



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI, UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS XANTIN OKSIDASE DAN
IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF DARI FRAKSI ETIL ASETAT PADA
EKSTRAK AKAR TANAMAN *Acalypha indica* Linn.**

SKRIPSI

**WARDAH
0806398796**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI, UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS XANTIN OKSIDASE DAN
IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF DARI FRAKSI ETIL ASETAT PADA
EKSTRAK AKAR TANAMAN *Acalypha indica* Linn.**

SKRIPSI

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

**WARDAH
0806398796**

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

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

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

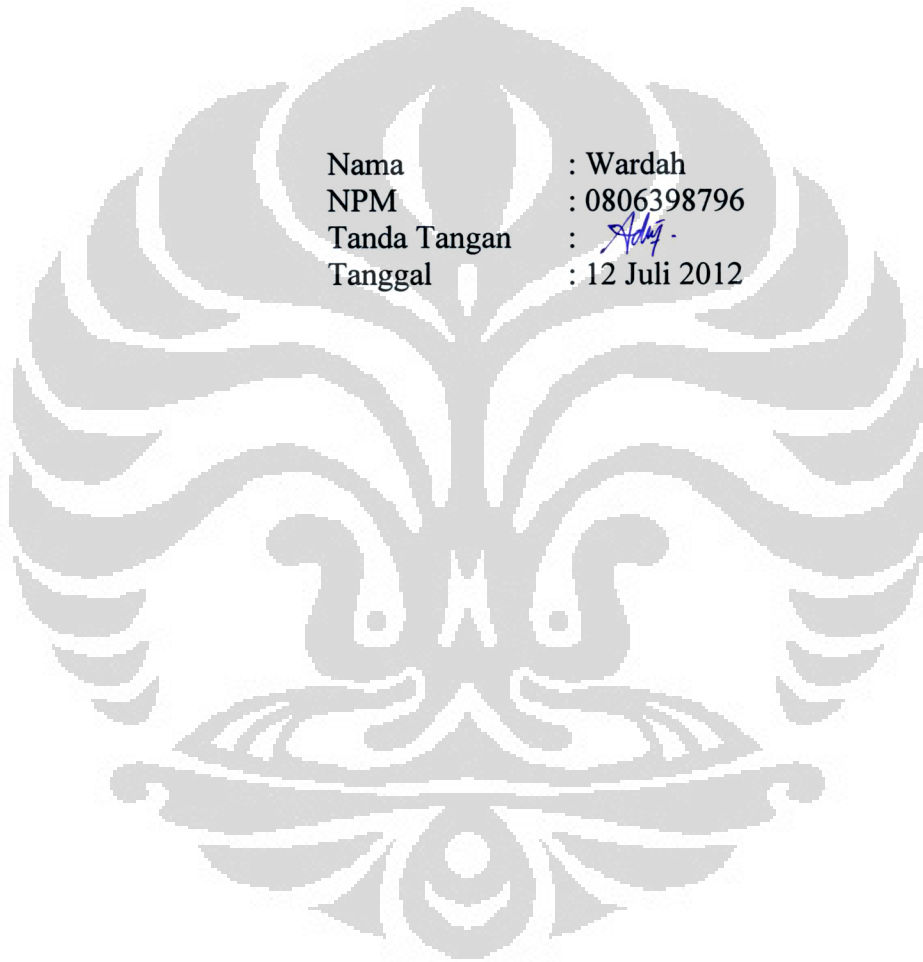
Jadi dikemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 12 Juli 2012


Wardah

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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



Nama : Wardah
NPM : 0806398796
Tanda Tangan : *Wardah*
Tanggal : 12 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Wardah
NPM : 0806398796
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Isolasi, Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Fraksi Etil Asetat Pada Ekstrak Akar *Acalypha indica* Linn.

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. ()

Penguji I : DR. Katrin, M.S. Apt. ()

Penguji II : Dra. Azizahwati, M.S., Apt. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : Juli 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu Wata'ala Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, atas curahan nikmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Abdul Mun'im M.Si, Apt selaku pembimbing yang dengan penuh kesabaran membimbing, memberi saran, bantuan, juga semangat selama penelitian berlangsung sampai tersusunnya skripsi ini.
2. Ibu Dr. Berna Elya Apt, M.Si selaku pembimbing akademik yang telah memberikan arahan selama masa perkuliahan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
3. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
4. Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Orang tua tercinta, Baba dan Mama serta Torik, Haris dan Ameer yang selalu mencurahkan kasih sayang, dukungan dan doa. Tanpa dukungan penuh dari mereka, tidaklah mungkin penulis dapat menempuh pendidikan tinggi.
6. Mas Agus, Mba Ulfah, Mba Yayuk dan Mba Lia selaku Teknisi dan Laboran Laboratorium di Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah banyak membantu penulis dalam memfasilitasi penelitian.

6. Orang tua tercinta, Baba dan Mama serta Torik, Haris dan Ameer yang selalu mencurahkan kasih sayang, dukungan dan doa. Tanpa dukungan penuh dari mereka, tidaklah mungkin penulis dapat menempuh pendidikan tinggi.
7. Ibu Puspa, Peneliti Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong, yang telah membantu analisis LC-MS dengan baik hati.
8. Teman-teman seperjuangan di Laboratorium Penelitian Fitokimia, Trias Kusuma Dewi yang telah menjadi teman kerja yang baik selama penelitian, serta Purwa, Bianca, Febriyanti, Kartika Febriyani, Nita, Yudi, Kurniawan, Indah, Lia, Elsa, Mamik, Devin, Ka putu, Ka Tika, Ka Aktsar, Ka Ruth, Bu Erna, Yunita yang selalu memberikan semangat kepada penulis.
9. Sahabatku Mulia Ade, Kartika Febiyanti, Pihaniar dan Purwa Indah yang selalu memberikan semangat dan doa kepada penulis, serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis
2012

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Wardah

NPM : 0806398796

Program Studi : Farmasi

Departemen : Farmasi

Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Jenis Karya : Skripsi

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

Isolasi, Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Fraksi Etil Asetat Pada Ekstrak Tanaman *Acalypha indica* L.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, 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 2011

Yang menyatakan



(Wardah)

ABSTRAK

Nama : Wardah
Program Studi : Farmasi
Judul : Isolasi, Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Fraksi Etil Asetat pada Ekstrak Akar Tanaman *Acalypha indica* Linn.

Hiperurisemia merupakan kelainan biokimia dalam uji klinis yang ditandai dengan kadar asam urat dalam darah yang tinggi (lebih besar dari 7,0 mg / dL), terjadi akibat dari produksi yang berlebihan atau kurangnya ekskresi dari asam urat ataupun kombinasi keduanya. Xantin oksidase merupakan metode yang telah banyak digunakan dalam pencarian obat hiperurisemia. Tujuan penelitian ini mengisolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat yang memiliki penghambatan aktivitas xantin oksidase. Serbuk akar di maserasi dengan metanol, kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut n-heksana, kloroform, etil asetat, n-butanol dan air. Fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} 2,49 $\mu\text{g/mL}$, fraksi ini dilakukan pemisahan secara kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dan fase gerak diklorometana : metanol. Isolat memiliki aktivitas penghambatan terhadap xantin oksidase sebesar 1,21 $\mu\text{g/mL}$. Kinetika penghambatan menggunakan Lineweaver-Burk Plot menunjukkan bahwa isolat mempunyai aktivitas penghambatan yang bersifat kompetitif. Dari hasil identifikasi yang dilakukan diduga isolat yang diperoleh merupakan golongan alkaloid.

Kata kunci : inhibitor xantin oksidase, hiperurisemia, *Acalypha indica* L., alkaloid.
xv+ 92 halaman; 30 gambar; 19 tabel; 15 lampiran
Bibliografi 35 (1956-2012)

ABSTRACT

Name : Wardah
Program Study : Pharmacy
Title : Isolation, Inhibitory Assay of Xanthine Oxidase Activity and Identification Active Compound from Ethyl Acetat Fraction in Root Extract *Acalypha indica* L.

Hyperuricemia is the biochemical abnormalities in clinical practice signed by high level of serum uric acid. It was a result of overproduction or underexcretion of uric acid or combination of both. Xanthine oxidase has been recognized as one of the promising targets for treatment of hyperuricemia. The purpose of this research is to isolation compound from ethyl acetat fraction which have activity to inhibite xanthine oxidase. The root powder were maserated with methanol and further partitioned with n-hexane, chloroform, ethyl acetat, dan n-buthanol. Successfully, ethyl acetate fraction with IC_{50} values 2.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$, this fraction was separated by column chromatography with stationary phase silica gel dan mobile phase dichloromethane : methanol. Isolate had activity to inhibite xanthine oxidase with IC_{50} values 1.21 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The kinetics of inhibition with Lineweaver-Burk Plot showed that the isolate was a competitive inhibitor of xanthine oxidase. Based on identification, isolate was indicated of alkaloid groups.

Keyword : xanthine oxidase inhibitor, hiperurycemia, *Acalypha indica* L. , alkaloid.
xi + 92 pages; 30 pictures; 19 tables; 15 appendix
Bibliography 35 (1956-2012)

