



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS ENZIM XANTIN OKSIDASE DARI
EKSTRAK DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) DAN
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA DARI FRAKSI AKTIF**

SKRIPSI

YUDHI KRESNANUGRAHA

0806398833

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN FARMASI

DEPOK

Juni, 2012

i



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS ENZIM XANTIN OKSIDASE DARI EKSTRAK
DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN
SENYAWA DARI FRAKSI AKTIF**

SKRIPSI

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

YUDHI KRESNANUGRAHA

0806398833

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN FARMASI

DEPOK

Juni, 2012

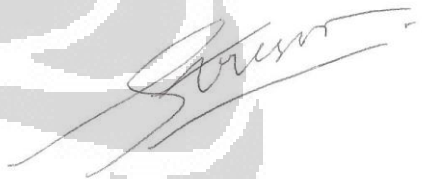
ii

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 12 Juli 2012



Yudhi Kresnanugraha

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Yudhi Kresnanugraha

NPM : 0806398833

Tanda Tangan :



Tanggal : 12 Juli 2012


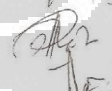

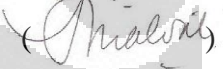
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Yudhi Kresnanugraha
NPM : 0806398833
Program Studi : Sarjana Farmasi
Judul Skripsi : Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin
Oksidase dari Ekstrak Daun Belimbing Wuluh
(*Averrhoa bilimbi* L.) dan Identifikasi Golongan
Senyawa dari Fraksi Aktif

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt. ()
Pembimbing II : Dr. Rani Sauriasari S.Si., Apt., M. Sc ()
Penguji I : Dr. Katrin, MS. ()
Penguji II : Dra. Azizahwati M.S., Apt ()

Ditetapkan di. : Depok
Tanggal : 12 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Ida Sang Hyang Widhi Wasa karena berkat rahmat, karunia dan perlindungan-Nya, skripsi ini dapat diselesaikan.

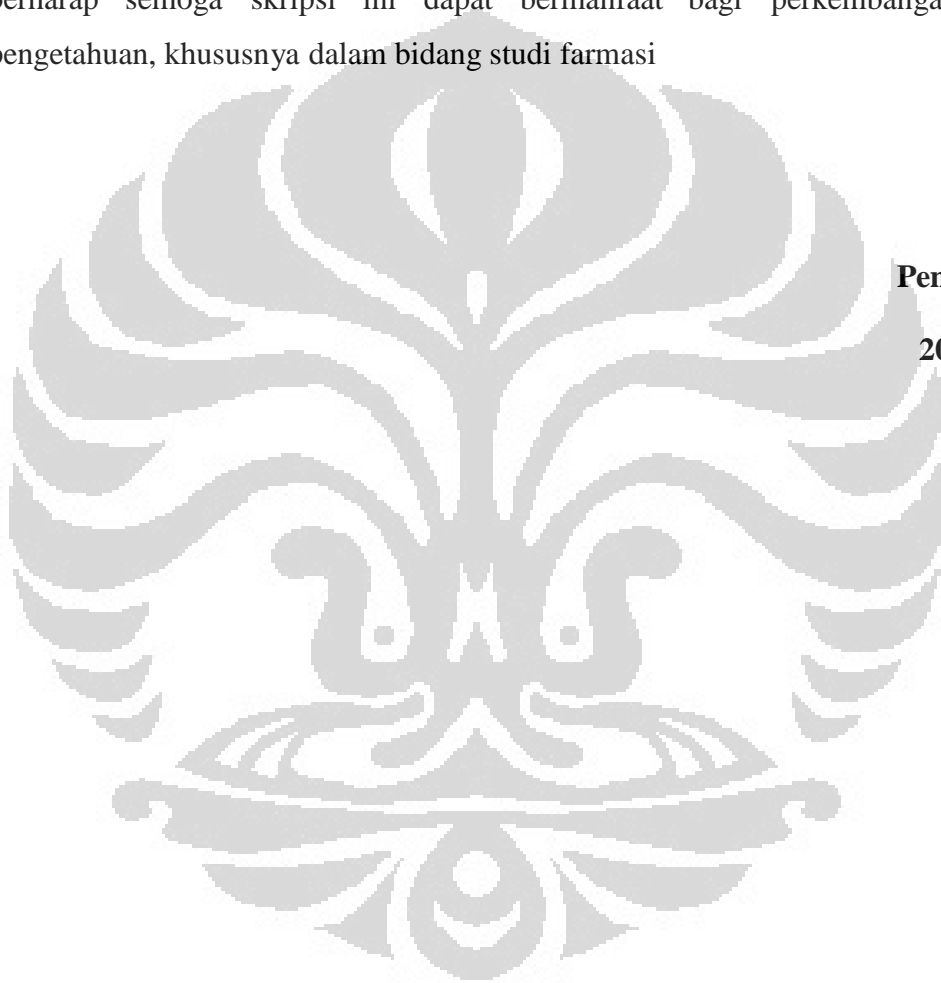
Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana pada Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis dibantu oleh berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya pada:

1. Prof. Dr. Yahdiana Harahap M.S., selaku Dekan Fakultas Farmasi atas kesempatan yang telah diberikan untuk melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini
2. Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt. selaku pembimbing I yang telah memberikan semangat, bimbingan, saran, bantuan, serta dukungan selama penelitian dan penyusunan skripsi
3. Dr. Rani Sauriasari S.Si., Apt., M. Sc selaku pembimbing II yang telah memberikan semangat, bimbingan, saran, bantuan, dukungan selama penelitian dan penyusunan skripsi
4. Dr. Berna Elya Apt., M.Si selaku pembimbing akademis atas bimbingannya dan petunjuknya selama kuliah dan penelitian
5. Ibunda Dyah Kasbudiarti dan Ayahanda Gede Putra Suastika, serta keluarga yang selalu memberikan dukungan tak terbilang untuk penulis. Tanpa kalian, ananda bukanlah apa-apa
6. Seluruh staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Indonesia yang telah dengan tulus membekali ilmu kepada penulis
7. Sahabat serta semua teman selama perkuliahan di Fakultas Farmasi terutama Adon, Dimas, Bian, Majang, Thia, Coni, Ajid, Babeh, Freddy, Andes, Jaka yang selalu mendukung, menyemangati dan memberikan yang terbaik untuk penulis

8. Rekan-rekan di ruang penelitian fitokimia yang telah saling membantu selama penyusunan dan penelitian
9. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan pengarahan, dorongan semangat dan membantu dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari masih adanya kekurangan dalam skripsi ini, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang studi farmasi



**Penulis,
2012**

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

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

Nama : Yudhi Kresnanugraha
NPM : 0806398833
Program Studi : S1Farmasi Paralel
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase dari Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi Aktif. Dengan Hak Bebas Royalti Noneklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan 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 : 12 Juli 2012

Yang menyatakan,



(Yudhi Kresnanugraha)

ABSTRAK

Nama : Yudhi Kresnanugraha
Program Studi : Farmasi
Judul : Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase dari Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi Aktif.

Hiperurisemia adalah keadaan dimana produksi berlebihnya ekskresi asam urat dalam tubuh. Xantin oksidase berperan dalam mengkatalisis hipoxantin dan xantin menjadi asam urat. Salah satu pengobatan hiperurisemia adalah menghambat xantin oksidase sehingga produksi asam urat berkurang. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas fraksi n-heksana, etil asetat, n-butanol, dan methanol dari daun *Averrhoa bilimbi* L. dalam menghambat xantin oksidase. Serbuk simplisia di refluks menggunakan etanol, kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut n-heksana, etil asetat, n-Butanol dan methanol secara berurut-urut. Fraksi n-butanol mempunyai IC_{50} tertinggi dengan nilai 0,06 $\mu\text{g/mL}$. Uji kinetika enzim menunjukkan bahwa fraksi n-butanol mempunyai aktivitas penghambatan kompetitif. Dari hasil identifikasi yang dilakukan fraksi n-butanol memiliki senyawa glikosida, tannin, dan flavonoid.

Kata kunci : *Averrhoa bilimbi* L. , flavonoid, hiperurisemia, xantin oksidase

xvii + 79 halaman ; 24 gambar; 18 tabel; 9 lampiran
Daftar acuan : 33 (1966-2012)

ABSTRACT

Name : Yudhi Kresnanugraha
Program Study : Pharmacy
Title : Inhibitory assay of Xanthine Oxidase Activity from *Averrhoa bilimbi* L. Leaves Extract and Identification Compound from Active Fraction.

Hyperuricemia is a condition in which excessive excretion of uric acid in the body. Xanthine oxidase plays a role in catalyzing hypoxanthine and xanthine into uric acid. One of the treatments of hyperuricemic is by inhibiting the xanthine oxidase so that the production of uric acid can be reduced. The purpose of this study was to determine the activity of fraction from n-hexane, ethyl acetate, n-butanol, and methanol from *Averrhoa bilimbi* L leaves in inhibiting xanthine oxidase. The simplicia powder was refluxed by ethanol, and then fractionated successively by n-hexane, ethyl acetate, n-butanol, and methanol. Fraction of n-butanol had the highest IC_{50} value of 0.0623 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Kinetic enzyme assay showed that n-butanol fraction had competitive inhibitory activity. From the results of phytochemical identification, the fraction of n-butanol contains glycosides, tannins, and flavonoids.

Keywords : *Averrhoa bilimbi* L. , flavonoids, hiperurycemia, xanthine oxidase.

xvii + 79 pages ; 24 figures; 18 tables; 9 appendix
Bibliography : 33 (1966-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Hiperurisemia dan Penyakit Gout	4
2.1.1 Definisi	4
2.1.2 Terapi Gout.....	4
2.1.3 Allopurinol	4
2.2 <i>Averrhoa bilimbi</i> L. (Belimbing Wuluh).....	5
2.2.1 Klasifikasi.....	5
2.2.2 Morfologi.....	6
2.2.3 Ekologi, Penyebaran, dan Budidaya.....	6
2.2.4 Kandungan Kimia.....	6
2.2.5 Manfaat.....	6
2.3 Enzim.....	7
2.3.1 Persamaan Michaelis-Menten	9
2.3.2 Bentuk Linear Persamaan Michaelis-Menten	10
2.3.3 Plot Lineweaver Burk.....	11
2.3.4 Inhibisi Kompetitif	11
2.3.5 Inhibisi Non-Kompetitif	12
2.3.6 Xantin Oksidase.....	13
2.4 Simplisia	13
2.5 Ekstraksi dan Ekstrak	14
2.5.1 Ekstraksi Cara Dingin.....	14
2.5.1.1 Maserasi.....	14
2.5.1.2 Perkolasi	14
2.5.2 Ekstraksi Cara Panas	15

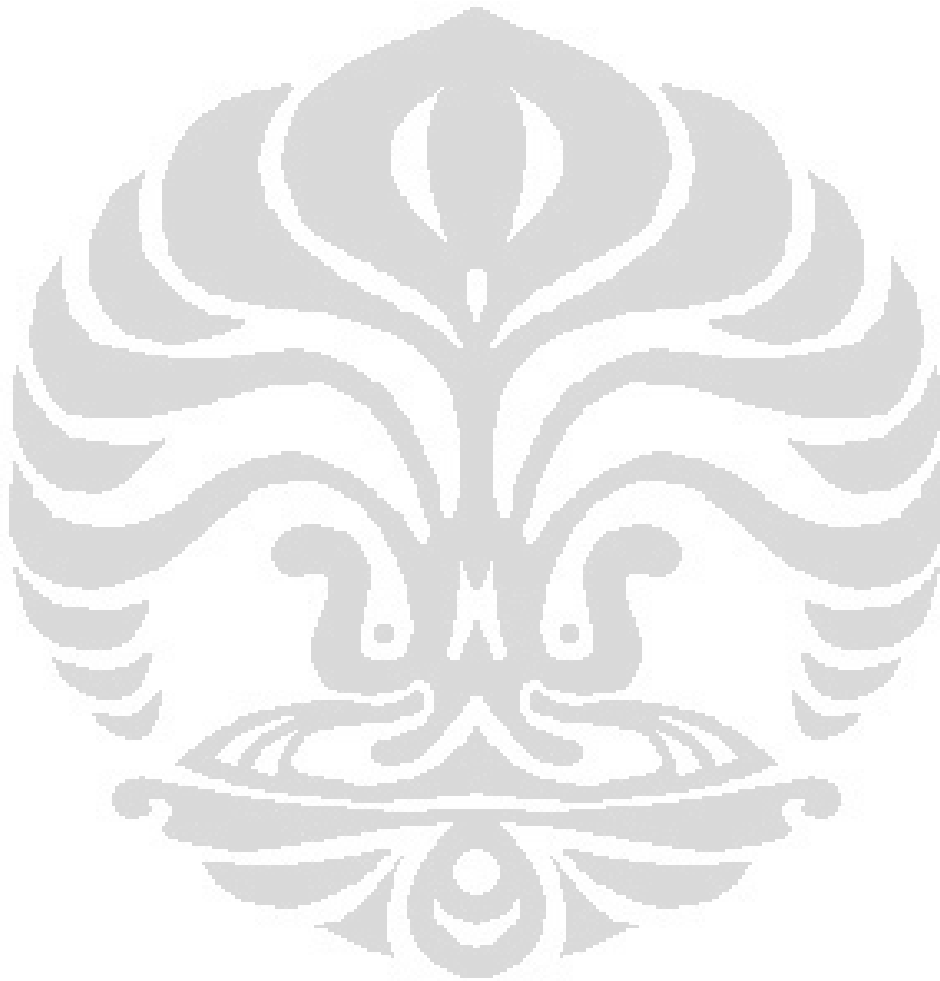
2.5.2.1 Refluks.....	15
2.5.2.2 Sokletasi.....	15
2.5.2.3 Digesti.....	15
2.5.2.4 Infusa.....	15
2.5.2.5 Dekokta.....	15
2.6 Spektrofotometri UV-Vis.....	16
2.7 Kromatografi Lapis Tipis.....	17
2.8 Golongan Senyawa Fitokimia.....	18
2.8.1 Alkaloid.....	18
2.8.2 Flavonoid.....	18
2.8.3 Terpenoid.....	19
2.8.4 Tanin.....	19
2.8.5 Glikosida.....	19
2.8.6 Saponin.....	20
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	21
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	21
3.2. Alat.....	21
3.3. Bahan.....	21
3.3.1 Bahan Uji.....	21
3.3.2 Bahan Kimia.....	22
3.4. Prosedur Pelaksanaan.....	22
3.4.1 Rancangan Penelitian.....	22
3.4.2 Persiapan Bahan Uji.....	22
3.4.2.1 Persiapan Simplisia Uji.....	22
3.4.2.1 Ekstraksi dan Fraksinasi.....	22
3.4.3 Pembuatan Larutan Uji dan Larutan Pereaksi.....	23
3.4.3.1 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Daun Averrhoa bilimbi L.....	23
3.4.3.2 Larutan Enzim Xantin Oksidase.....	23
3.4.3.3 Pembuatan Larutan Substrat Xantin.....	24
3.4.3.4 Pembuatan Larutan Standar Allopurinol.....	24
3.4.4 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase.....	24
3.4.4.1 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase.....	25
3.4.4.2 Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase.....	26
3.4.4.3 Perhitungan Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase (IC ₅₀).....	29
3.4.5 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia.....	29
3.4.5.1 Identifikasi Alkaloid.....	29
3.4.5.2 Identifikasi Glikosida.....	30
3.4.5.3 Identifikasi Saponin.....	30
3.4.5.4 Identifikasi Flavonoid.....	30
3.4.5.5 Identifikasi Tanin.....	31
3.4.5.6 Identifikasi Terpen.....	31

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1. Penyiapan Bahan	32
4.2. Ekstraksi Simplisia	32
4.3. Fraksinasi.....	33
4.4. Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase	34
4.4.1 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase.....	34
4.4.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	35
4.4.1.2 Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum.....	35
4.4.1.3 Penentuan pH Optimum.....	36
4.4.1.4 Penentuan Suhu Optimum.....	37
4.4.2 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase oleh Sampel dan Standar Allopurinol	38
4.4.2.1 Pengujian Standar Allopurinol.....	38
4.4.2.2 Pengujian Sampel.....	39
4.5. Uji Kinetika Penghambatan Xantin Oksidase	40
4.6. Identifikasi Golongan Senyawa Kimia.....	43
4.6.1 Identifikasi Alkaloid.....	44
4.6.2 Identifikasi Flavonoid	44
4.6.3 Identifikasi Glikosida	46
4.6.4 Identifikasi Tanin	46
4.6.5 Identifikasi Terpen	46
4.6.6 Identifikasi Saponin	48
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1. Kesimpulan.....	49
5.2. Saran	49
DAFTAR ACUAN	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur Kimia Allopurinol.....	5
Gambar 2.2	Perbedaan struktur antara inhibitor kompetitif dan inhibitor nonkompetitif.....	8
Gambar 2.3	Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh Enzim.....	9
Gambar 2.4	Plot Lineweaver Burk dari $1/V_i$ terhadap $1/[S]$	11
Gambar 2.5	Plot Lineweaver Burk yang memperlihatkan inhibisi kompetitif.....	12
Gambar 2.6	Plot Lineweaver Burk untuk inhibisi nonkompetitif.....	13
Gambar 2.7	Reaksi Enzimatis xantin oksidase mengonversi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat.....	14
Gambar 3.1	Reaksi Enzimatis xantin oksidase mengonversi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat.....	24
Gambar 4.1	Grafik penentuan konsentrasi substrat xantin pada 0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM dan 0,25 mM.....	35
Gambar 4.2	Grafik hasil optimasi pH.....	37
Gambar 4.3	Grafik hasil optimasi suhu.....	38
Gambar 4.4	Grafik regresi linear standar allopurinol.....	39
Gambar 4.5	Grafik efek konsentrasi substrat pada kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis enzim dengan inhibitor fraksi n-butanol 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	41
Gambar 4.6	Grafik efek konsentrasi substrat pada kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis enzim tanpa adanya inhibitor.....	41
Gambar 4.7	Plot Lineaweaver-Burk ekstrak kental fraksi n-butanol konsentrasi 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dengan konsentrasi xantin 0,05 ; 0,1 ; dan 0,15 mM.....	42
Gambar 4.8	Hasil KLT fraksi etil asetat dan n-butanol pada lempeng silika gel 60 F ₂₅₄ menggunakan fase gerak n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5).....	45
Gambar 4.9	Hasil KLT semua fraksi pada lempeng silika gel 60 F ₂₅₄ menggunakan fase gerak benzen : etil asetat dengan perbandingan (9 : 1).....	47
Gambar 4.10	Gambar Tanaman Belimbing Wuluh.....	60
Gambar 4.11	Gambar Serbuk Simplisia Daun Belimbing Wuluh.....	60
Gambar 4.12	Spektrum Serapan pada optimasi panjang gelombang maksimum	61
Gambar 4.13	Grafik Regresi Linear Sampel Fraksi n-Heksana.....	61
Gambar 4.14	Grafik Regresi Linear Sampel Fraksi Etil Asetat.....	62
Gambar 4.15	Grafik Regresi Linear Sampel Fraksi n-Butanol.....	62
Gambar 4.16	Grafik Regresi Linear Sampel Fraksi metanol.....	63
Gambar 4.17	Plot Lineaweaver-Burk ekstrak kental fraksi n-butanol konsentrasi 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dengan konsentrasi xantin 0,05 ; 0,1 ; dan 0,15 mM.....	63
Gambar 4.18	Hasil identifikasi alkaloid dengan reagen semprot dragendorff secara berurutan fraksi methanol, n-butanol, etil asetat, n-heksana dan kontrol positif kulit batang kina.....	64
Gambar 4.19	Hasil identifikasi alkaloid semua fraksi (B dan D etil asetat dan n-heksana, A dan C fraksi metanol dan n-butanol).....	64

Gambar 4.20	Hasil identifikasi flavonoid dengan menggunakan aseton- as.oksalat- as.borat-dietil eter (fraksi etil asetat-kontrol positif daun gandarus- fraksi n-butanol).....	65
Gambar 4.21	Hasil identifikasi tannin dengan reagen sempol FeCl_3 (fraksi metanol, n-butanol, etil asetat, n-heksana)	65
Gambar 4.22	Hasil identifikasi terpen dengan pereaksi Liebermann bouchard pada fraksi metanol, butanol, etil asetat, n-heksana	66
Gambar 4.23	Hasil identifikasi glikosida dengan reaksi molisch (fraksi metanol dan fraksi n-butanol).....	66
Gambar 4.24	Hasil identifikasi saponin dengan pengocokkan dan penambahan HCl 2N (fraksi metanol, n-butanol, etil asetat, n-heksana)	66

