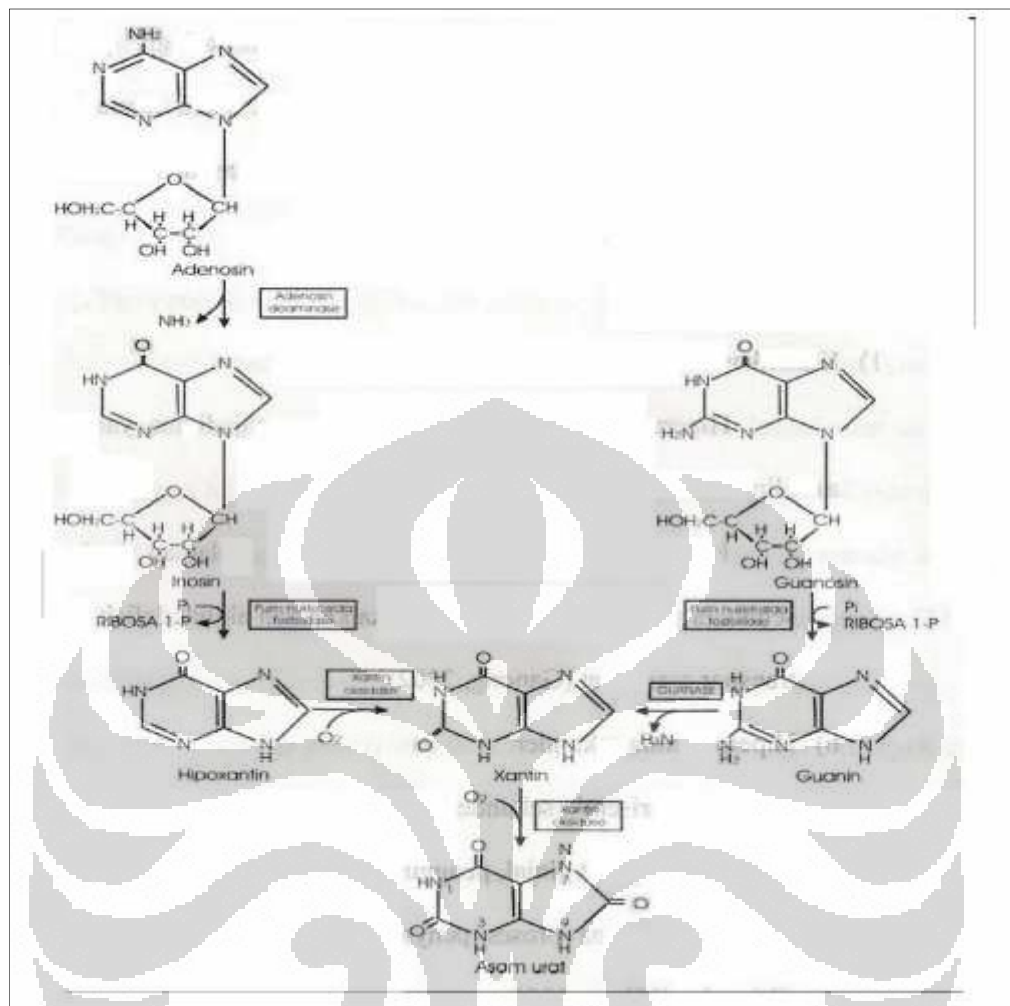
Inhibitor nonkompetitif yang reversibel menurunkan percepatan reaksi maksimal yang diperoleh pada pemberian sejumlah tertentu enzim ( $V_{maks}$  yang lebih rendah) tetapi biasanya tidak mempengaruhi  $K_m$  (Marks dan Smith, 2000).

Inhibitor *uncompetitive* hanya berikatan dengan kompleks enzim-substrat. Inhibitor *uncompetitive* menurunkan  $K_m$  dan  $V_{maks}$  (Marks dan Smith, 2000). Menurunnya nilai  $K_m$  disebabkan oleh besarnya afinitas enzim terhadap substrat, sedangkan menurunnya nilai  $V_{maks}$  disebabkan oleh adanya inhibitor yang berikatan dengan kompleks enzim-substrat, sehingga kecepatan reaksi enzim berkurang (McPherson dan Pincus, 2007).

Inhibisi nonkompetitif hampir mirip dengan inhibisi campuran. Pada inhibisi campuran, nilai  $K_m$  meningkat dan  $V_{maks}$  menurun (Campbell dan Farrell, 2009).

**2.5 Xantin Oksidase**

Xantin oksidase merupakan katalis oksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat, yang memainkan peran penting pada penyakit *gout* (Kong et al., 2000). Reaksinya sebagai berikut :



**Gambar 2.5** Pembentukan asam urat dari nukleosida purin lewat basa purin hipoxantin dan guanin

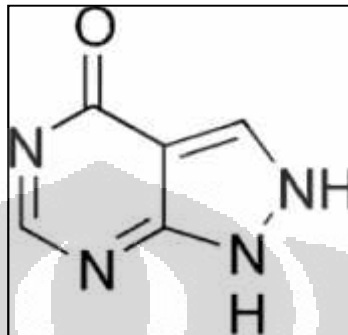
[Sumber : Murray et al., 2003]

Pada mamalia yang bukan primata yang lebih tinggi, enzim urikase akan memecah asam urat dengan membentuk produk akhir alantonin yang bersifat sangat larut dalam air, sedangkan pada manusia dikarenakan manusia kurang mengandung enzim urikase, maka produk akhir katabolisme purin pada manusia adalah asam urat (Murray et al., 2003).

## 2.6 Agen Penghambat Xantin Oksidase

Penghambat xantin oksidase adalah salah satu golongan obat anti-*gout*. Salah satu obat yang termasuk golongan ini adalah alopurinol. Alopurinol berupa serbuk halus berwarna putih hingga hampir putih dan berbau lemak dengan berat

molekul 136.11, serta bersifat sangat sukar larut dalam air dan etanol; larut dalam larutan kalium dan natrium hidroksida; praktis tidak larut dalam kloroform dan dalam eter. Rumus empiriknya adalah  $C_5H_4N_4O$  (Depkes RI, 1995). Struktur kimianya :



**Gambar 2.6** Struktur kimia Alopurinol

[Sumber : Sweetman, 2009)

Alopurinol bertindak menjadi substrat analog yang bereaksi sebagai inhibitor kompetitif bagi enzim. Obat ini bereaksi pada xantin oksidase, yaitu enzim yang mengkatalisis degradasi hipoxantin menjadi xantin dan selanjutnya menjadi asam urat. Penghambatan kerja xantin oksidase menyebabkan degradasi hipoxantin berkurang dan konsentrasi asam urat yang dihasilkan juga ikut berkurang (Astari, 2008).

Alopurinol memiliki efek samping yang merugikan, yaitu pada sistem SSP menyebabkan kantuk; pada sistem dermatologi menyebabkan ruam dan urtikaria; pada sistem gastro intestinal menyebabkan mual, muntah, diare, dan hepatitis; pada sistem hematologi menyebabkan anemia aplastik, trombositopenia, agranulositosis; dan pada ginjal dapat menyebabkan gagal ginjal; selain itu juga dapat terjadi reaksi hipersensitifitas (Ganiswara, 1995; Deglin, 2004).

## 2.7 Simplisia

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

## 2.8 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut. Jadi, ekstrak adalah sediaan yang diperoleh dengan cara ekstraksi tanaman obat dengan ukuran partikel tertentu dan menggunakan medium pengestraksi (*menstrum*) yang tertentu pula (Agoes, 2007).

Terdapat beberapa metode ekstraksi dengan pelarut cair, antara lain cara dingin yaitu maserasi dan perkolasi, serta cara panas yaitu refluks, sokletasi, digesti, infus, dekok. Berikut adalah penjelasan singkat beberapa metode ekstraksi (Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

### 2.8.1 Cara Dingin

Ekstraksi cara dingin meliputi maserasi dan perkolasi. Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (suhu kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya. Sedangkan, perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan atau penampungan ekstrak), terus menerus

sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

### 2.8.2 Cara Panas

Ekstraksi cara panas meliputi refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok. Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C. Infus 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). Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor-faktor yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan pelarut di antaranya adalah selektivitas, kemudahan bekerja, ekonomis, ramah lingkungan, serta keamanan (Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

## 2.9 Identifikasi Golongan Senyawa

### 2.9.1 Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan sebagai bagian dari sistem siklik (Harborne, 1987). Nitrogen itu sering bertindak sebagai basa (menerima ion hidrogen), sehingga banyak alkaloid yang bersifat agak basa (Salisbury dan Ross, 1995). Alkaloid kebanyakan berbentuk kristal, tetapi hanya sedikit yang berupa

cairan (misalnya nikotina) pada suhu kamar (Harborne, 1987) dan bersifat agak larut dalam air (Salisbury dan Ross, 1995).

### 2.9.2 Glikosida

Glikosida adalah senyawa organik hemiasetal yang biasanya berhubungan dengan anomer karbon dari gula (glikon) dengan alkohol atau fenol hidroksil dari molekul bukan gula (aglikon) (Farnsworth, 1966).

### 2.9.3 Saponin

Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah (Harborne, 1987).

### 2.9.4 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa turunan 1,3-difenilpropan yang umumnya tersebar di seluruh dunia tumbuhan. Kerangka dasar flavonoid biasanya diubah sedemikian rupa, sehingga terdapat lebih banyak ikatan rangkap yang menyebabkan senyawa itu menyerap cahaya tampak dan membuatnya menjadi berwarna (Salisbury dan Ross, 1995). Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau ammonia, sehingga mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi dan karena itu menunjukkan pita serapan pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak (Harborne, 1987).

### 2.9.5 Tanin

Tanin terdapat luas dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air. Secara kimia terdapat dua jenis utama tanin, yaitu tanin terkondensasi (flavolan) dan tanin terhidrolisis (Harborne, 1987). Tanin terhidrolisis memberikan warna biru-hitam dengan



penambahan larutan besi (III) klorida, sedangkan tanin terkondensasi memberikan warna hijau-coklat dengan penambahan larutan besi (III) klorida (Rangari, 2007).

#### 2.9.6 Kuinon/Antrakuinon

Kuinon adalah senyawa berwarna dan mempunyai kromofor dasar seperti kromofor pada benzokuinon yang terdiri atas dua gugus karbonil yang berkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbon. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dapat dipilah menjadi empat kelompok : benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon, dan kuinon isoprenoid (Harborne, 1987). Antrakuinon adalah senyawa kuinon yang paling banyak muncul di alam (Farnsworth, 1966).

#### 2.9.7 Terpen

Semua terpenoid berasal dari molekul isoprena  $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_3) - \text{CH} = \text{CH}_2$  dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan  $\text{C}_5$ . Secara kimia, terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat di dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya terpenoid diekstraksi dari jaringan tumbuhan dengan memakai eter minyak bumi, eter atau kloroform, dan dapat dipisahkan secara kromatografi pada *silica gel* atau alumina memakai pelarut di atas (Harborne, 1987).

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon  $\text{C}_{30}$  asiklik, yaitu skualena. Triterpenoid berupa senyawa tak berwarna, dan berbentuk kristal (Harborne, 1987).

Sterol adalah triterpena yang kerangka dasarnya sistem cincin siklopentana perhidrofenantrena (Harborne, 1987).

Uji yang banyak digunakan adalah reaksi Lieberman-Burchard (anhidrida asetat-asam sulfat pekat) yang dengan kebanyakan triterpena dan sterol memberikan warna hijau-biru (Harborne, 1987).

### 2.10 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase

atau lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, dan ukuran molekul, sehingga masing-masing zat dapat diidentifikasi atau ditetapkan dengan metode analitik (Depkes RI, 1995).

Teknik kromatografi memiliki dua fase, yaitu fase gerak yang membawa zat terlarut melalui media hingga terpisah dari zat terlarut lainnya yang terelusi lebih awal atau lebih akhir. Fase diam dapat bertindak sebagai penjerap. Umumnya zat terlarut dibawa melewati media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan yang disebut eluen (Depkes RI, 1995).

Prosedur identifikasi secara kromatografi lapis tipis adalah dibuat larutan uji seperti yang tertera pada masing-masing monografi. Pada garis sejajar dan berjarak lebih kurang 2 cm dari tepi lempeng kromatografi lapis tipis *silica gel* setebal 0,25 mm dan mengandung zat berfluoresensi yang sesuai seperti yang tertera pada kromatografi, ditotolkan masing-masing 10 µl larutan uji dan larutan baku. Totolan dibiarkan mengering, lalu dielusi dengan fase gerak yang sesuai hingga pelarut merambat tiga perempat tinggi lempeng. Lempeng di angkat, kemudian batas elusi ditandai dan fase gerak dibiarkan menguap. Pada lempeng dilakukan pengamatan langsung jika senyawanya tampak pada cahaya biasa atau diamati di bawah cahaya ultraviolet 254 nm/366 nm atau pengamatan dengan cahaya biasa/cahaya ultraviolet setelah disemprot dengan pereaksi yang membuat bercak tersebut tampak (pereaksi sebaiknya disemprotkan melalui alat pengabut) dan harga  $R_f$  bercak larutan uji dapat dihitung (Depkes RI, 1995).

Harga  $R_f$  suatu senyawa adalah perbandingan jarak rambat suatu senyawa tertentu terhadap jarak rambat fase gerak yang diukur dari titik penotolan (Depkes RI, 1995).

$$R_f = \frac{\text{jarak rambat suatu senyawa tertentu}}{\text{jarak rambat fase gerak yang diukur dari titik penotolan}}$$

(2.5)

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI) Depok mulai bulan Agustus 2011 sampai November 2011.

#### **3.2 Bahan Uji**

Bagian tanaman yang diteliti adalah daun kering *Sida rhombifolia* L. yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITRO) dan dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor.

#### **3.3 Bahan Kimia**

Larutan petroleum eter, etil asetat, n-butanol, etanol 96% teknis yang telah didestilasi, susbtrat xantin (Sigma), *xanthine oxidase from bovine milk X-4376 - 5* UN (Sigma), Alopurinol (Pyridam Farma), kalium dihidrogen ortofosfat (Merck, Jerman), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, Jerman), asam klorida (Merck, Jerman), Bouchardat LP, Mayer LP, Dragendorff LP, iodium (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Univar, USA), natrium sulfat anhidrat (Merck, Jerman), metanol, asam sulfat (Merck, Jerman), Molish LP, asan asetat anhidrat (Univar, USA), serbuk seng (Merck, Jerman), serbuk magnesium (Merck, Jerman), natrium karbonat (Merck, Jerman), natrium klorida (Mallinckrodt Chemicals, USA), gelatin (Merck, Jerman), besi (III) klorida, eter, benzena (Merck, Jerman), kloroform, isopropanol, aseton, serbuk asam borat (Merck, Jerman), dan serbuk asam oksalat (Merck, Jerman), serta lempeng KLT *silica gel 60 F<sub>254</sub>* (Merck, Jerman).