DAFTAR ISI

| | |
|--|-----------|
| HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS | iv |
| HALAMAN PENGESAHAN | v |
| KATA PENGANTAR | vi |
| HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI..... | viii |
| ABSTRAK..... | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| DAFTAR ISI..... | xi |
| DAFTAR GAMBAR | xiii |
| DAFTAR TABEL..... | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xv |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Tujuan Penelitian | 2 |
| 1.3 Manfaat Penelitian | 3 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA..... | 4 |
| 2.1 <i>Acalypha indica</i> L. | 4 |
| 2.1.1 Klasifikasi | 4 |
| 2.1.2 Nama Daerah dan Sinonim | 4 |
| 2.1.3 Habitat | 4 |
| 2.1.4 Morfologi | 4 |
| 2.1.5 Aktivitas Biologi..... | 5 |
| 2.1.6 Kandungan Kimia..... | 7 |
| 2.2 Teknik Pemisahan | 8 |
| 2.2.1 Ekstraksi..... | 8 |
| 2.2.2 Kromatografi..... | 10 |
| 2.2.3 Kristalisasi dan Rekrystalisasi..... | 11 |
| 2.3 Hiperurisemia dan Gout..... | 12 |
| 2.4 Enzim..... | 13 |
| 2.5 Xantin Oksidase dan Alopurinol | 17 |
| 2.6 Spektroskopi | 19 |
| 2.6.1 Spektrofotometer UV-Vis | 19 |
| 2.6.2 Spektroskopi IR | 20 |
| 2.6.3 LC-MS..... | 20 |
| BAB 3. METODE PENELITIAN..... | 22 |
| 3.1 Waktu dan Tempat..... | 22 |
| 3.2 Bahan Uji | 22 |
| 3.3 Bahan Kimia | 22 |
| 3.4 Alat..... | 22 |
| 3.5 Pembuatan Pelarut dan Larutan Untuk Reaksi | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6 Cara Kerja | 26 |
| 3.6.1 Ekstraksi | 26 |
| 3.6.2 Partisi Ekstrak | 26 |
| 3.6.3 Isolasi dan pemurnian ekstrak | 27 |
| 3.6.4 Uji Kemurnian | 27 |
| 3.6.5 Identifikasi Golongan Senyawa Isolat | 28 |
| 3.6.6 Karakterisasi Senyawa | 30 |
| 3.6.7 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase | 30 |
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 36 |
| 4.1 Ekstraksi Simplisia | 36 |
| 4.2 Fraksinasi | 36 |
| 4.3 Isolasi dan pemurnian ekstrak | 38 |
| 4.4 Uji Kemurnian | 39 |
| 4.5 Identifikasi Golongan Senyawa Isolat | 40 |
| 4.6 Karakterisasi Seyawa | 41 |
| 4.7 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase | 42 |
| BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN | 48 |
| 5.1 Kesimpulan | 48 |
| 5.2 Saran | 48 |
| DAFTAR ACUAN | 49 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| Gambar 2.1 Flavanoid | 7 |
| Gambar 2.2 Glukosida sianogenik | 7 |
| Gambar 2.3 Plot Lineweaver Burk dari $1/v_i$ terhadap $1/[S]$ | 15 |
| Gambar 2.4 Plot Lineweaver Burk yang memperlihatkan inhibisi kompetitif | 16 |
| Gambar 2.5 Plot Lineweaver Burk untuk inhibisi nonkompetitif | 17 |
| Gambar 2.6. Reaksi xantin oksidase | 17 |
| Gambar 2.7 a. Pembentukan asam urat dari substrat xantin dan b. Alopurinol menghambat pembentukan asam urat | 18 |
| Gambar 4.1 Tanaman <i>Acalypha indica</i> | 53 |
| Gambar 4.2 Spektrum serapan pada optimasi lamda | 53 |
| Gambar 4.3 Grafik pada optimasi konsentrasi substrat | 54 |
| Gambar 4.4 Grafik pada optimasi pH optimum | 54 |
| Gambar 4.5 Grafik pada optimasi suhu optimum | 54 |
| Gambar 4.6 Grafik regresi linier Alopurinol | 55 |
| Gambar 4.7 Grafik regresi linier fraksi n-heksana | 55 |
| Gambar 4.8 Grafik regresi linier fraksi kloroform | 55 |
| Gambar 4.9 Grafik regresi linier fraksi etil asetat | 56 |
| Gambar 4.10 Grafik regresi linier fraksi n-butanol | 56 |
| Gambar 4.11 Grafik regresi linier fraksi air | 56 |
| Gambar 4.12 Grafik regresi linier fraksi A | 57 |
| Gambar 4.13 Grafik regresi linier fraksi H | 57 |
| Gambar 4.14 Grafik regresi linier fraksi I | 57 |
| Gambar 4.15 Grafik regresi linier fraksi J | 58 |
| Gambar 4.16 Grafik regresi linier fraksi K | 58 |
| Gambar 4.17 Grafik regresi linier isolat | 58 |
| Gambar 4.18 Grafik kinetika isolat dibandingkan dengan tanpa inhibitor | 59 |
| Gambar 4.19 Kromatografi kolom | 59 |
| Gambar 4.20 Identifikasi Alkaloid (metode semprot) | 60 |
| Gambar 4.21 KLT dua dimensi | 60 |
| Gambar 4.22 Bentuk kristal isolat W1 | 61 |
| Gambar 4.23 KLT penggabungan fraksi hasil KK | 62 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 4.1 Rendemen ekstrak | 64 |
| Tabel 4.2 Data bobot fraksi hasil kromatografi kolom | 64 |
| Tabel 4.3 Data serapan pada penentuan konsentrasi substrat optimum | 65 |
| Tabel 4.4 Data serapan pada penentuan pH optimum..... | 65 |
| Tabel 4.5 Data serapan pada penentuan suhu optimum | 66 |
| Tabel 4.6 Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh Alopurinol..... | 66 |
| Tabel 4.7 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi n-heksana .. | 67 |
| Tabel 4.8 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi kloroform .. | 67 |
| Tabel 4.9 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi etil asetat ... | 68 |
| Tabel 4.10 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi n-butanol . | 68 |
| Tabel 4.11 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi air | 69 |
| Tabel 4.12 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi A..... | 69 |
| Tabel 4.13 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi H..... | 70 |
| Tabel 4.14 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi I..... | 70 |
| Tabel 4.15 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi J..... | 71 |
| Tabel 4.16 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi K..... | 71 |
| Tabel 4.17 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh isolat..... | 72 |
| Tabel 4.18 Data serapan tanpa inhibitor pada uji kinetika | 72 |
| Tabel 4.19 Data serapan isolat pada uji kinetika..... | 73 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|----|
| Lampiran 1. Skema kerja ekstraksi dan fraksinasi akar <i>Acalypha indica</i> L. | 75 |
| Lampiran 2. Isolasi, pemurnian, karakterisasi senyawa aktif | 76 |
| Lampiran 3. Skema pengujian penghambatan aktivitas xantin oksidase | 77 |
| Lampiran 4. Perhitungan dan pembuatan larutan xantin oksidase 0,1 unit/mL | 78 |
| Lampiran 5. Perhitungan dan pembuatan larutan xantin..... | 79 |
| Lampiran 6. Contoh Perhitungan Nilai IC ₅₀ Isolat..... | 80 |
| Lampiran 7. Hasil determinasi tanaman..... | 81 |
| Lampiran 8. Sertifikat analisis xantin oksidase..... | 82 |
| Lampiran 9. Sertifikat analisis xantin | 83 |
| Lampiran 10. Sertifikat analisis alopurinol..... | 84 |
| Lampiran 11. Skema Tabel Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase | 85 |
| Lampiran 12. Skema Tabel Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Standar dan Sampel | 86 |
| Lampiran 13. Spektrum UV isolat W1 | 87 |
| Lampiran 14. Spektrum infra merah isolat W1..... | 88 |
| Lampiran 15. Spektrum LC-MS isolat W1 | 91 |

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hiperurisemia merupakan kelainan biokimia dalam uji klinis yang ditandai dengan kadar asam urat dalam darah yang tinggi (lebih besar dari 7,0 mg / dL), terjadi akibat dari produksi yang berlebihan atau kurangnya ekskresi dari asam urat ataupun kombinasi keduanya. Asam urat adalah produk akhir dari metabolisme purin, yang merupakan hasil katabolisme dari dinukleotida atau asam ribonukleotida. Pada hiperurisemia dapat terjadi akumulasi kristal asam urat pada persendian sehingga menimbulkan rasa sakit atau nyeri yang dikenal dengan istilah penyakit pirai atau gout. Prevalensi *gout* di Taiwan adalah sekitar 11,7% pasien dari 41,4% yang mengalami hiperurisemia. Dari salah satu studi menyatakan, prevalensi hiperurisemia dan atau asam urat meningkat sekitar 2 kasus per 1000 pendaftar pada lebih dari 10 tahun (1990-1999) dalam keseluruhan populasi dan pasien asam urat selalu meningkat di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Indonesia (Purwatiningsih et al, 2010).

Xantin oksidase merupakan enzim utama pada jalur metabolisme purin, yang mengkatalisis reaksi oksidasi dari hipoxantin menjadi xantin dan akhirnya menjadi asam urat. Tentunya, dengan menjaga kadar asam urat dalam batas normal merupakan terapi penting untuk pencegahan *gout* dan gangguan lainnya. Xantin oksidase merupakan metode yang telah banyak digunakan dalam pencarian obat hiperurisemia (Yanfen Niu et al, 2010).

Alopurinol sampai saat ini merupakan satu-satunya senyawa penghambat xantin oksidase yang sering digunakan dalam pengobatan. Dalam penggunaannya, obat ini tidak lepas dari adanya efek samping seperti hipersensitivitas, Sindrom Steven Johnson, dan toksisitas ginjal. Oleh karena itu, perlu dilakukan pencarian dari bahan alam untuk mengembangkan senyawa yang memiliki aktivitas penghambat xantin oksidase tetapi tidak memiliki efek samping seperti pada penggunaan

alopurinol. Efek aktivitas penghambat xantin oksidase yang terdapat pada pengobatan tradisional tersebut diduga disebabkan karena adanya flavonoid, triterpenoid, alkaloid, lignan dan tentunya senyawa fenol. Jadi, skrining berbagai ekstrak tanaman untuk melihat aktivitas penghambatan xantin oksidase penting dalam mengidentifikasi senyawa kimia poten untuk mengobati asam urat dan gangguan inflamasi yang terkait (Umamaheswari et al, 2009 dan 2006).