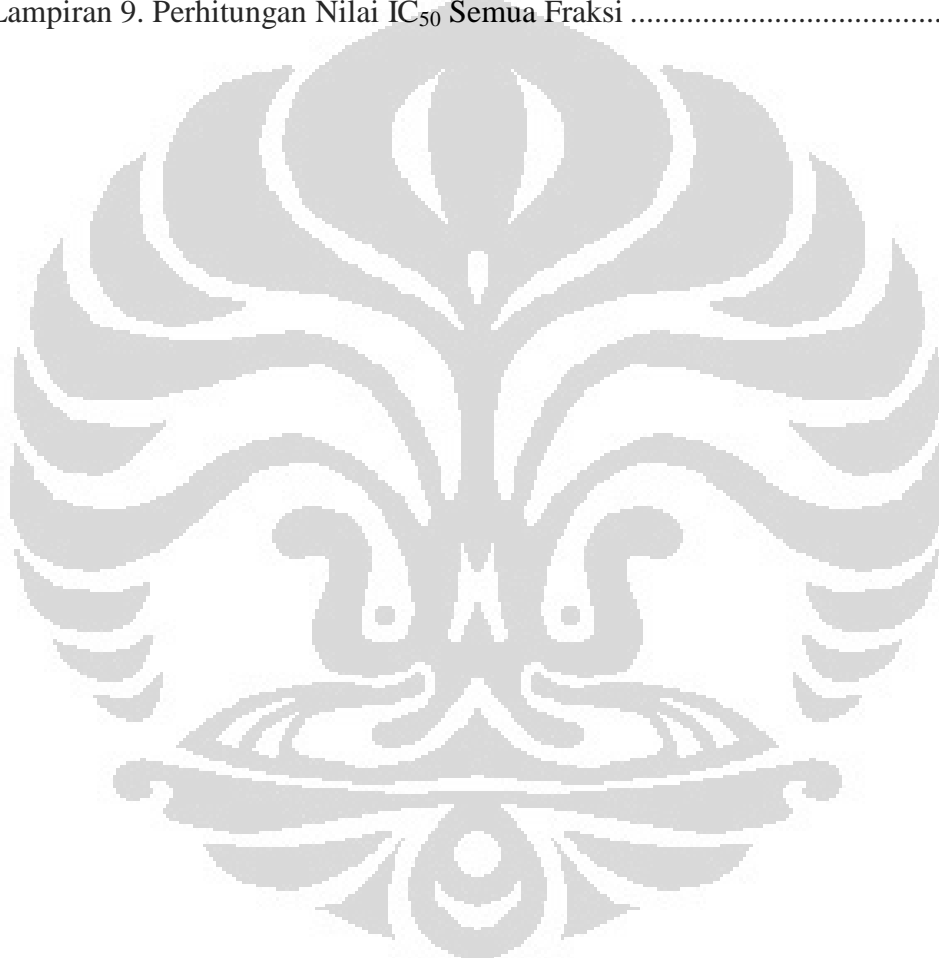


DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Prosedur uji penghambatan aktivitas xantin oksidase.....	28
Tabel 4.1. Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten pada Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase	42
Tabel 4.2. Hasil identifikasi golongan senyawa pada ekstrak daun tanaman <i>Averrhoa bilimbi</i> L	43
Tabel 4.3. Nilai Rf KLT masing-masing bercak pada ekstrak fraksi n-butanol dan fraksi etil asetat dengan fase gerak n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5).....	46
Tabel 4.4. Nilai Rf KLT masing-masing bercak pada identifikasi terpen dari ekstrak n-heksana	48
Tabel 4.6. Rendemen ekstrak	54
Tabel 4.7. Data serapan pada uji pendahuluan penentuan konsentrasi substrat optimum.....	54
Tabel 4.8. Data serapan pada uji pendahuluan penentuan pH optimum	54
Tabel 4.9. Data serapan pada uji pendahuluan penentuan suhu optimum	55
Tabel 4.10. Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh Allopurinol.....	55
Tabel 4.11. Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh Allopurinol dengan penurunan konsentrasi.....	55
Tabel 4.12. Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh ekstrak n-heksana	56
Tabel 4.13. Data Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi Etil asetat	56
Tabel 4.14. Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi n-butanol .	56
Tabel 4.15. Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi metanol....	57
Tabel 4.16. Data serapan fraksi n-butanol konsentrasi 1 µg/ml pada uji kinetika penghambatan aktivitas xantin oksidase.....	58
Tabel 4.17. Data serapan tanpa inhibitor pada uji kinetika penghambatan aktivitas xantin oksidase	58
Tabel 4.18. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia	59

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Ekstraksi dan Fraksinasi	67
Lampiran 2. Skema Prosedur Pelaksanaan	68
Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan Xantin Oksidase 0,1 unit/ml.	69
Lampiran 4. Perhitungan dan Pembuatan Larutan Xantin.....	70
Lampiran 5. Hasil Determinasi Tanaman.....	71
Lampiran 6. Sertifikat Analisis Xantin Oksidase	72
Lampiran 7. Sertifikat Analisis Xantin.....	73
Lampiran 8. Sertifikat Analisis Allopurinol	75
Lampiran 9. Perhitungan Nilai IC ₅₀ Semua Fraksi	76



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dalam perkembangan zaman, manusia semakin banyak menciptakan teknologi dari ilmu pengetahuan yang dimiliki, aktivitas yang dilakukanpun semakin banyak sehingga berbagai kesibukan sehari-hari menjadi hal yang lazim, mulai dari sekolah, kerja, dan lainnya. Sebaliknya, manusia semakin mengubah pola hidupnya terutama dalam usia produktif dan usia lanjut, sangat rentan terkena berbagai macam penyakit akibat buruknya pola hidup dengan berbagai macam aktifitas dan kesibukannya. Pola makan, istirahat dan olahraga semakin tidak teratur. Perubahan gaya hidup tersebut dapat menimbulkan berbagai macam penyakit yang dapat membahayakan manusia. Salah satu penyakit yang sering diderita pada usia produktif dan usia lanjut adalah hiperurisemia akibat tingginya makanan yang mengandung purin seperti makanan laut.

Hiperurisemia adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kadar asam urat diatas normal (Rudi Hidayat, 2009). Hiperurisemia biasanya tidak terdapat gejala-gejala yang terlihat dengan meningkatnya kadar asam urat didalam tubuh. Konsentrasi urat yang lebih besar dari 7,0 mg/dL adalah tidak normal dan berkaitan dengan peningkatan risiko untuk gout (Adnyana, I., et al, 2009).

Prevalensi hiperurisemia kira-kira 2,6-47,2 % yang bervariasi pada berbagai populasi. Sedangkan prevalensi gout juga bervariasi antara 1-15,3 %. Pada suatu studi didapatkan insidensi gout 4,9% pada kadar asam urat darah >9 mg/dL, 0,5 % pada kadar 7-8,9 %, dan 0,1 % pada kadar <7 mg/dL. Insidensi kumulatif gout mencapai angka 22 % setelah 5 tahun, pada kadar asam urat >9 mg/dL (Rudi Hidayat, 2009).

Penyakit gout merupakan penyakit yang cukup banyak diderita oleh usia dewasa dan lanjut karena metabolisme tubuh sudah mulai berkurang sehingga dapat menyebabkan gangguan metabolik katabolisme purin sehingga kadar asam urat dalam

tubuh melebihi batas normal yaitu dibawah 7,0 mg/dL. Penyakit ini dapat menimbulkan rasa nyeri yang hebat dibagian persendian sehingga dapat mengganggu mobilitas dan pergerakan manusia.

Salah satu obat gout yang sering digunakan adalah Allopurinol karena mekanisme kerjanya adalah dengan menghambat enzim xantin oksidase. Mekanisme penghambatannya dengan menghambat enzim xantin oksidase, maka terhambat juga pembentukan xantin dari hipoxantin dan asam urat dari xantin sehingga kristal asam urat dalam tubuh menurun sehingga rasa sakit yang diderita berkurang.

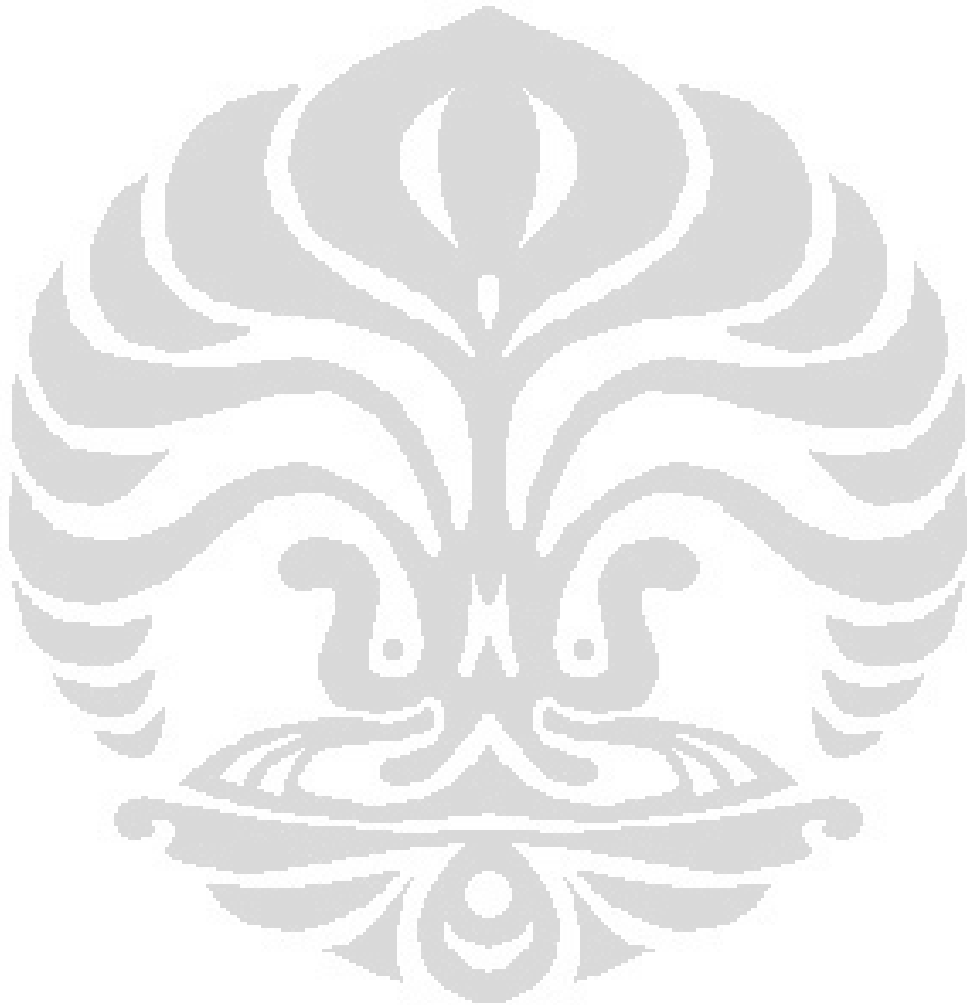
Berbagai macam penelitian sudah dilakukan untuk mengetahui aktivitas penghambatan terhadap enzim xantin oksidase mulai dari bahan alam hingga bahan-bahan kimia hasil sintesis. Tanaman-tanaman yang sudah dilakukan penelitian terhadap aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase adalah *Acalypha indica* L., *Adhatoda vasica* Ness, *Coccinia grandis* L., *Datura metel* L., *Vitex negundo* L., *Strychnos nuxvomica* (Umamaheswari, M., et.al, 2006)

Tanaman belimbing wuluh secara tradisional dipercaya dapat mengobati penyakit hipertensi, diabetes mellitus, demam, radang poros usus, batuk, encok dan menghilangkan jerawat (Thomas, 1989). Penelitian yang akan dilakukan adalah dengan menggunakan tanaman *Averrhoa bilimbi* L., atau biasa dikenal dengan belimbing wuluh dengan bilimbi folium sebagai simplisianya. Penelitian ini akan menguji aktifitas penghambatan terhadap enzim xantin oksidase dari fraksi n-heksana, etil asetat, n-butanol, metanol. Ekstraksi akan dilakukan dengan cara refluks dengan pelarut etanol karena kemampuan ekstraksi oleh etanol yang cukup tinggi untuk hampir semua senyawa bahan alam dengan berat molekul rendah, seperti alkaloid, saponin, dan flavonoid (Samuelsson, 1999).

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya efek penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase pada ekstrak daun belimbing wuluh dan mengetahui golongan senyawa dari fraksi aktif. Manfaat penelitian ini adalah agar daun

belimbing wuluh dapat dimanfaatkan masyarakat luas sebagai pengobatan hiperurisemia



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hiperurisemia dan Penyakit Gout

2.1.1 Definisi

Hiperurisemia adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kadar asam urat diatas normal (Rudi Hidayat, 2009). Hiperurisemia erat sekali dihubungkan dengan penyakit gout atau pirai. Hiperurisemia merupakan suatu keadaan dimana kadar natrium urat melebihi daya larutnya sehingga serum sangat jenuh dan dapat menstimulasi terbentuknya kristal natrium urat di jaringan lunak dan sendi sehingga menimbulkan reaksi inflamasi atau biasa disebut artritis gout.

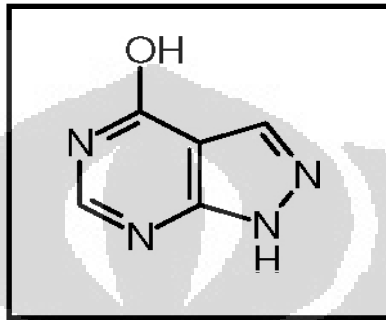
2.1.2 Terapi Gout

Tujuan dari terapi gout adalah untuk mengatasi rasa nyeri sendi akibat proses peradangan serta menurunkan kadar asam urat dalam tubuh. Biasanya terapi untuk penderita penyakit gout diberikan 3 jenis obat, yaitu anti inflamasi non-steroid (AINS), kortikosteroid dan obat-obat untuk mengatasi gout. Tujuan pemberian AINS karena dapat berefek sebagai analgesik untuk pengobatan nyeri berlanjut atau berulang akibat radang. Terapi kortikosteroid bertujuan untuk mempengaruhi keseimbangan air dan elektrolit tubuh sehingga dapat membantu dalam proses pelarutan asam urat. Terapi obat-obat penyakit gout ditujukan untuk mengatasi penanganan serangan akut gout dan mempengaruhi kadar asam urat seperti allopurinol. Secara pragmatis dapat digunakan patokan kadar asam urat >7 mg/dL pada laki-laki, dan >6 mg/dL pada perempuan (Rudi Hidayat, 2009).

2.1.3 Allopurinol

Allopurinol adalah salah satu obat yang paling sering digunakan untuk mengatasi penyakit hiperurisemia atau gout dengan mekanisme penghambat xantin oksidase digunakan untuk mencegah dan mengurangi terbentuknya asam urat.

Allopurinol mempengaruhi perubahan hipoxantin menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat. Allopurinol dapat dengan cepat diabsorpsi dengan pemberian oral. Metabolit utama dari allopurinol adalah oksipurinol tetapi kurang aktif dibandingkan dengan allopurinol (Adnyana, I., et al, 2009). Mempunyai rumus empirik $C_5H_4N_4O$ dengan berat molekul 136,1.



[sumber gambar: Clarke's analysis of drugs and poisons]

Gambar 2.1 Struktur Kimia Allopurinol

Metabolit dari allopurinol mempunyai waktu paruh yang panjang yaitu 12 sampai 40 jam, sedangkan allopurinol sekitar 0,5 sampai 2 jam. Sehingga pemberian allopurinol biasanya cukup diberikan satu kali sehari dengan dosis oral harian sebesar 300 mg.

2.2 *Averrhoa bilimbi*.L (Belimbing Wuluh)

2.2.1 Klasifikasi

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: <i>Oxalidales</i>
Suku	: <i>Oxalidaceae</i>
Marga	: <i>Averrhoa</i>
Jenis	: <i>Averrhoa bilimbi</i> L.

Nama Lain : Belimbing asam (Indonesia, Malaysia), Iba (Tagalog), Belimbing wuluh (Jawa), Calincing (Sunda) Bhalimbing bulu (Madura), Blimbing buluh (Bali), Selimeng (Aceh), Balimbing (Lampung), Balimbeng (Flores), Calene (Bugis), Takurela (Ambon).

2.2.2 Morfologi

Pohon kecil tinggi mencapai 10 m, batang tidak begitu besar, biasanya ditanam sebagai pohon buah, batang kasar banyak tonjolan, percabangan sedikit. Cabang muda berambut halus warna cokelat muda. Daun bulat telur memanjang, warna hijau, bertangkai. Berbunga kecil-kecil bentuk bintang, warna ungu kemerahan, keluar dari batang. Buah bentuk bulat lonjong bersegi, warna hijau kekuningan, mengandung banyak air, rasa asam. Biji bulat telur gepeng (Mun'im .A dan Hanani E., 2011).

2.2.3 Ekologi, penyebaran dan budidaya

Tumbuh dan ditanam di Asia sampai perbukitan Asia Tenggara termasuk Indonesia. Banyak ditanam orang di pekarangan-pekarangan yang cukup memperoleh sinar matahari. Dapat Tumbuh baik, dari dataran rendah sampai ketinggian kurang dari 750 m di atas permukaan laut.

2.2.4 Kandungan Kimia

Ekstrak daun belimbing wuluh mengandung fitol (senyawa diterpen alkohol asiklik), dietil-ftalat, flavonoid, tanin, sulfur, asam format, asam sitrat, kalium sitrat, saponin, kalsium oksalat. Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun belimbing wuluh adalah luteolin dan apigenin (Zakaria et al., 2007). Kandungan kimia yang paling dominan adalah dietil-ftalat dan fitol (Hernani et al., 2009)

2.2.5 Manfaat

Belimbing wuluh sering dimanfaatkan sebagai obat-obatan tradisional serta sebagai masakan. Belimbing ini juga digunakan untuk membersihkan logam dan

Universitas Indonesia

menghilangkan karat (PROSEA, n.d). Tanaman belimbing wuluh secara tradisional dipercaya dapat mengobati penyakit hipertensi, diabetes mellitus, demam, radang poros usus, batuk, encok dan menghilangkan jerawat (Thomas, 1989). Bagian tanaman yang paling sering dimanfaatkan adalah daun dan buah dari tanaman belimbing wuluh.

2.3 Enzim

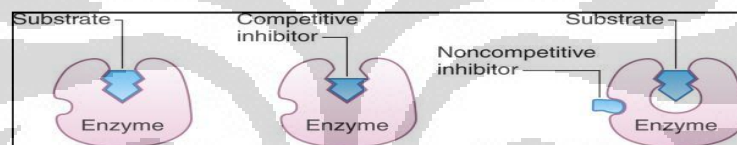
Enzim merupakan katalisator protein yang mengatur kecepatan berlangsungnya berbagai macam proses fisiologis (Rodwell, 2003). Enzim memiliki tempat aktif yang mengandung asam amino pada sisi rantai yang akan membentuk permukaan tiga dimensi yang saling melengkapi dengan substrat. Tempat aktif pada enzim akan berikatan dengan substrat, membentuk kompleks enzim-substrat (ES). ES akan dirubah menjadi enzim-produk (EP), setelah itu akan berpisah menjadi enzim dan produk.

Nama-nama yang paling sering digunakan untuk kebanyakan enzim menjelaskan tipe reaksi yang dikatalisis, diikuti oleh akhiran *-ase*. Contohnya, dehidrogenase (mengeluarkan atom-atom hydrogen), protease (menghidrolisis protein), isomerase (mengatalisis tata ulang dalam konfigurasi). Pemoifikasi dapat terletak di depan atau di belakang nama enzim untuk menjelaskan substrat enzim (contoh : xantin oksidase), sumber enzim (contoh : ribonuklease pancreas), pengaturannya (contoh : lipase peka-hormon), atau suatu gambaran dari mekanisme kerjanya (protease sistein) (Murray, Granner, Rodway, 2009).

Faktor-faktor yang memengaruhi kerja dari enzim adalah suhu, pH dan inhibitor. Peningkatan suhu akan meningkatkan laju baik reaksi yang tidak dikatalisis maupun yang dikatalisis enzim. Namun, energi panas juga dapat meningkatkan energi kinetik enzim hingga ke suatu titik yang melebihi hambatan energi untuk merusak interaksi non-kovalen yang mempertahankan struktur tiga dimensi enzim. Rantai polipeptida enzim akan mengalami denaturasi disertai dengan hilangnya kemampuan katalitik enzim. Enzim pada manusia umumnya dapat stabil hingga suhu 45-55 °C.

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

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



[Sumber : McPherson & Pincus, 2006]

Gambar 2.2 Perbedaan struktur antara inhibitor kompetitif dan inhibitor nonkompetitif.