#### **3.4 Alat**

*Shaker*, bejana maserasi, penguap vakum putar (*rotary vacuum evaporator*) (Janke & Kunkel IKA, Jerman), pipet mikro 10-100  $\mu$ L, pipet mikro 100-1000  $\mu$ L

(Eppendorf, Jerman), spektrofotometer UV-Vis (*PG Instruments Ltd*), kuvet kuarsa (Merck, Jerman), plat tetes, *freezer* (Sanyo), dan alat-lat gelas.

### 3.5 Prosedur Kerja

#### 3.5.1 Ekstraksi

Sebanyak 1200 g serbuk kering daun *Sida rhombifolia* L. dimasukkan ke dalam bejana maserasi, kemudian ditambahkan kedalamnya 5 L petroleum eter hingga merendam serbuk, dan selanjutnya dikocok selama 6 jam dan dibiarkan dalam bejana maserasi selama 18 jam. Selanjutnya cairan penyari dipisahkan dari residu dan disimpan dalam wadah penampungan. Selanjutnya residu diekstraksi kembali dengan cara yang sama. Dilakukan pengulangan maserasi sebanyak 5 kali hingga diperoleh warna cairan penyari jernih. Ekstrak cair yang diperoleh dikumpulkan menjadi satu dan dipekatkan dengan menggunakan rotavapor pada suhu 50°C, hingga diperoleh ekstrak kental (pelarut hilang dengan sempurna dan ekstrak tidak dapat dituang/tidak dapat mengalir), selanjutnya ekstrak kental ditimbang menggunakan timbangan analitik untuk mengetahui rendemen yang dihasilkan. Ampas kemudian berturut-turut diekstraksi dengan cara yang sama menggunakan etil asetat, n-butanol, dan etanol 96%.

Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal.

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot serbuk simplisia}} \times 100\%$$

(3.1)

#### 3.5.2 Penyiapan Larutan Pereaksi

##### 3.5.2.1 Pereaksi Identifikasi Kandungan Kimia

###### a. Larutan Pereaksi Bouchardat (Depkes RI, 1995)

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

b. Larutan Pereaksi Mayer (Depkes RI, 1995)

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

c. Larutan Pereaksi Dragendorff (Depkes RI, 1995)

Pereaksi Dragendorff dibuat dari campuran 20 mL larutan bismuth nitrat P 40% b/v dalam asam nitrat P dan larutan 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. Kedua larutan dicampur, dan didiamkan hingga memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan diencerkan dengan air secukupnya hingga 100 mL.

d. Larutan Pereaksi Molish (Depkes RI, 1995)

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

3.5.2.2 Pereaksi Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

a. Larutan Dapar Fosfat 0,05 M pH 7,5

Dibuat dengan mencampur 6,805 g kalium dihidrogen ortofosfat ke dalam 600 mL air bebas karbondioksida P, lalu ditambahkan 18 mL larutan natrium hidroksida 2 N dan dicukupkan volumenya hingga 1000 mL. Sesuaikan pH larutan menjadi 7,5 dengan natrium hidroksida 0,2 N atau asam klorida 0,2 N.

b. Larutan Dapar Fosfat 0,05 M pH 7,8

Ditimbang kalium dihidrogen ortofosfat sebanyak 1,3609 g dan dilarutkan ke dalam 200 mL air bebas karbondioksida P. Dapar dibuat dengan mencampur 50 mL kalium dihidrogen fosfat 0,05 M dengan 44,5 mL natrium hidroksida 0,2 N

dan diencerkan dengan air bebas karbondioksida P secukupnya hingga 200 mL. Sesuaikan pH larutan menjadi 7,8 dengan natrium hidroksida 0,2 N atau asam klorida 0,2 N.

c. Larutan Dapar Fosfat 0,05 M pH 8,0

Dibuat dengan mencampur 25 mL kalium dihidrogen fosfat 0,05 M dengan 23,05 mL natrium hidroksida 0,2 N dan diencerkan dengan air bebas karbondioksida P secukupnya hingga 100 mL. Sesuaikan pH larutan menjadi 8 dengan natrium hidroksida 0,2 N atau asam klorida 0,2 N.

d. Larutan Dapar Fosfat 0,05 M pH 8,3

Dibuat dengan mencampur 25 mL kalium dihidrogen fosfat 0,05 M dengan 25 mL natrium hidroksida 0,2 N dan diencerkan dengan air bebas karbondioksida P secukupnya hingga 100 mL. Sesuaikan pH larutan menjadi 8,3 dengan natrium hidroksida 0,2 N atau asam klorida 0,2 N.

e. Larutan Dapar Fosfat 0,05 M pH 8,5

Dibuat dengan mencampur 25 mL kalium dihidrogen fosfat 0,05 M dengan 26,5 mL natrium hidroksida 0,2 N dan diencerkan dengan air bebas karbondioksida P secukupnya hingga 100 mL. Sesuaikan pH larutan menjadi 8,5 dengan natrium hidroksida 0,2 N atau asam klorida 0,2 N.

f. Larutan Uji

Ditimbang 10 mg ekstrak kental lalu ditambahkan 5 tetes dimetil sulfoksida (DMSO) dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Larutan ekstrak diencerkan dengan penambahan air suling bebas karbondioksida P hingga 10 mL, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Selanjutnya dilakukan pengenceran sampai diperoleh larutan dengan konsentrasi 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL; 50 µg/mL; dan 100 µg/mL.

#### g. Larutan Alopurinol

Ditimbang 10 mg Alopurinol lalu ditambahkan 5 tetes NaOH 1 N dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Larutan ekstrak diencerkan dengan penambahan air suling bebas karbondioksida P hingga 10 mL, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Selanjutnya dilakukan pengenceran sampai diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; dan 2,0 µg/mL.

#### h. Larutan Xantin Oksidase

Larutan enzim dibuat dengan cara 9,09 mg xantin oksidase dilarutkan dalam 10 ml larutan dapar kalium fosfat pH optimum dalam kondisi dingin, sehingga diperoleh larutan enzim 0,1 U/mL.

#### i. Larutan Substrat Xantin

Pada pembuatan beberapa konsentrasi substrat, dilakukan pengenceran dari larutan substrat 1 mM. Sebanyak 15,21 mg xantin ditimbang dan melarutkannya dengan 3 tetes NaOH 1 N, kemudian diencerkan dalam 100 mL air suling bebas karbondioksida P maka diperoleh larutan substrat 1 mM. Larutan substrat 1 mM diencerkan sehingga diperoleh larutan substrat 0,25 mM; 0,2 mM; 0,15 mM; 0,1 mM, dan 0,05 mM.

### 3.5.3 Uji Pendahuluan

#### 3.5.3.1 Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan dapar fosfat 50 mM pH 7,5 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin 0,15 mM, kemudian dilakukan pra inkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit, lalu ditambahkan 0,1 mL larutan enzim 0,1 U/mL dalam dapar fosfat. Kemudian campuran diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit. Lalu segera ditambahkan HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

### 3.5.3.2 Penentuan suhu optimum

Larutan dapar fosfat 50 mM pH 7,5 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin 0,15 mM, kemudian dilakukan preinkubasi pada suhu 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C selama 10 menit, lalu ditambahkan 0,1 mL larutan enzim 0,1 U/mL dalam dapar fosfat. Kemudian campuran diinkubasi pada suhu 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C selama 30 menit. Lalu segera ditambahkan HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

### 3.5.3.3 Penentuan pH optimum

Larutan dapar fosfat 50 mM dengan pH masing-masing 7,5; 7,8; 8,0; 8,3; dan 8,5 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin konsentrasi 0,15 mM, kemudian dilakukan preinkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit, lalu ditambahkan 0,1 mL larutan enzim 0,1 U/mL dalam dapar fosfat. Selanjutnya campuran diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Kemudian segera ditambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

### 3.5.3.4 Penentuan konsentrasi xantin optimum

Larutan dapar fosfat 50 mM pH 7,8 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan xantin dengan konsentrasi 0,25 mM; 0,2 mM; 0,15 mM; 0,1 mM; dan 0,05 mM, kemudian dilakukan preinkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit, lalu ditambahkan 0,1 mL larutan enzim 0,1 U/mL dalam dapar fosfat. Campuran diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Kemudian segera ditambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

### 3.5.4 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

Aktivitas xantin oksidase dengan xantin sebagai substrat diukur secara spektrofotometri menggunakan prosedur Owen dan Johns (1999), serta prosedur



Umamaheswari et al. (2007) dan Umamaheswari et al. (2009) yang disertai dengan modifikasi. Semua ekstrak yang dihasilkan diukur penghambatan aktivitas xantin oksidase-nya. Penghambatan aktivitas xantin oksidase diuji secara spektrofotometri di bawah kondisi aerob. Larutan uji sebanyak 1 mL dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml, ditambahkan 2,9 mL 50 mM dapar fosfat (pH 7,5) dan 2 mL larutan substrat (Xantin 0,15 mM dalam dapar fosfat pH 7,5). Setelah dilakukan pra inkubasi pada suhu 25°C selama 15 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 0,1 mL larutan enzim (0,1 U/mL dalam dapar fosfat (pH 7,5)). Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu 25°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 290 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Larutan blanko disiapkan dengan cara yang sama, tapi larutan enzim ditambahkan setelah penambahan HCl 1 N. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali. Satu unit xantin oksidase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 mmol asam urat per menit pada suhu 25°C. Alopurinol (Sigma) digunakan sebagai standar inhibitor dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml (Owen dan Johns, 1999; Umamaheswari et al., 2007; Umamaheswari et al., 2009).

Aktivitas xantin oksidase dinyatakan sebagai persen penghambatan xantin oksidase yang dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{A - B}{A} \times 100\% \quad (3.2)$$

Keterangan : A adalah perubahan serapan uji tanpa ekstrak ( $\Delta\text{abs. dengan adanya enzim} - \Delta\text{abs. tanpa enzim}$ ), dan B adalah perubahan serapan uji dengan adanya ekstrak ( $\Delta\text{abs. dengan adanya enzim} - \Delta\text{abs. tanpa enzim}$ ).

Nilai  $IC_{50}$  dihitung menggunakan rumus persamaan regresi untuk menentukan  $y = a + bx$ . Aktivitas inhibisi dinyatakan dengan *Inhibition Concentration 50%* ( $IC_{50}$ ) yaitu konsentrasi sampel yang dapat menghambat kerja xantin oksidase sebesar 50% (Murray, 2009).

Jika  $y = 50$ , maka persamaannya menjadi :

$$50 = a + bx$$

$$\text{Maka, } x = \frac{50 - a}{b}$$
(3.3)

#### 3.5.4.1 Pengujian blanko

Larutan dapar fosfat 50 mM (pH 7,8) sebanyak 2,9 mL dan 2 mL larutan substrat (Xantin 0,15 mM dalam dapar fosfat (pH 7,8)). Setelah dilakukan pra-inkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 0,1 mL larutan enzim (0,1 U/mL dalam dapar fosfat (pH 7,8)). Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

#### 3.5.4.2 Pengujian kontrol blanko

Larutan dapar fosfat 50 mM (pH 7,8) sebanyak 3,0 mL dan 2 mL larutan substrat (Xantin 0,15 mM dalam dapar fosfat (pH 7,8)). Setelah dilakukan inkubasi pada suhu 30°C selama 40 menit ditambahkan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

#### 3.5.4.3 Pengujian sampel

Larutan sampel (ekstrak) sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml, dan 100 µg/ml, ditambahkan 2,9 mL 50 mM dapar fosfat (pH 7,8) dan 2 mL larutan substrat (Xantin 0,15 mM dalam dapar fosfat (pH 7,8)). Setelah dilakukan pra inkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 0,1 mL larutan enzim (0,1 U/mL dalam dapar fosfat (pH 7,8)). Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

#### 3.5.4.4 Pengujian kontrol sampel

Larutan sampel (ekstrak) sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml, dan 100 µg/ml, ditambahkan 50 mM dapar fosfat (pH 7,8) sebanyak 3,0 mL dan 2 mL larutan substrat (Xantin 0,15 mM dalam dapar fosfat (pH7,8)). Setelah dilakukan inkubasi pada suhu 30°C selama 40 menit ditambahkan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

#### 3.5.4.5 Pengujian pembandingan (Alopurinol)

Larutan Alopurinol sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 0,1 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; dan 2,0 µg/ml, lalu ditambahkan 2,9 mL 50 mM dapar fosfat (pH 7,8) dan 2 mL larutan substrat (Xantin 0,15 mM dalam dapar fosfat (pH7,8)). Setelah dilakukan pra inkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 0,1 mL larutan enzim (0,1 U/mL dalam dapar fosfat (pH 7,8)). Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

#### 3.5.4.6 Pengujian kontrol pembandingan (Alopurinol)

Larutan Alopurinol sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 0,1 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; dan 2,0 µg/ml, lalu ditambahkan 3,0 mL 50 mM dapar fosfat (pH 7,8) dan 2 mL larutan substrat (Xantin 0,15 mM dalam dapar fosfat (pH7,8)). Setelah dilakukan inkubasi pada suhu 30°C selama 40 menit ditambahkan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Tabel 3.5.4.6. Prosedur Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase pada Semua Ekstrak Daun Sidaguri (sebagai Sampel) dan pada Pembanding Alopurinol

Reagen	Volume (mL)			
	B <sub>1</sub>	B <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>0</sub>
Sampel	-	-	1,0	1,0
Dapar	2,9	3,0	2,9	3,0
Substrat	2,0	2,0	2,0	2,0
Inkubasi selama 10 menit pada suhu 30°C				
Enzim	0,1	-	0,1	-
Inkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C				
HCl 1 N	1,0	1,0	1,0	1,0
Ukur absorbansi pada $\lambda = 284 \text{ nm}$				

Keterangan : B<sub>1</sub> = blanko (tanpa penambahan beberapa ekstrak daun sidaguri); B<sub>0</sub> = kontrol blanko (tanpa penambahan beberapa ekstrak daun sidaguri dan enzim); S<sub>1</sub> = sampel (ekstrak petroleum eter, ekstrak etil asetat, ekstrak n-butanol, dan ekstrak etanol 96%) dan pembanding alopurinol; dan S<sub>0</sub> = kontrol sampel dan kontrol pembanding alopurinol

### 3.5.4.7 Perhitungan Aktivitas Enzim

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{\Delta \frac{A_{284 \text{ nm}}}{\text{menit}} \cdot \text{uji} - \Delta \frac{A_{284 \text{ nm}}}{\text{menit}} \cdot \text{blanko}}{(6)(df)} \quad (3.4)$$

Keterangan : 6 = volume total larutan uji (mL); df = faktor pengenceran; 12,2 = koefisien ekstingsi asam urat pada 284 nm (mM); 0,1 = volume enzim yang digunakan (mL).