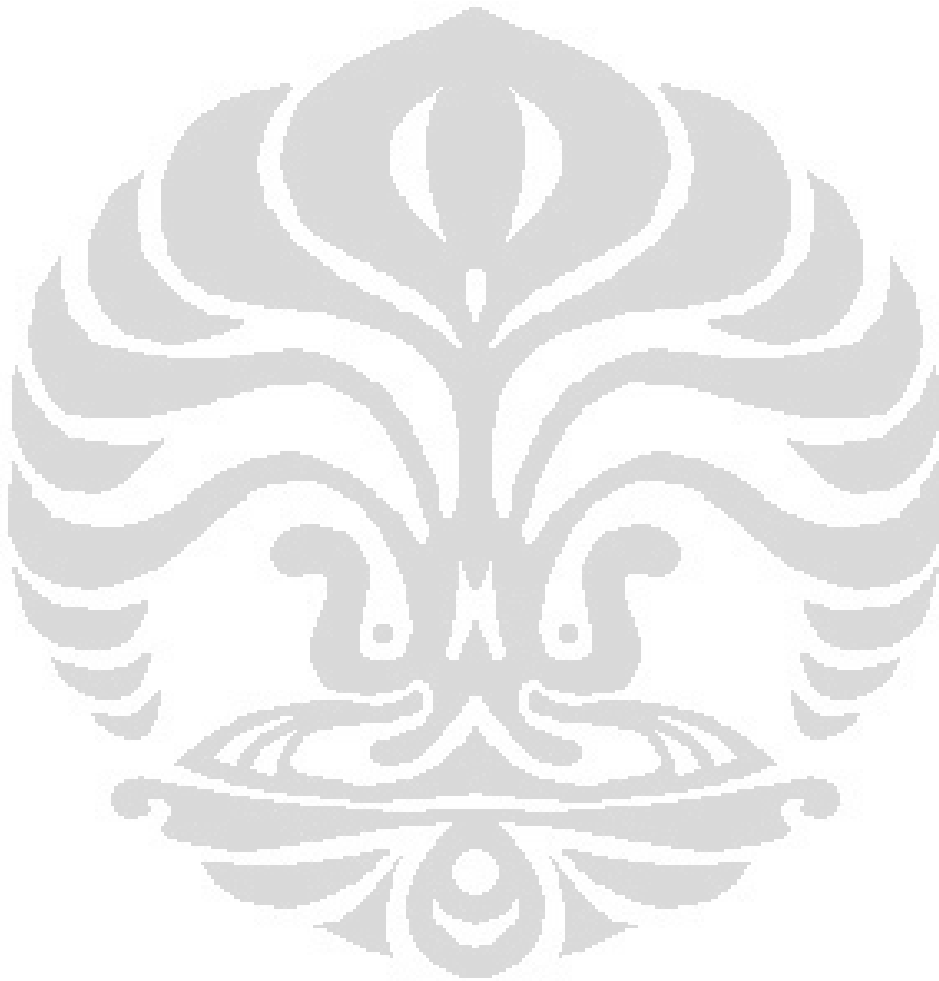
Beberapa jenis tanaman Indonesia telah dilakukan skrining terhadap uji penghambatan aktivitas xantin oksidase, termasuk *Acalypha indica* L. dari suku Euphorbiaceae. Hasil skrining penghambatan aktivitas xantin oksidase pada beberapa tanaman obat di Indonesia yang berkhasiat sebagai anti hiperurisemia, akar tanaman *Acalypha indica* L. memiliki aktivitas penghambatan xantin oksidase sebesar 17,47% pada konsentrasi sampel sebesar 25,255 ppm (Laurens, 2010). Telah dilakukan pula uji penghambatan terhadap aktivitas xantin oksidase oleh akar tanaman *Acalypha indica* L, dan diperoleh penghambatan terbesar pada dua fraksi yaitu n-butanol dan etil asetat, yaitu dengan IC_{50} masing-masing sebesar 0,38 dan 5,54 (Fitriani, 2012). Akar *Acalypha indica* dapat menurunkan kadar asam urat darah pada tikus putih jantan setara dengan alopurinol dosis 36 mg/ 200 g berat badan atau 200 mg untuk manusia (Azizahwati et al, 2005). Namun, belum diketahui senyawa aktif yang dapat menghambat xantin oksidase, sehingga pada penelitian ini dilakukan isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap xantin oksidase serta mengetahui jenis penghambatannya.

1.2 Tujuan Penelitian

- a. Mengisolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat pada tumbuhan *Acalypha indica* L. terhadap penghambatan aktivitas xantin oksidase.
- b. Menguji isolat terhadap penghambatan aktivitas xantin oksidase.
- c. Mengkarakterisasi dan identifikasi senyawa yang diperoleh.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan untuk memperoleh senyawa atau obat baru dalam pengobatan hiperurisemia, serta dapat digunakan sebagai landasan penelitian lebih lanjut mengenai efek penghambatan aktivitas xantin oksidase secara in vivo pada hewan coba.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Acalypha indica* L.

2.1.1 Klasifikasi Tanaman

Kerajaan : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Bangsa : Euphorbiales
Suku : Euphorbiaceae
Marga : Acalypha
Jenis : *Acalypha indica* L. (Porter, C.L., 1959).

2.1.2 Nama Daerah dan Sinonim

Nama daerah: *Jawa*: Ceka mas, lelatang, rumput bolong-bolong, rumput kokosongan. *Inggris*: Indian nettle, cat's nettle. Sinonim: *A. spicata* L., *A. ciliata* L., *A. canescana* L., *A. australis* L., *A. canescens* Wall (BPOM, 2010).

2.1.3 Habitat

Tumbuhan ini banyak ditemukan di Indonesia, India, Indocina dan Ethiopia (BPOM, 2010).

2.1.4 Morfologi

Tumbuhan berhabitus terna menahun dengan tinggi mencapai 80 cm, batang berambut, biasanya tidak bercabang-cabang. Helaiian daun tunggal, letak berseling, panjang tangkai daun 2-6 cm, bentuk daun bulat telur sampai belah ketupat, tepi bergerigi halus, permukaan atas tidak berambut atau jika berambut hanya terdapat

pada ibu tulang daun, ukuran helaian daun 1-7 x 1-5 cm. Perbungaan berupa bunga majemuk bulir, ibu tangkai bunga tumbuh dari bagian ketiak daun, dalam satu ibu tangkai bunga terdapat 6-9 bulir bunga, 1-2 bunga jantan ada di bagian atas, 5-7 bunga betina berada di bagian bawahnya. Bunga jantan: tersusun dalam suatu bulir, perhiasan bunga kecil berwarna putih, daun pelindung hijau dengan tepi bergerigi halus. Bunga betina: tersusun dalam suatu bulir, daun pelindung berwarna hijau seperti mangkuk, tepi daun pelindung bergigi, tidak berambut atau jika berambut tersebar, lebar daun pelindung 3-4 mm, panjang 7-10 mm. Buah berbentuk kapsul kecil, terdiri atas 3 ruang ovarium, ukuran diameter buah 2-2,5 mm, setiap buah berisi 3 biji, berwarna coklat keabu abuan. Berbunga sepanjang tahun, banyak tumbuh di dataran rendah, tepi jalan atau sawah (BPOM, 2010).

2.1.5 Aktivitas Biologi

Tanaman *Acalypha indica* L. pada akar dan bagian aerialnya secara tradisional digunakan dalam pengobatan masyarakat sebagai ekspektoran, asma dan pneumonia, emetik, pencahar dan antihelminik (Hungeling et al, 2009). Selain itu digunakan juga secara tradisional sebagai obat rematik (Djarwaningsih, Tutie).

Adapun beberapa uji aktivitas yang telah dilakukan pada tanaman *Acalypha indica* L. yaitu:

a. Aktivitas antibakteri

Ekstrak heksan, chloroform, etil asetat dan metanol dari daun *Acalypha indica* L. memiliki aktivitas antibakteri terhadap mikroorganisme Gram positif dengan konsentrasi hambat minimum antara 0.156 sampai 2.5 mg/mL, tetapi tidak memiliki aktivitas pada mikroorganisme Gram negatif kecuali *Pseudomonas aeruginosa* (Govindarajan, M., 2008).

b. Aktivitas neuroproteksi dan neuroterapi

Ekstrak air dari akar *Acalypha indica* Linn. memiliki efek neuroproteksi dan neuroterapi yang sama atau lebih baik dibandingkan pirasetam pada katak yang dilumpuhkan dengan pankuronium bromida. Pada dosis ekstrak 400 dan 500 mg/ kg berat badan terjadi efek neuroproteksi yang berbeda bermakna dibanding kontrol

negatif dan pirasetam ($p < 0.05$). Ekstrak pada dosis 200-500 mg/ kg berat badan menunjukkan efek neuroterapi yang berbeda bermakna dibandingkan kontrol negatif ($p = 0,000$) dan tidak berbeda bermakna dibandingkan pirasetam, kecuali pada dosis ekstrak 300 mg/ kg berat badan, menunjukkan efek lebih baik dibandingkan dengan pirasetam ($p = 0,012$) (Purwaningsih et al., 2010).

c. Aktivitas analgesik dan antiinflamasi

Ekstrak methanol *Acalypha indica* Linn. menunjukkan aktivitas analgesik dan antiinflamasi pada mencit. Penghambatan maksimum dari ekstrak dapat diamati pada dosis 250 mg/kg berat badan setelah tiga jam, yang dibandingkan dengan obat standar fenilbutazon dengan dosis 100 mg/kg berat badan (Rachman et al, 2010).

d. Aktivitas antidiabetes

Efek antidiabetes dari ekstrak methanol dan aseton *Acalypha indica* Linn. telah dilihat pada tikus normal maupun tikus yang telah diinduksi alloksan (diabetes). Berkurangnya kadar glukosa darah dari hewan uji menunjukkan bahwa ekstrak menunjukkan aktivitas antidiabetes yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok control diabetes (Masih et al, 2011).

e. Aktivitas anti hiperurisemia

Hasil uji menunjukkan bahwa dekok dari akar tanaman *Acalypha indica* L. dengan dosis 2,7g/200g berat badan; 5,4g/200g berat badan; dan 10,8g/200g berat badan dapat mengurangi kadar asam urat tikus putih jantan. Potensi penurunan kadar asam urat sebanding dengan meningkatkannya dosis, sehingga hasil terbaik yang dapat mengurangi kadar asam urat adalah dosis 10,8g/200g berat badan (Azizahwati et al, 2005).

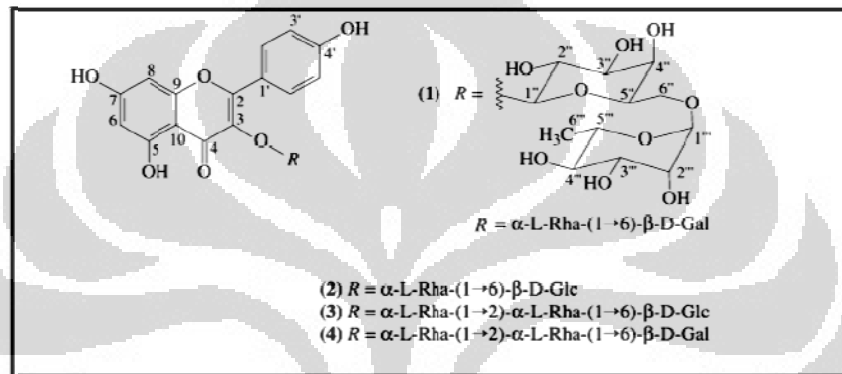
f. Aktivitas antifertilitas

Ekstrak dari empat pelarut yang berbeda dari tanaman *Acalypha indica* L. diuji aktivitas antifertilitas post-coital pada tikus albino betina. Ekstrak petroleum eter dan ethanol memiliki aktivitas yang paling efektif, yaitu pada dosis 600mg/kg berat badan menunjukkan aktivitas estrogenik (Hiremath, 1999).