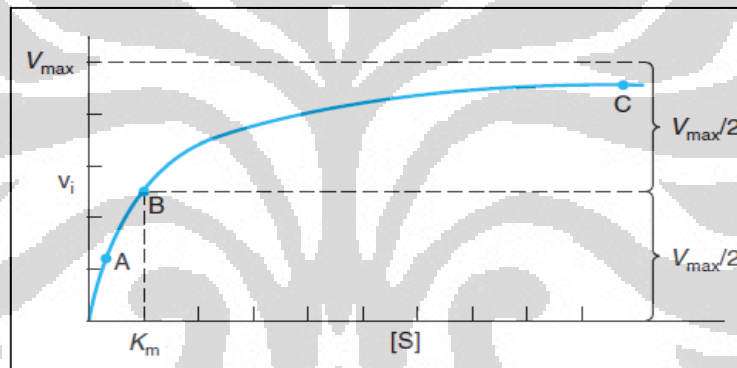
Inhibisi kompetitif terjadi ketika inhibitor berikatan dengan enzim pada tempat yang sama dengan substrat. Molekul substrat dan inhibitor memiliki struktur yang sama, sehingga berkompetisi untuk dapat berikatan pada tempat aktif enzim membentuk kompleks enzim-inhibitor yang reversibel. Inhibisi nonkompetitif terjadi ketika inhibitor berikatan dengan enzim pada tempat yang berbeda dengan tempat berikatannya dengan substrat. Inhibitor dan substrat dapat berikatan dengan enzim secara serempak. Ikatan inhibitor pada tempat yang lain pada sisi enzim dapat menghilangkan aktivitas enzim atau menurunkan sebagian aktivitasnya

2.3.1 Persamaan Michaelis-Menten

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

(2.1)

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



[Sumber : Murray et al., 2003]

Gambar 2.3 Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim

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

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

- b. Bila konsentrasi substrat [S] jauh melampaui K_m , maka percepatan awal V_i , merupakan percepatan maksimal (V_{maks}). Pada gambar 2.1 dapat dilihat sebagai titik C.
- c. Bila konsentrasi substrat sama dengan nilai K_m , maka percepatan awal V_i separuh dari percepatan maksimal. Pada gambar 2.1 dapat dilihat sebagai titik B.

2.3.2 Bentuk Linear Persamaan Michaelis-Menten

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

$$\text{---} \quad (2.2)$$

Persamaan dibalik $\text{---} \quad (2.3)$

Difaktorkan $\text{---} = \text{---} \quad (2.4)$

Sederhanakan $\text{---} = \text{---} \quad (2.5)$

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

Dengan $y = \text{---}$ dan $x = \text{---} \quad (2.7)$

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

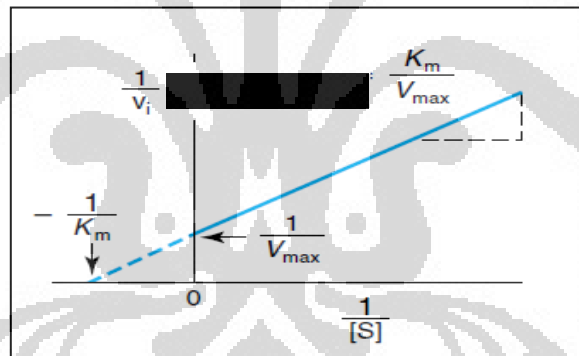
$$\text{--- ---} \quad (2.8)$$

2.3.3 Plot Lineweaver Burk

Plot Lineweaver-Burk dapat digunakan untuk menghitung K_m dan V_{\max} , untuk menentukan mekanisme penghambatan. K_m dapat diperkirakan dengan menggunakan garis miring y dan titik potong y atau titik potong negatif x .

$$\text{--- --- ---} \quad (2.9)$$

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



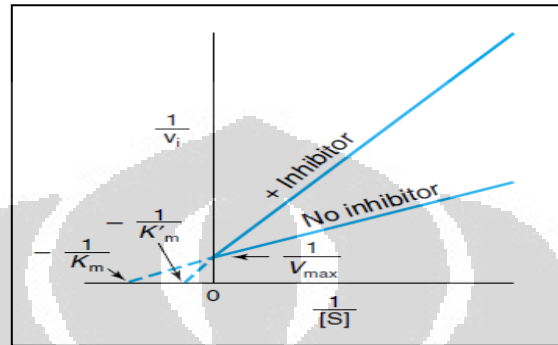
[Sumber : Murray et al., 2003, telah diolah kembali]

Gambar 2.4 Plot Lineweaver Burk dari $1/V_i$ terhadap $1/[S]$

2.3.4 Inhibisi Kompetitif

Inhibisi kompetitif terjadi ketika inhibitor berikatan dengan enzim pada tempat yang sama dengan substrat. Molekul substrat dan inhibitor memiliki struktur yang sama, sehingga berkompetisi untuk dapat berikatan pada tempat aktif enzim

(McPherson & Pincus, 2006). Inhibitor dapat berikatan secara reversibel dengan enzim sehingga bukan membentuk kompleks enzim-substrat, melainkan membentuk kompleks enzim-inhibitor.



[Sumber : Murray et al., 2003]

Gambar 2.5 Plot Lineweaver Burk yang memperlihatkan inhibisi kompetitif.

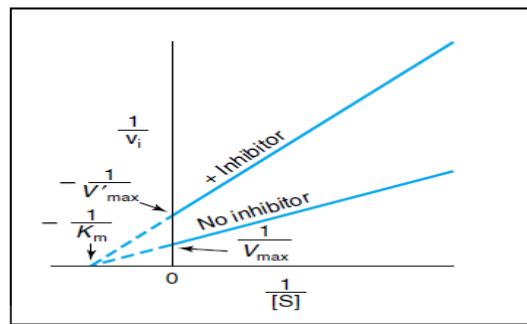
Kecepatan pembentukan produk bergantung pada konsentrasi enzim-substrat. Bila konsentrasi inhibitor tetap, ditambahkan lebih banyak substrat, akan meningkatkan probabilitas bahwa enzim akan lebih banyak berikatan dengan substrat dibandingkan dengan inhibitor (Murray et al., 2003).

2.3.5 Inhibisi Non-Kompetitif

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

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

Universitas Indonesia

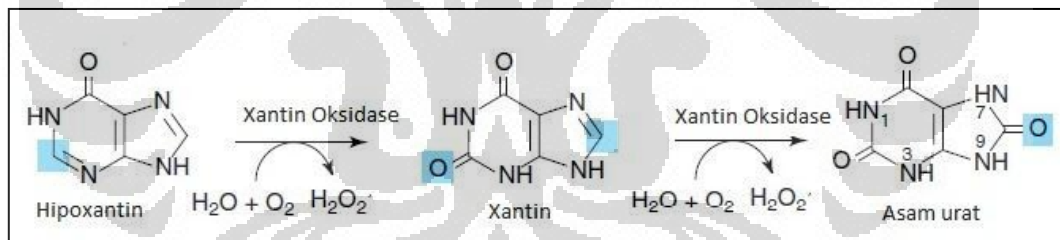


[Sumber : Murray et al., 2003]

Gambar 2.6 Plot Lineweaver Burk untuk inhibisi nonkompetitif

2.3.6 Xantin Oksidase

Enzim xantin oksidase adalah enzim yang berfungsi dalam sintesis asam urat dari xantin. Xantin oksidase paling banyak terdistribusi dalam hati dan saluran cerna. Enzim xantin oksidase bekerja dengan mengatalisis oksidasi dari hipoxantin menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat dengan mekanisme reaksi sebagai berikut :



[Sumber : Murray et al., 2003]

Gambar 2.7 Reaksi Enzimatis xantin oksidase mengonversi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat

2.4 Simplisia

Simplisia yang digunakan adalah bagian daun belimbing wuluh (*Bilimbii folium*). Simplisia adalah bahan alam yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga, kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Departemen Kesehatan III, 1979). Ciri makroskopik dari simplisia *bilimbii folium* adalah anak daun berwarna hijau muda, hijau sampai hijau

kecoklatan, permukaan bawah berwarna lebih muda, bentuk bundar panjang sampai jorong, pangkal daun membulat, pinggir daun rata. Tangkai daun 1 mm sampai 2 mm, tulang daun, terutama tulang daun utama menonjol pada permukaan bawah. Permukaan bawah berambut lebih banyak dari pada permukaan atas (Materia Medika Indonesia V, 1989).

2.5 Ekstraksi dan Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental, atau cair dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (Departemen Kesehatan III, 1979). Ekstraksi atau penyarian adalah suatu cara penarikan kandungan kimia dari simplisia dengan cara dan pelarut yang cocok agar kandungan kimia yang dapat larut terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Terdapat dua model ekstraksi, yaitu cara dingin dan cara panas. Cara dingin meliputi maserasi, dan perkolasi. Sedangkan cara panas meliputi reflux, soxhlet, digest, infusa, dekokta.

2.5.1 Ekstraksi Cara Dingin

2.5.1.1 Maserasi

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

2.5.1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahapan maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan / penampungan ekstrak), terus menerus sampai perkolat yang jumlahnya 1-5 kali jumlah bahan.

2.5.2 Ekstraksi Cara Panas

2.5.2.1 Refluks

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

2.5.2.2 Sokletasi

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

2.5.2.3 Digesti

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

2.5.2.4 Infusa

Infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati dengan air pada suhu 90 °C selama 15 menit (Departemen Kesehatan, 1979).

2.5.2.5 Dekokta

Dekokta adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati dengan air pada suhu 90 °C selama ≥ 30 menit

Pelarut yang dipilih untuk melakukan ekstraksi dilihat berdasarkan kemampuan menarik metabolit sekunder dari tanaman tersebut. Sebagai cairan untuk melakukan ekstraksi digunakan air, eter atau campuran etanol dan air (Departemen Kesehatan, 1979). Ekstraksi yang dilakukan terhadap simplisia bilimbii folium adalah dengan

menggunakan pelarut etanol. Alkohol, bagaimanapun juga adalah pelarut serba guna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan (Harborne, 1987).

2.6 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri serap adalah pengukuran serapan radiasi elektromagnet panjang gelombang tertentu yang sempit, mendekati monokromatik, yang diserap zat (Departemen Kesehatan, 1979). Spektrum UV-Vis merupakan hasil interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan molekul. REM merupakan bentuk energi radiasi yang mempunyai sifat gelombang dan partikel (foton). Spektrum serapan adalah hubungan panjang gelombang antara serapan atau fungsi serapan dengan panjang gelombang yang biasanya digambarkan dalam bentuk grafik (Departemen Kesehatan, 1979). Lambert dan Beer telah menurunkan secara empirik hubungan antara intensitas cahaya yang ditransmisikan dengan tebalnya larutan dan hubungan antara intensitas tersebut dengan konsentrasi zat.

Keterangan :

A = Serapan

I_0 = Intensitas sinar yang datang

I_t = Intensitas sinar yang ditransmisikan atau diteruskan

γ = absorpsitivitas molekuler (mol.cm.I_t^{-1})

a = daya serap (g.cm.I_t^{-1})

b = tebal larutan atau kuvet

c = konsentrasi ($\text{g.I}_t^{-1}.\text{mg.ml}^{-1}$)

Jenis spektrofotometer UV-Vis ada dua macam, yaitu *single beam* dan *double beam*. Pada *single beam*, cahaya keluar sinar monokromatis hanya satu, wadah atau kuvet yang dapat dilalui sinar hanya satu, dan setiap perubahan panjang gelombang alat harus dinolkan. Sedangkan pada *double beam*, cahaya keluar sinar monokromatis ada dua, wadah melalui dua kuvet sekaligus, dan cukup satu kali dinolkan dengan cara mengisi kedua kuvet dengan larutan blanko

Senyawa yang dapat diukur dengan metode spektrofotometer ini adalah senyawa yang memiliki gugus kromofor, yaitu gugus fungsional yang mengabsorpsi radiasi ultra violet dan tampak, jika diikat oleh senyawa bukan pengabsorpsi (auksokrom). Hampir semua kromofor memiliki ikatan rangkap berkonjugasi (contohnya diena $C=C-C=C$, dienon $C=C-C=O$, benzene, dan lain lain). Sedangkan auksokrom biasanya merupakan gugus fungsional seperti $-OH$, $-NH_2$, $-NO_2$, $-X$. Spektrofotometer pada dasarnya terdiri atas sumber sinar monokromator, tempat sel untuk zat yang diperiksa, detektor, penguat arus dan alat ukur/pencatat (Departemen Kesehatan, 1979).

2.7 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah cara pemisahan zat berkhasiat dan zat lain yang ada dalam sediaan, dengan jalan penyarian berfraksi, atau penyerapan, atau penukaran ion pada zat berpori, menggunakan cairan atau gas yang mengalir. Metode kromatografi yang digunakan pada penelitian ini adalah kromatografi lapisan tipis yang umum digunakan untuk memperoleh profil kromatogram dan identifikasi karena metode ini khas dan mudah dilakukan untuk zat dengan jumlah sedikit (*Materia Medika*, 1995).

Ukuran lempeng KLT biasanya adalah 20 x 20 cm dengan jarak tempuh fase gerak pada lapis tipis tersebut adalah 15 cm. Sampel ditotolkan pada lapis tipis tersebut berjarak 1 – 2 cm dari tepi bawah lempeng. Pemisahan dengan melewati sebuah pelarut, fase gerak, melalui lempeng tipis KLT. Setelah pelarut selesai dielusikan pada lempeng, kemudian kromatogram dikeringkan dan lokasi bercak dapat diketahui dengan beberapa cara, diantaranya dengan visualisasi di bawah sinar

ultraviolet, juga dengan reagen semprot yang akan memberukan warna atau senyawa yang berfluoresensi. Nilai Rf ditentukan untuk mengetahui posisi senyawa pada kromatogram tersebut, dengan nilai Rf antara 0 sampai 0,999, dihitung dengan persamaan :

Untuk menunjukkan posisi relatif terhadap posisi dari senyawa lain, standar (x), dengan nilai Rx dapat lebih dari 1, maka nilai Rx dapat dihitung dengan persamaan :

2.8 Golongan Senyawa Fitokimia

2.8.1 Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam gabungan berbentuk siklik. Alkaloid sebagian besar berbentuk kristal padat dan sebagian kecil berupa cairan (misalnya nikotin) pada suhu kamar, memutar bidang polarisasi dan terasa pahit dan biasanya tanpa warna (Harborne, 1987).

2.8.2 Flavonoid

Flavonoid mengandung system aromatik yang terkonjugasi dan arena itu dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spectrum UV. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai glikosida dan aglikon flavonoid. Flavonoid biasanya terdapat dalam semua tumbuhan berpembuluh.

Proses ekstraksi flavonoid dilakukan dengan etanol mendidih untuk menghindari oksidasi enzim (Harborne, 1987). Pendeteksian adanya senyawa ini dapat dilakukan dengan menambahkan larutan besi (III) klorida 1% dalam air atau etanol yang menimbulkan warna hijau atau hitam kuat.

2.8.3 Terpenoid

Terpenoid adalah suatu senyawa yang berasal dari molekul isopren $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ dan kerangka karbonnya yang dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan C_5 ini. Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa yaitu monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang sukar menguap dan yang tidak menguap, triterpenoid dan sterol, serta karotenoid

2.8.4 Tanin

Tanin umum terdapat dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus di dalam jaringan. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air.

Secara kimia, tanin terdiri dua golongan yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal (atau galokatekin) yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Tanin terhidrolisis mengandung ikatan ester yang terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer (Harborne, 1987). Tanin terkondensasi hampir terdapat semesta di dalam paku-pakuan dan gimnospermae, serta tersebar luas dalam angiospermae, terutama pada tumbuhan berkayu. Sedangkan tanin terhidrolisis penyebarannya terbatas pada tumbuhan berkeping dua.

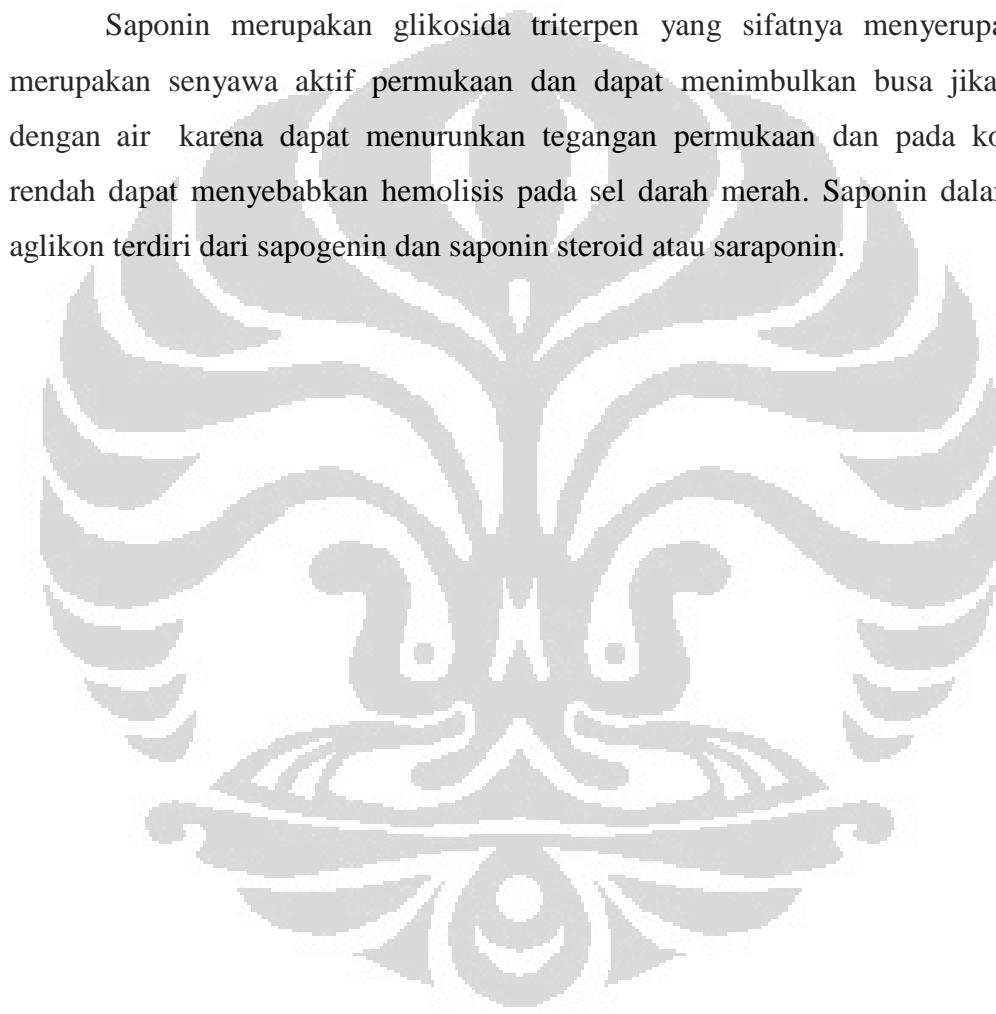
2.8.5 Glikosida

Glikosida merupakan suatu senyawa terdiri dari bagian gula (glikon) dan senyawa lain (aglikon atau genin). Pada umumnya glikon berupa glukosa, fruktosa,

laktosa, galaktosa dan manosa. Sedangkan aglikon (genin) biasanya mempunyai gugus $-OH$ dalam bentuk alkoholis atau fenolis. Glikosida dapat dibedakan menjadi α -glikosida dan β -glikosida. Pada tanaman, glikosida biasanya terdapat dalam bentuk β -glikosida.

2.8.6 Saponin

Saponin merupakan glikosida triterpen yang sifatnya menyerupai sabun, merupakan senyawa aktif permukaan dan dapat menimbulkan busa jika dikocok dengan air karena dapat menurunkan tegangan permukaan dan pada konsentrasi rendah dapat menyebabkan hemolisis pada sel darah merah. Saponin dalam bentuk aglikon terdiri dari sapogenin dan saponin steroid atau saraponin.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia dan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok, dari bulan Februari sampai Mei 2012.

3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah lemari pengering, ayakan, refluks, kondensor, timbangan analitik, blender, *oven vacuum*, *rotary vacuum evaporator* (Janke & Kunkel IKA, Jerman), inkubator, vortex, pH meter (Eutech Instruments), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-265, Jepang), kuvet, pipet volume, pipet mikro, lempeng silika gel 60 F₂₅₄ (Merck, Jerman), *chamber* KLT, dan alat-alat gelas.

3.3 Bahan

3.3.1 Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang diperoleh dari sekitar lingkungan Universitas Indonesia di Depok dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI), Cibinong.

3.3.2 Bahan Kimia

Etanol (PT. Harum Kimia), n-heksana (PT. Harum Kimia), n-butanol (PT. Harum Kimia), metanol (PT. Bratachem), etil asetat (PT. Bratachem), air suling demineralisatataisata bebas CO₂, standar allopurinol (Kimia Farma), substrat xantin (Sigma Aldrich), xantin oksidase (Sigma Aldrich), asam sulfat P, asam asetat anhidrat, dimetil sulfoksida, HCl, natrium sulfat anhidrat, serbuk seng, serbuk magnesium, natrium karbonat, NaCl, benzen (Merck, Jerman), dapar fosfat.

3.4 Prosedur Pelaksanaan

3.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap. Pertama penyiapan simplisia, kedua ekstraksi simplisia, ketiga fraksinasi, keempat optimasi aktivitas enzim xantin oksidase, kelima uji aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase dari berbagai fraksi, dan terakhir kromatografi serta identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi aktif.

3.4.2 Persiapan Bahan Uji

3.4.2.1 Persiapan Simplisia Uji

Daun belimbing wuluh diambil dari pohonnya yang masih berwarna hijau, kemudian disortasi dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan terlindung dari cahaya matahari langsung. Simplisia yang telah kering disortasi kembali untuk memisahkan bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang tertinggal, kemudian dibuat serbuk dengan menggunakan blender.