### 3.5.5 Uji Kinetika Penghambatan Enzim

#### 3.5.5.1 Pengujian tanpa inhibitor

Larutan dapar fosfat 50 mM (pH 7,8) sebanyak 2,9 mL dan 2 mL larutan substrat (Xantin 0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM; 0,25 mM dalam dapar fosfat (pH7,8)). Setelah dilakukan pra inkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 0,1 mL larutan enzim (0,1 U/mL dalam dapar fosfat (pH 7,8)). Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL HCl 1 N,

kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

#### 3.5.5.2 Pengujian kontrol tanpa inhibitor

Larutan dapar fosfat 50 mM (pH 7,8) sebanyak 3,0 mL dan 2 mL larutan substrat (Xantin 0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM; 0,25 mM dalam dapar fosfat (pH 7,8)). Dilakukan inkubasi pada suhu 30°C selama 40 menit, lalu ditambahkan 1 mL HCl 1 N. Kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

#### 3.5.5.3 Pengujian dengan inhibitor

Larutan ekstrak sebagai inhibitor sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 0,1 µg/ml; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; dan 5 µg/ml, lalu ditambahkan 2,9 mL 50 mM dapar fosfat (pH 7,8) dan 2 mL larutan substrat (Xantin 0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM; 0,25 mM dalam dapar fosfat (pH7,8)). Setelah dilakukan pra inkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 0,1 mL larutan enzim (0,1 U/mL dalam dapar fosfat (pH 7,8)). Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

#### 3.5.5.4 Pengujian kontrol dengan inhibitor

Larutan ekstrak sebagai inhibitor sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 0,1 µg/ml; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; dan 5 µg/ml, ditambahkan 3,0 mL 50 mM dapar fosfat (pH 7,8), dan 2 mL larutan substrat (Xantin 0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM; 0,25 mM dalam dapar fosfat (pH7,8)). Dilakukan inkubasi pada suhu 30°C selama 40 menit, lalu ditambahkan 1 mL HCl 1 N. Kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Tabel 3.5.5.4 Prosedur Uji Kinetika Penghambatan Enzim pada Ekstrak n-Butanol (sebagai Inhibitor) dan Tanpa Penambahan Ekstrak n-Butanol (Tanpa Inhibitor)

Reagen	Volume (mL)			
	B <sub>1</sub>	B <sub>0</sub>	I <sub>1</sub>	I <sub>0</sub>
Ekstrak	-	-	1,0	1,0
Dapar	2,9	3,0	2,9	3,0
Substrat	2,0	2,0	2,0	2,0
Inkubasi selama 10 menit pada suhu 30°C				
Enzim	0,1	-	0,1	-
Inkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C				
HCl 1 N	1,0	1,0	1,0	1,0
Ukur absorbansi pada $\lambda = 284 \text{ nm}$				

Keterangan : B<sub>1</sub> = tanpa inhibitor (tanpa ekstrak n-butanol); B<sub>0</sub> = kontrol tanpa inhibitor (tanpa penambahan ekstrak n-butanol dan enzim); I<sub>1</sub> = dengan inhibitor (penambahan ekstrak n-butanol); dan I<sub>0</sub> = kontrol dengan inhibitor (penambahan ekstrak n-butanol dan enzim)

### 3.5.6 Identifikasi Kandungan Kimia

#### 3.5.6.1 Identifikasi alkaloid (Depkes RI, 1995)

Ekstrak kental 50 mg dilarutkan dengan 9 ml air suling dan 1 ml HCL 2 N, kemudian panaskan di atas penangas air selama 2 menit, lalu dinginkan. Selanjutnya disaring dan filtrat digunakan sebagai larutan percobaan yang akan digunakan dalam pengujian berikut :

- a. Sejumlah 1 ml filtrat pada kaca arloji, ditambahkan 2 tetes Bouchardat LP. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan coklat hitam.
- b. Sejumlah 1 ml filtrat pada kaca arloji, ditambahkan 2 tetes Mayer LP. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning yang larut dalam metanol P.
- c. Sejumlah 1 ml filtrat pada kaca arloji, ditambahkan 2 tetes Dragendorff LP. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga coklat.

Kontrol positif yang digunakan untuk identifikasi alkaloid adalah Chinae Cortex (*Cinchona officinalis*).

### 3.5.6.2 Identifikasi glikosida (Depkes RI, 1995)

Ekstrak kental 300 mg ditambahkan 25 ml air dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M, kocok, diamkan selama 5 menit dan saring. Sari filtrat tiga kali, tiap kali dengan 20 ml campuran (3:2) kloroform P dan isopropanol P. Pada kumpulan sari ditambahkan natrium sulfat anhidrat, disaring, dan diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50°. Dilarutkan sisa dengan 2 ml methanol. Larutan ini digunakan sebagai larutan percobaan.

- a. Diuapkan larutan percobaan sebanyak 1 mL hingga kering, sisanya ditambahkan 5 ml asam asetat anhidrat P dan 10 tetes asam sulfat P. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna biru atau hijau, menunjukkan adanya glikosida (Reksi Liebermann-Burchard).
- b. Larutan percobaan sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya dilarutkan dengan 2 mL air dan 5 tetes Molish LP. Kemudian ditambahkan 2 mL asam sulfat P dengan hati-hati. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan, menunjukkan adanya ikatan gula (Reaksi Molish).

Kontrol positif yang digunakan untuk identifikasi glikosida adalah *Nerium Folium* (*Nerium oleander* L.)

### 3.5.6.3 Identifikasi saponin (Depkes RI, 1995)

Ekstrak kental 50 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air suling panas, didinginkan, dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N, buih tidak hilang.

Kontrol positif yang digunakan untuk identifikasi saponin adalah *Liquiritiae Radix* (*Glycyrrhiza glabra* L.).

### 3.5.6.4 Identifikasi Flavonoid (Depkes RI, 1995)

- a. Ekstrak kental 50 mg dilarutkan dalam 5 ml etanol 95% kemudian dilakukan percobaan sebagai berikut.

Diambil 2 ml larutan ekstrak, ditambahkan 0,5 gram serbuk seng, kemudian ditambahkan 2 ml asam klorida 2N, didiamkan 1 menit. Setelah itu tambahkan 10 tetes asam klorida pekat. Dikocok perlahan, kemudian didiamkan 2-5 menit. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna merah intensif, menunjukkan adanya flavonoida (glikosida-3-flavonol).

Diambil 2 ml larutan ekstrak, ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium. Kemudian ditambahkan 10 tetes asam klorida pekat. Dikocok perlahan. Terbentuk warna merah jingga hingga merah ungu yang menunjukkan positif adanya flavonoida. Jika terjadi warna kuning jingga, menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron.

- b. Ekstrak kental 500 mg dilarutkan dengan aseton. Kemudian ditambahkan sedikit serbuk asam borat dan asam oksalat, dipanaskan hati-hati di atas penangas air. Ditambahkan 10 ml eter dan diamati dengan sinar ultraviolet 366 nm. Larutan akan berfluoresensi kuning intensif yang menunjukkan positif flavonoida.

Kontrol positif yang digunakan untuk identifikasi flavonoid adalah daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*).

#### .5.7.5 Identifikasi tanin (Farnsworth, 1966)

Ekstrak kental 200 mg dilarutkan dalam 5 mL air suling panas dan diaduk. Setelah dingin disentrifugasi dan bagian cairan didekantisir dan diberi larutan natrium klorida 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  $\text{FeCl}_3$  3% dan diperhatikan terjadinya perubahan warna menjadi hijau coklat atau biru hitam.
- c. Ditambahkan 3 mL larutan NaCl-gelatin (larutan gelatin 1% dalam larutan NaCl 10%) dan diperhatikan adanya endapan.

Kontrol positif yang digunakan untuk identifikasi tanin adalah daun teh (*Camellia sinensis*).



#### 3.5.6.5 Identifikasi kuinon/antrakuinon (Depkes RI, 1995)

Ekstrak 20 mg dilarutkan dengan 5 mL asam sulfat 2 N, dipanaskan sebentar kemudian didinginkan. Ditambahkan 10 mL benzen P, dikocok, dan didiamkan. Dipisahkan lapisan benzena, disaring, filtrat berwarna kuning menunjukkan adanya antrakuinon. Dikocok lapisan benzena dengan 1 mL sampai 2 mL natrium hidroksida 2 N, didiamkan, lapisan air berwarna merah intensif dan lapisan benzena tidak berwarna.

Kontrol positif yang digunakan untuk identifikasi glikosida adalah Rhei Radix (*Rheum officinale*).

#### 3.5.6.6 Identifikasi terpen (Farnsworth, 1966)

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

Kontrol positif yang digunakan untuk identifikasi terpen adalah Hirtae Herba (*Euphorbia hirta*).

## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Ekstraksi Simplisia**

Ekstraksi serbuk simplisia dilakukan dengan cara dingin, yaitu secara maserasi bertingkat berdasarkan tingkat kepolaran pelarut. Hal ini dimaksudkan agar senyawa tersari dengan sempurna pada masing-masing tingkat kepolaran pelarut tersebut. Pelarut yang digunakan berturut-turut dari nonpolar ke polar, yaitu petroleum eter, etil asetat, n-butanol, dan etanol 96%. Pemilihan pelarut ini didasarkan pada jenis simplisianya yang berupa daun, sehingga digunakan petroleum eter untuk menarik senyawa seperti klorofil, lemak, dan malam. Selain itu, pemilihan didasarkan pada titik didih, selektivitas, dan dari segi ekonomis.

Maserasi dilakukan selama 24 jam, kemudian ekstrak cair yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotavapor dan selanjutnya diuapkan dengan menggunakan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental didefinisikan sebagai ekstrak yang tidak dapat mengalir. Ekstrak yang diperoleh disimpan dalam wadah (vial) dan ditimbang untuk menghasilkan rendemennya. Selanjutnya ekstrak kental disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C agar ekstrak tersebut tidak menjadi rusak. Data rendeman ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.1 (2).

#### **4.2 Uji Pendahuluan**

Pada tahap uji pendahuluan dilakukan penentuan konsentrasi substrat optimum, pH dapar optimum, dan suhu optimum yang sesuai dengan kondisi analisis yang digunakan. Pada pengujian ini, unit enzim yang digunakan adalah 0,1 U/mL. Hal ini disesuaikan dengan unit enzim yang digunakan pada jurnal yang menjadi acuan yaitu Umamaheswari et al. (2009).

Proses inkubasi terdiri dari dua tahap, yaitu tahap pertama disebut pra-inkubasi. Pada tahap ini, inkubasi dilakukan selama 10 menit. Hal ini bertujuan untuk menyesuaikan kondisi larutan uji dengan kondisi lingkungan optimumnya.

Sedangkan tahap kedua dilakukan selama 30 menit. Hal ini merupakan waktu inkubasi untuk reaksi enzimatik yang dapat berlangsung. Penghentian reaksi enzimatik dilakukan dengan penambahan asam klorida 1 N.

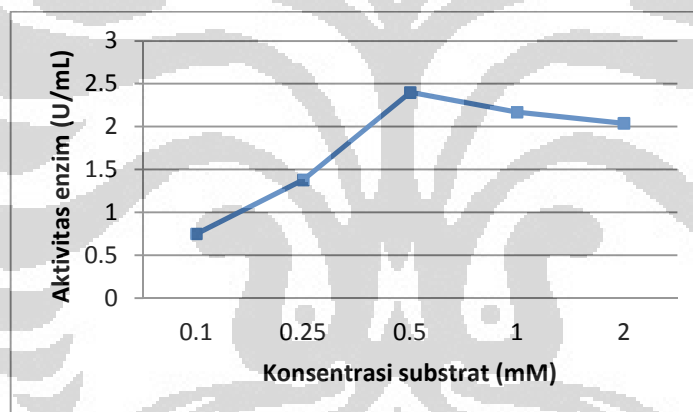
Penentuan panjang gelombang maksimum dimaksudkan untuk menentukan panjang gelombang yang dapat memberikan serapan maksimum (Harmita, 2006). Hasil yang diperoleh berbeda dengan yang tertera pada literatur. Pada pengujian diperoleh panjang gelombang 284 nm, sedangkan panjang gelombang pada literatur adalah 290 nm. Hal ini terjadi karena perbedaan deteksi pada alat pengukuran dan konsentrasi yang digunakan (Harmita, 2006).

Penentuan konsentrasi substrat optimum dimaksudkan untuk mengetahui konsentrasi substrat yang sesuai pada unit enzim yang akan digunakan agar aktivitas enzim dapat berlangsung secara optimal. Mula-mula dilakukan penentuan terhadap suhu optimum yang dilakukan dengan mereaksikan larutan substrat xantin konsentrasi 0,15 mM dengan enzim xantin oksidase 0,1 U/mL dalam larutan dapar fosfat 50 mM pH 7,8; kemudian diinkubasi pada suhu 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C selama 30 menit. Hasil serapan menunjukkan bahwa suhu optimum terdapat pada suhu 30°C. Pada suhu 20°C dan 25°C masih terjadi peningkatan serapan, sedangkan pada suhu 35°C dan 40°C terjadi penurunan serapan seperti yang terlihat pada Gambar 4.2. Hal ini terjadi karena rantai polipeptida enzim mulai terurai dan mengalami denaturasi, sehingga mengurangi kemampuan katalitik dari enzim (Murray et al., 2003). Hasil optimasi suhu dapat dilihat pada Tabel 4.2 (1).