2.1.6 Kandungan Kimia *Acalypha indica* Linn. (Masih et al, 2011, Hungeling et al., 2009, Nahrstedt et al, 2006)

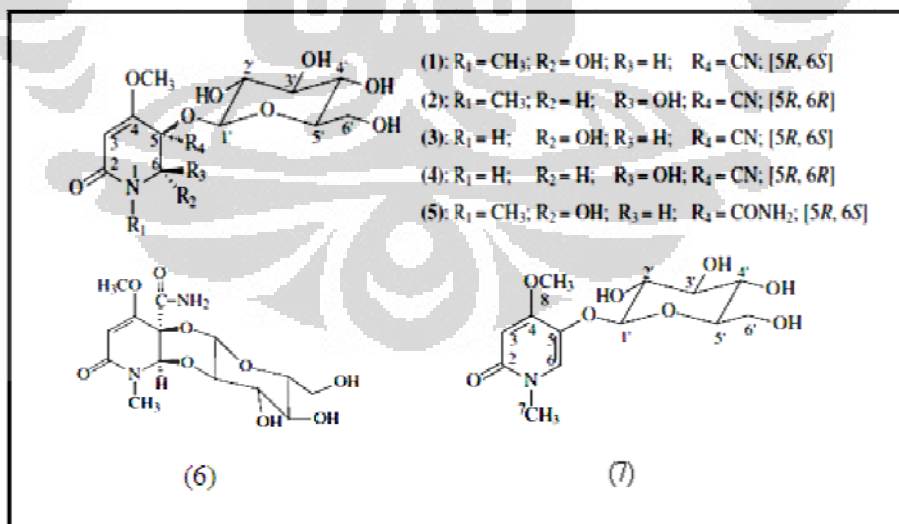
Acalypha indica L. mengandung berbagai senyawa kimia, diantaranya;

- Tanin (diperoleh dari ekstrak metanol dari bagian daun dan bunga).
- Flavonoid, terutama glikosida kaempferol yaitu mauritianin, klitorin, niktiflorin dan biorobin, serta mengandung naringin, kuersetin, dan hesperitin (diperoleh dari ekstrak metanol dari bagian daun dan bunga)



Gambar 2.1 Flavanoid yaitu mauritianin (1), klitorin (2), niktiflorin (3) dan biorobin(4).

- Glukosida sianogenik (diperoleh dari ekstrak metanol daun),



Gambar 2.2 Glukosida sianogenik, yaitu akalipin (1), epikalipin(2), norakalipin(3), epinorakalipin(4), akalipinamida(5), epiakalipin amida siklosida(6), ar-akalipidon(7).

- d. Acalipamida dan acalipamida asetat, aurantiamida dan aurantiamida asetat, succinimida dan succinimida calipo-laktat (diperoleh dari ekstrak metanol dari bagian daun).
- e. Alkaloid yaitu acalipus dan acalipin
- f. Stigmasterol, stigmasterol asetat, β - sitosterol dan β - sitosterol asetat (diperoleh dari herba).
- g. Senyawa lainnya yaitu, flindersin, 2-metil antrakuinon, triasetonamin, kaempferol, katekol, senyawa fenolik, saponin, minyak atsiri dan asam-asam lemak (diperoleh dari ekstrak metanol dari bagian daun dan bunga).

2.2 Teknik Pemisahan

2.2.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Terdapat beberapa metode ekstraksi antara lain cara dingin yaitu maserasi dan perkolasi serta cara panas yaitu refluks, sokletasi, digesti, infuse, dekok (Anonim. 1995).

Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harborne, 1987).

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan (Anonim. 2000). Terdapat beberapa metode ekstraksi, yaitu : (Anonim. 2000).

Ekstraksi dengan menggunakan pelarut, diantaranya :

2.2.1.1 Cara dingin

a. Perkolasi

Perkolasi dilakukan dengan cara dibasahkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok, menggunakan 2,5 bagian sampai 5 bagian cairan penyari dimasukkan dalam bejana tertutup sekurang-kurangnya 3 jam. Massa dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam perkolator, ditambahkan cairan penyari. Perkolator ditutup dibiarkan selama 24 jam, kemudian kran dibuka dengan kecepatan 1 mL permenit, sehingga simplisia tetap terendam. Filtrat dipindahkan ke dalam bejana, ditutup dan dibiarkan selama 2 hari pada tempat terlindung dari cahaya.

b. Maserasi

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat yang cocok ke dalam bejana, kemudian ditambahkan cairan penyari 75 bagian, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali-kali setiap hari lalu disaring dan ampasnya dimaserasi kembali dengan cairan penyari. Penyarian diakhiri setelah pelarut tidak berwarna lagi, lalu dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan pada tempat yang tidak bercahaya, setelah lima hari lalu endapan dipisahkan.

2.2.1.2 Cara panas

a. Soxhletasi

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya ekstraksi secara berkesinambungan. Cairan penyari dipanaskan sampai mendidih. Uap penyari akan naik melalui pipa samping, kemudian diembunkan lagi oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia. Selanjutnya bila cairan penyari mencapai pipa sifon, maka seluruh cairan akan turun ke labu alas bulat dan terjadi proses sirkulasi. Demikian seterusnya sampai zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersari seluruhnya yang ditandai jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifon.

b. Refluks

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin tegak dan akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut, demikian seterusnya. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali diekstraksi selama 4 jam.

c. Digesti

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

d. Infus

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

e. Dekok

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

2.2.2 Kromatografi

Kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan di dalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan muatan ion. Dengan demikian masing-masing zat dapat diidentifikasi atau ditetapkan dengan metode analitik (Anonim. 2000).

Kromatografi lapis tipis adalah pemisahan fisika-kimia. Lapisan yang memisahkan terdiri dari fase diam ditempatkan pada penyangga yang berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa

larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita (awal). Setelah pelat atau lapisan ditaruh dalam bejana yang rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak) pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Lazimnya untuk identifikasi menggunakan harga R_f , meskipun harga R_f dalam lapisan tipis kurang tepat bila dibandingkan dengan kertas (Gritter Roy J et al. 1985).

Kromatografi kolom merupakan metode kromatografi cair yang baik digunakan untuk pemisahan campuran dalam skala besar (lebih dari 1 gram). Pada kromatografi kolom, campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita pada bagian atas kolom penjerap yang berada dalam tabung kaca, tabung logam, atau tabung plastik. Kromatografi kolom terbagi dua jenis yaitu kromatografi kolom lambat dan kromatografi kolom dipercepat (kilat). Pada kromatografi kolom dipercepat, pelarut pengembang didorong dengan cepat (dengan tekanan gas) melalui kolom bergaris tengah besar tetapi pendek yang berisi penjerap basah yang ukuran partikelnya dikendalikan dengan ketat (Gritter Roy J et al. 1985).

2.2.3 Kristalisasi dan rekristalisasi

Kristalisasi dapat didefinisikan sebagai proses di mana komponen padatan mengendap dari larutan jenuh dalam bentuk kristal. Penjenuhan biasanya dilakukan melalui pendinginan atau penguapan. Rekristalisasi adalah metode dasar untuk memurnikan senyawa organik padat. Senyawa yang diperoleh dari sumber alam atau dari campuran reaksi kimia hampir selalu terdapat pengotor. Pengotor ini terdiri dari kombinasi pengotor yang tidak larut, terlarut, dan zat pewarna. Untuk mendapatkan senyawa yang murni, pengotor ini harus dibersihkan dengan tahapan pemisahan secara prosedur rekristalisasi.

Untuk memahami proses rekristalisasi, kelarutan dari zat harus diperhatikan. Sering dinyatakan bahwa "*like dissolves like*" yaitu senyawa yang memiliki struktur yang sama dapat larut satu sama lain. Sifat struktural yang sangat jelas dapat mempengaruhi kelarutan adalah kepolaran dan kemampuan senyawa untuk membentuk ikatan hidrogen. Untuk senyawa yang diketahui, sangat berguna untuk memperhatikan struktur dari senyawa ketika memilih pelarut untuk rekristalisasi.

Sedangkan untuk senyawa yang tidak diketahui strukturnya maka perlu dilakukan uji kelarutan.

Pemurnian dengan rekristalisasi bergantung pada fakta berikut bahwa:

1. Zat padat yang berbeda memiliki kelarutan yang berbeda dalam pelarut yang digunakan.
2. Sebagian besar zat padat akan lebih terlarut dalam pelarut panas dibandingkan dengan pelarut dingin.

Pada saat padatan yang belum murni dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, baik dengan atau tanpa pemanasan kemudian didinginkan secara bertahap, maka akan terjadi proses penjuanan dan akhirnya terjadi kristalisasi senyawa tersebut. Pengotor pada padatan tersebut ada dua macam, yaitu yang larut dan tidak larut, sehingga perlu dilakukan rekristalisasi untuk memurnikan padatan. Pengotor yang tidak larut dapat dihilangkan dengan menggunakan filtrasi gravitasi, sedangkan pengotor yang bersifat larut tetap terlarut dalam larutan jenuh (larutan induk). Setelah pengendapan senyawa yang diinginkan, kristal murni dipisahkan dari supernatan cair dengan filtrasi hisap (Vogel, 1956).

2.3 Hiperurisemia dan Gout

Hiperurisemia adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kadar asam urat (AU) darah di atas normal. Hiperurisemia bisa terjadi karena peningkatan metabolisme asam urat, penurunan pengeluaran asam urat, atau gabungan keduanya.

Banyak batasan untuk menyatakan hiperurisemia, secara umum kadar asam urat di atas 2 standar deviasi hasil laboratorium pada populasi normal dikatakan hiperurisemia. Batasan pragmatis yang sering digunakan untuk hiperurisemia adalah suatu keadaan dimana terjadi peningkatan kadar asam urat yang bisa mencerminkan adanya kelainan patologi. Kadar asam urat di atas 7mg/dL pada laki dan 6mg/dL pada perempuan dipergunakan sebagai batasan hiperurisemia.

Hiperurisemia yang berkepanjangan dapat menyebabkan *gout* atau pirai, namun tidak semua hiperurisemia akan menimbulkan kelainan patologi berupa *gout*.

Gout atau pirai adalah penyakit akibat adanya penumpukan kristal monosodium urat pada jaringan akibat peningkatan asam urat.

Penyebab hiperurisemia dan *gout* dapat dibedakan dengan hiperurisemia primer, sekunder, dan idiopatik. Hiperurisemia dan *gout* primer adalah hiperurisemia dan *gout* tanpa disebabkan penyakit atau penyebab lain. Hiperurisemia dan *gout* sekunder adalah hiperurisemia dan *gout* yang disebabkan karena penyakit lain atau penyebab lain. Hiperurisemia dan *gout* idiopatik adalah hiperurisemia yang tidak jelas penyebab primer, kelainan genetik, tidak ada kelainan fisiologi atau anatomi yang jelas (Sudoyo, Aru W. et al, 2006).

Terapi *gout* meliputi terapi non farmakologi dan terapi farmakologi. Terapi non farmakologi adalah tanpa menggunakan bahan kimia sebagai pengobatan. Terapi ini dengan menganjurkan pasien untuk mengurangi konsumsi makanan yang tinggi purin, menghindari alkohol, menurunkan berat badan jika obesitas. Sedangkan terapi farmakologi adalah dengan menggunakan bahan kimia sebagai pengobatan, antara lain : kolkisin, Anti Inflamasi Non Steroid (AINS), kortikosteroid untuk serangan akut dan untuk *gout* kronik digunakan alopurinol atau urikosurik.