3.4.2.2 Ekstraksi dan Fraksinasi

Simplisia kering sebanyak 1 kg direfluks dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Saring filtrat hingga dihasilkan ekstrak cair yang sudah tidak berwarna pekat. Kemudian seluruh ekstrak cair etanol diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40-50°C hingga etanol menguap seluruhnya dan diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak kental etanol kemudian difraksinasi menggunakan pelarut yang semakin meningkat kepolarannya yaitu n-heksana, etil asetat, n-butanol dan metanol.

Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi menggunakan corong pisah. Namun sebelum difraksinasi, ekstrak kering etanol didispersikan dengan air panas terlebih dahulu, kemudian dipartisi dengan menambahkan n-heksana dengan

perbandingan 1:1, kocok selama \pm 1 jam, diamkan hingga terbentuk 2 lapisan dengan ekstrak air yang berada di bagian bawah dan ekstrak / lapisan n-heksana di bagian atas dan dilakukan berulang hingga didapatkan warna hampir jernih di lapisan n-heksana, selanjutnya pisahkan keduanya.

Ekstrak n-heksana diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental n-heksana, sedangkan ekstrak air selanjutnya difraksinasi kembali secara berturut-turut dengan cara yang sama menggunakan pelarut, etil asetat dan n-butanol hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat, ekstrak kental n-butanol dan ekstrak air.

Ekstrak air kemudian diuapkan dengan menggunakan *oven vacuum* hingga sedikit mengental, lalu ditambahkan metanol sedikit demi sedikit dan dibiarkan menguap hingga diperoleh ekstrak kental metanol. Kemudian timbang ekstrak kental n-heksana, etil asetat, n-butanol dan metanol yang diperoleh.

3.4.3 Pembuatan Larutan Uji dan Larutan Pereaksi

3.4.3.1 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Daun *Averrhoa bilimbi* L.

Ekstrak kental sebanyak 10 mg ditambahkan 4 tetes DMSO hingga larut kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur. Setelah itu diencerkan dengan air suling demineralisaisata bebas CO₂ sampai batas dan diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan uji ekstrak daun belimbing wuluh dibuat dengan terlebih dahulu membuat larutan induk 1000 ppm dan kemudian diencerkan dengan air suling demineralisaisata bebas CO₂ hingga diperoleh konsentrasi 0,05; 0,10; 0,20; 0,25; 0,50; 1,0; 5,0; 10; 20; 25; dan 50 ppm dengan pengenceran masing-masing.

3.4.3.2 Larutan Enzim Xantin Oksidase

Perhitungan yang diperoleh dari keterangan pada label kemasan xantin oksidase diperoleh : 0,8 unit/mg protein. Konsentrasi larutan enzim yang dibuat adalah 0,1 unit/mL. Total mg protein adalah 5,126 unit/6,408 mg protein. Ditimbang

22,17 mg xantin oksidase, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur dan dilarutkan ke dalam dapar fosfat sampai dengan 25,0 mL.

3.4.3.3 Pembuatan Larutan Substrat Xantin

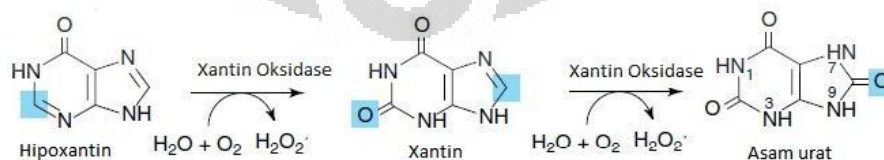
Sebanyak 15,21 mg xantin ditimbang dan ditambahkan dengan lima tetes NaOH 1 M hingga larut, setelah itu diencerkan dengan air suling demineralisata bebas CO₂ sampai dengan 100 mL (konsentrasi 1 mM). Larutan xantin dibuat dengan mengencerkan larutan induk sampai diperoleh larutan xantin dengan konsentrasi 0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM dan 0,25 mM.

3.4.3.4 Pembuatan Larutan Standar Allopurinol

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

3.4.4 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

Uji aktivitas penghambatan xantin oksidase dilakukan secara *in vitro* dengan reaksi enzimatik dan pengukuran secara spektrofotometri. Enzim xantin oksidase akan menghidrolisis hipoxantin menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat dengan mekanisme reaksi sebagai berikut :



[Sumber : Murray et al., 2003]

Gambar 3.1 Reaksi Enzimatik xantin oksidase mengonversi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat

Universitas Indonesia

Penghambatan aktivitas xantin oksidase diuji dengan spektrofotometri dengan mengukur jumlah asam urat yang terbentuk.

3.4.4.1 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase

a. Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,5 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,05, 0,10, 0,15, 0,2, dan 0,25 mM dan 0,1 mL larutan enzim xantin oksidase (0,1 U/mL dalam dapar fosfat, pH optimum). Campuran diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 ml HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

b. Penentuan pH Optimum

Larutan dapar fosfat 0,05 M pada pH 7,0; pH 7,2; pH 7,5; pH 7,8; dan pH 8,0 sebanyak 2,9 ml, masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,15 mM dan 0,1 ml larutan enzim xantin oksidase (masing-masing 0,1 U/mL dalam dapar fosfat, pH 7,5 dan 7,8). Campuran diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 ml HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

c. Penentuan Suhu Optimum

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,5 sebanyak 2,9 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 ml larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,15 dan 0,1 mL larutan enzim xantin oksidase (0,1 U/ml dalam dapar fosfat, pH 7,5). Campuran diinkubasi pada suhu 20, 25 dan 30 °C selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 ml HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum

d. Perhitungan Aktifitas Optimum Enzim

Kondisi optimum dapat ditentukan dengan menentukan aktivitas optimum dari enzim, dihitung berdasarkan rumus :

$$\left(\frac{\quad}{\quad} \right)$$

Keterangan :

vol : total volume saat pengujian

df : faktor pengenceran

12,2 : koefisien asam urat (mM)

0,1 : volume xantin oksidase yang digunakan

Satu unit xantin oksidase akan mengkonversi 0,1 μ mol xantin menjadi asam urat per menit.

3.4.4.2 Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase

a. Pengujian Sampel

Semua ekstrak yang dihasilkan diukur penghambatannya terhadap aktivitas xantin oksidase. Pengujian dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer di bawah kondisi aerob. Larutan uji sebanyak 1 mL dengan konsentrasi (0,05; 0,10; 0,20; 0,25; 0,50; 1,0; 5,0; 10; 20; 25; dan 50 μ g/mL) dtambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi 0,15 mM. Setelah dilakukan prainkubasi pada suhu 30°C selama 15 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 0,1 mL larutan enzim dengan konsentrasi 0,1 unit/mL dalam dapar fosfat. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 281,5 nm menggunakan spektrofotometer.

b. Pengujian Kontrol Sampel

Larutan uji sebanyak 1 mL dengan konsentrasi (0,05; 0,10; 0,20; 0,25; 0,50; 1,0; 5,0; 10; 20; 25; dan 50 μ g/mL) dtambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 dan 2

Universitas Indonesia

mL larutan substrat xantin pada konsentrasi 0,15 mM. Kemudian ditambahkan larutan HCl 1 N. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 30 menit. Larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 281,5 nm.

c. Pengujian Standar Allopurinol

Larutan standar allopurinol sebanyak 1 mL dengan konsentrasi (0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 20; 50 dan 100 µg/mL) ditambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi 0,15 mM. Setelah dilakukan preinkubasi pada suhu 30°C selama 15 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 0,1 mL larutan enzim dengan konsentrasi 0,1 unit/mL dalam dapar fosfat. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 281,5 nm menggunakan spektrofotometer.

d. Pengujian Kontrol Standar Allopurinol

Larutan standar sebanyak 1 mL dengan konsentrasi (0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 20; 50 dan 100 µg/mL) ditambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum. Kemudian ditambahkan larutan HCl 1 N. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai, diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

e. Pengujian Blanko

Dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 sebanyak 3,4 ml ditambahkan larutan DMSO sebanyak 0,5 mL dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi 0,15 mM kemudian ditambahkan 0,1 mL larutan enzim dengan konsentrasi 0,1 unit/mL dalam dapar fosfat. 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 281,5 nm menggunakan spektrofotometer.

f. Pengujian Kontrol Blanko

Dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 sebanyak 3,4 ml ditambahkan larutan DMSO sebanyak 0,5 mL dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum. Kemudian ditambahkan larutan HCL 1 N. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai, diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

Tabel 3.1. Prosedur uji penghambatan aktivitas xantin oksidase

Reagen	Volume			
	Blanko (A ₁)	Kontrol Blanko (A ₂)	Sampel (B ₁)	Kontrol Sampel (B ₂)
Sampel ekstrak (inhibitor)	-	-	1 ml	1ml
DMSO	0,2 ml	0,2 ml	-	-
Dapar	3,7 ml	3,8 ml	2,9 ml	3,0 ml
Substrat Xantin	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Pra inkubasi (suhu optimum)	10 menit			
Enzim	0,1 ml	-	0,1 ml	-
HCl 1 N	-	1 ml	-	1 ml
Inkubasi (suhu optimum)	30 menit			
HCl 1N	1 ml	-	1 ml	-
Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 281,5 nm				

3.4.4.3 Perhitungan Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase (IC₅₀)

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

Keterangan A : Perubahan absorbansi larutan uji tanpa ekstrak (dengan enzim-Blanko (dengan enzim) – Kontrol blanko (tanpa enzim)

B : Perubahan absorbansi larutan uji dengan ekstrak Sampel (dengan enzim)– Kontrol sampel (tanpa enzim)

Sebagai kontrol positif digunakan Allopurinol dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 20; 50 dan 100 µg/mL. Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan rumus persamaan regresi : $y = a + bx$

3.4.5 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia

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

3.4.5.1 Identifikasi Alkaloid (Depkes RI, 1995)

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

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

3.4.5.2 Identifikasi Glikosida (Depkes RI, 1995)

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

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

3.4.5.3 Identifikasi Saponin (Depkes RI,1995)

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

3.4.5.4 Identifikasi Flavonoid (Depkes RI,1995)

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

- b. Sejumlah 500 mg ekstrak dilarutkan dalam 1 mL etanol (95%) P. kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium P dan 10 tetes asam klorida pekat. Jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid. Jika warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron.
- c. Ekstrak dilarutkan dalam aseton, ditambahkan 50 mg as oksalat dan 50 mg as borat, diaduk kemudian didiamkan hingga mongering. Lalu tambahkan dietil eter, diaduk kemudian diamkan hingga mengering lalu dilihat di bawah sinar UV 366 nm akan berfluoresensi kuning kehijauan.
- d. Ekstrak disemprotkan dengan AlCl_3 dan dilihat di bawah sinar UV 366 nm akan berfluoresensi kuning.

3.4.5.5 Identifikasi Tanin (Farnsworth, 1966)

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

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

3.4.5.6 Identifikasi Terpen (Farnsworth, 1966)

Sejumlah 200 mg ekstrak kental ditambahkan campuran asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1). Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna merah hijau atau violet biru. Semprot dengan larutan p-anisaldehyd dalam asam sulfat pekat berfluoresensi di bawah sinar UV 366 nm membentuk warna biru tua, hijau, merah, coklat

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Bahan

Pada penelitian ini, simplisia yang digunakan adalah bagian daun dari tanaman *Averrhoa bilimbi L.* (belimbing wuluh) yang diperoleh dari lingkungan Universitas Indonesia, Depok dan telah dideterminasi oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong. Daun tanaman belimbing wuluh yang diambil dilakukan pencucian untuk memisahkan dari kotorannya kemudian dilakukan sortasi untuk dipilih yang masih berwarna hijau dan segar. Setelah itu, dilakukan pengeringan dengan cara diangin-anginkan hingga diperoleh simplisia kering. Setelah pengeringan, simplisia dijadikan serbuk dengan menggunakan blender agar luas permukaan bertambah sehingga mudah diperoleh kandungan kimia saat dilakukan ekstraksi. Gambar tanaman dari belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dapat dilihat pada gambar 4.9.

4.2 Ekstraksi Simplisia

Ekstraksi serbuk simplisia dilakukan dengan cara panas, yaitu dengan cara refluks untuk mempercepat ekstraksi. Serbuk simplisia daun belimbing wuluh yang diekstraksi adalah sekitar 750 gram dengan penggunaan pelarut etanol sebanyak 17 liter. Serbuk simplisia diekstraksi bertahap 2 kali karena keterbatasan alat. Sekitar 500 gram simplisia di refluks sebanyak 7 kali sampai warna ekstrak cair yang didapat sudah tidak pekat atau tidak berwarna dan dengan dihitung setelah tetesan pertama dimulai, setiap 30 menit sekali diambil ekstrak cair kemudian diganti dengan pelarut baru dan direfluks ulang. Sekitar 250 gram sisanya dilakukan refluks juga seperti sebelumnya. Kemudian ekstrak cair yang diperoleh dari hasil refluks disaring agar ekstrak yang diperoleh terpisah dari ampas. Ekstrak cari etanol 96 % yang sudah bebas ampas kemudian diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*, setelah itu

dipekatkan di atas penangas air hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental etanol 96 % diperoleh sebanyak 68,2 gram dengan randemen 9,1 %.

4.3 Fraksinasi

Ekstrak kental etanol yang telah diperoleh kemudian difraksinasi dengan menggunakan berbagai macam pelarut sesuai tingkat kepolaran yang berbeda-beda. Fraksinasi dilakukan dari menggunakan pelarut yang bersifat non polar, semi polar sampai polar. Pelarut yang digunakan pada fraksinasi ini secara berurutan dari non polar sampai polar adalah n-heksana, etil asetat, n-butanol, dan metanol. Ekstrak kental etanol 96 % yang didapatkan kemudian didispersikan dalam air suling panas sebanyak 100 mL sebelum dilakukan fraksinasi dengan tujuan untuk mempermudah distribusi senyawa saat fraksinasi.

Setelah ekstrak terdispersi merata dalam air suling panas, fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksana sebanyak 100 mL di dalam corong pisah dengan cara pengocokan. Setelah terpisah larutan n-heksana dan air, lapisan n-heksana didekantisir, kemudian ditambahkan kembali pelarut n-heksana baru lalu dikocok kembali dan dilakukan berulang hingga lapisan n-heksana hampir tidak berwarna. Fraksinasi menggunakan n-heksana menghabiskan 4 L pelarut. Hasil fraksinasi berupa larutan hijau yang kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan penangas air pada suhu 50 °C sampai diperoleh ekstrak kental n-heksana. Setelah fraksi n-heksana dan fraksi air terpisah, fraksi air dilakukan fraksinasi selanjutnya menggunakan etil asetat.

Fraksinasi selanjutnya dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan penambahan 100 mL di corong pisah dan dengan pengocokan. Setelah lapisan etil asetat dan lapisan air terpisah, lapisan etil asetat ditampung dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan penangas air hingga didapatkan ekstrak kental etil asetat. Fraksinasi yang dilakukan menghabiskan 2 L etil asetat.

Fraksinasi selanjutnya menggunakan pelarut n-butanol dengan penambahan 100 mL di corong pisah dengan cara pengocokan juga. Setelah terpisah lapisan n-

butanol dan lapisan air, lapisan air terjadi pengurangan volume karena kemiripan kepolaran sehingga sebagian air terdispersi dalam pelarut n-butanol, sehingga diperlukan penambahan air suling setiap pengocokan dengan n-butanol agar senyawa kimia yang polar tetap tertarik pada lapisan air. Fraksi n-butanol kemudian ditampung dan dipekatkan dengan menggunakan *oven vacuum* dan penangas air hingga didapatkan ekstrak kental n-butanol. Fraksinasi menghabiskan 1,5 liter n-butanol. Lapisan air yang tersisa di pekatkan terlebih dahulu dengan menggunakan penangas air kemudian dilarutkan dalam metanol dengan bantuan pemanasan untuk mempercepat pelarutan. Setelah itu ekstrak metanol dipekatkan dengan menggunakan penangas air hingga didapatkan ekstrak kental metanol. Masing-masing ekstrak kental yang diperoleh dan randemennya dapat dilihat di tabel 4.6

4.4 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase dilakukan secara *in vitro* dengan reaksi enzimatik dan pengukuran secara spektrofotometri. Prinsipnya adalah mengukur jumlah asam urat terbentuk dari reaksi yang dikatalisis oleh xantin oksidase. Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase terdiri dari uji pendahuluan penghambatan aktivitas xantin oksidase dan pengujian sampel terhadap penghambatan aktivitas xantin oksidase.

4.4.1 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

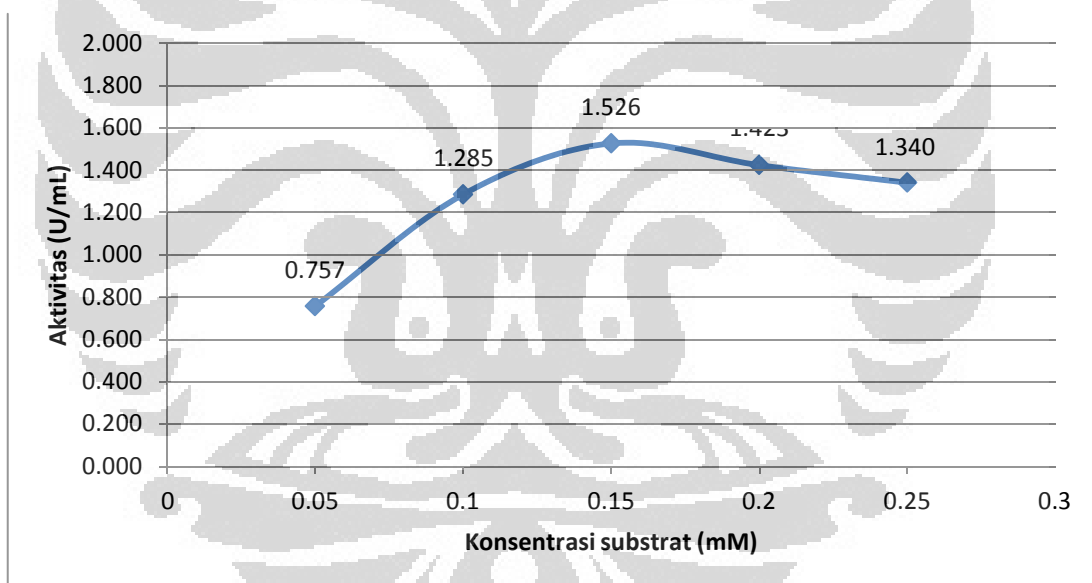
Uji pendahuluan penghambatan aktivitas xantin oksidase bertujuan untuk menentukan kondisi optimum aktivitas enzim sehingga dapat berlangsung optimal. Pada uji pendahuluan yang ditentukan adalah konsentrasi substrat, kondisi pH, dan suhu pra inkubasi dan inkubasi. Pada uji pendahuluan, tidak dilakukan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

4.4.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk menentukan panjang gelombang dimana diperolehnya produk asam urat terbanyak yang menandakan besarnya aktivitas enzim xantin oksidase. Panjang gelombang maksimum terdapat pada panjang gelombang 281,5 nm.

4.4.1.2 Penentuan konsentrasi substrat Optimum

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



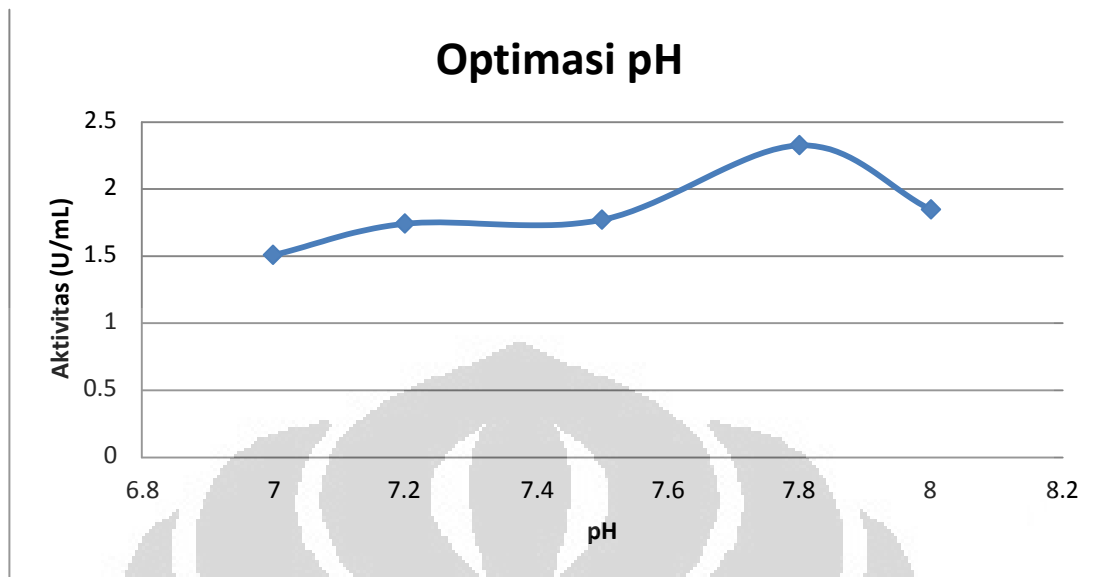
Gambar 4.1. Grafik penentuan konsentrasi substrat xantin pada 0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM dan 0,25 mM.