Penentuan pH dapar optimum dilakukan dengan mereaksikan larutan substrat xantin konsentrasi 0,15 mM dengan xantin oksidase 0,1 U/mL dalam larutan dapar fosfat 50 mM; selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit dan reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL asam klorida 1 N. Hasil serapan menunjukkan bahwa pH optimum terdapat pada pH 7,8. Pada pH 7,5 masih terjadi peningkatan serapan, sedangkan pada pH 8,0; 8,3; dan 8,5 terjadi penurunan serapan. Hal ini terjadi karena pH dapat mempengaruhi aktivitas melalui perubahan struktur atau pengubahan muatan pada residu yang berfungsi dalam pengikatan substrat atau katalisis (Murray et al., 2003). Hasil optimasi pH dapat dilihat pada Tabel 4.2 (2).

Pembuatan konsentasi substrat xantin dilakukan dengan mengukur serapan yang diberikan oleh larutan uji dengan konsentrasi substrat xantin yang digunakan adalah 0,25 mM; 0,2 mM; 0,15 mM; 0,1 mM; dan 0,05 mM pada panjang gelombang maksimum 284 nm. Larutan substrat xantin dibuat dengan cara melarutkan 15,21 mg xantin dengan 3 tetes NaOH 1 N, kemudian diencerkan dengan air bebas karbondioksida P hingga 100 mL.

Suhu dan pH yang digunakan agar reaksi enzimatik dapat berlangsung dilakukan pada suhu dan pH optimumnya, yaitu 30°C dan pH 7,8. Berdasarkan hasil uji tersebut dapat dihitung aktivitas enzimnya. Konsentrasi substrat yang menghasilkan aktivitas enzim yang optimal digunakan pada uji penghambatan aktivitas xantin oksidase. Berdasarkan hasil yang diperoleh, konsentrasi substrat yang digunakan untuk uji penghambatan aktivitas xantin oksidase adalah 0,15 mM. Hasil optimasi konsentrasi substrat dapat dilihat pada Tabel 4.2 (3).



**Gambar 4.2** Aktivitas Enzim pada Berbagai Konsentrasi Substrat

Peningkatan aktivitas enzim terjadi pada peningkatan konsentrasi substrat 0,05 mM sampai 0,15 mM, dengan aktivitas enzim berturut-turut 0,75 Unit/mL; 1,38 Unit/mL; dan 2,40 Unit/mL. kemudian aktivitas enzim menurun pada konsentrasi substrat 0,2 mM dan 0,25 mM dengan aktivitas enzim berturut-turut 2,17 Unit/mL dan 2,04 Unit/mL. Penurunan aktivitas ini terjadi karena produk bisa menjadi inhibitor, sehingga akan bersaing dengan substrat untuk menempati tempat aktif enzim (Bisswanger, 2008). Produk tersebut adalah asam urat yang memiliki kemiripan struktur dengan substrat xantin, sehingga dapat berperan sebagai inhibitor.

### 4.3 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

Semua ekstrak *Sida rhombifolia* L. di uji secara *in vitro*. Prinsip dasar pengujian ini adalah mengukur serapan dari asam urat yang merupakan produk dari reaksi katalisis xantin oksidase terhadap substratnya yaitu xantin (Umamaheswari et. al., 2009). Pengukuran serapan dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis (*PG Instruments Ltd*) pada panjang gelombang 284 nm. Pengujian dilakukan pada larutan blanko, kontrol blanko, sampel, kontrol sampel, pembanding alopurinol, dan kontrol pembanding alopurinol.

Pengujian larutan blanko dan kontrol blanko dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim tanpa penambahan ekstrak, sedangkan pengujian larutan sampel dan pembanding alopurinol dilakukan untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim yang diberikan oleh ekstrak dan pembanding alopurinol, sedangkan kontrol sampel dan kontrol pembanding alopurinol dilakukan sebagai faktor koreksi terhadap larutan sampel dan pembanding alopurinol.

Sebagai kontrol positif digunakan pembanding alopurinol. Pengujian dilakukan dengan konsentrasi 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; dan 2,0 µg/mL. Larutan sampel alopurinol dibuat dengan cara menimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan 4 tetes natrium hidroksida 1 N, lalu diencerkan dengan 10 mL air bebas karbondioksida P. Hasil pengujian menunjukkan bahwa pembanding alopurinol memiliki efek penghambatan aktivitas xantin oksidase dengan nilai  $IC_{50}$  0,07 µg/mL. Hasil uji penghambatan aktivitas alopurinol dapat dilihat pada Tabel 4.3 (1).berdasarkan pengujian terhadap alopurinol pada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, kemampuan alopurinol dalam menghambat aktivitas xantin oksidase menunjukkan nilai  $IC_{50}$  0,09 µg/mL pada konsentrasi akhir 0,5 µg/mL (Gonzalez et al., 1995); 0,28 µg/mL (Nguyen et al., 2004); dan 6,1 µg/mL (Apaya dan Chichioco-Hernandez, 2011). Semua pengujian tersebut menggunakan xantin oksidase yang berasal dari susu sapi (*bovine milk*). Hasil pengujian menggunakan enzim dapat berbeda kecuali pada kondisi pengujian yang sama (McPherson dan

Pincus, 2007). Jadi nilai  $IC_{50}$  pada beberapa pengujian dapat saja berbeda karena dipengaruhi oleh kondisi pengujian.

Pengujian penghambatan ekstrak terhadap aktivitas xantin oksidase dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi. Pengujian pada konsentrasi bervariasi ini dilakukan untuk melihat pengaruh penambahan konsentrasi ekstrak terhadap peningkatan daya hambat. Variasi konsentrasi ekstrak yang digunakan mulai dari 1 ppm hingga konsentrasi 100 ppm. Ekstrak yang tidak dapat larut dengan air bebas karbondioksida P dilarutkan terlebih dahulu dengan 3 tetes DMSO (dimetil sulfoksida). Penggunaan DMSO sebaiknya hanya 5% dari konsentrasi akhir yang diharapkan tidak mempengaruhi pengujian dengan menggunakan enzim (Umamaheswari et al., 2009).

Hasil pengujian terhadap sampel, yaitu ekstrak petroleum eter, ekstrak etil asetat, ekstrak n-butanol, dan ekstrak etanol 96% menunjukkan bahwa ekstrak mempunyai aktivitas untuk menghambat aktivitas xantin oksidase. Nilai  $IC_{50}$  pada setiap ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.3 (2)–4.3 (5). Nilai  $IC_{50}$  yang besar disebabkan oleh persen hambatan yang kecil dari variasi konsentrasi ekstrak, sedangkan kecilnya nilai  $IC_{50}$  disebabkan oleh kandungan kimia yang menghambat aktivitas xantin oksidase memiliki efek sinergis dalam menghambat aktivitas xantin oksidase. Berdasarkan uji identifikasi kandungan kimia, daun sidaguri mengandung alkaloid, glikosida, flavonoida, dan terpen. Telah dilaporkan bahwa polifenol (Chang et al., 1993) dan flavonoida (Chang et al., 1993; Lio et al., 1985; Lespade dan Bercion, 2010) dapat menghambat aktivitas xantin oksidase. Flavonoida menghambat aktivitas xantin oksidase secara kompetitif (Jiao et al., 2006).

Nilai  $IC_{50}$  pada ekstrak metanol-air (9:1) herba *Sida rhombifolia* L. memiliki nilai sampai 55% (Iswantini dan Darusman, 2003), sedangkan pada ekstrak daun *Sida rhombifolia* L. memiliki nilai  $IC_{50}$  di bawah 50%. Hal ini disebabkan oleh perbedaan dari kondisi pengujian, bagian simplisia yang digunakan, proses ekstraksi dan konsentrasi ekstrak yang digunakan. Pada uji dengan menggunakan ekstrak metanol-air (9:1) herba *Sida rhombifolia* L., konsentrasi ekstrak yang digunakan dari 100-800 ppm, sedangkan penelitian pada

beberapa ekstrak daun *Sida rhombifolia* L., konsentrasi ekstrak yang digunakan dari 1-100 ppm.

#### 4.4 Kinetika Penghambatan Enzim

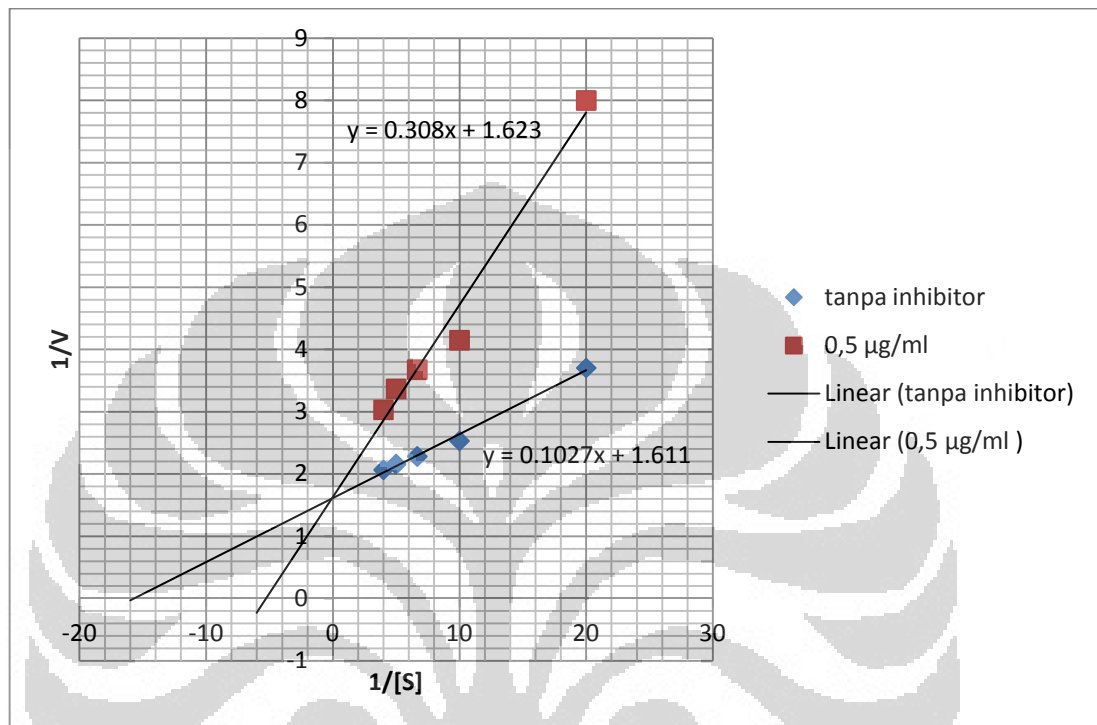
Pada uji kinetika penghambatan enzim, ekstrak yang digunakan adalah ekstrak n-butanol daun sidaguri dengan konsentrasi 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1 µg/mL; dan 5 µg/mL. Alasan dipilihnya ekstrak n-butanol karena ekstrak tersebut memiliki penghambatan aktivitas xantin oksidase yang mendekati nilai  $IC_{50}$  pembanding (alopurinol) dan nilai  $IC_{50}$ -nya paling kecil yang berarti asam urat yang dihasilkan sedikit. Pada uji ini juga dibuat konsentrasi substrat xantin yang bervariasi yaitu 0,25 mM; 0,2 mM; 0,15 mM; 0,1 mM, dan 0,05 mM. Hal ini bertujuan untuk melihat jenis penghambatan enzim pada penggunaan plot Lineweaver-Burk. Data hasil uji kinetika penghambatan enzim dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Hasil plot Lineweaver-Burk (Gambar 4.4) menunjukkan bahwa ekstrak n-butanol daun sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) memiliki mekanisme penghambatan enzim kompetitif. Hal ini dapat dilihat dari perpotongan garis linier konsentrasi inhibitor 0,5 µg/mL dengan garis linier substrat tanpa penambahan inhibitor terletak pada sumbu y. Berdasarkan persamaan yang diperoleh, nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$  dapat ditentukan. Pada sistem tanpa inhibitor diperoleh persamaan  $y = 1,611 + 0,1027 x$  dengan nilai konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) yaitu 0,06 dan  $V_{maks}$  0,62. Sedangkan pada sistem dengan inhibitor 0,5 µg/mL diperoleh persamaan  $y = 1,623 + 0,308 x$  dengan nilai konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) yaitu 0,19 dan  $V_{maks}$  0,62.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Iswantini, Darusman, dan Hidayat (2009), hasil kinetika penghambatan enzimnya juga menunjukkan jenis penghambatan enzim secara kompetitif. Hal ini menunjukkan bahwa herba dan daun sidaguri memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas xantin oksidase pada uji secara *in vitro*.

Struktur inhibitor kompetitif cenderung mirip dengan struktur substrat sehingga dinamai analog substrat. Efek inhibitor kompetitif dapat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Pada umumnya, inhibitor kompetitif berikatan

dengan bagian dari tempat aktif yang mengikat substrat dan menghambat akses ke substrat. Inhibitor kompetitif bekerja dengan menurunkan jumlah molekul enzim bebas yang tersedia untuk mengikat substrat yaitu untuk membentuk enzim-substrat yang akhirnya menghasilkan produk (Murray et al., 2003).



Gambar 4.4. Plot Lineweaver-Burk Ekstrak n-Butanol Daun Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) Konsentrasi 0,5 µg/ml dengan Konsentrasi Substrat Xantin 0,25 mM; 0,2 mM; 0,15 mM; 0,1 mM, dan 0,05 mM

#### 4.5 Identifikasi Kandungan Kimia

Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi aktif daun sidaguri. Kandungan kimia yang diidentifikasi antara lain alkaloid, glikosida, flavonoida, terpen, tanin, saponin, dan antrakuinon. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak tanaman dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menggunakan peraksi Mayer, Bouchardat, dan Dragendorff (Depkes RI, 1995). Mula-mula ekstrak kental dilarutkan dalam campuran air suling dan asam klorida agar alkaloid yang bersifat basa dapat berikatan dengan asam membentuk garam yang larut dalam air suling (Evans, 2002). Berdasarkan hasil identifikasi, hanya ekstrak n-butanol dan



etanol 96% yang memberikan hasil positif, yaitu membentuk endapan berwarna coklat hitam dengan pereaksi Bouchardat dan membentuk endapan putih kuning dengan pereaksi Mayer, serta membentuk endapan jingga dengan pereaksi Dragendorff. Kontrol positif yang digunakan adalah Chinae Cortex (*Cinchona officinalis*). Hasil identifikasi alkaloid dari kontrol positif, ekstrak n-butanol, dan etanol 96% daun sidaguri dapat dilihat pada Gambar 4.8.