2.4 Enzim

Enzim adalah polimer biologis yang mengatalisis reaksi kimia yang memungkinkan berlangsungnya kehidupan seperti yang kita kenal. Enzim yang mengkatalisis perubahan satu atau lebih senyawa (substrat) menjadi satu atau lebih senyawa lain (produk) meningkatkan laju reaksi setidaknya 10^6 kali dibandingkan jika tidak dikatalisis. Seperti semua katalis lain, enzim tidak berubah secara permanen atau dikonsumsi sebagai konsekuensi dan keikutsertaannya dalam reaksi yang bersangkutan.

2.4.1 Faktor yang mempengaruhi laju reaksi

Banyak faktor yang mempengaruhi laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim, yaitu :

a. Suhu

Peningkatan suhu akan meningkatkan laju baik reaksi yang tidak dikatalisis maupun yang dikatalisis enzim dengan meningkatkan energi kinetik dan frekuensi tumbukan molekul-molekul yang bereaksi. Namun, energi panas juga dapat meningkatkan energi kinetik enzim hingga ke satu titik yang melebihi hambatan energi untuk merusak interaksi nonkovalen yang mempertahankan struktur tiga dimensi enzim. Rantai polipeptida enzim kemudian mulai terurai, atau mengalami denaturasi, disertai hilangnya kemampuan katalitik enzim.

b. Konsentrasi Ion Hidrogen

Laju pada hampir semua reaksi yang dikatalisis oleh enzim memperlihatkan ketergantungan signifikan pada konsentrasi ion hidrogen. Sebagian besar enzim intrasel memperlihatkan aktivitas optimal pada nilai pH antara 5 dan 9. Hubungan antara aktivitas dengan konsentrasi ion hidrogen mencerminkan keseimbangan antara denaturasi enzim pada pH tinggi atau rendah dan efek pada keadaan bermuatan dari enzim, substrat, atau keduanya.

c. Konsentrasi Substrat

Untuk suatu enzim, peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan v_i hingga tercapai nilai v_{max} . Jika peningkatan lebih lanjut konsentrasi substrat tidak meningkatkan v_i , enzim dikatakan jenuh dengan substrat. Pada setiap saat hanya molekul substrat yang berikatan dengan enzim dalam bentuk kompleks ES (Enzim-Substrat) yang dapat diubah menjadi produk (Murray et al, 2006).

2.4.2 Persamaan Michaelis-Menten dan Penentuan nilai K_m dan V_{maks}

Persamaan Michaelis-Menten memperlihatkan secara matematis hubungan antara kecepatan awal reaksi v_i dan konsentrasi substrat $[S]$.

$$V_i = \frac{V_{maks} [S]}{K_m + [S]}$$

Konstanta Michaelis K_m adalah konsentrasi substrat dengan v_i adalah separuh dari kecepatan maksimal ($V_{max}/2$) yang dapat dicapai pada konsentrasi tertentu enzim. Oleh karena itu, K_m memiliki besaran konsentrasi substrat.

Pengukuran langsung nilai numerik V_{max} , dan karenanya perhitungan K_m sering memerlukan konsentrasi substrat yang sangat tinggi untuk mencapai kondisi jenuh. Bentuk linier persamaan Michaelis-Menten mengatasi masalah ini dan memungkinkan V_{max} dan K_m diekstrapolasikan dari data kecepatan awal yang diperoleh pada konsentrasi substrat lebih rendah dari pada konsentrasi jenuh. Dimulai dari persamaan:

(2.1)

Persamaan dibalik

(2.2)

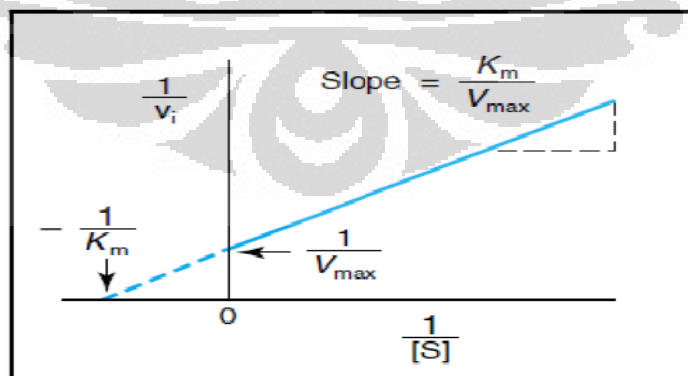
Difaktorkan

(2.3)

Sederhanakan

(2.4)

Persamaan 2.4 adalah persamaan untuk garis lurus, $y = a+bx$, dengan $y = 1/v_i$ dan $x = 1/[S]$. Oleh karena itu, plot $1/v_i$ sebagai y , yang merupakan fungsi dari $1/[S]$ sebagai x menghasilkan garis lurus yang memotong y di $1/V_{max}$ dengan kecuraman K_m/V_{max} . Plot tersebut disebut dengan Plot Lineweaver-Burk.



[Sumber : Murray et al., 2006]

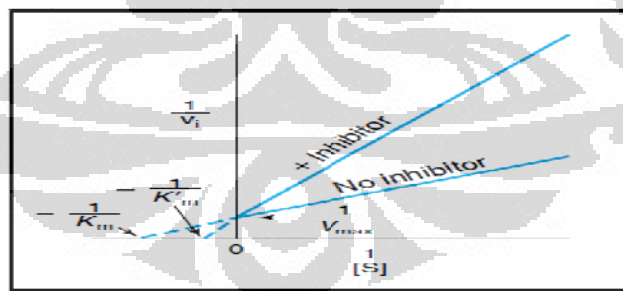
Gambar 2.3 Plot Lineweaver Burk dari $1/v_i$ terhadap $1/[S]$

2.4.3 Analisis Kinetik Membedakan Inhibisi Kompetitif dan Non Kompetitif

Inhibitor dapat diklasifikasikan berdasarkan tempat kerjanya di enzim, apakah inhibitor tersebut memodifikasi enzim secara kimiawi, atau pada parameter kinetik yang dipengaruhinya. Secara kinetis kita membedakan dua kelas inhibitor berdasarkan pada apakah peningkatan konsentrasi substrat akan mengatasi inhibisi atau tidak.

a. Inhibisi Kompetitif

Efek inhibitor kompetitif dapat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Umumnya pada inhibisi kompetitif ini, inhibitor berikatan dengan bagian dari tempat aktif yang mengikat substrat dan menghambat akses ke substrat. Oleh karena itu, struktur kebanyakan inhibitor kompetitif klasik cenderung mirip dengan struktur substrat, dan karenanya dinamai analog substrat. Untuk inhibisi kompetitif klasik, garis yang menghubungkan titik-titik data eksperimen bertemu di sumbu y (Gambar 2.4). Karena perpotongan garis di sumbu y sama dengan $1/V_{max}$, pola ini menunjukkan bahwa jika $1/[S]$ mendekati 0, v_i tidak bergantung pada keberadaan inhibitor. Oleh karena itu, inhibitor kompetitif tidak berefek pada V_{max} , tetapi meningkatkan K'_m , K_m yang tampak untuk substrat.

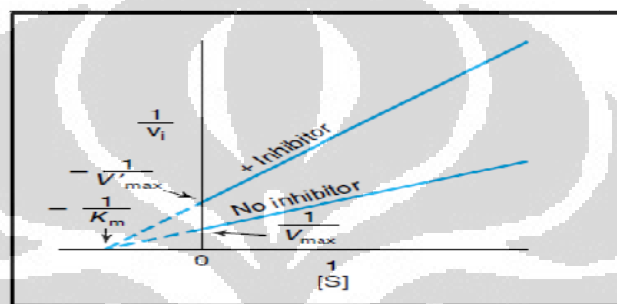


[Sumber : Murray et al., 2006]

Gambar 2.4 Plot Lineweaver Burk yang memperlihatkan inhibisi kompetitif.

b. Inhibisi Non Kompetitif

Pada inhibisi non kompetitif, pengikatan inhibitor tidak memengaruhi pengikatan substrat. Oleh karena itu, kompleks EI dan EIS dapat terbentuk. Namun, sementara kompleks enzim-inhibitor tetap dapat mengikat substrat, namun efisiensinya mengubah substrat menjadi produk yang tercermin oleh V_{max} berkurang. Inhibitor nonkompetitif mengikat enzim di bagian-bagian yang berbeda dari bagian pengikat substrat dan umumnya tidak atau sedikit memiliki kesamaan struktural dengan substrat.



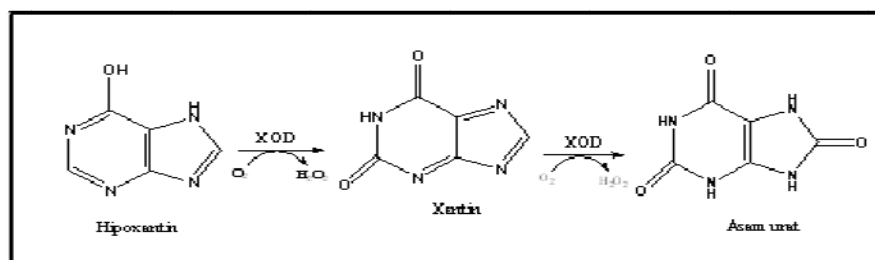
[Sumber : Murray et al., 2006]

Gambar 2.5 Plot Lineweaver Burk untuk inhibisi nonkompetitif

2.5 Xantin Oksidase dan Alopurinol

Xantin oksidase memegang peranan penting dalam metabolisme nukleotida purin pada manusia. Fungsi utamanya adalah untuk mengkatalisis oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat (Apaya et al, 2011).

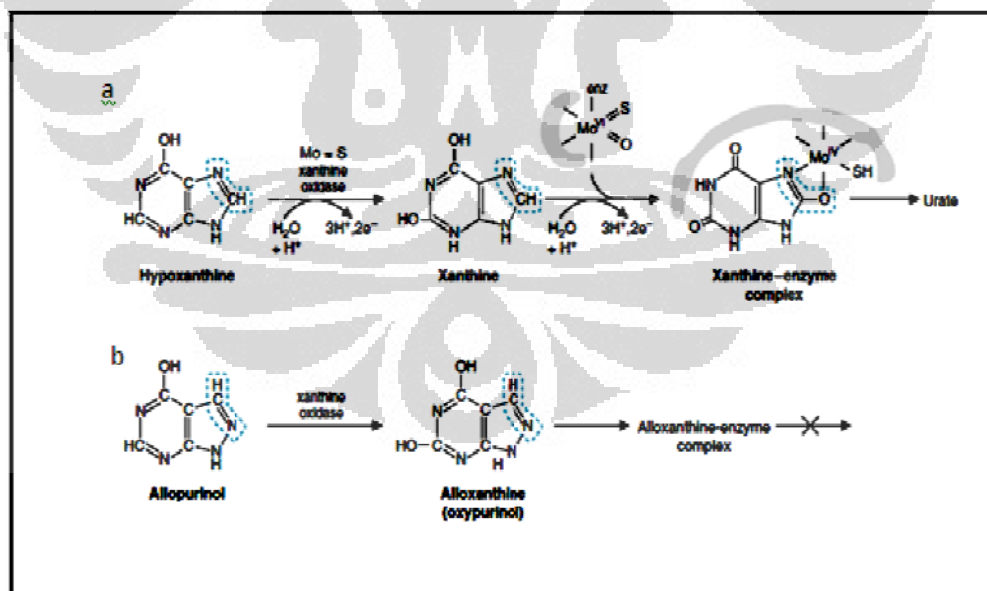
Xantin oksidase merupakan enzim yang mengandung FAD, Fe(II), dan Mo (IV). Pada reaksi, molekul oksigen merupakan substrat dan H_2O_2 yang dihasilkan sebagai produk. Asam urat merupakan produk akhir dari katabolisme nukleotida purin dan diekskresi dalam urin.