Berdasarkan hasil pengukuran secara spektrofotometri (Tabel 4.7), aktivitas enzim meningkat sebanding dengan kenaikan konsentrasi substrat dan mencapai aktivitas maksimum pada konsentrasi 0,15 mM dengan aktivitas sebesar 1,526 unit/mL dan mengalami penurunan ketika konsentrasi 0,2 mM. Peningkatan

konsentrasi substrat akan meningkatkan jumlah enzim-substrat, namun pada konsentrasi tertentu akan berada pada kondisi jenuh ketika tidak ada lagi enzim bebas yang tersedia, peningkatan laju konsentrasi substrat tidak lagi meningkatkan laju pembentukan enzim-substrat (Murray et al., 2003). Pada Gambar 4.1 setelah konsentrasi optimum diperoleh, terjadi penurunan aktivitas pada konsentrasi 0,2 mM dan 0,25 mM yang disebabkan oleh penghambatan aktivitas enzim oleh produk yang dihasilkan, yaitu asam urat. Data konsentrasi, serapan dan aktivitas pada penentuan konsentrasi substrat optimum dapat di lihat Tabel 4.7.

4.4.1.3 Penentuan pH Optimum

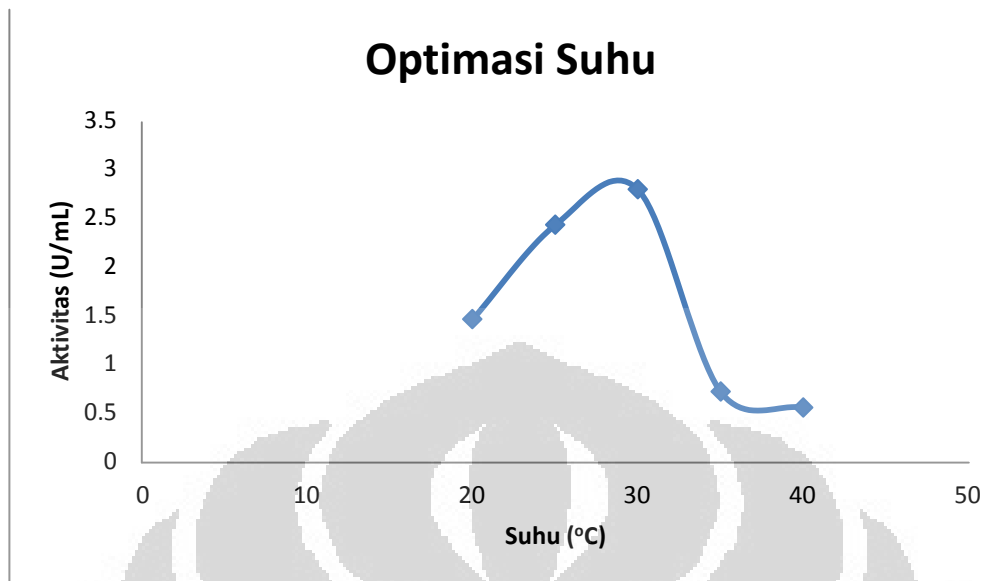
Pada uji optimasi pH, variasi yang digunakan adalah pada pH 7,0 ; 7,2; 7,5; 7,8 dan 8,0. Kondisi optimum ditunjukkan pada pH 7,8 dengan serapan dan nilai aktivitas terbesar dibandingkan dengan pada pH 7,0 , pH 7,2, pH 7,5 dan pH 8,0. Nilai optimasi pH yang di dapatkan berbeda dengan COA dari Sigma Aldrich dimana disebutkan bahwa kondisi pH optimum berada pada pH 7,5. Dari beberapa literatur lain, optimasi pH juga menunjukkan adanya perbedaan hasil dimana nilai di beberapa literatur tidak ada yang memperoleh hasil optimasi pH di bawah 7,4 dikarenakan reaksi enzimatik pembentukan asam urat dapat berhenti dalam kondisi asam. Hal tersebut kemungkinan disebabkan akibat perbedaan dalam penyimpanan enzim dan substrat yang digunakan serta perbedaan dalam perlakuannya. Nilai pH yang diperoleh pada uji pendahuluan akan digunakan pada saat pengujian selanjutnya. Data serapan penentuan pH optimum dapat dilihat pada Tabel 4.8.



Gambar 4.2 Grafik hasil optimasi pH

4.4.1.4 Penentuan Suhu Optimum

Uji kondisi suhu optimum dilakukan pada suhu 20, 25, 30, 35 dan 40°C. Prainkubasi dilakukan selama 10 menit di dalam inkubator dan bertujuan untuk menyesuaikan suhu larutan uji dengan suhu inkubasi, dimana enzim dapat bekerja dengan optimum. Kondisi optimum ditunjukkan pada suhu 30°C, dimana serapan dan aktivitas yang dihasilkan paling besar dibandingkan pada suhu 20, 25, 30 dan 35°C. Data COA yang dimiliki Sigma Aldrich menyebutkan bahwa suhu optimum terdapat pada 25°C, sedangkan dari literatur lain ada yang menyebutkan suhu optimum pada 22°C (Arnhold J. et al., 2011), 25°C (Umamaheswari et al., 2009) dan 30°C (Markham J.L et al., 2001). Hal tersebut kemungkinan dikarenakan perbedaan perlakuan dan kondisi lingkungan sekitar. Suhu optimum yang diperoleh digunakan pada prainkubasi dan inkubasi pada saat pengujian sampel. Data serapan penentuan suhu optimum dapat dilihat pada Tabel 4.9.



Gambar 4.3 Grafik hasil optimasi suhu

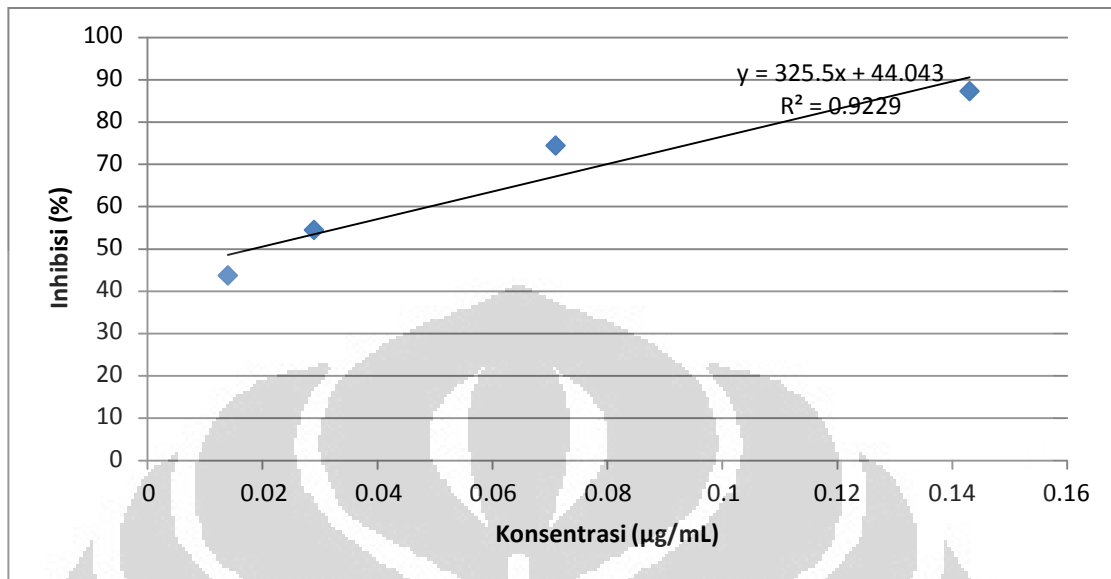
4.4.2 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase oleh Sampel dan Standar Allopurinol

Pada uji penghambatan aktivitas xantin oksidase, dilakukan pengujian terhadap standar allopurinol dan sampel ekstrak daun *Averrhoa bilimbi* L. Serapan diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 281,5 nm dan berdasarkan hasil yang didapat dari uji pendahuluan, yaitu kondisi optimum xantin oksidase pada suhu 30 °C, menggunakan dapar fosfat pH 7,8 dan konsentrasi substrat pada 0,15 mM.

4.4.2.1 Pengujian Standar Allopurinol

Standar yang digunakan pada uji penghambatan aktivitas xantin oksidase adalah allopurinol. Konsentrasi allopurinol yang digunakan adalah 1, 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL yang diencerkan dari larutan induk 1000 µg/mL. Persen inhibisi yang diperoleh cukup besar sehingga diperoleh hasil IC₅₀ negatif (Tabel 4.11). Pengujian selanjutnya dilakukan dengan penurunan konsentrasi allopurinol menjadi 0,1; 0,2; 0,5; dan 1,0 µg/mL dan diperoleh hasil IC₅₀ sebesar 0,01 µg/mL. Data serapan, persen inhibisi konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 4.10 dan Tabel 4.11.

Universitas Indonesia



Gambar 4.4 Grafik regresi linear standar allopurinol

4.4.2.2 Pengujian Sampel

Pengujian sampel terhadap penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase dilakukan dengan mengukur sampel, kontrol sampel, blanko, dan kontrol blanko secara spektrofotometri. Pengukuran kontrol sampel dilakukan sebagai faktor koreksi bila pada ekstrak yang diuji menghasilkan serapan pada panjang gelombang maksimum pengukuran.

Ekstrak dari hasil fraksinasi diukur penghambatannya terhadap aktivitas enzim xantin oksidase secara spektrofotometri. Ekstrak tersebut adalah fraksi n-heksana, etil asetat, n-butanol, dan fraksi metanol. Masing-masing ekstrak kental ditimbang 10,0 mg dan ditambahkan satu hingga 5 tetes DMSO untuk meningkatkan proses pelarutan dan dicukupkan volumenya menggunakan air suling demineralisata bebas CO₂ hingga 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 1000 µg/mL. Penggunaan DMSO sampai dengan 5% pada konsentrasi akhir tidak mengganggu pengukuran penghambatan aktivitas xantin oksidase (Kong et al.,2000). Masing-masing ekstrak dari hasil fraksinasi dibuat larutan induk sebesar 1000 µg/mL yang kemudian diencerkan masing-masing menjadi konsentrasi 1, 5, 10, 20, 25, dan 50

Universitas Indonesia

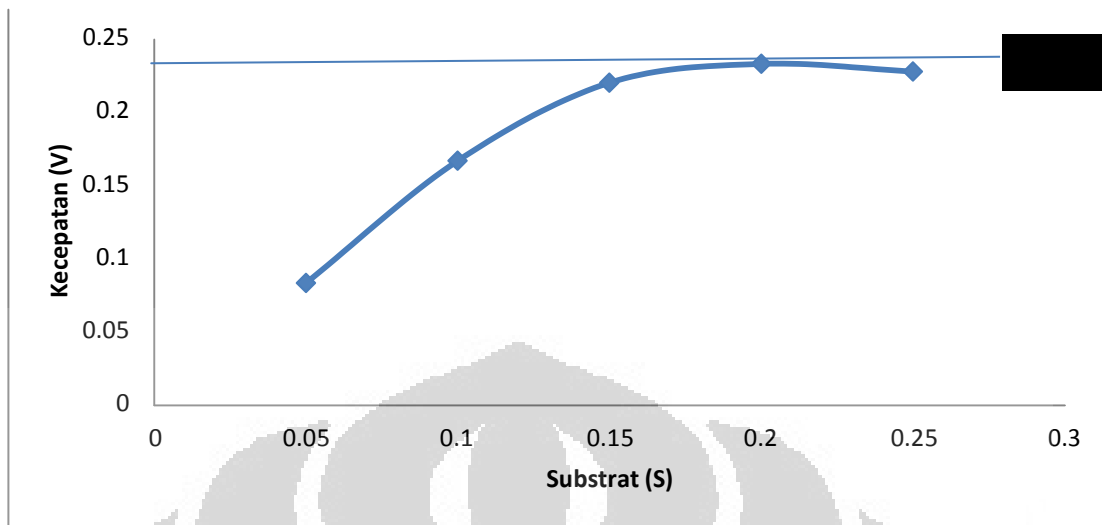
$\mu\text{g/mL}$. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan air suling demineralisata bebas CO_2 yang dicukupkan volumenya di dalam labu ukur 10,0 mL.

Pada pengukuran penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase oleh ekstrak dari fraksi n-heksana menghasilkan IC_{50} yang bernilai $0,8931\mu\text{g/mL}$, sedangkan pada ekstrak dari fraksi metanol menghasilkan nilai IC_{50} sebesar $1,60\mu\text{g/mL}$. Hasil pengukuran pada ekstrak dari fraksi etil asetat dan fraksi n-butanol menghasilkan persen inhibisi yang cukup besar sehingga nilai dari IC_{50} bernilai negatif sehingga pada kedua fraksi tersebut dilakukan penurunan konsentrasi menjadi 0,05; 0,10; 0,20; 0,25; 0,5; 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} dari fraksi etil asetat setelah diturunkan konsentrasinya adalah $0,06\mu\text{g/mL}$ sedangkan hasil IC_{50} dari fraksi n-butanol adalah $0,06\mu\text{g/mL}$.

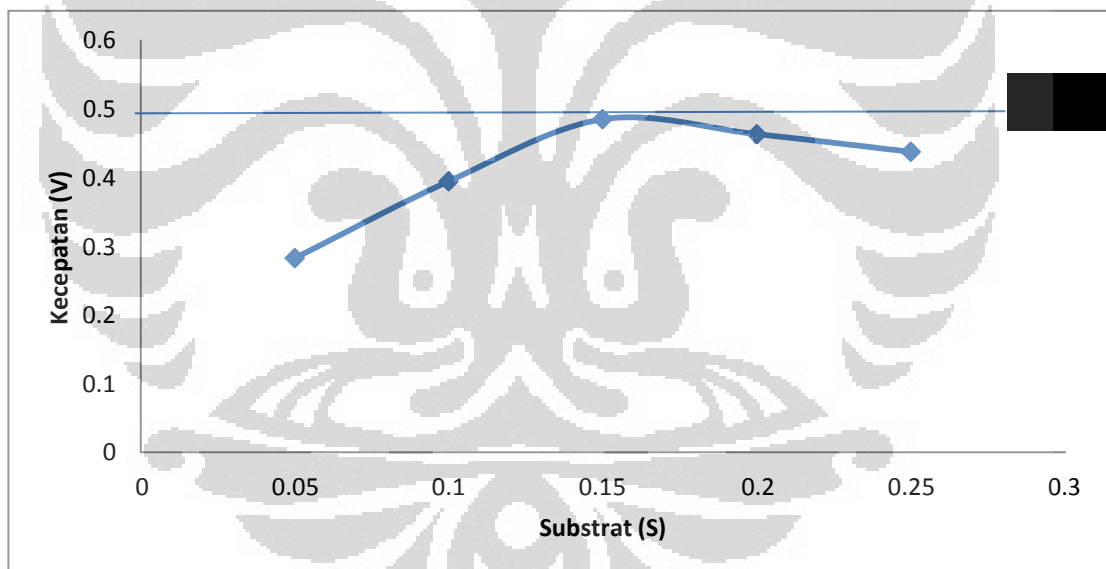
Setelah dilakukan pengujian ekstrak kental dari masing-masing fraksi terhadap aktivitas enzim xantin oksidase, diperoleh hasil bahwa masing-masing mempunyai kekuatan menghambat aktivitas enzim xantin oksidase. Nilai IC_{50} secara berurutan dari yang paling mendekati allopurinol adalah fraksi n-butanol dengan nilai IC_{50} $0,06\mu\text{g/mL}$, fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} $0,06\mu\text{g/mL}$, fraksi n-heksana dengan nilai IC_{50} $0,89\mu\text{g/mL}$, dan fraksi metanol dengan nilai IC_{50} $1,60\mu\text{g/mL}$. Masing-masing data serapan dan persen inhibisi dapat dilihat pada Tabel 4.11, Tabel 4.12, Tabel 4.13, dan Tabel 4.14.

4.5 Uji Kinetika Penghambatan Xantin Oksidase

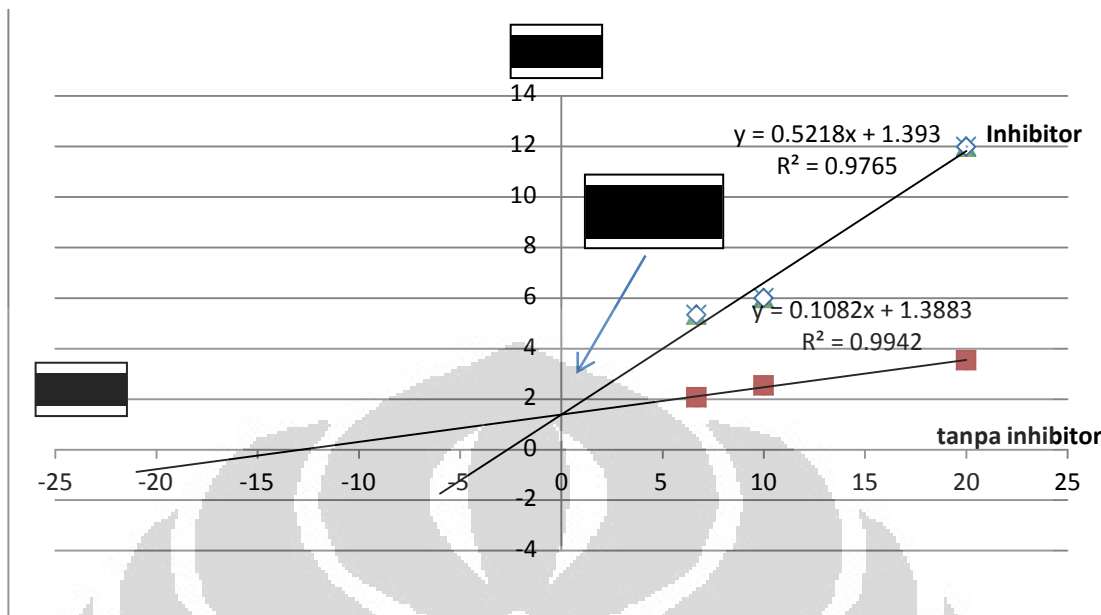
Analisis kinetika penghambatan xantin oksidase dilakukan menggunakan plot Lineweaver-Burk. Sampel ekstrak yang digunakan adalah ekstrak kental fraksi n-butanol, karena memiliki penghambatan yang paling baik dengan IC_{50} paling mendekati IC_{50} standar allopurinol. Konsentrasi substrat xantin pada uji kinetika penghambatan xantin oksidase adalah 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; dan 0,25 mM.



Gambar 4.5 Grafik efek konsentrasi substrat pada kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis enzim dengan inhibitor fraksi n-butanol 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Gambar 4.6 Grafik efek konsentrasi substrat pada kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis enzim tanpa adanya inhibitor.



Gambar 4.7 Plot Lineaweaver-Burk ekstrak kental fraksi n-butanol konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ dengan konsentrasi xantin 0,05 ; 0,1 ; dan 0,15 mM.

Tabel 4.1 Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten pada Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

Sampel	Tanpa inhibitor	Fraksi n-butanol 1 $\mu\text{g/mL}$
a	1,388	1,393
b	0,108	0,522
r	0,997	0,988
Km	0,077	0,374
Vmaks	0,720	0,717

Pada gambar 4.3 perpotongan garis regresi linier tanpa inhibitor dan fraksi n-butanol terletak pada sumbu y, sehingga dapat disimpulkan bahwa jenis kinetika penghambatan ekstrak n-butanol terhadap aktivitas xantin oksidase adalah inhibisi kompetitif. Pada penghambatan jenis ini, inhibitor yang memiliki mekanisme penghambatan kompetitif adalah senyawa yang memiliki struktur menyerupai struktur substrat (Murray et al., 2003). Penghambatan kompetitif ditunjukkan dengan

Universitas Indonesia

nilai V_{max} yang sama atau hampir sama dan nilai K_m inhibitor lebih kecil dari nilai K_m tanpa inhibitor.

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

4.6 Identifikasi Golongan Senyawa

Identifikasi golongan senyawa dilakukan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa berdasarkan golongan senyawa dari masing-masing fraksi. Identifikasi dilakukan menggunakan kontrol positif berupa simplisia yang telah diketahui memiliki kandungan golongan senyawa. Kontrol positif tersebut antara lain kulit batang kina untuk kontrol positif golongan senyawa alkaloid, daun gandarusa untuk golongan senyawa flavonoid, Nerii Folium untuk golongan senyawa glikosida, daun teh untuk golongan senyawa tanin, sterol untuk golongan senyawa terpen/sterol, dan Liquiritae Radix untuk golongan senyawa saponin. Hasil identifikasi dari masing-masing fraksi ekstrak daun *Averrhoa bilimbi* L. dapat dilihat pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil identifikasi golongan senyawa pada ekstrak daun tanaman *Averrhoa bilimbi* L.