Uji identifikasi glikosida memberikan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya cincin ungu pada ekstrak n-butanol dan etanol 96% dengan menggunakan pereaksi Molish. Pereaksi Molish digunakan untuk mengidentifikasi gula (Depkes RI, 1995). Kontrol positif yang digunakan adalah Nerii Folium (*Nerium oleander* L.) yang memberikan hasil positif (terbentuk cincin ungu). Hasil identifikasi glikosida dari kontrol positif dan beberapa ekstrak daun sidaguri dapat dilihat pada Gambar 4.9.

Pada uji identifikasi flavonoida, ekstrak etil asetat, n-butanol, dan etanol 96% memberikan hasil yang positif yaitu warna jingga merah ketika direaksikan dengan serbuk seng, sedangkan dengan penambahan serbuk magnesium memberikan warna jingga. Selanjutnya dilakukan reaksi lain yaitu dengan menggunakan pereaksi aseton-serbuk asam borat-serbuk asam oksalat-eter lalu dilihat di bawah sinar ultraviolet 366 nm yang memberi hasil positif, yaitu fluoresensi kuning intensif yang menunjukkan adanya flavonoida. Pada uji ini digunakan kontrol positif daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*). Hasil identifikasi flavonoida dan beberapa ekstrak daun sidaguri dari kontrol positif dapat dilihat pada Gambar 4.10.

Pada uji identifikasi terpen, ekstrak petroleum eter, ekstra etil asetat, dan ekstrak n-butanol memberikan hasil yang positif terhadap pereaksi Lieberman-Bouchard yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau. Senyawa terpen umumnya merupakan senyawa yang larut dalam lemak, sehingga dapat ditarik oleh pelarut non- polar seperti petroleum eter (Harborne, 1987). Pada uji identifikasi digunakan kontrol positif berupa Hirtae Herba (*Euphorbia hirta*). Hasil positif ditandai dengan terbentuk warna hijau. Hasil identifikasi terpen dari kontrol positif dan beberapa ekstrak daun sidaguri dapat dilihat pada Gambar 4.11.

Tanin merupakan senyawa fenol yang larut dalam pelarut polar seperti air, tetapi tidak larut dalam pelarut organik, seperti eter, kloroform, dan benzena. Tanin terhidrolisis memberikan warna biru-hitam dengan penambahan larutan besi (III) klorida, sedangkan tanin terkondensasi memberikan warna hijau coklat dengan penambahan larutan besi (III) klorida (Rangari, 2007). Pada pengujian dengan menggunakan larutan besi (III) klorida 1% memberikan hasil positif pada ekstrak n-butanol dan ekstrak etanol 96%, yaitu terbentuk warna hijau coklat. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak n-butanol dan etanol 96% mengandung senyawa yang memiliki gugus fenol. Sedangkan identifikasi tanin dengan menggunakan larutan gelatin 10% dan natrium klorida-gelatin memberikan hasil yang negatif pada semua ekstrak. Kontrol positif yang digunakan adalah daun teh (*Camellia sinensis*). Hasil identifikasi tanin dari kontrol positif dan hasil identifikasi dari ekstrak etanol 96% menggunakan larutan besi (III) klorida dapat dilihat pada Gambar 4.12.

#### 4.6 Kromatografi Lapis Tipis

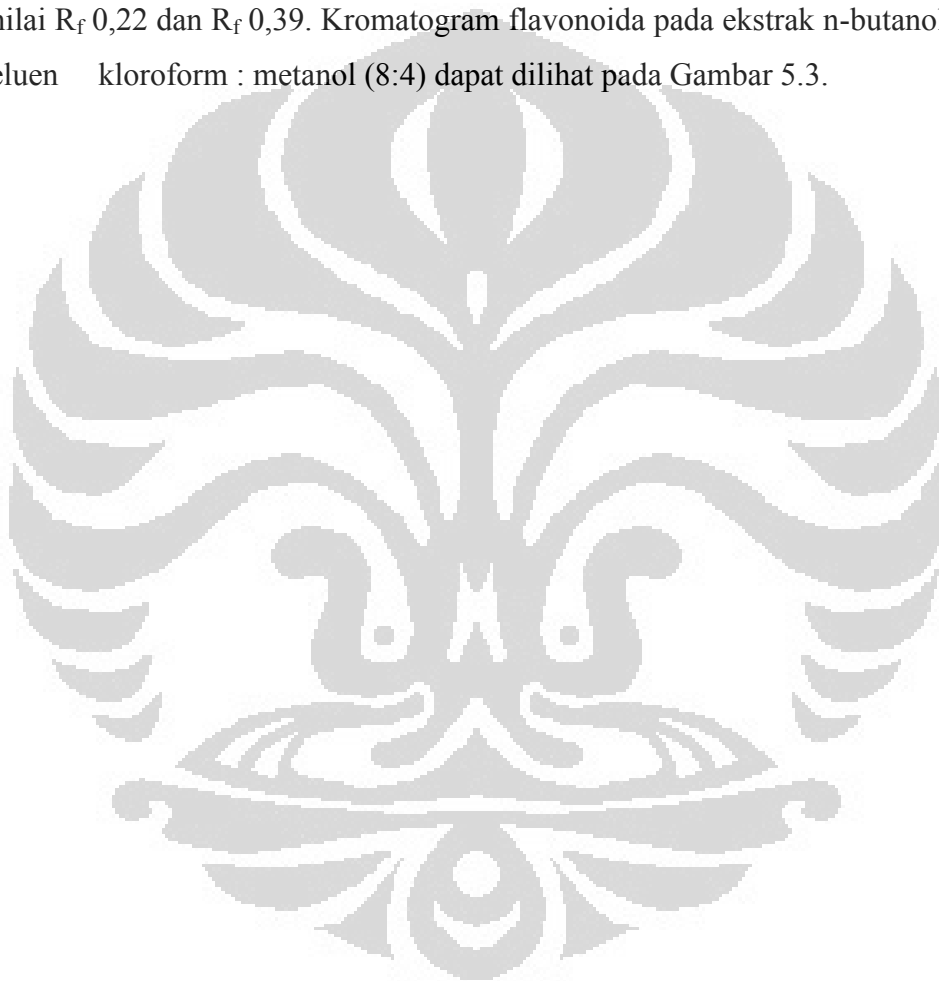
Ekstrak n-butanol daun sidaguri diuji secara kromatografi lapis tipis (KLT) untuk memastikan hasil identifikasi yang telah dilakukan dengan menggunakan pereaksi kimia. Pada identifikasi menggunakan pereaksi kimia, ekstrak n-butanol mengandung alkaloid, glikosida, flavonoida, dan terpen. Pada KLT digunakan eluen yang sesuai.

Pada KLT digunakan eluen kloroform : metanol (8:3), lalu diidentifikasi terpen yang terlihat dengan adanya empat bercak berwarna ungu setelah disemprot dengan penyemprot vanillin- $H_2SO_4$  dan dipanaskan perlahan-lahan pada suhu  $100^\circ C$  selama 10 menit. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak n-butanol mengandung terpen dengan nilai  $R_f$  0,4; 0,46; 0,58; dan 0,66. Kromatogram terpen pada ekstrak n-butanol dengan eluen kloroform : metanol (8:3) dapat dilihat pada Gambar 5.1.

KLT menggunakan eluen kloroform : metanol (8:3), lalu diidentifikasi alkaloid yang terlihat dengan timbulnya bercak berwarna coklat jingga dengan latar belakang kuning setelah disemprot dengan penyemprot Dragendorff. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak n-butanol mengandung alkaloid dengan nilai  $R_f$  0,59.

Kromatogram alkaloid pada ekstrak n-butanol dengan eluen kloroform : metanol (8:3) dapat dilihat pada Gambar 5.2.

Untuk menunjukkan bahwa ekstrak n-butanol mengandung flavonoida, maka dilakukan KLT menggunakan eluen kloroform : metanol (8:4). Bercak warna kuning terlihat pada kromatogram setelah dilakukan penyemprotan dengan  $\text{AlCl}_3$  10%. Warna ini terlihat jelas pada kromatogram di bawah cahaya UV 366 nm. Hal ini menandakan bahwa ekstrak n-butanol mengandung flavonoida dengan nilai  $R_f$  0,22 dan  $R_f$  0,39. Kromatogram flavonoida pada ekstrak n-butanol dengan eluen kloroform : metanol (8:4) dapat dilihat pada Gambar 5.3.



## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil pengujian, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

- a. Semua ekstrak daun sidaguri memiliki potensi untuk menghambat aktivitas xantin oksidase, dengan nilai  $IC_{50}$  9,52  $\mu\text{g/mL}$  pada ekstrak petroleum eter; 2,38  $\mu\text{g/mL}$  pada ekstrak etil asetat; 1,71  $\mu\text{g/mL}$  pada ekstrak n-butanol; dan 4,64  $\mu\text{g/mL}$  pada ekstrak etanol 96% .
- b. Golongan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak daun sidaguri adalah alkaloid, glikosida, flavonoida, dan terpen.

#### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan isolasi dan karakterisasi struktur senyawa dari ekstrak daun *Sida rhombifolia* L. untuk mengetahui identitas dan senyawa aktif penghambat aktivitas xantin oksidase yang terkandung di dalam ekstrak tersebut.

## DAFTAR ACUAN

- Agoes, Goeswin. (2007). *Teknologi Bahan Alam*. Bandung : Penerbit ITB.
- Apaya, Karmella L., dan Chichioco-Hernandez, Christine L. (2011). Xanthine Oxidase Inhibition of Selected Philippine Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 2, 289-292.
- Astari, Ery Yudik. (2008). *Pengaruh Pemberian Decocta Daun Dewa (Gynura pseudochina (L) DC) terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Serum pada Mencit Putih Jantan Galur Balb-C Hiperurisemia*. 8 September, 2011. <http://etd.eprints.ums.ac.id/1526/1/K100040190.pdf>.
- Bisswanger, Hans. (2008). *Enzyme Kinetics Principles and Methods*. Jerman : Wiley-VCH.
- Campbell, Mary K. dan Farrell, Shawn O. (2009). *Biochemistry Sixth Edition*. Kanada : Thomson Brooks/Cole.
- Champe, Pamela C., Harvey, Richard A., dan Ferrier, Denise R. (2005). *Lippincott's Illustrated Reviews : Biochemistry*. Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins.
- Chang, W. S., Lee, Y. J., Lu, F. J., dan Chiang, H. C. (1993). Inhibitory Effects of Flavonoids on Xanthine Oxidase. *Anticancer Research*, Vol. 13.
- Connor, Mark. (2009). Allourinol for Pain Relief : More Than Just Crystal Clearance?. *British Journal of Pharmacology*, 156, 4-6.
- Dalimartha, Setiawan. (2003). *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 3*. Jakarta : Puspa Swara.
- Deglin, Judith Hopfer. (2004). *Pedoman Obat untuk Perawat (H. Y. Kuncara dan Palupi Widyastuti, Penerjemah)*. Jakarta : EGC.
- Depkes RI. (1995). *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Dew, Tristan P., Day, Andrea J., dan Morgan, Michael R. A. (2005). Xanthine Oxidase Activity in Vitro : Effects of Food Extracts and Components. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 16.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Evans, W.C. (2002). *Trease and Evans Pharmacognosy 15<sup>th</sup> Edition*. Edinburgh : W. B. Saunders.
- Fransworth, Norman.R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science* , 55, 3.
- Ganiswarna, Sulistia G. (1995). *Farmakologi dan Terapi Edisi 4*. Jakarta : bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Gonzalez, Antonio G., Bazzocchi, Isabel L., Moujir, Laila., Ravelo, Angel G., Correa, Mireya D., dan Gupta, Mahabir P. (1995). Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Some Panamanian Plants from Celastraceae and Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 25-29.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Mengkatalisis Tumbuhan* (Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerjemah). Bandung : Penerbit ITB.
- Harmita. (2006). *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Iswantini, D., Darusman, L. K., dan Hidayat, R. (2009). Indonesia Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) as Antigout and Inhibition Kinetics of Crude Extract on the Activity of Xanthine Oxidase. *Journal of Biological Sciences*, 9, 5.
- Jiao, Rui H., Ge, Hui M., Shi, Da H., dan Tan, Ren X. (2006). An Apigenin-derived Xanthine Oxidase Inhibitor from *Palhinhaea cernua*. *Journal of Natural Products*, 69, 1089-1091.
- Jones, Samuel B. (1987). *Plant Systematics*. Singapura : McGraw-Hill Book Company.
- Kong, L. D., et al.. (2000). Inhibition of Xanthine Oxidase by Some Chinese Medicinal Plants Used to Treat Gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 73.

- Kuchel, Philip dan Ralston, Gregory B. (2006). *Schaum's Easy Outlines : Biokimia* (Eva Laelasari, Penerjemah.). Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Laurens, Deddy Rifandi. (2010). *Skrining dan Identifikasi Aktivitas Penghambatan Enzim Xantin Oksidase oleh Beberapa Tanaman Obat di Indonesia yang Berkhasiat sebagai Anti Hiperurisemia*. Depok : FMIPA UI.
- Lespade, L. dan Bercion, S. (2010). Theoretical Study of the Mechanism of Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids and Gallic Acid Derivatives. *Journal of Physical Chemistry*, 114.
- Lio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takaki, N., dan Fukumoto, M. (1985). Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*, 49.
- Marks, Dawn B., Marks, Allan D., dan Smith, Collen M. (2000). *Biokimia Kedokteran Dasar : Sebuah Pendekatan Klinis* (Brahm U. Pendit, Penerjemah.). Jakarta : EGC.
- McCarty, Daniel J. dan Hollander, Joseph L. (1961). Identification of Urate Crystals in Gouty Synovial Fluid. *Annal of Internal Medicine*, 54, 452-460.
- McPherson, Richard A. dan Pincus, Matthew R. (2007). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods (21th ed.)*. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Murray, Robert K., Granner, Daryl K., Mayes, Peter A., dan Rodwell, Victor W. (2003). *Biokimia Harper* (Andry Hartono, Penerjemah). Jakarta : EGC.
- Murray, Robert K., Bender, David A., Botham, Kathleen M., Kennelly, Peter J., Rodwell, Victor W., dan Weil, P. A. (2009). *Harper's Illustrated Biochemistry Twenty-Eighth Edition*. New York : McGraw Hill Medical
- Nguyen, Mai Thanh Thi., Awale, Suresh., Tezuka, Yasuhiro., Tran, Quan Le., Watanabe, Hiroshi., dan Kadota, Shigetoshi. (2004). Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Vietnamese Medicinal Plants. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 9, 1414-1421.
- Owen, Patrick L. dan Johns, Timothy. (1999). Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Northeastern North American Plant Remedies Used for Gout. *Journal Ethnopharmacology*, 64, 149-160.