Gambar 2.6. Reaksi xantin oksidase yang mengoksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat

Fungsi fisiologis normal xantin oksidase adalah oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat pada jalur degradasi purin (Gambar 2.6). Enzim ini mengandung kompleks molibdenum-sulfida (Mo-S) yang mengikat substrat dan transfer elektron yang dibutuhkan untuk reaksi oksidasi. Oksidasi dilakukan oleh suatu kompleks koordinasi molibdenum-okso-sulfida di tempat aktif yang membentuk kompleks dengan gugus yang sedang dioksidasi, sehingga terbentuk asam urat (Gambar 2.7a).

Alopurinol merupakan obat yang digunakan untuk mengobati *gout*, menurunkan produksi asam urat dengan menghambat xantin oksidase (inhibitor kompetitif). Xantin oksidase mengoksidasi alopurinol menjadi oksipurinol yaitu suatu senyawa yang berikatan sangat kuat dengan kompleks molibdenum-sulfida di sisi aktif. Akibatnya, enzim tidak bekerja dan tidak mampu melaksanakan fungsi normal sehingga tidak terbentuk asam urat (Gambar 2.7b) (Marks et al, 1996).



Gambar 2.7 a. Pembentukan asam urat dari substrat xantin dan **b.** Alopurinol menghambat pembentukan asam urat

2.6 Spektroskopi

2.6.1 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis terutama digunakan untuk menganalisa senyawa yang memiliki gugus kromofor (senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi). Senyawa yang mengandung gugus kromofor akan mengabsorpsi radiasi sinar ultraviolet dan cahaya tampak jika diikat oleh senyawa-senyawa bukan pengabsorpsi (auksokrom). Gugus auksokrom yaitu gugus yang mempunyai elektron non bonding dan tidak menyerap radiasi UV jauh contohnya -OH, -NH₂, -NO₂, -X. Sistem kromofor yang berbeda memberikan puncak serapan maksimum dan bentuk kurva serapan yang khas. Hal tersebut menjadi dasar spektrofotometri UV-Vis menjadi bagian dalam elucidasi struktur senyawa. Prinsip dari spektroskopi UV-Vis adalah molekul dapat menyerap energi dalam spektrum cahaya ultra violet dan cahaya tampak, tergantung dari struktur elektronik dari molekul. Energi yang diserap dalam daerah UV menghasilkan transisi elektron valensi dalam molekul. Transisi ini terjadi terdiri elektron tereksitasi dari orbital molekul ke energi orbital yang lebih tinggi. Serapan tersebut direkam dan ditampilkan sebagai kurva serapan dengan absis menunjukkan panjang gelombang dan ordinat berupa intensitas serapan (Kosela, 2010).

Spektrum ultra violet dan tampak biasanya dilakukan dalam larutan sangat encer. Pelarut yang digunakan harus tidak memberikan serapan pada panjang gelombang dimana dilakukan pengukuran dan transparan. Pelarut yang biasa digunakan metanol, etanol, air, pentana, heksana, dan sikloheksana. Letak dan intensitas suatu serapan dapat bergeser jika digunakan pelarut yang berbeda. Jenis pelarut terutama pelarut polar dapat menyebabkan pergeseran puncak serapan yang disebut batokromik dan hipsokromik. Pergeseran batokromik (pergeseran merah) artinya pergeseran serapan kearah panjang gelombang lebih panjang dan pergeseran hipsokromik (pergeseran biru) artinya pergeseran serapan kearah panjang gelombang

lebih pendek. Adapun efek hiperkromik yang dapat mengakibatkan kenaikan intensitas serapan serta efek hipokromik yang dapat menurunkan intensitas serapan (Supratman, 2010).

2.6.2 Spektroskopi Infra Red (IR)

Panjang gelombang eksak dari absorpsi oleh suatu tipe ikatan, bergantung pada macam getaran dari ikatan tersebut. Oleh karena itu, tipe ikatan yang berlainan (C-H, C-C, C=O, C=C, O-H dan sebagainya) menyerap radiasi inframerah pada panjang gelombang yang berlainan. Dengan demikian spektrometri inframerah dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya gugus fungsi dalam suatu molekul (Supratman, 2010).

Vibrasi yang informatif untuk tujuan elusidasi struktur adalah pada daerah antara bilangan gelombang 4000 cm^{-1} hingga 400 cm^{-1} . Besarnya bilangan gelombang bergantung pada kekuatan ikatan dan massa atom yang melakukan ikatan kimia. Cahaya yang diserap oleh molekul diterjemahkan kedalam sebuah kurva spektrum infra merah dengan absis berupa bilangan gelombang dan ordinat berupa intensitas serapan. Hal yang perlu diperhatikan dalam menginterpretasi kurva serapan infra merah adalah: bilangan gelombang, bentuk kurva serapan (sempit tajam atau melebar), intensitas serapan (kuat, sedang, atau lemah) (Kosela, 2010).

2.6.3 LC-MS (Kromatografi Cair- Spektroskopi Massa)

LC-MS merupakan suatu gabungan antara teknik dan prinsip pemisahan kromatografi (HPLC) dan MS. Perbedaan prinsip fisika dapat digunakan untuk memisahkan dan mengukur ion (beban partikel) dengan rasio massa yang berbeda di bawah kondisi vacuum tinggi dan ini menghasilkan spectrum massa. Fungsi dari semua spectrum massa melalui empat tahap :

1. Pengenalan sampel,
2. Ionisasi sampel, molekul untuk mengkonversi molekul netral menjadi ion dalam fasa gas (metode ionisasi);

3. Penganalisa massa (penyortiran ion fasa gas yang dihasilkan oleh massa muatan ke rasio)

4. Deteksi ion yang dipisahkan

Beberapa macam metode ionisasi yang ada, yaitu *electron impact* (EI), *chemical ionization* (CI), *desorption ionization* (DI), *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI), *desorption electrospray ionization* (DESI), *electrospray ionization* (ESI), dan *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI).

Penganalisa massa memiliki fungsi untuk mengukur massa, dimana prinsipnya bergantung kepada interaksi partikel dengan medan listrik atau magnet. Penganalisa data yang biasa digunakan yaitu : *magnetic sector*, *quadrupole*, *ion trap*, *time-of-flight* (TOF), dan *fourier transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR) (Kazakevich, 2007).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia, Laboratorium Kimia Analisis Kualitatif dan Kuantitatif, serta Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekuivalensi Fakultas

Farmasi Universitas Indonesia Depok. Penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai dengan bulan Mei 2012.

3.2 Bahan Uji

Pada penelitian ini bahan uji yang digunakan adalah serbuk akar *Acalypha indica* yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITRO) dan telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Pusat Penelitian Bogor (Lampiran 7).

3.3 Bahan Kimia

Metanol, kloroform, n-heksana, etil asetat, n-butanol, diklorometana, air demineralisata (diperoleh dari Bratachem), lempeng kromatografi lapis tipis silica gel 60 F₂₄₅ (Merck, Jerman), silika gel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck, Jerman), Alopurinol (diperoleh dari Kimia Farma), xantin (Sigma Aldrich), xantin oksidase *from bovine milk* (Sigma Aldrich), dimetil sulfoksida, NH₄OH, HCl (Merck, Jerman), kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat (Analar).

3.4 Alat

Mechanical shaker, rotary vacuum evaporator (Buchi® R11, Switzerland), seperangkat alat untuk KLT (kromatografi lapis tipis), seperangkat alat untuk KK (kromatografi kolom), corong Buchner (Haldenwangler, Berlin), pipet tetes, pipet mikro, pipet volume, spatel, batang pengaduk, tabung reaksi, rak tabung reaksi,

corong, kertas saring, termometer, vial bertutup, cawan penguap, erlenmeyer, gelas piala, labu takar, gelas ukur, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1601), kuvet kuarsa, plat tetes, sendok tanduk, vortex mixer (Health), timbangan digital, Alat pH-meter Eutech pH-510, Spektrofotometer infra merah FTIR 8400 S (Shimadzu), LC-MS, Alat penentu titik lebur (Stuart Scientific).

3.5 Pembuatan Larutan Reaksi

3.5.1 Pembuatan Larutan Dikalium Hidrogen Fosfat (K_2HPO_4) 1M

Ditimbang 87,09 gram K_2HPO_4 , dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi dan berisi aquademin bebas CO_2 sebanyak 300 mL, kemudian aduk dan tambahkan kembali aquademin bebas CO_2 hingga volume akhir 500,0 mL, aduk hingga homogen.

3.5.2 Pembuatan Larutan Kalium Dihidrogen Fosfat (KH_2PO_4) 1M

Ditimbang 68,045 gram KH_2PO_4 , dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi dan berisi aquademin bebas CO_2 sebanyak 300 mL, kemudian aduk dan tambahkan kembali aquademin bebas CO_2 hingga volume akhir 500,0 mL, aduk hingga homogen.

3.5.3 Pembuatan Dapar Fosfat 0,05 M pH 7,0

Dipipet sebanyak 15,4 mL larutan K_2HPO_4 dan 9,6 mL larutan KH_2PO_4 , lalu dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi dan berisi 300 mL aquademin bebas CO_2 , kemudian diaduk dan ditambahkan kembali aquademin bebas CO_2 hingga volume akhir 500,0 mL, aduk hingga homogen, cek pH menggunakan pH-meter dan adjust dengan KH_2PO_4 atau K_2HPO_4 hingga tepat pH 7,0.

3.5.4 Pembuatan Dapar Fosfat 0,05 M pH 7,2

Dipipet sebanyak 17,9 mL larutan K_2HPO_4 dan 7,1 mL larutan KH_2PO_4 , lalu dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi dan berisi 300 mL aquademin bebas CO_2 , kemudian diaduk dan ditambahkan kembali aquademin bebas CO_2 hingga

volume akhir 500,0 mL, aduk hingga homogen, cek pH menggunakan pH-meter dan adjust dengan KH_2PO_4 atau K_2HPO_4 hingga tepat pH 7,2.