Golongan Senyawa	Ekstrak n-heksana	Ekstrak Etil asetat	Ekstrak n-butanol	Ekstrak Metanol
Alkaloid	-	-	-	-
Flavonoid	-	+	+	-
Glikosida	-	-	+	+
Tanin	-	+	+	+
Terpen	+	-	-	-
Saponin	+	-	-	+

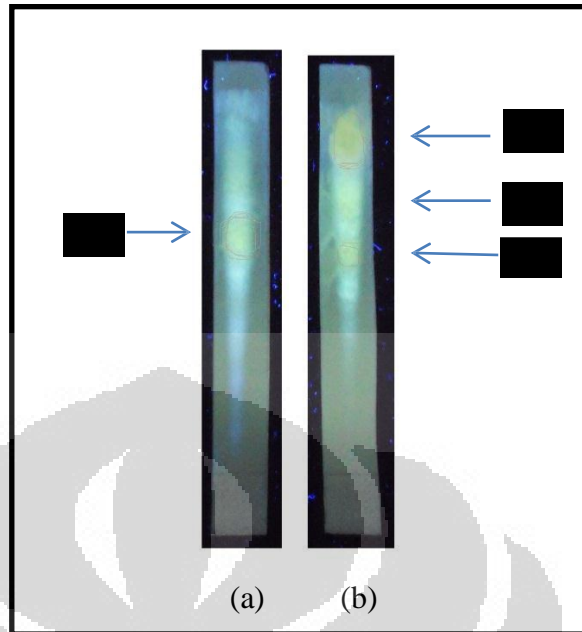
4.6.1 Identifikasi Alkaloid

Pada identifikasi golongan senyawa alkaloid, masing-masing ekstrak ditambahkan campuran air suling dan larutan HCl 2N. Alkaloid adalah senyawa bersifat basa sehingga dengan penambahan asam, akan terbentuk garam yang larut dalam air suling. Masing-masing ekstrak kemudian ditambahkan pereaksi Mayer, Dragendorff dan Bouchardat yang kemudian dibandingkan dengan kontrol positif kulit batang Kina. Selain itu masing-masing ekstrak di larutkan dalam pelarutnya masing-masing dan ditotolkan pada kromatografi kertas dan kemudian disemprot dengan reagen Dragendorff. Hasil positif ditandai dengan bercak coklat jingga dengan latar belakang kuning (Harborne, 1987). Semua ekstrak dari daun *Averrhoa bilimbi* L. tidak ada yang menghasilkan hasil positif terhadap golongan senyawa alkaloid (Gambar 4.17 dan Gambar 4.18).

4.6.2 Identifikasi Flavonoid

Pada identifikasi golongan senyawa flavonoid, identifikasi dilakukan dengan membandingkan dengan kontrol positif yaitu daun gandarusa. Ekstrak yang menunjukkan hasil positif pada identifikasi flavonoid adalah ekstrak dari fraksi n-butanol dan fraksi etil asetat. Pada kedua ekstrak dan kontrol positif daun gandarusa tersebut dengan penambahan aseton, asam oksalat, asam borat dan dietil eter dapat berfluorosensi kuning kehijauan di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm (gambar 4.19)

Pada identifikasi golongan senyawa flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis, ekstrak dari fraksi n-butanol dan fraksi etil asetat dapat berfluorosensi kuning kehijauan di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm dengan penyemprotan $AlCl_3$ dan menggunakan fase gerak n-butanol-asam asetat glasial-air dengan perbandingan 4:1:5 (gambar 4.7).



Keterangan : : Gambar diatas merupakan hasil identifikasi pada fraksi etil asetat (gambar a) dan fraksi n-butanol (gambar b) menggunakan eluen n-butanol : asam asetat : air dengan perbandingan 4 : 1 : 5 dan disemprot dengan AlCl_3 10% dan diamati dibawah sinar UV 366 nm

Gambar 4.8 Hasil KLT fraksi etil asetat dan n-butanol pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄ menggunakan fase gerak n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5)

Pada Gambar 4.7 pemisahan pada fraksi etil asetat dan fraksi n-butanol masih memberikan ekor yang berarti kurang sempurna karena hanya digunakan untuk identifikasi sehingga hanya dibutuhkan untuk memisahkan flavonoid dan memberikan warna pada penyemprotan AlCl_3 di bawah sinar UV 366 nm. Pada fraksi etil asetat terdapat 1 bercak yang berfluoresensi kekuningan. Berdasarkan literatur, senyawa flavonoid yang terdapat pada daun belimbing wuluh adalah golongan flavon yaitu apigenin dan luteolin (Zakaria Z. et al., 2007). Kedua senyawa tersebut mempunyai efek penghambatan kompetitif terhadap enzim xantin oksidase (Van Hoorn D.E. et al., 2002). Pada fraksi n-butanol terdapat 3 bercak berfluoresensi kekuningan. Nilai Rf masing-masing dapat dilihat pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Nilai Rf KLT masing-masing bercak pada ekstrak fraksi n-butanol dan fraksi etil asetat dengan fase gerak n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5).

Fraksi n-butanol		Fraksi etil asetat	
Bercak	Rf	Bercak	Rf
A	0,5	A	0,3
B	0,7		
C	0,8		

4.6.3 Identifikasi Glikosida

Glikosida mengandung dua komponen, yaitu bagian aglikon atau bagian bukan gula dan bagian gula. Identifikasi golongan senyawa glikosida dibandingkan dengan kontrol positif yaitu *Nerii Folium*. Ekstrak yang memberikan hasil positif adalah ekstrak fraksi metanol dan fraksi n-butanol. Identifikasi yang digunakan dengan pereaksi molisch dengan hasil memberikan cincin ungu. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Gambar 4.22.

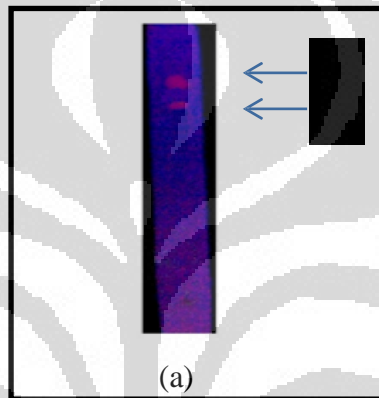
4.6.4 Identifikasi Tanin

Identifikasi tanin meliputi penambahan FeCl_3 , larutan NaCl -gelatin dan larutan gelatin 10%. Identifikasi menggunakan FeCl_3 dilakukan dengan cara penyemprotan pada kertas kromatogram. Hasil positif di tunjukan pada ekstrak dari fraksi metanol, n-butanol dan etil asetat dengan hasil bercak hijau tua hingga hitam yang membuktikan adanya senyawa fenol. Gambar hasil penyemprotan FeCl_3 dapat dilihat pada Gambar 4.20. Pada penambahan larutan NaCl -gelatin dan larutan gelatin memberikan endapan pada ketiga fraksi sehingga menunjukkan adanya golongan tanin pada ketiga fraksi

4.6.5 Identifikasi Terpen

Identifikasi golongan senyawa terpen dilakukan dengan menggunakan penambahan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat dan dibandingkan dengan

kontrol positif yaitu sterol, jika positif terdapat golongan senyawa terpen maka akan terbentuk warna merah hijau atau hijau biru (Harborne, 1987). Hasil positif ditunjukkan oleh ekstrak dari fraksi n-heksana warna hijau (Gambar 4.21). Pada identifikasi dengan reagen semprot anisaldehid, hasil positif ditunjukkan jika terdapat bercak semprot warna merah keungu. Hanya pada fraksi n-heksana yang menghasilkan warna merah keunguan. Dari identifikasi dengan reagen semprot p-anisaldehyd. Hanya pada fraksi n-heksana yang memberikan hasil positif dengan ditandai warna merah keunguan.



Keterangan : Gambar diatas merupakan hasil identifikasi pada semua fraksi menggunakan eluen n-benzen : etil asetat dengan perbandingan 9 : 1 dan disemprot dengan menggunakan larutan p-anisaldehyd dan diamati dibawah sinar UV 366 nm. Gambar a merupakan fraksi n-heksana

Gambar 4.9 Hasil KLT fraksi n-heksana pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄ menggunakan fase gerak campuran benzen : etil asetat dengan perbandingan (9 : 1)

Dari gambar 4.9, hanya terdapat dua bercak yang menunjukkan positif terhadap golongan senyawa terpen. Nilai Rf masing-masing dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Nilai Rf KLT masing-masing bercak pada identifikasi terpen dari ekstrak n-heksana.

Bercak	Rf
1	0,7
2	0,5

4.6.6 Identifikasi Saponin

Pada identifikasi golongan senyawa saponin dibandingkan dengan kontrol positif, yaitu dengan akar Liquiritae, hasil positif ditunjukkan oleh ekstrak dari fraksi n-heksana dan fraksi metanol (Gambar 4.23). Buih mantap terbentuk setelah ditambahkan air suling panas dan dikocok selama 10 detik. Buih tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Fraksi n-heksana, etil asetat, n-butanol, metanol dari ekstrak belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* .L) mempunyai daya penghambatan aktivitas xantin oksidase. Nilai IC_{50} terbesar terdapat pada fraksi n-butanol dengan nilai IC_{50} 0,06 $\mu\text{g/mL}$ dan fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} 0,06 $\mu\text{g/mL}$ lalu fraksi n-heksana dengan nilai IC_{50} 0,89 $\mu\text{g/mL}$ dan terakhir fraksi metanol dengan nilai IC_{50} 1,60 $\mu\text{g/mL}$.
2. Pada fraksi n-butanol, terdapat golongan senyawa flavonoid, glikosida dan tanin. Pada fraksi etil asetat terdapat golongan senyawa flavonoid dan tanin.

5.2 Saran

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi dan karakterisasi senyawa yang terdapat pada fraksi n-butanol dari daun belimbing wuluh untuk mengetahui senyawa yang dapat menghambat aktivitas enzim xantin oksidase.

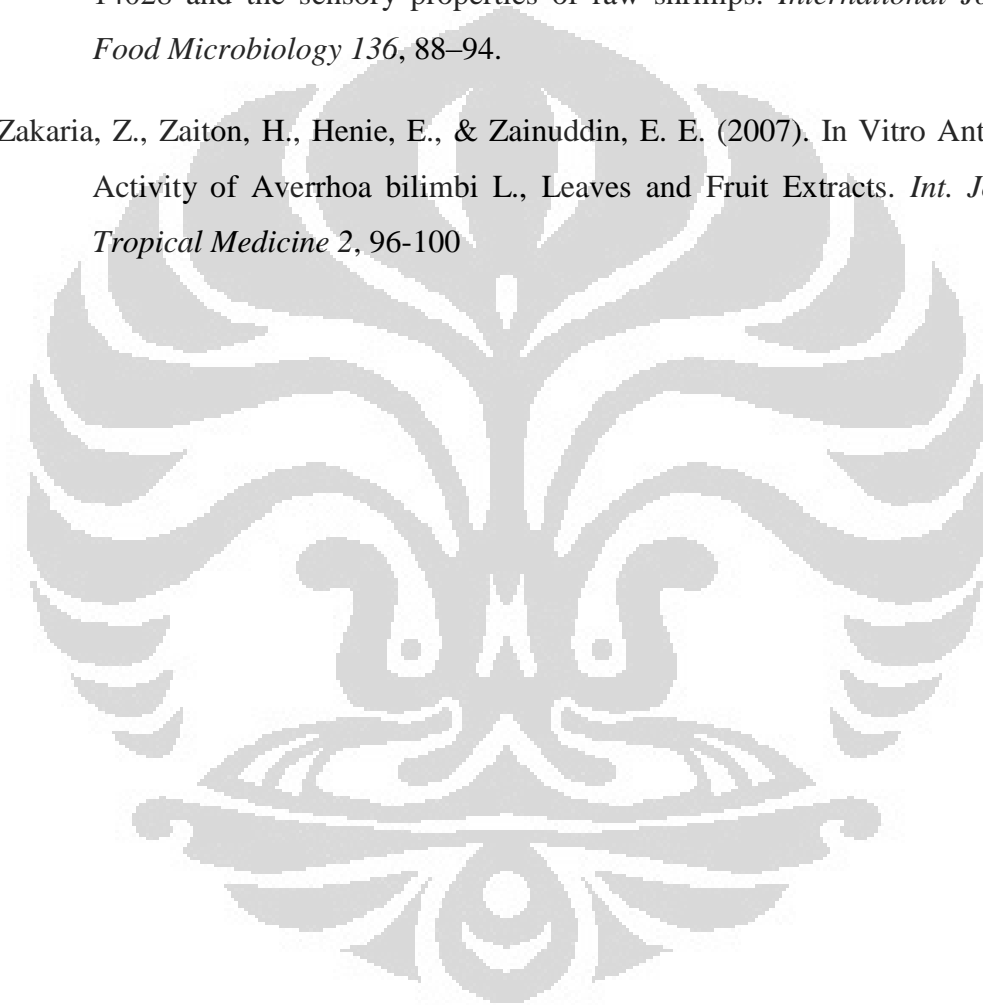
DAFTAR PUSTAKA

- Adnyana, I., Andrajati, R., Sukandar, E. Y., Sigit, J. I., Setiadi, A. P., & Kusnandar. (2009). *ISO Farmakoterapi*. Jakarta: Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia (ISFI), hal 645-658
- Alderman, M. H. (2002). Uric Acid and Cardiovascular Risk. *Current Opinion in Pharmacology* 2, 126-130.
- Asean Countries. (2004). *Standard of Asean Herbal Medicines vol 2*. Jakarta.
- Azmi, S., Jamal, P., & Amid, A. (2012). Xanthine Oksidase Inhibitory Activity from Potential Malaysian Medicinal Plant as Remedies for Gout. *Int. Food Research Journal* 19, 159-165.
- Champe, P., Harvey, R., & Ferrier, D. (2005). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, hal 296-298.
- Cos, P., Li Ying, Calomme, M., Hu, J., Cimanga, K., Van Poel, B., et al. (1998). Structure Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *Jou. Nat. Prod* 61, 71-76.
- Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI. (2007). *Farmakologi dan Terapi ed. 5*. Jakarta: UI Press, hal 242-244.
- Departemen Kesehatan RI. (1979). *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta, hal 28-29
- Departemen Kesehatan RI. (1989). *Materia Medika Indonesia jilid 5*. Jakarta, hal 92-94
- Departemen Kesehatan RI. (1989). *Vademekum Bahan Obat Alam*. Jakarta, hal 14-16.
- Departemen Kesehatan RI. (1995). *Materia Medika Indonesia jilid 6*. Jakarta, hal 334-337.

- Departemen Kesehatan RI. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta.
- Evans, W. C. (2002). *Trease and Evans: Pharmacognosy* (15th ed.). London: Harcourt Publishers.
- Farnsworth, N.R. (1966). *Biological and Phytochemical Screening of Plants*. *Journal of Pharmaceutical Science* 55(3), 226-276
- Kong, L., Cai, Y., Huang, W., Cheng, C. H., & Tan, R. (2000). Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal. *Journal of Ethnopharmacology* 73 , 199–207.
- Harborne, J. (1987). *Metode Fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. (K. Padmawinata, & I. Soediro, Trans.) Bandung: ITB, 6-235
- Hernani, Winarti, C., & Marwati, T. (2009). Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Belimbing Wuluh Terhadap Penurunan Tekanan Darah Pada Hewan Uji. *J. Pascapanen* 6, 54-61.
- Hidayat, R. (2009). Gout dan Hiperurisemia. *Medicinus vol.22*, 47-50.
- Hodges, G., Young, M. J., Paul, T., & Ingold, K. (2000). How Should Xanthine Oxidase-Generated Superoxide Yields be Measured. *Free Radical Biology & Medicine Vol. 29 No. 5*, 434–441.
- Mardisiswojo, S., & Harsono, R. (1985). *Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang*. Jakarta: Balai Pustaka.
- Mun'im, A., & Hanani, E. (2011). *Fitoterapi Dasar*. Jakarta: Dian Rakyat, hal 30-31.
- Murray, R., Granner, D., & Rodwell, V. (2009). *Biokimia Harper edisi 27*. (B. Pendit, Trans.) Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, hal 53-86.

- Pushparaj, P., Tan, C., & Tan, B. (2000). Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 69–76.
- Samuelsson, G. (1999). *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy* (4th ed.). Swedia: Apotekarsocieteten.
- Sweeney, A., Wyllie, S., Shalliker, R., & Markham, J. (2001). Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Selected Australian Native Plants. *Journal of Ethnopharmacology* 75, 273-277.
- Thomas, A. (1989). *Tanaman Obat Tradisional*. Yogyakarta: Kanisius hal 105-108
- Touchstone, J., & Dobbins, M. (1983). *Practice Thin Layer Chromatography* (2nd ed.). Canada: John Wiley & Sons.
- Tyler, V., Brady, L., & Robbers, J. (1988). *Pharmacognosy* (9th ed.). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Umamaheswari, M., Kumar, K. A., Somasundaram, A., Sivashanmugam, T., Subhadradevi, V., & Ravi, T. K. (2006). Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2007), 547-551.
- Van Hoorn, D. E., Nijveldt, R., Van Leeuwen, P., Hofman, Z., M'Rabet, L., De Bont, D., et al. (2002). Accurate Prediction of Xanthine Oxidase Inhibition Based on The Structure of Flavonoids. *European Journal of Pharmacology* 451, 111-118.
- Verheij, E., & Coronel, R. (1997). *Prosea Sumber Daya Nabati Asia Tenggara 2 Buah-buahan Yang Dapat Dimakan*. (S. Danimiharja, H. Sutarno, N. W. Utami, D. S. Hazar, & Hoesen, Trans.) Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

- Wagner, H., Bladt, S., & Zgainski, E. (1984). *Plant Drug Analysis*. (T. A. Scott, Trans.) New York: Springer-Verlag, hal 7-304.
- Wan Norhana, M., Mohd Nor Azman A., Poole, S., Deeth, H., & Dykes, G. (2009). Effects of bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.) and tamarind (*Tamarindus indica* L.) juice on *Listeria monocytogenes* Scott A and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and the sensory properties of raw shrimps. *International Journal of Food Microbiology* 136, 88–94.
- Zakaria, Z., Zaiton, H., Henie, E., & Zainuddin, E. E. (2007). In Vitro Antibacterial Activity of *Averrhoa bilimbi* L., Leaves and Fruit Extracts. *Int. Journal of Tropical Medicine* 2, 96-100



Tabel 4.6 Rendemen ekstrak

Ekstrak	Berat Ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
Etanol 96%	68,25	9,1
n-Heksana	12,8	1,71
Etil asetat	5,0	0,67
n-Butanol	9,6	1,28
Metanol	7,2	0,96

Keterangan : Berat serbuk simplisia daun *Averrhoa bilimbi L.* adalah 750 gram

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat Ekstrak kental}}{\text{Berat Serbuk}} \times 100\%$$

Tabel 4.7 Data serapan pada uji pendahuluan penentuan konsentrasi substrat optimum

Kons.substrat (mM)	Absorbansi			Aktivitas (Unit/ml)
	Blangko	Kontrol blangko	B-KB	
0,05	0,2109	0,0791	0,132	0,757
0,1	0,3170	0,0934	0,224	1,285
0,15	0,3678	0,1021	0,266	1,526
0,20	0,3528	0,1052	0,248	1,423
0,25	0,3505	0,1143	0,237	1,340

Tabel 4.8 Data serapan pada uji pendahuluan penentuan pH optimum

pH	Absorbansi			Aktivitas (Unit/ml)
	Blangko	Kontrol blangko	B-KB	
7,0	0,3438	0,0812	0,2626	1,507
7,2	0,3848	0,0814	0,3034	1,741
7,5	0,3909	0,0822	0,3087	1,771
7,8	0,4879	0,0825	0,4054	2,326
8,0	0,4031	0,0814	0,3217	1,846

Tabel 4.9 Data serapan pada uji pendahuluan penentuan suhu optimum

Suhu	Absorbansi			Aktivitas (Unit/ml)
	Blangko	Kontrol blangko	B-KB	
20°C	0,3432	0,0863	0,2569	1,47
25°C	0,5120	0,0864	0,4256	2,44
30°C	0,5753	0,0863	0,4890	2,805
35°C	0,2131	0,0865	0,1266	0,726
40°C	0,1840	0,0858	0,0982	0,563

Tabel 4.10 Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh Allopurinol

Konsentrasi (µg/mL)		Serapan (A)			% Inhibisi	IC ₅₀
Kons. awal	Kons. akhir	Kontrol Standar	Standar	S - KS		
1	0,143	0,091	0,152	0,061	88,37	-87,71
5	0,714	0,103	0,125	0,022	95,86	
10	1,428	0,105	0,128	0,023	95,75	
20	2,857	0,111	0,131	0,020	96,35	
50	7,143	0,130	0,134	0,004	99,25	
100	14,286	0,163	0,167	0,004	99,20	
Kontrol Blanko		0,0648	Blanko	0,6158		
Persamaan regresi linier $y = 93,594 + 0,497x$						

Tabel 4.11 Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh Allopurinol dengan penurunan konsentrasi