- Pacher, Pal., Nivorozhkin, Alex., dan Szabo, Csaba. (2006). Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors : Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacological Reviews.*, 58, 1, 87-114.
- Pande, I. (2006). An Update on Gout. *Indian Journal of Rheumatology* Vol.1 No.2.
- Price, Sylvia Anderson dan Wilson, Lorraine McCarty. (2005). *Patofisiologi : Konsep Klinis Proses-proses Penyakit* (Brahm U. Pendit, Penerjemah). Jakarta : EGC.
- Rangari, Vinod D. (2007). *Pharmacognosy : Tannin Containing Drugs*. Desember 9, 2011. <http://www.nsdlniscair.res.in>.
- Salisbury, Frank B dan Ross, Cleon W. (1995). *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2* (Diah R Lukman dan Sumaryono, Penerjemah). Bandung : Penerbit ITB.
- Smith, A. D., et al. (2000). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology Revised Edition*. New York : Oxford University Press Inc.
- Syamsuhidayat, S.S. dan Hutapea, J.R. (1991). *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Sweetman, Sean C. (2009). *Martindale The Complete Drug Reference Thirty-sixth Edition*. London : Pharmaceutical Press.
- Tjitrosoopomo, Gembong. (1991). *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashammugam, A. T., dan Kemyaraju, A. (2007). Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Some Indian Medical Plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 109.
- Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmugam, A. T., dan Remyaraju, A. (2009). In Vitro Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of The Fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journaal of Ethnopharmacology*, 124, 646-648.
- Van Valkenburg, J. L. C. H. dan Bunyapraphatsara, N.. (2002). *Plant Resources of South-East Asia-Medicinal and Poisonous Plants 2*. Bogor : PROSEA.





# GAMBAR



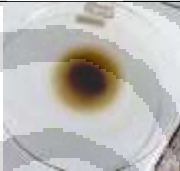


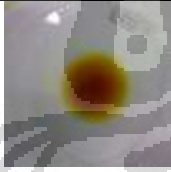
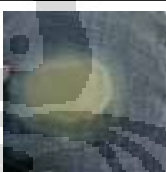
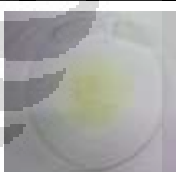
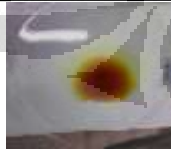


Gambar 4.5 Tanaman Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.)



Gambar 4.6 Daun Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.)






Gambar 4.7 Spektrofotometer UV-Vis (*PG Instruments Ltd*)

	Penambahan pereaksi Bouchardat	Penambahan pereaksi Dragendorff	Penambahan pereaksi Mayer
Kontrol positif Chinae Cortex			
	(+)	(+)	(+)
Ekstrak n-Butanol			
	(+)	(+)	(+)
Ekstrak Etanol 96%			
	(+)	(+)	(+)











Keterangan : positif (+) menandakan bahwa ekstrak mengandung senyawa alkaloid

Gambar 4.8 Identifikasi Alkaloid pada Kontrol Positif Chinae Cortex dan pada Ekstrak n-Butanol serta Ekstrak Etanol 95% Daun Sidaguri

	Cincin warna ungu		
Kontrol positif Nerii folium (+)		Ekstrak n-butanol (+)	Ekstrak etanol 96% (+)





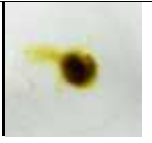
Keterangan : positif (+) ditandai dengan terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas lapisan yang menunjukkan bahwa ekstrak mengandung gugus gula

Gambar 4.9 Reaksi Molish pada Identifikasi Glikosida

	Kontrol positif daun benalu mangga	Ekstrak petroleum eter	Ekstrak etil asetat	Ekstrak n-butanol	Ekstrak etanol 96%;
Reaksi dengan serbuk seng (warna merah)					
	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Reaksi positif dengan serbuk magnesium (warna kuning jingga)					
	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)



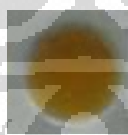

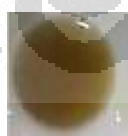

Keterangan : positif (+) menandakan bahwa ekstrak mengandung senyawa flavonoida; dan reaksi negatif (-) menandakan bahwa ekstrak tidak mengandung senyawa flavonoida

Gambar 4.10 Identifikasi Flavonoida pada Reaksi Menggunakan Serbuk Seng dan Serbuk Magnesium

Kontrol positif Hirtae Herba	Ekstrak petroleum eter	Ekstrak etil asetat	Ekstrak n- butanol	Ekstrak etanol 96%
				
(+)	(+)	(+)	(+)	(-)

Keterangan : positif (+) warna hijau menandakan bahwa ekstrak mengandung senyawa terpen; dan reaksi negatif (-) menandakan bahwa ekstrak tidak mengandung senyawa terpen

Gambar 4.11 Identifikasi Terpen dengan Menggunakan Reaksi Liebermann-Burchard

	Kontrol positif daun teh	Ekstrak Etanol 96%
		
	A B C D	E F
Kontrol negatif larutan besi (III) klorida		
Reaksi positif menggunakan larutan besi (III) klorida		

Keterangan : A = kontrol negatif (HCl 2 N + Pb (II) asetat); B = penambahan gelatin 10%; C = penambahan NaCl-gelatin; D = penambahan ekstrak, HCl dan Pb (II) asetat; E = penambahan gelatin 10% pada ekstrak etanol 96%; F = penambahan NaCl-gelatin pada ekstrak etanol 96%

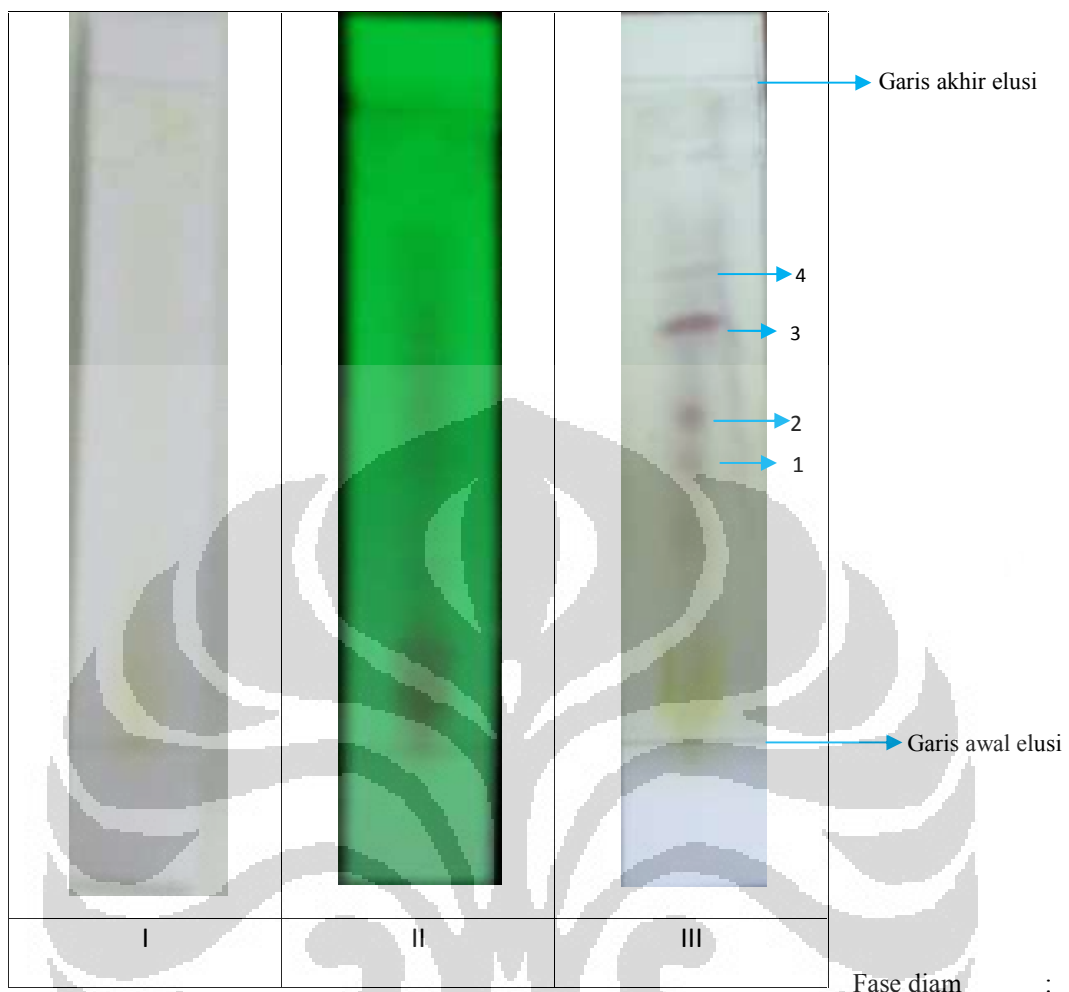
Gambar 4.12 Identifikasi Tanin pada Kontrol Positif Daun Teh dan Ekstrak Etanol 96%



Gambar 4.13 Kontrol Positif Rhei Radix pada Identifikasi Antrakuinon



Gambar 4.14 Kontrol Positif Liquiritae Radix pada Identifikasi Saponin



Lempeng KLT *silica gel* 60 F<sub>254</sub>

Eluen : Kloroform-metanol (8:3)

Penyemprot : Vanilin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dipanaskan perlahan-lahan pada suhu 100°C selama 10 menit

Jarak rambat : 5 cm

Nilai R<sub>f</sub> : R<sub>f1</sub> 0,4; R<sub>f2</sub> 0,46; R<sub>f3</sub> 0,58; dan R<sub>f4</sub> 0,66

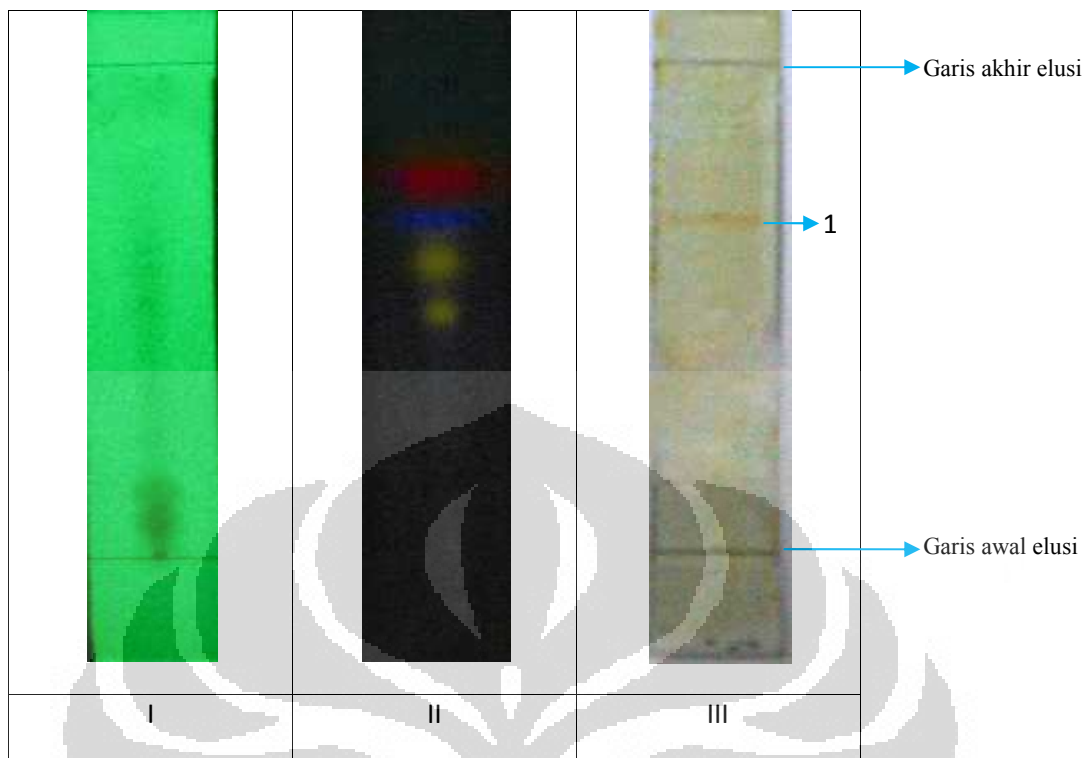
Keterangan :

I. : Hasil pengamatan dengan cahaya tampak

II. : Hasil pengamatan dengan cahaya UV 254 nm

III. : Hasil pengamatan setelah disemprot dan dipanaskan dan pengamatan dengan cahaya tampak

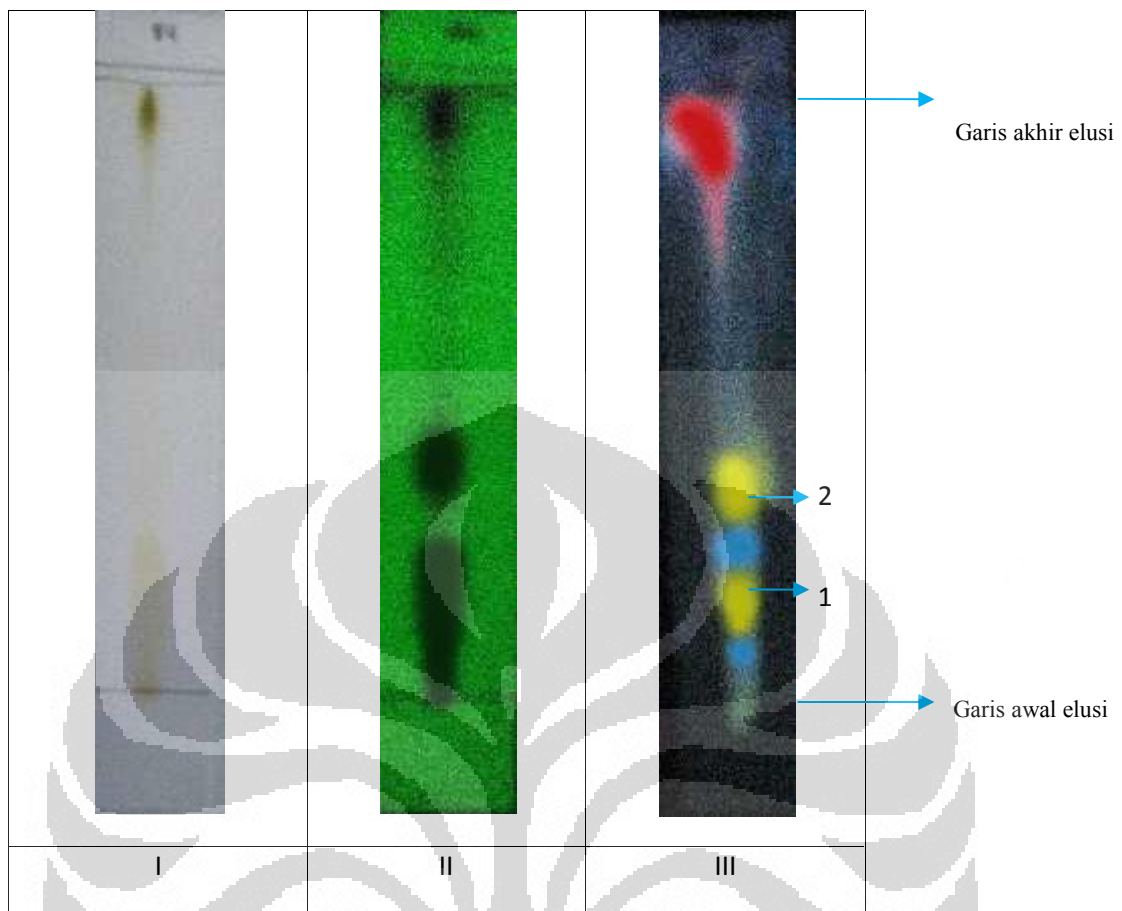
Gambar 5.1 Kromatogram Terpen pada Ekstrak n-Butanol dengan Eluen Kloroform : Metanol (8:3)