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

Dipipet sebanyak 20,4 mL larutan K_2HPO_4 dan 4,7 mL larutan KH_2PO_4 , lalu dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi dan berisi 300 mL aquademin bebas CO_2 , kemudian diaduk dan ditambahkan kembali aquademin bebas CO_2 hingga volume akhir 500,0 mL, aduk hingga homogen, cek pH menggunakan pH-meter dan adjust dengan KH_2PO_4 atau K_2HPO_4 hingga tepat pH 7,5.

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

Dipipet sebanyak 45,4 mL larutan K_2HPO_4 dan 4,6 mL larutan KH_2PO_4 , lalu dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi dan berisi 500 mL aquademin bebas CO_2 , kemudian diaduk dan ditambahkan kembali aquademin bebas CO_2 hingga volume akhir 1000,0 mL, aduk hingga homogen, cek pH menggunakan pH-meter dan adjust dengan KH_2PO_4 atau K_2HPO_4 hingga tepat pH 7,8.

3.5.7 Pembuatan Dapar Fosfat 0,05 M pH 8,0

Dipipet sebanyak 23,5 mL larutan K_2HPO_4 dan 1,5 mL larutan KH_2PO_4 , lalu dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi dan berisi 300 mL aquademin bebas CO_2 , kemudian diaduk dan ditambahkan kembali aquademin bebas CO_2 hingga volume akhir 500,0 mL, aduk hingga homogen, cek pH menggunakan pH-meter dan adjust dengan KH_2PO_4 atau K_2HPO_4 hingga tepat pH 8,0.

3.5.8 Pembuatan Larutan HCl 1 N

Larutan asam klorida 1 N dibuat dengan cara, dimasukkan 9 mL $\text{HCl}_{(p)}$ ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi dan berisi 50 mL aquademin bebas CO_2 , kemudian tambahkan kembali aquademin bebas CO_2 hingga volume akhir 100,0 mL, aduk homogen.

3.5.9 Pembuatan Larutan NaOH 0,05 M

Larutan natrium hidroksida 0,05 M dibuat dengan cara ditimbang 0,2 gram NaOH, dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi dan berisi 50 mL aquademin bebas CO₂, diaduk hingga larut dan ditambahkan kembali aquademin bebas CO₂ hingga volume akhir 100,0 ml, aduk homogen.

3.5.10 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak dan Isolat dari Akar *Acalypha indica* L.

Larutan induk fraksi etil asetat, fraksi hasil kromatografi kolom, isolat dari akar tanaman *Acalypha indica* L dibuat dengan menimbang ekstrak kental fraksi etil asetat, fraksi hasil kromatografi kolom, isolat sebanyak 10 mg, kemudian ditambahkan 3 tetes DMSO diaduk hingga larut kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Setelah itu diencerkan dengan aquademin bebas CO₂ sampai tanda batas dan diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan uji dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga diperoleh konsentrasi 100 µg/mL, 50 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, dan 1 µg/mL.

3.5.11 Pembuatan Larutan Substrat Xantin

Larutan induk substrat xantin dibuat dengan menimbang sebanyak 15,21 mg substrat xantin dimasukkan ke dalam labu ukur. Kemudian ditambahkan dengan lima tetes NaOH 1 M, digoyang hingga larut, setelah itu diencerkan dengan aquademin bebas CO₂ sampai dengan 100,0 mL (konsentrasi 1 mM). Larutan xantin dibuat dengan mengencerkan larutan induk sampai diperoleh larutan xantin dengan konsentrasi 0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM dan 0,25 mM.

3.5.12 Pembuatan Larutan Standar Alopurinol

Larutan induk standar Alopurinol dibuat dengan menimbang 10 mg Alopurinol lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Kemudian ditambahkan dengan NaOH 1 N beberapa tetes hingga larut lalu diencerkan dengan aquademin bebas CO₂ di dalam labu ukur, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas dan diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm (1000 µg/mL). Larutan standar

Alopurinol dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga diperoleh larutan standar alopurinol dengan konsentrasi 0,1, 0,2, 0,5 dan 1,0 $\mu\text{g/mL}$.

3.5.13 Pembuatan Larutan Xantin Oksidase

Ditimbang 22,17 mg xantin oksidase dengan menggunakan botol timbang dan sendok tanduk, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan dapar fosfat di dalam labu ukur, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas dan diperoleh larutan xantin oksidase 0,1 unit/mL. Dilakukan pada kotak es (memerlukan perlakuan khusus)

3.6 Cara Kerja

3.6.1 Ekstraksi

Ditimbang Serbuk akar *Acalypha indica* L. sebanyak 4,380 kg dan dimasukan masing-masing 500 gram ke dalam botol maserasi kemudian ditambahkan metanol sampai seluruh serbuk terendam seluruhnya atau hingga tiga jari di atas permukaan simplisia. Kemudian dilakukan maserasi, yaitu dilakukan pengocokan selama 6 jam dengan kecepatan 125 rpm lalu dibiarkan dalam bejana maserasi selama 18 jam. Selanjutnya cairan penyari dipisahkan dari ampas dan disimpan dalam wadah penampung. Selajutnya ampas diekstraksi kembali dengan cara yang sama. Maserasi dilakukan hingga warna dari lapisan metanol tidak pekat lagi atau hampir tidak berwarna. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 50°C dan kecepatan 30 rpm.

3.6.2 Partisi Ekstrak

Larutan ekstrak metanol yang diperoleh kemudian dilakukan partisi berkali-kali dengan menggunakan corong pisah. Pertama, ekstrak didispersikan dalam air, kemudian ditambahkan heksan kemudian dikocok, didiamkan hingga memisah dan dipisahkan lapisan heksannya. Ulangi partisi berkali-kali hingga lapisan heksan tidak berwarna lagi. Diperoleh fraksi heksan dan fraksi air. Kemudian fraksi air dipartisi dengan kloroform, diperoleh fraksi kloroform dan fraksi air. Fraksi air kemudian

dipartisi kembali dengan menggunakan etil asetat, sehingga diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Selanjutnya fraksi air tersebut dilakukan partisi kembali dengan menggunakan n-butanol, diperoleh fraksi n-butanol dan fraksi air. Pada masing-masing fraksi yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 30 rpm hingga menjadi ekstrak kental.

3.6.3 Isolasi dan pemurnian ekstrak

Ditimbang ekstrak kental dari fraksi etil asetat sebanyak 15,0 gram dan diserbukkan dengan penambahan silika gel sebanyak 9 gram. Kemudian dilakukan kromatografi kolom, fase diam silika gel 60 (0,063-0,200 mm) dan fase gerak diklorometana : metanol yang ditingkatkan kepolarannya (elusi gradien). Kemudian masing-masing fraksi dikumpulkan dengan melihat profil kromatografi lapis tipis, dan untuk fraksi yang memiliki bobot yang banyak dilakukan uji aktivitas penghambatan terhadap xantin oksidase. Fraksi yang paling besar aktivitas pengahambatannya dan terdapat kristal dilakukan rekristalisasi dengan menggunakan pelarut n-heksana : diklorometana 2:1. Isolat kemudian diuji kemurnian, uji aktivitas serta dilakukan karakterisasi.

3.6.4 Uji Kemurnian

3.6.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Dua Dimensi

Kromatografi lapis tipis dua dimensi dilakukan dengan cara melarutkan isolat dalam pelarut diklorometanaa dan ditotolkan pada sisi horizontal plat. Dilakukan elusi dengan eluen diklorometana : metanol dengan perbandingan 9:1. Setelah dielusi dilihat pada sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366nm. Setelah itu plat tersebut dielusi kembali dengan posisi vertikal dengan menggunakan eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 8:2 dan dilihat kembali pada sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366nm.

3.6.4.2 Penentuan Jarak Lebur

Penentuan jarak lebur pada isolat dilakukan dengan cara, isolat atau kristal yang diperoleh dimasukkan ke dalam mikrokapiler yang tertutup pada salah satu ujungnya. Mikrokapiler dimasukkan ke dalam alat penentu titik lebur dan pemanas diaktifkan. Dilihat jarak lebur senyawa tersebut mulai dari mulai melebur hingga melebur seluruhnya, catat suhu tersebut. Kemudian dilakukan kembali dengan cara pertama-tama kecepatan diatur 20°C/menit, kurangi kecepatan sedikit demi sedikit hingga menjadi 10°C/menit pada saat suhu sekitar 60% dari titik lebur senyawa. Kecepatan terus dikurangi perlahan hingga 1°C/menit pada saat suhu pada termometer menunjukkan 15°C sebelum titik lebur. Lanjutkan pengamatan dengan kecepatan 1°C/menit hingga isolat/kristal tersebut mulai melebur hingga melebur seluruhnya, dicatat suhu tersebut sebagai jarak lebur.

3.6.5 Identifikasi Golongan Senyawa Isolat

3.6.5.1 Identifikasi alkaloid

Larutan uji : 500 mg ekstrak ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air, dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring.

- a. Larutan uji ditambahkan bauchardat LP, jika terbentuk endapan coklat sampai hitam maka positif mengandung alkaloid.
- b. Larutan uji ditambahkan mayer LP, jika terbentuk endapan putih sampai kuning maka mengandung alkaloid.
- c. Larutan uji ditambahkan 2 tetes Dragendorff LP, jika terbentuk endapan jingga coklat maka positif mengandung alkaloid.

Selain itu, identifikasi alkaloid dapat menggunakan pereaksi penyemprot, yaitu pereaksi dragendorff akan menghasilkan spot berwarna coklat sampai orange kecoklatan.

3.6.5.2 Identifikasi flavonoid

Diuapkan hingga kering 1 mL larutan uji, dibasahkan sisa dengan aseton P, ditambahkan sedikit serbuk asam borat P dan serbuk asam oksalat P, dipanaskan. Sisa

dicampur dengan 10 ml eter P. Diamati dibawah sinar UV 366 nm, jika larutan berfluoresensi kuning intensif menunjukkan adanya flavanoid.

Identifikasi flavonoid dapat juga dilakukan dengan metode semprot. Sampel terlebih dahulu ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi dan dapat dilihat pada UV-254 dan UV-366 jika berfluoresensi kuning gelap, hijau, biru maka merupakan flavonoid. Dapat pula digunakan pereaksi penyemprot, yaitu larutan aluminum klorida 10% dalam etanol. Hasilnya, berfluoresensi kuning pada panjang gelombang sinar UV 366 nm.