Konsentrasi		Serapan (A)			% Inhibisi	IC ₅₀
µg/mL	Kons. akhir	Kontrol Standar	Standar	S - KS		
0,1	0,014	0,0228	0,3334	0,3106	43,691	0,01
0,2	0,029	0,0244	0,2756	0,2512	54,460	
0,5	0,071	0,0282	0,1694	0,1412	74,402	
1,0	0,143	0,0341	0,1043	0,0702	87,273	
Kontrol		0,0646	0,6162			
$y=44,043 + 325,49x$						

Tabel 4.12 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh ekstrak n-heksana

Konsentrasi sampel (µg/mL)		Serapan (A)			% Inhibisi	IC ₅₀
Awal	Akhir	Kontrol Sampel	Sampel	S - KS		
1	0,143	0,072	0,400	0,328	40,47	0,89
5	0,714	0,089	0,377	0,288	47,73	
10	1,428	0,120	0,375	0,255	53,72	
20	2,857	0,125	0,299	0,174	68,42	
25	3,571	0,144	0,276	0,132	76,04	
50	7,143	0,184	0,218	0,034	93,84	
Kontrol Blanko		0,0648	Blanko	0,6158		
Persamaan regresi linier $y = 43,18 + 7,64x$						

Tabel 4.13 Data Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi Etil asetat

Konsentrasi Sampel (µg/ml)		Serapan				Sr-Kr	Inhibisi %	IC ₅₀
Awal	Akhir	Sampel	Sampel rata-rata (Sr)	Kontrol	Kontrol rata-rata (Kr)			
0,05	0,007	0,392	0,392	0,042	0,043	0,349	36,62	0,0625
		0,391		0,045				
0,10	0,014	0,352	0,356	0,048	0,052	0,304	47,79	
		0,360		0,056				
0,20	0,029	0,344	0,343	0,051	0,053	0,290	47,31	
		0,343		0,055				
0,25	0,036	0,340	0,339	0,057	0,056	0,283	48,60	
		0,338		0,056				
0,5	0,071	0,330	0,336	0,058	0,056	0,280	49,22	
		0,342		0,054				
1,0	0,143	0,242	0,242	0,060	0,063	0,179	67,51	
		0,242		0,066				
Kontrol Blanko		0,0648		Blanko		0,6158		
Persamaan regresi linier $y = 40,407 + 182,03x$								

Tabel 4.14 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi n-butanol

Konsentrasi Sampel ($\mu\text{g/ml}$)		Serapan				Sr-Kr	Inhibisi %	IC ₅₀
Awal	Akhir	Sampel	Sampel rata-rata (Sr)	Kontrol	Kontrol rata-rata (Kr)			
0,05	0,007	0,351	0,350	0,003	0,003	0,347	37,02	0,0623
		0,350		0,003				
0,10	0,014	0,324	0,323	0,004	0,006	0,320	42,46	
		0,322		0,008				
0,20	0,029	0,301	0,301	0,007	0,007	0,294	46,64	
		0,301		0,006				
0,25	0,036	0,286	0,286	0,008	0,009	0,277	49,73	
		0,285		0,009				
0,5	0,071	0,254	0,253	0,011	0,011	0,242	56,08	
		0,254		0,010				
1,0	0,143	0,241	0,245	0,014	0,013	0,232	57,89	
		0,250		0,012				
Kontrol Blanko		0,0648		Blanko		0,6158		
Persamaan regresi linier $y = 41,44 + 137,15x$								

Tabel 4.15 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi metanol

Konsentrasi sampel ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)			% Inhibisi	IC ₅₀
Awal	Akhir	Kontrol Sampel	Sampel	S - KS		
1	0,143	0,035	0,381	0,346	37,20	1,60
5	0,714	0,039	0,362	0,323	41,38	
10	1,428	0,070	0,337	0,267	51,54	
20	2,857	0,094	0,323	0,229	58,44	
25	3,571	0,123	0,283	0,160	70,96	
50	7,143	0,143	0,283	0,140	74,59	
Kontrol Blanko		0,0648	Blanko	0,6158		
Persamaan regresi linier $y = 41,2 + 5,48x$						

Tabel 4.16 Data serapan fraksi n-butanol konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$ pada uji kinetika penghambatan aktivitas xantin oksidase.

Konsentrasi xantin (S)	Serapan			1/S	1/V
	Blanko (B)	Kontrol Blanko (KB)	B-KB		
0,05 mM	0,1664	0,0830	0,0834	20	11,9849
0,1 mM	0,2509	0,0839	0,1670	10	5,9876
0,15 mM	0,2741	0,0868	0,1873	6,6667	5,3393

Tabel 4.17 Data serapan tanpa inhibitor pada uji kinetika penghambatan aktivitas xantin oksidase

Konsentrasi xantin (S)	Serapan			1/S	1/V
	Blanko (B)	Kontrol Blanko (KB)	B-KB		
0,05 mM	0,3078	0,0251	0,2827	20	3,5373
0,1 mM	0,4750	0,0804	0,3946	10	2,5342
0,15 mM	0,5079	0,0230	0,4849	6,6667	2,0623

Tabel 4.18 Hasil identifikasi golongan senyawa kimia

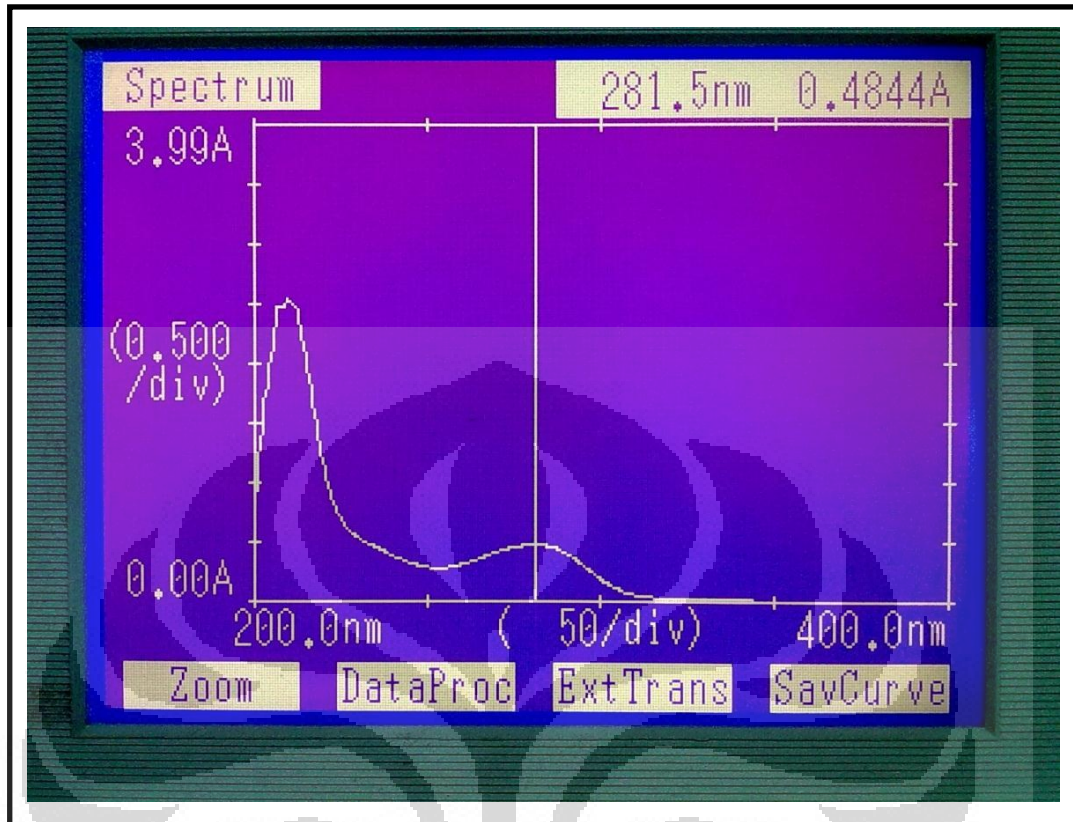
Golongan Senyawa	Pereaksi Kimia	Ekstrak			
		n-Heksana	Etil asetat	n-Butanol	Metanol
Alkaloid	Mayer	-	-	-	-
	Bouchardat	-	-	-	-
	Dragendorf	-	-	-	-
Flavonoid	AlCl ₃	-	+	+	-
	Aseton + As.Oksalat + As. Borat + eter	-	+	+	-
Glikosida	Reaksi Molisch	-	-	+	+
Saponin	Air Panas	+	-	-	+
Tanin	FeCl ₃	-	+	+	+
	Gelatin-NaCl	-	+	+	+
	Gelatin 10%	-	+	+	+
Terpen	Lieberman-Bouchard	+	-	-	-
	Anisaldehyd	+	-	-	-



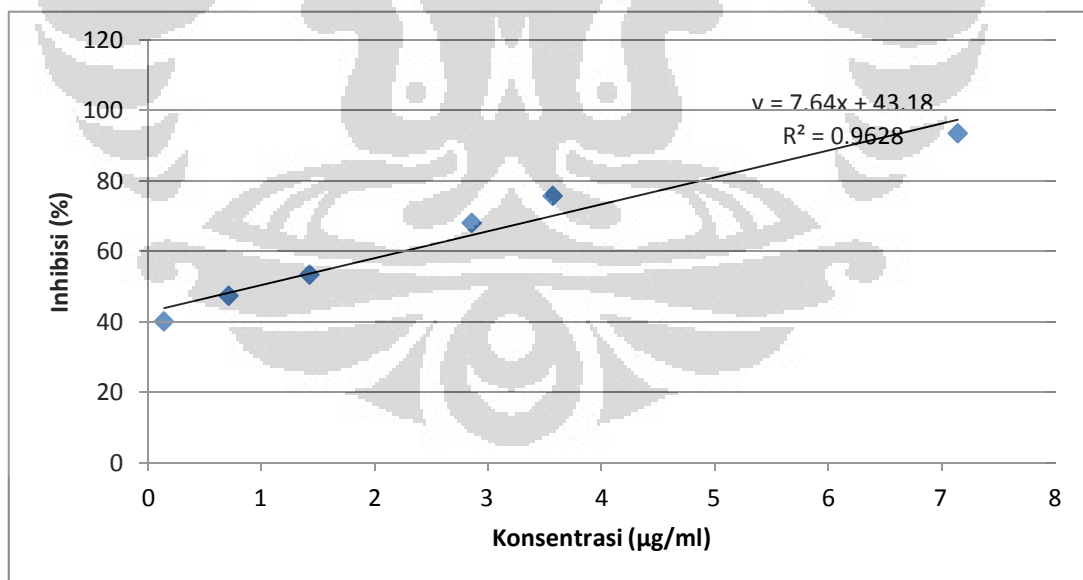
Gambar 4.10 Gambar Tanaman Belimbing Wuluh



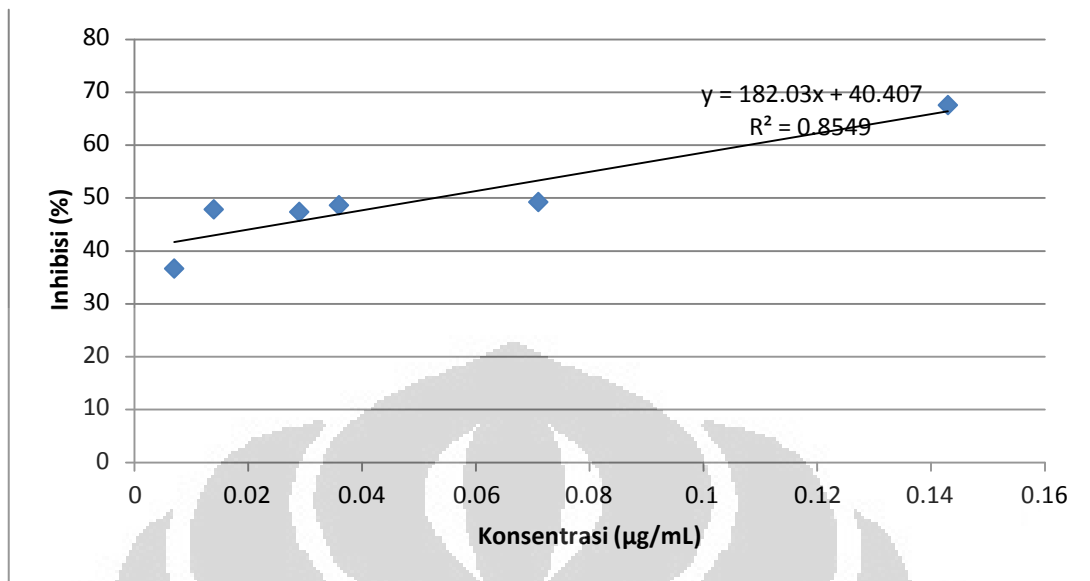
Gambar 4.11 Gambar Serbuk Simplisia Daun Belimbing Wuluh



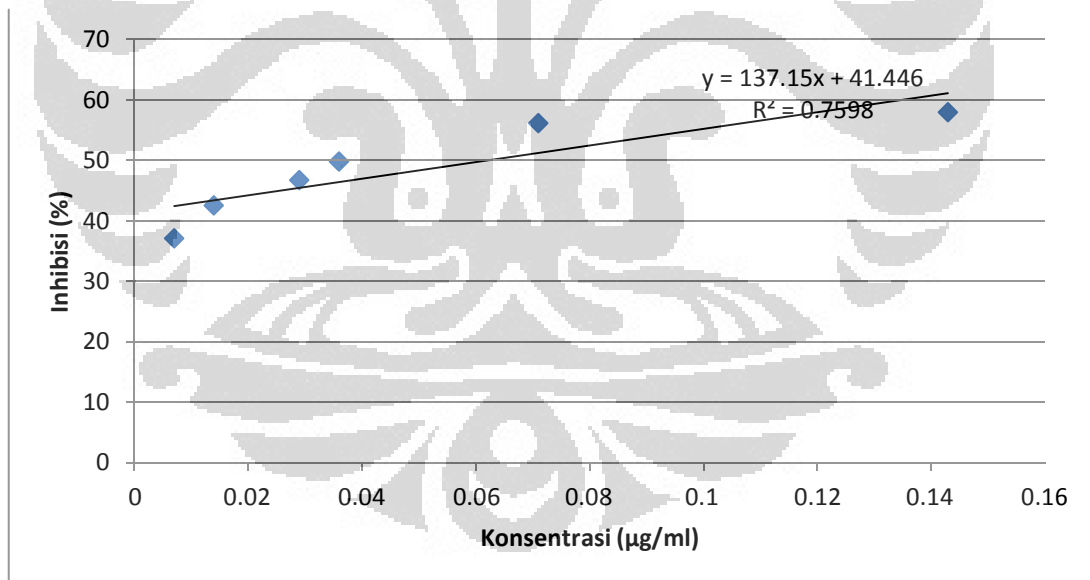
Gambar 4.12 Spektrum serapan pada optimasi panjang gelombang maksimum



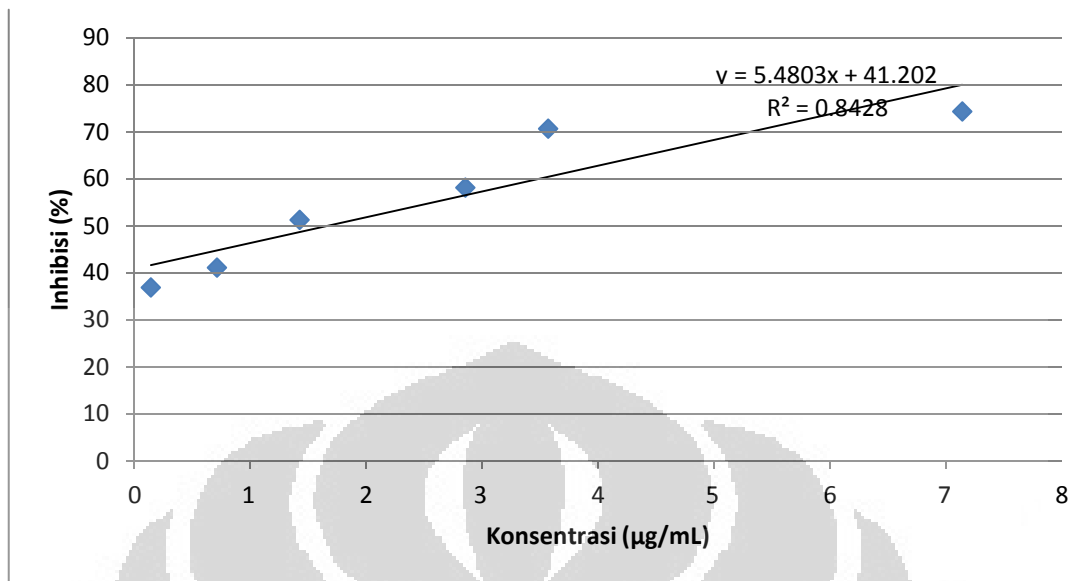
Gambar 4.13 Grafik regresi linier sampel fraksi n-heksana



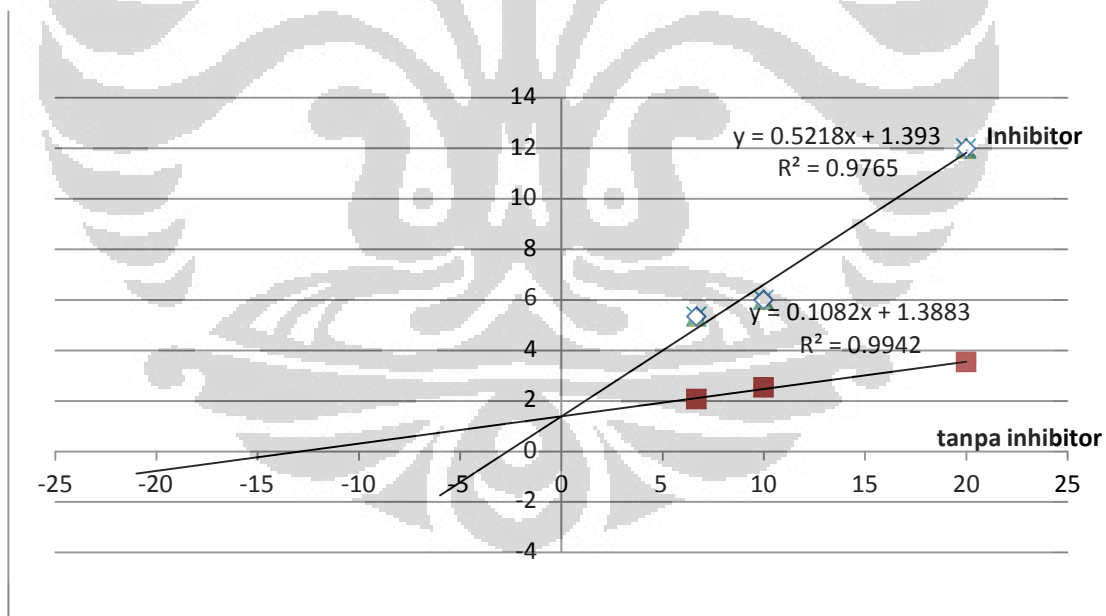
Gambar 4.14 Grafik regresi linier sampel fraksi etil asetat



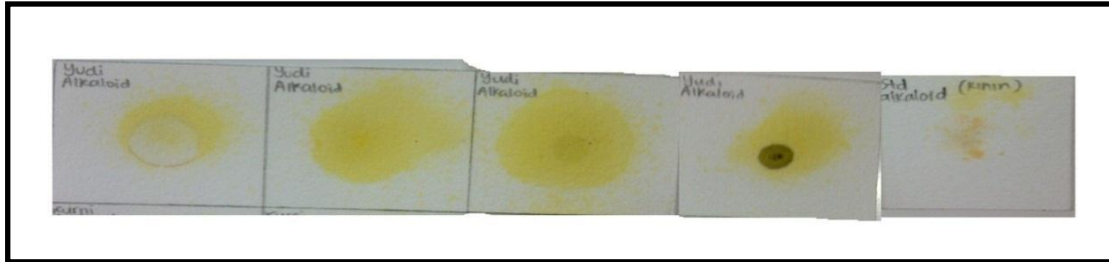
Gambar 4.15 Grafik regresi linier sampel fraksi n-butanol



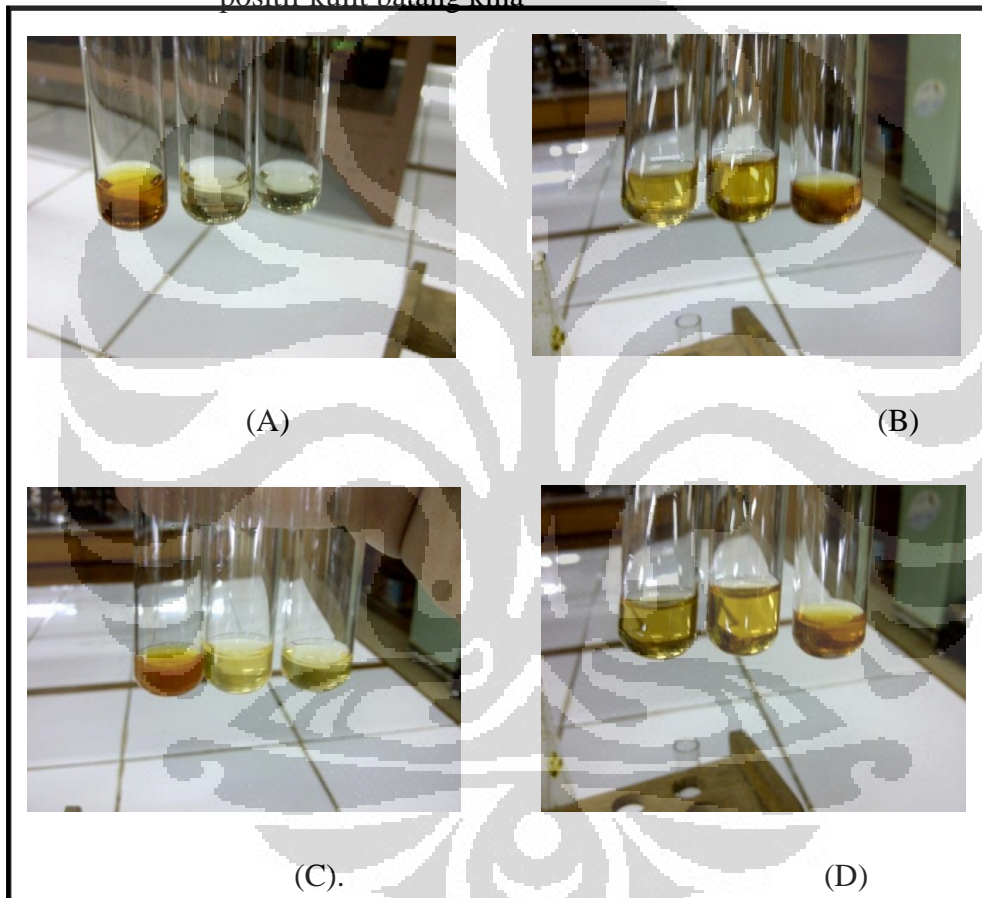
Gambar 4.16 Grafik regresi linier sampel fraksi methanol



Gambar 4.17 Plot Lineaweaver-Burk ekstrak kental fraksi n-n-butanol konsentrasi 1 µg/mL dengan konsentrasi xantin 0,05 ; 0,1 ; dan 0,15 mM.