- Fase diam : Lempeng KLT *silica gel* 60 F<sub>254</sub>  
 Eluen : Kloroform-metanol (8:3)  
 Penyemprot : Dragendorff  
 Jarak rambat : 5 cm  
 Nilai R<sub>f</sub> : R<sub>f1</sub> 0,59  
 Keterangan :  
 I. : Hasil pengamatan dengan cahaya UV 254 nm  
 II. : Hasil pengamatan dengan cahaya UV 366 nm  
 III. : Hasil pengamatan setelah disemprot dan pengamatan dengan cahaya tampak

Gambar 5.2 Kromatogram Alkaloid pada Ekstrak n-Butanol dengan Eluen Kloroform : Metanol (8:3)





- Fase diam : Lempeng KLT *silica gel* 60 F<sub>254</sub>  
 Eluen : Kloroform-metanol (8:4)  
 Penyemprot : AlCl<sub>3</sub> 10%  
 Jarak rambat : 4,9 cm  
 Nilai R<sub>f</sub> : R<sub>f1</sub> 0,22 dan R<sub>f2</sub> 0,39  
 Keterangan :  
 I. : Hasil pengamatan dengan cahaya tampak  
 II. : Hasil pengamatan dengan cahaya UV 254 nm  
 III. : Hasil pengamatan setelah disemprot dan pengamatan dengan cahaya UV 366 nm

Gambar 5.3 Kromatogram Flavonoid pada Ekstrak n-Butanol dengan Eluen Kloroform : Metanol (8:4)



Tabel 4.1 (1) Susut Pengerinan

Nama Tanaman	Bagian Tanaman	Bobot basah (g)	Bobot Kering (g)	Susut Pengerinan (%)
<i>Sida rhombifolia</i> L.	Daun	1400	1200	14,29

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{Bobot basah} - \text{bobot kering}}{\text{Bobot basah}} \times 100\%$$

Tanel 4.1 (2) Rendemen Ekstrak

Nama Simplisia : Daun Sidaguri ( <i>Sida rhombifolia</i> L.)				
Ekstrak				
	Peroleum Eter	Etil Asetat	n-Butanol	Etanol 96%
Bobot Simplisia (g)			1200	
Bobot Ekstrak (g)	20,00	16,7443	9,6171	7,9866
Rendemen Ekstrak (%)	1,67	1,40	0,80	0,67

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot serbuk simplisia}} \times 100\%$$

Tabel 4.2 (1) Hasil Optimasi Suhu

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	0,340	0,099 0,099	0,099	0,241	0,98
25°C	0,490 0,510	0,500	0,099 0,099	0,099	0,391	1,97
30°C	0,556 0,558	0,557	0,099 0,099	0,099	0,458	2,25
35°C	0,222 0,202	0,212	0,075 0,073	0,074	0,138	0,68
40°C	0,200 0,200	0,200	0,071 0,073	0,072	0,128	0,63

Tabel 4.2 (2) Hasil Optimasi pH

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	0,555	0,099 0,099	0,099	0,456	2,24
7,8	0,605 0,605	0,605	0,101 0,103	0,102	0,503	2,47
8,0	0,320 0,320	0,320	0,094 0,094	0,094	0,226	1,11
8,3	0,272 0,276	0,274	0,085 0,087	0,086	0,188	0,92
8,5	0,211 0,213	0,212	0,074 0,074	0,074	0,137	0,68

Tabel 4.2 (3) Hasil Optimasi Konsentrasi Substrat

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 0,186	0,187	0,034 0,035	0,035	0,152	0,75
0,1	0,383 0,374	0,379	0,098 0,100	0,099	0,280	1,38
0,15	0,637 0,583	0,610	0,113 0,111	0,112	0,498	2,40
0,2	0,600 0,588	0,594	0,150 0,156	0,153	0,441	2,17
0,25	0,620 0,610	0,615	0,202 0,200	0,201	0,414	2,04

Tabel 4.3 (1) Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Alopurinol (sebagai Pembanding)

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan				$S_1-S_0$	% Penghambatan	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	$A_1$	$A_2$	Rata-rata				
0,1	$S_1$	0,335	0,331	0,333	0,327	40,33	0,07
	$S_0$	0,008	0,004	0,006			
0,25	$S_1$	0,273	0,271	0,272	0,258	52,92	
	$S_0$	0,015	0,013	0,014			
0,5	$S_1$	0,198	0,194	0,196	0,169	69,16	
	$S_0$	0,029	0,025	0,027			
1	$S_1$	0,152	0,150	0,151	0,076	86,13	
	$S_0$	0,079	0,071	0,075			
2	$S_1$	0,129	0,127	0,128	0,029	94,71	
	$S_0$	0,101	0,097	0,099			
Blanko						0,548	
Persamaan regresi						$y = 48,048 + 26,756 x$	

Keterangan :  $A_1$  = serapan 1;  $A_2$  = serapan 2;  $S_1$  = sampel;  $S_0$  = kontrol sampel;  $IC_{50}$  = konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian

Tabel 4.3 (2) Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Petroleum Eter Daun Sidaguri

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan		Rata-rata	$S_1-S_0$	% Penghambatan	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	$A_1$	$A_2$				
1	$S_1$	0,411	0,402	0,407	0,384	29,93
	$S_0$	0,028	0,017	0,023		
5	$S_1$	0,404	0,394	0,399	0,370	32,48
	$S_0$	0,034	0,023	0,029		
10	$S_1$	0,391	0,382	0,387	0,351	35,95
	$S_0$	0,047	0,025	0,036		
20	$S_1$	0,384	0,375	0,380	0,321	41,42
	$S_0$	0,064	0,054	0,059		
50	$S_1$	0,379	0,368	0,374	0,282	48,54
	$S_0$	0,097	0,087	0,092		
100	$S_1$	0,364	0,353	0,359	0,238	56,57
	$S_0$	0,129	0,113	0,121		
Blanko					0,548	
Persamaan regresi					$y = 32,819 - 1,8056 x$	

Keterangan :  $A_1$  = serapan 1;  $A_2$  = serapan 2;  $S_1$  = sampel;  $S_0$  = kontrol sampel;  $IC_{50}$  = konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian

Tabel 4.3 (3) Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Etil Asetat Daun Sidaguri

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan		Rata-rata	$S_1-S_0$	% Penghambatan	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	$A_1$	$A_2$				
1	$S_1$	0,349	0,309	0,329	0,316	42,34
	$S_0$	0,014	0,011	0,013		
5	$S_1$	0,329	0,283	0,306	0,290	47,08
	$S_0$	0,019	0,013	0,016		
10	$S_1$	0,305	0,277	0,291	0,272	50,36
	$S_0$	0,022	0,016	0,019		
20	$S_1$	0,296	0,267	0,282	0,259	52,74
	$S_0$	0,028	0,018	0,023		
50	$S_1$	0,264	0,251	0,258	0,231	57,85
	$S_0$	0,032	0,021	0,027		
100	$S_1$	0,243	0,260	0,252	0,135	75,36
	$S_0$	0,116	0,118	0,117		
Blanko					0,548	
Persamaan regresi					$y = 45,035 - 2,0894 x$	

Keterangan :  $A_1$  = serapan 1;  $A_2$  = serapan 2;  $S_1$  = sampel;  $S_0$  = kontrol sampel;  $IC_{50}$  = konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian

Tabel 4.3 (4) Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak n-Butanol Daun Sidaguri

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan		Rata-rata	$S_1-S_0$	% Penghambatan	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	$A_1$	$A_2$				
1	$S_1$	0,316	0,364	0,340	0,310	43,43
	$S_0$	0,030	0,029	0,030		
5	$S_1$	0,313	0,338	0,326	0,284	48,18
	$S_0$	0,044	0,040	0,042		
10	$S_1$	0,311	0,324	0,318	0,271	50,55
	$S_0$	0,049	0,045	0,047		
20	$S_1$	0,306	0,299	0,303	0,247	54,93
	$S_0$	0,057	0,055	0,056		
50	$S_1$	0,209	0,238	0,224	0,208	62,04
	$S_0$	0,074	0,058	0,016		
100	$S_1$	0,207	0,234	0,221	0,102	81,39
	$S_0$	0,126	0,112	0,119		
Blanko					0,548	
Persamaan regresi					$y = 45,765 - 2,4812 x$	

Keterangan :  $A_1$  = serapan 1;  $A_2$  = serapan 2;  $S_1$  = sampel;  $S_0$  = kontrol sampel;  $IC_{50}$  = konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian



Tabel 4.3 (5) Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Etanol 96% Daun Sidaguri

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan		Rata-rata	$S_1-S_0$	% Penghambatan	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	$A_1$	$A_2$				
1	$S_1$	0,343	0,364	0,354	0,338	38,32
	$S_0$	0,019	0,013	0,016		
5	$S_1$	0,335	0,344	0,340	0,322	41,24
	$S_0$	0,020	0,015	0,018		
10	$S_1$	0,304	0,328	0,316	0,293	46,53
	$S_0$	0,026	0,020	0,023		
20	$S_1$	0,301	0,323	0,312	0,285	47,99
	$S_0$	0,030	0,024	0,027		
50	$S_1$	0,292	0,319	0,306	0,232	57,66
	$S_0$	0,053	0,094	0,074		
100	$S_1$	0,270	0,316	0,293	0,187	65,88
	$S_0$	0,111	0,101	0,106		
Blanko					0,548	
Persamaan regresi					$y = 41,429 - 1,8458 x$	

Keterangan :  $A_1$  = serapan 1;  $A_2$  = serapan 2;  $S_1$  = sampel;  $S_0$  = kontrol sampel;  $IC_{50}$  = konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian

Tabel 4.4 Hasil Uji Kinetika Penghambatan Enzim

Konsentrasi Substrat [S]	Serapan			1/[S]	1/V <sub>0</sub>	1/V <sub>1</sub>	1/V <sub>2</sub>
	V						
	V <sub>0</sub>	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>				
0,05	0,270	0,140	0,129	20	3.704	7.143	7.752
0,1	0,395	0,270	0,226	10	2.532	3.704	4.425
0,15	0,438	0,176	0,341	6,667	2.283	5.682	2.933
0,2	0,463	0,327	0,402	5	2.159	3.058	2.488
0,25	0,484	0,334	0,367	4	2.066	2.994	2.725

Keterangan : V<sub>0</sub> = tanpa inhiitor; V<sub>1</sub> = inhibitor 0,1 µg/mL; V<sub>2</sub> = inhibitor 0,25 µg/mL

Tabel 4.4 Hasil Uji Kinetika Penghambatan Enzim (lanjutan)

Konsentrasi Substrat [S]	Serapan			1/[S]	1/V <sub>0</sub>	1/V <sub>3</sub>	1/V <sub>4</sub>
	V						
	V <sub>0</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>				
0,05	0,270	0,125	0,097	20	3.704	8	10.309
0,1	0,395	0,241	0,117	10	2.532	4.149	8.547
0,15	0,438	0,272	0,123	6,667	2.283	3.676	8.13
0,2	0,463	0,297	0,109	5	2.159	3.367	9.174
0,25	0,484	0,330	0,136	4	2.066	3.03	7.353

Keterangan : V<sub>0</sub> = tanpa inhibitor; V<sub>3</sub> = inhibitor 0,5 µg/mL; V<sub>4</sub> = inhibitor 1 µg/mL

Tabel 4.4 Hasil Uji Kinetika Penghambatan Enzim (lanjutan)

Konsentrasi Substrat [S]	Serapan		1/[S]	1/V <sub>0</sub>	1/V <sub>5</sub>
	V				
	V <sub>0</sub>	V <sub>5</sub>			
0,05	0,270	0,18	20	3.704	5.556
0,1	0,395	0,173	10	2.532	5.78
0,15	0,438	0,176	6,667	2.283	5.682
0,2	0,463	0,172	5	2.159	5.814
0,25	0,484	0,192	4	2.066	5.208