Gambar 4.18 Hasil identifikasi alkaloid dengan reagen semprot dragendorff secara berurutan fraksi methanol, n-butanol, etil asetat, n-heksana dan kontrol positif kulit batang kina



Keterangan : Gambar B dan D berturut-turut dengan pereaksi mayer-bouchardat-dragendorff. Gambar A dan C berurut-urur dengan pereaksi dragendorff-bouchardat-mayer

Gambar 4.19 Hasil identifikasi alkaloid semua fraksi (B dan D etil asetat dan n-heksana, A dan C fraksi metanol dan n-butanol)



Gambar 4.20 Hasil identifikasi flavonoid dengan menggunakan aseton-as.oksalat-as.borat-dietil eter (fraksi etil asetat-kontrol positif daun gandarusa-fraksi n-butanol)



Gambar 4.21 Hasil identifikasi tannin dengan reagen semprot FeCl_3 (fraksi metanol, n-butanol, etil asetat, n-heksana)



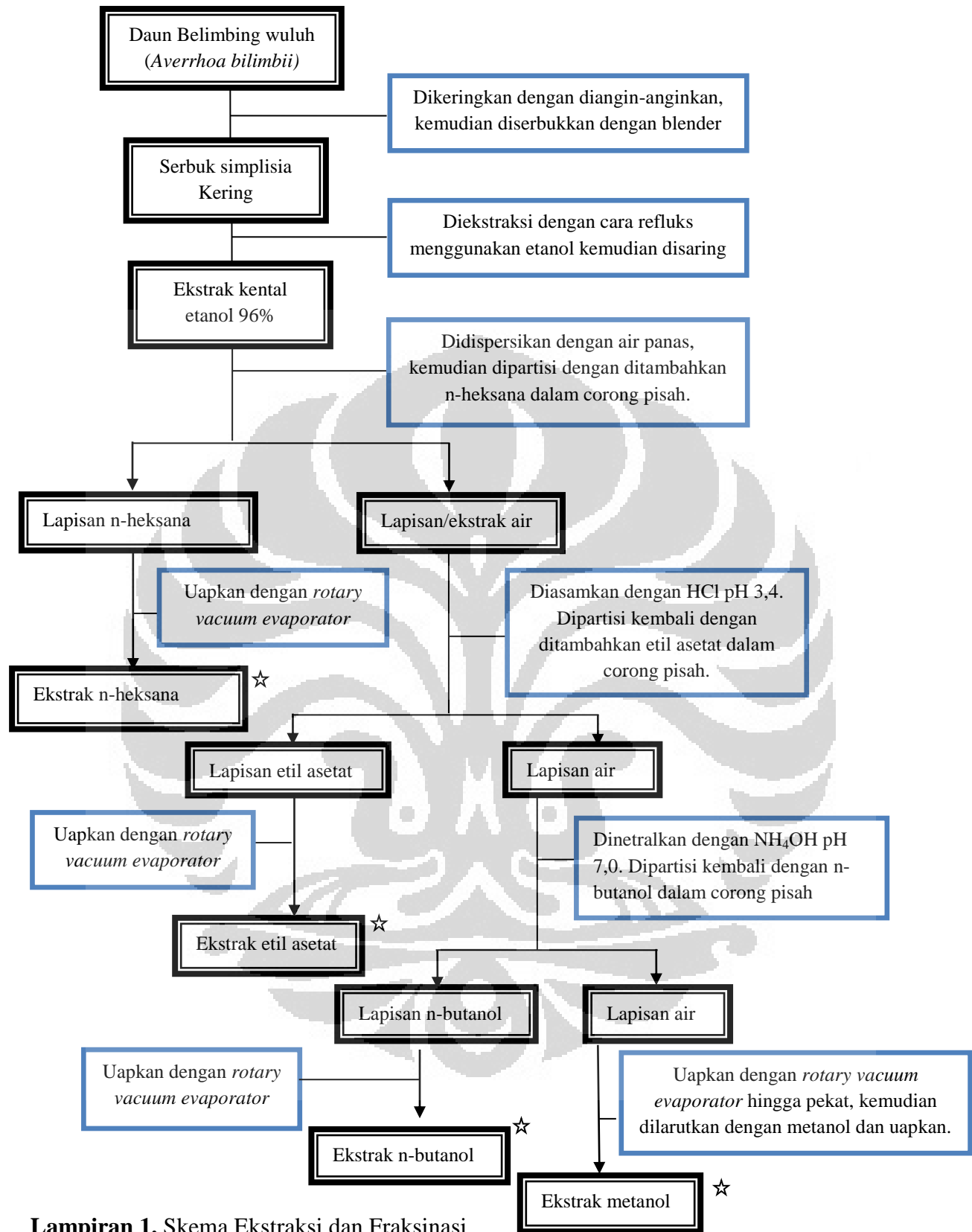
Gambar 4.22 Hasil identifikasi terpen dengan pereaksi Liebermann bouchard pada fraksi metanol, butanol, etil asetat, n-heksana



Gambar 4.23 Hasil identifikasi glikosida dengan reaksi molisch (fraksi metanol dan fraksi n-butanol)

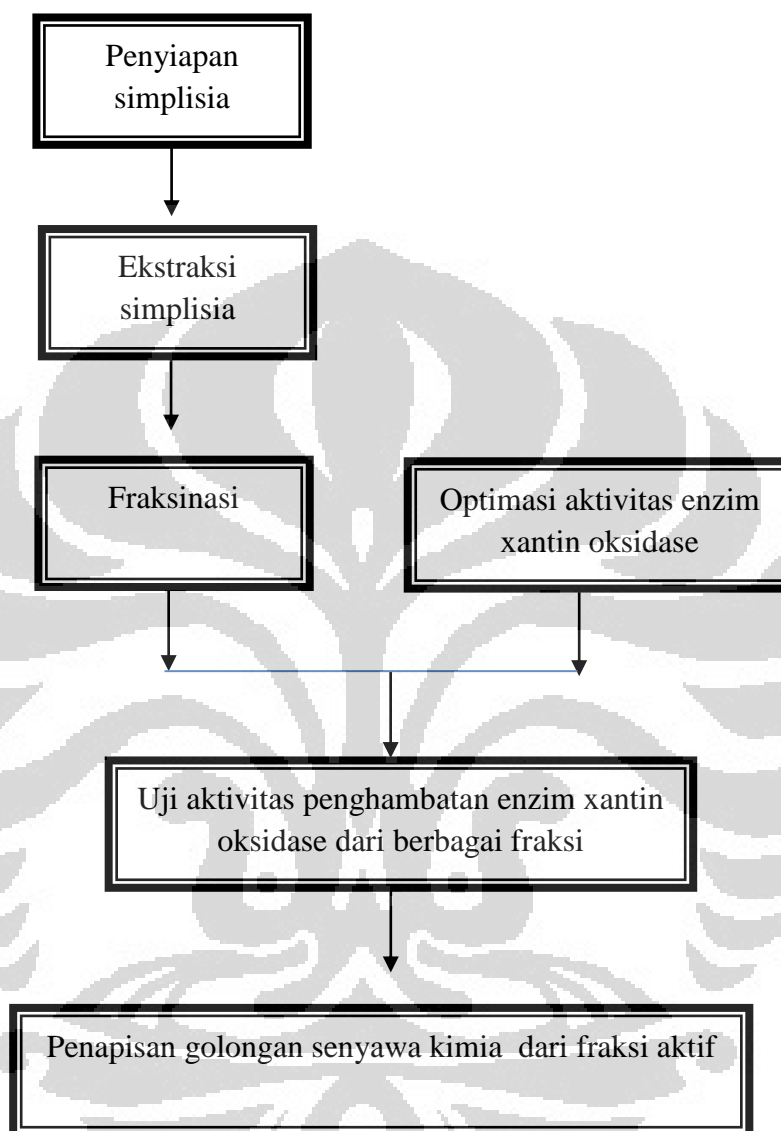


Gambar 4.24 Hasil identifikasi saponin dengan pengocokkan dan penambahan HCl 2N (fraksi metanol, n-butanol, etil asetat, n-heksana)



Lampiran 1. Skema Ekstraksi dan Fraksinasi

Ket: ☆ : Dilakukan uji penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase

Lampiran 2. Skema Prosedur Pelaksanaan.

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

Pada label kemasan dituliskan :

45,45 mg solid 0,11 unit/mg solid
Xantin Oksidase 0,8 unit/ mg protein

Diperlukan 0,1 Unit/mL larutan xantin oksidase. Enzim dilarutkan dalam 25 mL, maka diperlukan larutan xantin oksidase 2,5 Unit/mL.

1. Satu kemasan enzim mengandung 45,45 mg solid :

a. 0,8 Unit/mg protein

b. 0,11 Unit/mg solid

2. Jumlah total mg protein dalam satu kemasan:

$$14,1 \% \times 45,45 \text{ mg solid} = 6,408 \text{ mg protein}$$

Jumlah total enzim dalam satu kemasan :

$$0,8 \text{ Unit/mg protein} \times 6,408 \text{ mg protein} = 5,126 \text{ Unit/6,408 mg protein}$$

Oleh karena itu ditimbang enzim sebesar:

$$\frac{2,5 \text{ Unit}}{5,126 \text{ Unit}} \times 45,45 \text{ mg solid} = 22,17 \text{ mg}$$

Lampiran 4. Perhitungan dan pembuatan larutan xantin

Perhitungan larutan substrat xantin

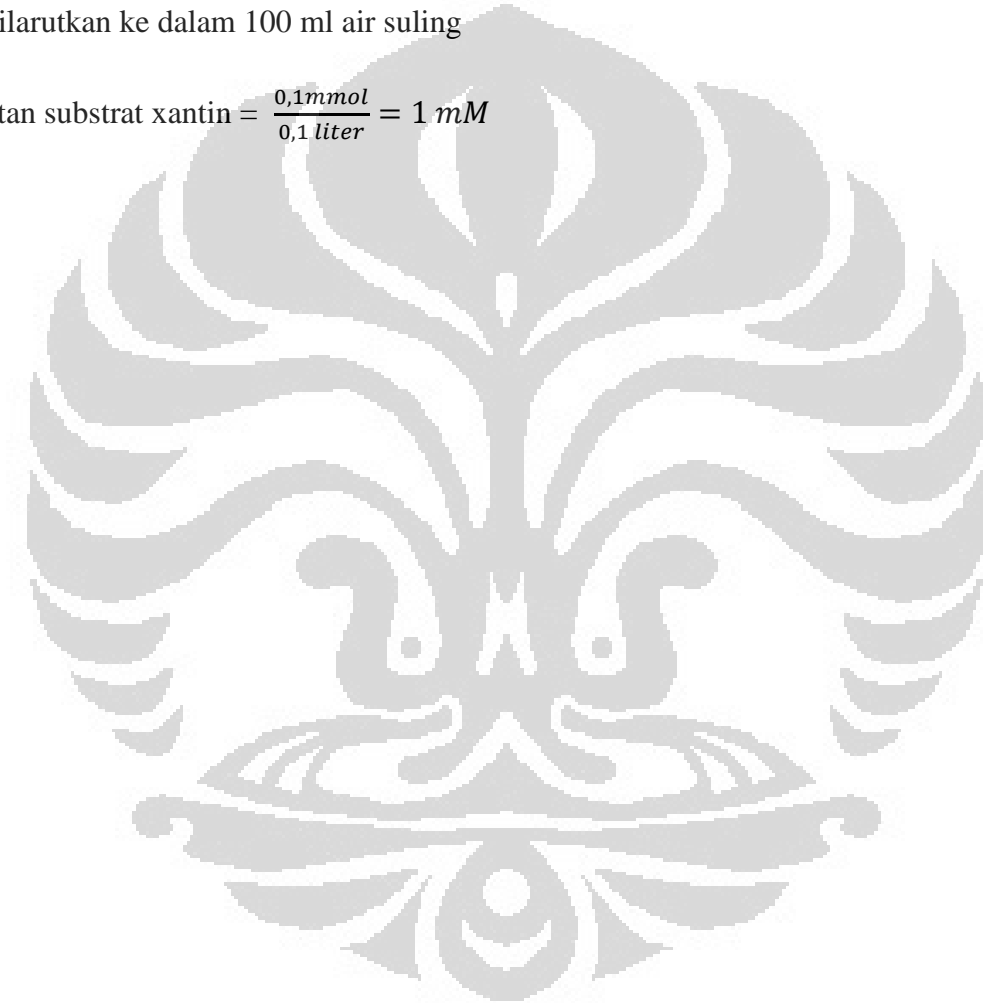
Xantin , BM = 152,1 (Sigma Aldrich)

Substrat xantin yang ditimbang = 15,21 mg

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

dilarutkan ke dalam 100 ml air suling

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



Lampiran 5. Hasil determinasi tanaman



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

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

Cibinong, 24 Februari 2012

Nomor : 243 /IPH.1.02/If.8/II/2012
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i).Yudhi Kresnanugraha
 Mhs. Univ. Indonesia
 Jakarta

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	Belimbing Wuluh	<i>Averrhoa bilimbi</i> L.	Oxalidaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

Dr. Joeni Setijoe Rahajoe
 NIP. 196706241993032004

Lampiran 6. Sertifikat analisis xantin oksidase

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
XANTHINE OXIDASE FROM BOVINE MILK

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

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



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

Lampiran 7. Sertifikat analisis xantin

SIGMA-ALDRICH[®]

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of AnalysisProduct Name:
Xanthine - BioUltra, ≥99%

Product Number: X4002
 Lot Number: 077K53071V
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 69-89-6
 MDL Number: MFCD00078453
 Formula: C₅H₄N₄O₂
 Formula Weight: 152.11 g/mol
 Quality Release Date: 25 NOV 2008
 Date Retested: 01 JUN 2011
 Recommended Retest Date: JUN 2015



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

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

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

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



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

Lampiran 8. Sertifikat analisis allopurinol

kimia farma

Plant Bandung

LAPORAN ANALISA BAHAN BAKU

Nama Bahan Baku : ALLOPURINOLUM	No. Batch :20110304 Exp. Date :24-03-2015	Kode Dok. : FQC-01-0022/00 Tgl. Berlaku : 26 Juli 2010
Kode Bahan :3012010 Origin :Nanjing - China No. LA :B110626 No. SP :P113161	Supplier :PT Parit Padang Tgl. Sampling :23-06-2011 Tgl. Selesai :12-07-2011	Jumlah :325 Kg Pemeriksa :Bambang No. BTBS :B110626

No.	PEMERIKSAAN	SPESIFIKASI	HASIL
1	Pemerian (R)	Serbuk hablur warna putih hingga hampir putih, berbau lemah	Serbuk hablur warna putih, berbau lemah.
2	Kelarutan	Sangat sukar larut dalam air dan etanol, larut dalam kalium dan natrium hidroksida, praktis tidak larut dalam kloroform dan eter	Sesuai
3	Identifikasi (R)	a. Terbentuk endapan kuning. b. Serapan maksimum pd panjang gelombang 250 nm \pm 1,1	Sesuai
4	Kejernihan dan warna larutan	Larutan jernih, warna tidak lebih kuat dari larutan pembanding Y ₆ atau GY ₆	Sesuai
5	Susut pengeringan (R)	Tidak lebih dari 0,5%	0,01%
6	Kadar abu sulfat	Tidak lebih dari 0,1%	0,05%
7	Logam berat	Tidak lebih dari 20 bpj	Sesuai
8	Kadar dihitung terhadap zat anhidrat (R)	Antara 98,0% dan 101,0%	100,21%

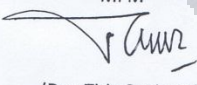
Pustaka : BP 1993, USP 32

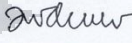
Kesimpulan : Memenuhi Syarat

Bandung,, 13 Juli 2011

Penanggung Jawab :
MPM

AMPM


(Dra. Titin Supiamah)


(Dra. Endang Widiastuti)

Jl. Pajajaran No. 29 -31
Bandung 40171
Halaman 1 dari 1
Indonesia
Telp. (022) 4204043, 4204044
Fax. (022) 4237079
Plantbdg@bdg.centrin.net.id

Lampiran. 9 Perhitungan Nilai IC₅₀ Semua Fraksi

Perhitungan nilai IC₅₀ Fraksi n-heksana :

Kons. Akhir (x)	% Inhibisi (y)
0,143	40,47
0,714	47,73
1,428	53,72
2,857	68,42
3,571	76,04
7,143	93,84

Berdasarkan data tersebut dimana nilai x adalah konsentrasi akhir larutan sampel dan nilai y adalah nilai % inhibisi masing-masing konsentrasi larutan sampel, dicari rumus persamaan regresi :

$$y = 43,18 + 7,64x$$

Nilai y disubsitusi dengan 50, maka :

$$50 = 43,18 + 7,64x$$

$$7,64 x = 50 - 43,18$$

$$7,64 x = 6,82$$

$$x = 0,89 \mu\text{g/mL}$$

Perhitungan nilai IC_{50} Fraksi Etil asetat :

Kons. Akhir (x)	% Inhibisi (y)
0,007	36,62
0,014	47,79
0,029	47,31
0,036	48,60
0,071	49,22
0,143	67,51

Berdasarkan data tersebut dimana nilai x adalah konsentrasi akhir larutan sampel dan nilai y adalah nilai % inhibisi masing-masing konsentrasi larutan sampel, dicari rumus persamaan regresi :

$$y = 40,407 + 182,03x$$

Nilai y disubsitusi dengan 50, maka :

$$50 = 40,407 + 182,03x$$

$$182,03x = 50 - 40,407$$

$$182,03x = 9,59$$

$$x = 0,0625 \mu\text{g/mL}$$

Perhitungan nilai IC_{50} Fraksi n-butanol :

Kons. Akhir (x)	% Inhibisi (y)
0,007	37,02
0,014	42,46
0,029	46,64
0,036	49,73
0,071	56,08
0,143	57,89

Berdasarkan data tersebut dimana nilai x adalah konsentrasi akhir larutan sampel dan nilai y adalah nilai % inhibisi masing-masing konsentrasi larutan sampel, dicari rumus persamaan regresi :

$$y = 41,44 + 137,15x$$

Nilai y disubsitusi dengan 50, maka :

$$50 = 41,44 + 137,15x$$

$$137,15x = 50 - 41,44$$

$$137,15x = 8,56$$

$$x = 0,0623 \mu\text{g/mL}$$

Perhitungan nilai IC_{50} Fraksi n-heksana :

Kons. Akhir (x)	% Inhibisi (y)
0,143	37,20
0,714	41,38
1,428	51,54
2,857	58,44
3,571	70,96
7,143	74,59

Berdasarkan data tersebut dimana nilai x adalah konsentrasi akhir larutan sampel dan nilai y adalah nilai % inhibisi masing-masing konsentrasi larutan sampel, dicari rumus persamaan regresi :

$$y = 41,2 + 5,48x$$

Nilai y disubsitusi dengan 50, maka :

$$50 = 41,2 + 5,48x$$

$$5,48x = 50 - 41,2$$

$$5,48x = 8,80$$

$$x = 1,60 \mu\text{g/mL}$$