Keterangan : V<sub>0</sub> = tanpa inhibitor; V<sub>5</sub> = inhibitor 5 µg/mL

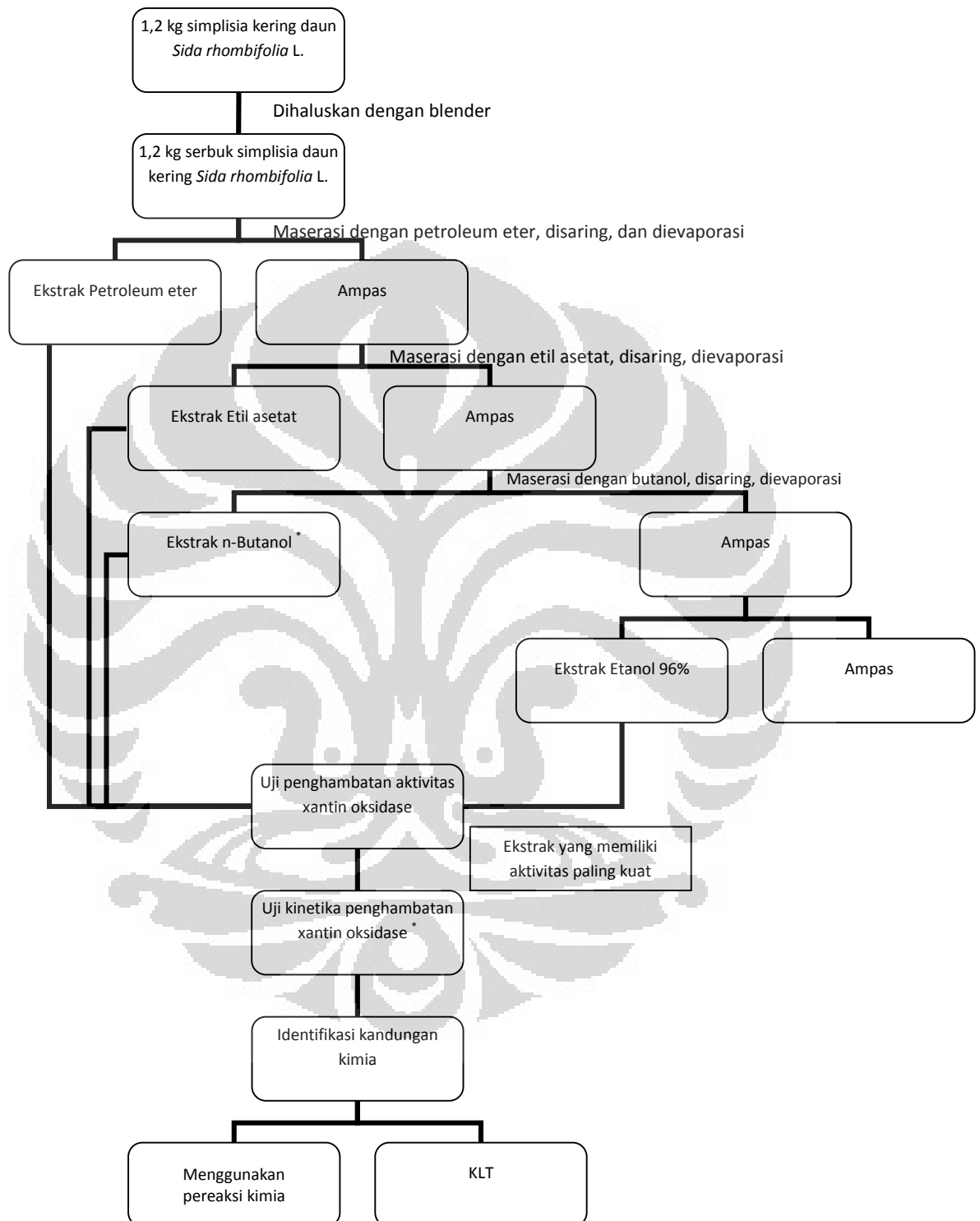
Tabel 4.5 Hasil Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Tanaman

Ekstrak daun sidaguri					
Kandungan kimia	Pereaksi kimia	Petroleum eter	Etil asetat	n-Butanol	Etanol 96%
Alkaloid	Mayer LP	-	-	+	+
	Bouchardat LP	-	-	+	+
	Dragendorf LP	-	-	+	+
Glikosida	Reaksi Molish	-	-	+	+
	Serbuk Zn + HCl 2 N + HCl(p)	-	+	+	+
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl (p)	-	-	+	-
	Aseton + serbuk asam borat + serbuk asam oksalat + eter	-	+	+	+
Terpen	Reaksi Liebermann-Bouchard	+	+	+	-
Tanin	FeCl <sub>3</sub> 1%	-	-	+	+
	Gelatin 10%	-	-	-	-
	NaCl-Gelatin	-	-	-	-
Saponin	Air panas	-	-	-	-
Antrakuinon	Benzena + NaOH 2 N	-	-	-	-

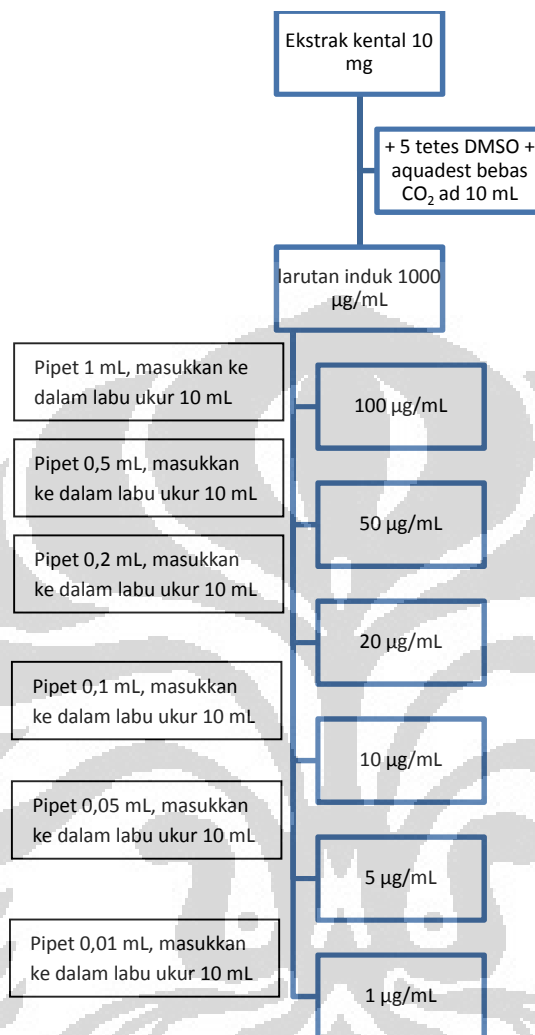
Keterangan : (+) = terdeteksi dalam ekstrak; (-) = tidak terdeteksi dalam ekstrak



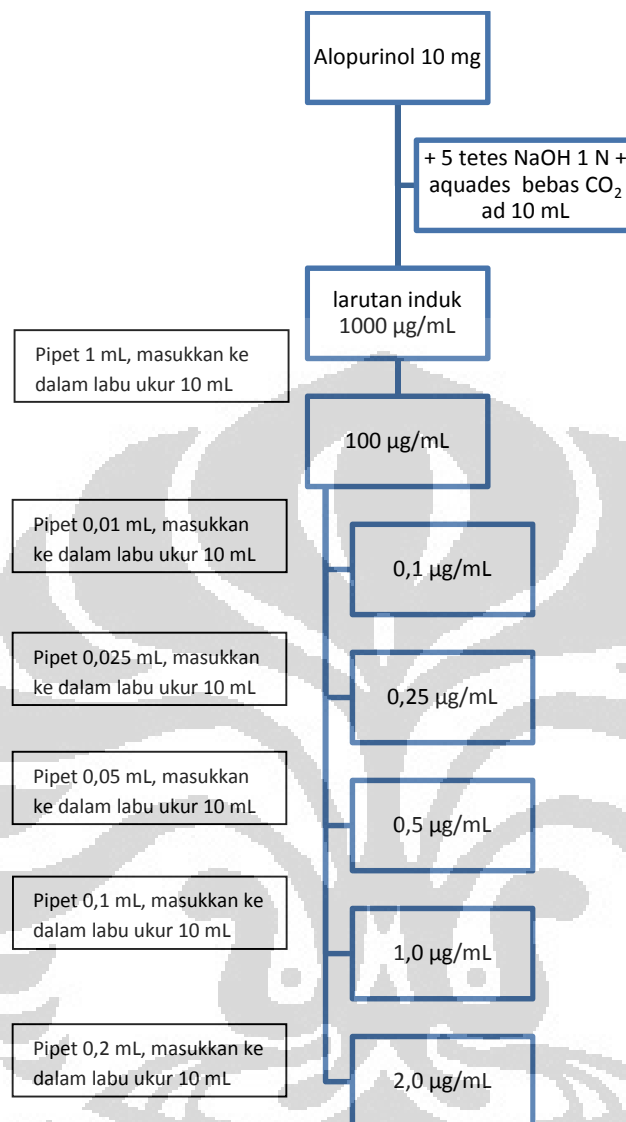
## Lampiran 1. Skema Kerja



## Lampiran 2. Pembuatan Larutan Uji



## Lampiran 3. Pembuatan Larutan Alopurinol



## Lampiran 4. Perhitungan Xantin Oksidase

Perhitungan enzim :

**Pada label tertulis = 0,4-1,0 unit/mg protein**

**45,45 mg solid 0,11 units/mg solid**

**0,8 unit/mg protein**

45,45 mg solid x 0,11 units/mg solid = 4,9995 units ∞ 5 units

$$\frac{5 \text{ unit}}{0,8 \frac{\text{unit}}{\text{mg protein}}} = 6,25 \text{ mg protein}$$

$$\frac{45,45 \text{ mg solid}}{6,25 \text{ mg protein}} = 7,272 \frac{\text{mg solid}}{\text{mg protein}}$$

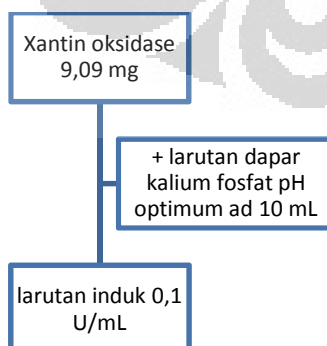
**1 mg protein ∞ 7,272 mg solid ∞ 0,8 unit**

**Pembuatan larutan induk enzim 0,1 U/ml :**

$$\frac{7,272 \frac{\text{mg solid}}{\text{mg protein}} \times 0,1 \text{ unit}}{0,8 \frac{\text{unit}}{\text{mg protein}}} = 0,909 \text{ mg solid dalam 1 mL}$$

Jadi dalam 10 ml = 9,09 mg.

## Lampiran 5. Pembuatan Larutan Xantin Oksidase





## Lampiran 6. Perhitungan Substrat Xantin

Pembuatan larutan substrat xantin 1 mM :

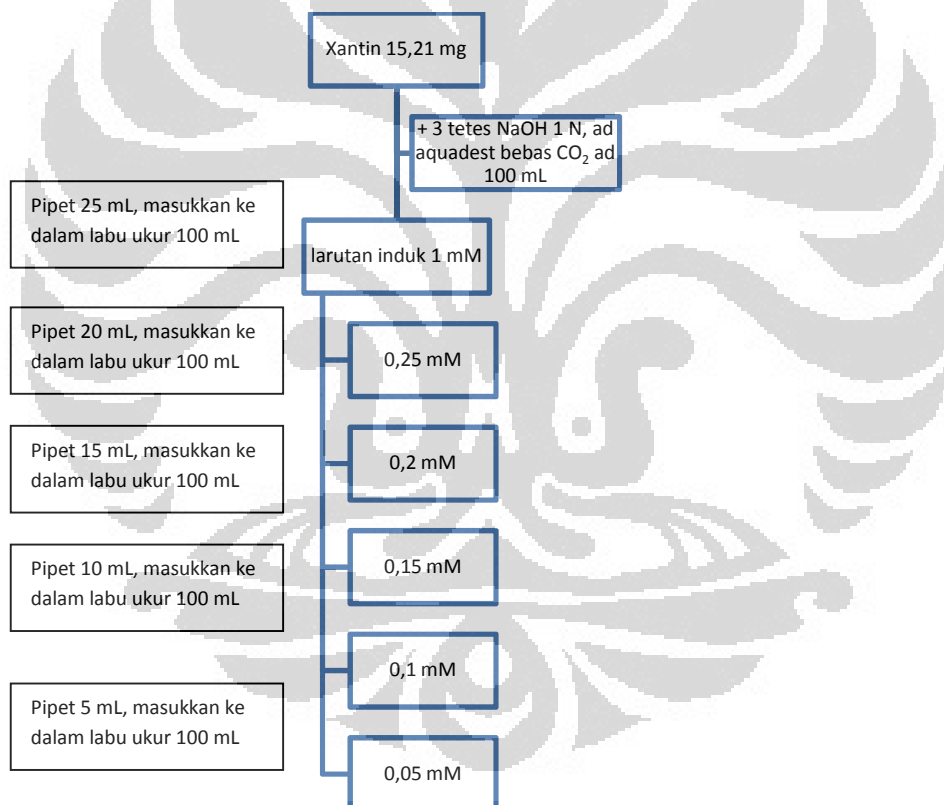
Mr Xantin = 152,1 (Sigma)

$$M = \frac{\text{berat (g)}}{\text{Mr} \times V \text{ (L)}}$$


$$1 \times 10^{-3} = \frac{\text{berat (g)}}{152,1 \times 100 \times 10^{-3}}$$

$$\text{Berat} = 15,21 \times 10^{-3} \text{ g} = 15,21 \text{ mg}$$

## Lampiran 7. Pembuatan Larutan Substrat Xantin



## Lampiran 8. Hasil Identifikasi/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, 6 September 2011

Nomor : 437/IPH.1.02/IL.8/IX/2011  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan


Kepada Yth.  
Bpk./Ibu/Sdr/ij. Siti Marwah Lestari  
NPM : 0906601885  
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	Sidaguri	<i>Sida rhombifolia</i> L.	Malvaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani  
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,  
  
Dr. Joeni Setiyo Rahajoe  
NIP. 196706241993032004

D:\Ident 2011\Siti Marwah Lestari.doc\JJA-DG

Page 1 of 1

## Lampiran 9. Sertifikat Alopurinol

7/1/13/109

**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% Impurity B&C not more than 0.2% Impurity D or E not more than 0.1% Individual unknown impurity not more than 0.1% Total unknown impurities not more than 0.3%	0.07% 0.14% Not detected 0.06% 0.12%
10.0	Assay	93.0%-101.0%On dried basis	99.83%
11.0	PARTICLE SIZE	95% < 50 µm	Complies
12.0	DENSITY OF SLOP	0.8 +/- 0.05 g / ml	Complies
13.0	DENSITY OF STAMPED	0.40 +/- 0.05 g / ml	Complies
14.0	Residual solvents	Ethanol NMT 1000ppm Other solvent NMT200ppm	Complies Complies
	Organic volatile impurite	Conform with USP28	Complies
	Total bacteria	NMT 1000cfu/g	Complies

REMARKS: The Product conforms to USP28/BP2003 Specification with respect to above tests