3.6.5.3 Identifikasi Glikon (ikatan gula pada glikosida)

Sebanyak 0,1 mL larutan uji dalam tabung reaksi di uapkan. Sisa ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes Molish LP. Ditambahkan 2 mL asam sulfat P. Terbentuk cincin warna ungu pada batas cairan menunjukkan adanya ikatan gula (reaksi Molish).

3.6.5.4 Identifikasi saponin

- a. 20% larutan antimoni-III-klorida dalam kloroform atau etanol. Plat KLT disemprot dengan 15-20 ml reagen kemudian dipanaskan selama 5-6 menit pada suhu 110°C. Dilihat pada sinar UV 366 nm.
- b. Vanilin asam sulfat atau anis aldehid menimbulkan warna biru violet.

3.6.5.5 Identifikasi antrakuinon

Reaksi Borntrager:

Potassium hidroksida (KOH) 10% dalam etanol. Plat disemprot dengan 10 ml larutan dan dievaluasi pada daerah UV 366 nm, dengan atau tanpa dihangatkan. Hasilnya dilihat pada daerah UV 366 nm yaitu merah.

3.6.5.6 Identifikasi triterpen

Identifikasi triterpen menggunakan pereaksi semprot anis aldehid asam sulfat, kemudian dipanaskan selama 6 menit pada suhu 100°C. Dilihat pada UV-254 dan UV-366 nm.

3.6.6 Karakterisasi senyawa

Karakterisasi senyawa yang diperoleh dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis, IR, dan LC-MS.

3.6.6.1 Spektrofotometri UV-Vis

Penentuan spektrum UV dilakukan dengan cara, ditimbang 1,2 mg kristal (isolat) kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL dan dilarutkan dengan pelarut metanol hingga tanda batas, diaduk hingga homogen. Dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm.

3.6.6.2 Spektrofotometri IR

Penentuan spektrum infra merah dilakukan dengan cara, ditimbang 2 mg kristal (isolat), kemudian digerus dan dicampur dengan 48 mg kalium bromida yang telah dikeringkan selama 24 jam pada suhu 105°C, kemudian digerus kembali hingga homogen. Selanjutnya dibuat *baseline* dengan menggunakan kalium bromide kemudian sampel dianalisis pada bilangan gelombang 4000 cm^{-1} sampai 400 cm^{-1} . Spektrum tersebut kemudian dilakukan analisis untuk mengetahui rumus struktur senyawa yang diperoleh.

3.6.6.3 Spektrum massa dengan LC-MS

Dilakukan dengan cara, ditimbang 5 mg kristal (isolat) lalu dimasukkan pada labu ukur 5 ml, dilarutkan pada metanol dan dihomogenkan. Selanjutnya dipipet 20 μL larutan tersebut dan disuntikkan pada LC-MS melalui kolom C-18 dengan kecepatan alir 1 ml/menit.

3.6.7 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

Pada uji penghambatan aktivitas xantin oksidase digunakan metode yang digunakan oleh Umamaheswari (2007) dan Owen & Jhones (1999). Penghambatan

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

3.6.7.1 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

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

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,5 sebanyak 3,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,15 mM kemudian dilakukan pra inkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Setelah pra inkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Campuran diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer untuk memperoleh panjang gelombang maksimum pengukuran.

b. Suhu Optimum

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,5 sebanyak 3,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,15 mM kemudian dilakukan pra inkubasi masing-masing pada suhu 20, 25, 30, 35 dan 40°C selama 10 menit. Setelah pra inkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Campuran diinkubasi pada suhu 25, 30, 35 dan 40 °C selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

c. 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 sebanyak 3,9 mL, masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu masing-

masing tabung reaksi ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,15 mM dan dilakukan prainkubasi pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Campuran diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

d. Penentuan Konsentrasi Substrat Xantin Optimum

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH optimum sebanyak 3,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 dan 0,2 mM kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Campuran diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

e. Perhitungan Aktivitas Enzim

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

$$\text{Aktivitas} = \frac{(\text{Serapan blanko} - \text{serapan kontrol blanko}) \times \text{vol} \times \text{df}}{12,2 \times 0,1} \text{ Error! Digit expected.}$$

(3.1)

Keterangan vol : Total volume saat pengujian

df : faktor pengenceran

12,2 : Koefisien ekstrinsik asam urat pada 290 nm (mM)

0,1 : Volume xantin oksidase yang digunakan unit/mL enzim

3.6.7.2 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

a. Pengujian Sampel

Fraksi etil asetat, setra fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom diukur penghambatannya terhadap aktivitas xantin oksidase. Pengujian dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer di bawah kondisi aerob. Larutan uji sebanyak 1 mL ditambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer.

b. Pengujian Kontrol Sampel

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

c. Pengujian Standar

Larutan standar alopurinol sebanyak 1 mL (konsentrasi 0,1; 0,2; 0,5 dan 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ditambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum, kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer.

d. Pengujian Kontrol Standar

Larutan standar alopurinol sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,5 dan 1,0 µg/mL ditambahkan 3,0 mL dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum. Larutan dilakukan prainkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan larutan HCl 1 N . Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai, larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

e. Pengujian Blanko

Dapar fosfat 0,05 M pH optimum sebanyak 3,9 mL dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer.

f. Pengujian Kontrol Blanko

Dapar fosfat 0,05 M pH optimum sebanyak 4,0 mL dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum. Larutan dilakukan prainkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan larutan HCl 1 N. Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

3.6.7.3 Perhitungan Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase (IC_{50})

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

Keterangan:

A : Perubahan absorbansi larutan uji tanpa ekstrak akar *Acalypha indica* Blanko (abs dengan enzim) – Kontrol blanko (abs tanpa enzim)

B : Perubahan absorbansi larutan uji dengan ekstrak akar *Acalypha indica* Sampel (abs dengan enzim) – Kontrol sampel (abs tanpa enzim)

Sebagai kontrol positif digunakan Alopurinol dengan konsentrasi 0,1, 0,2, 0,5 dan 1,0 µg/mL. Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan rumus persamaan regresi : $y = a + bx$. Sebagai variabel x adalah konsentrasi sampel dan sebagai variabel y adalah % inhibisi.

3.6.7.4 Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim

Uji kinetika dilakukan dengan menggunakan beberapa konsentrasi xantin sebagai substrat. Kinetika penghambatan enzim dilakukan pada fraksi aktif yang memiliki IC₅₀ terbaik. Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten. Tetapan kinetika Michaelis-Menten (Km) dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + b x$, dimana x adalah konsentrasi substrat [S] dan y adalah absorbansi sampel.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Simplisia

Serbuk simplisia yang telah dideterminasi (Lampiran 7), diekstraksi dengan cara dingin, yaitu dengan cara maserasi untuk menghindari pemanasan yang berlebihan agar kandungan senyawa yang terdapat pada akar tanaman *Acalypha indica* L (Gambar 4.1) tidak rusak. Selain itu keuntungan dari maserasi adalah menggunakan peralatan sederhana, namun memiliki kerugian berupa penggunaan banyak pelarut dan memerlukan waktu yang lama.

Banyaknya serbuk simplisia *Acalypha indica* L. yang diekstraksi adalah 4,380 kg dan pelarut yang digunakan pada maserasi adalah metanol sebanyak 32 liter. Pemilihan metanol sebagai pelarut dalam maserasi dikarenakan metanol merupakan pelarut umum yang dapat mengekstraksi semua senyawa. Serbuk simplisia kemudian dimasukkan ke dalam botol coklat dan dibagi menjadi delapan bagian yaitu 500 gram (6 botol), 550 gram (1 botol) dan 430 gram (1 botol). Maserasi dilakukan selama 6 jam dengan menggoyangkan botol coklat menggunakan *mechanical shaker* dengan kecepatan 125 rpm, setelah itu didiamkan selama 18 jam, agar kandungan senyawa pada serbuk simplisia dapat terekstraksi sempurna dan memudahkan dalam proses penyaringan. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dengan ampas menggunakan penyaringan, kemudian ampas ditambahkan pelarut dan proses maserasi diulangi kembali sampai larutan hasil maserasi hampir tidak berwarna. Proses maserasi dilakukan sebanyak tujuh belas kali. Larutan hasil maserasi dikumpulkan dan diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental metanol diperoleh sebanyak 310,6 gram dengan rendemen 7,09%.

4.2 Fraksinasi

Ekstrak kental metanol yang telah diperoleh kemudian difraksinasi menggunakan pelarut yang masing-masing berbeda kepolarannya. Fraksinasi dilakukan dengan pelarut yang bersifat non polar, kemudian disusul dengan pelarut yang bersifat semipolar, setelah itu menggunakan pelarut yang lebih polar. Pelarut yang digunakan pada fraksinasi secara berturut-turut adalah heksan, kloroform, etil asetat, dan butanol. Proses ini dimaksudkan untuk memisahkan senyawa-senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya.

Sebelum dilakukan proses fraksinasi, ekstrak kental metanol ditambahkan aquadest sebanyak 500 mL kemudian diaduk hingga bercampur homogen. Tujuan penambahan ini adalah agar ekstrak metanol dapat terdispersi di dalam aquadest sehingga mempermudah distribusi senyawa berdasarkan kepolaran yang terjadi selama fraksinasi.

Setelah didispersikan menggunakan aquadest, ekstrak metanol difraksinasi menggunakan n-heksana sebanyak 500 mL di dalam corong pisah kemudian dilakukan pengocokan. Fraksinasi dilakukan sebanyak sembilan kali sampai dengan lapisan n-heksana hampir tidak berwarna. Setelah kedua lapisan berpisah, lapisan air dipisahkan dengan lapisan n-heksana. Hasil fraksinasi berupa lapisan n-heksana yang berwarna hijau, dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental n-heksana. Diperoleh ekstrak kental n-heksana sebanyak 50,4 gram dengan rendemen sebesar 1,15%.

Selanjutnya lapisan air difraksinasi kembali menggunakan kloroform sebanyak 500 mL di dalam corong pisah kemudian dilakukan pengocokan. Fraksinasi dilakukan sebanyak empat kali sampai dengan lapisan kloroform hampir tidak berwarna. Setelah kedua lapisan berpisah, lapisan air dipisahkan dengan lapisan kloroform. Hasil fraksinasi berupa lapisan kloroform yang berwarna coklat, dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental kloroform. Diperoleh ekstrak kental kloroform sebanyak 11,7 gram dengan rendemen sebesar 0,27%.

Lapisan air yang telah dipisahkan dengan kloroform kemudian difraksinasi kembali menggunakan etil asetat sebanyak 500 mL. Fraksinasi dilakukan sebanyak tiga kali sampai dengan lapisan etil asetat hampir tidak berwarna. Setelah dilakukan pengocokan dan kedua lapisan terpisah, lapisan etil asetat dipisahkan dengan lapisan air. Hasil fraksinasi berupa larutan yang berwarna kuning kecoklatan dan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Diperoleh ekstrak kental etil asetat sebanyak 21,4 gram dengan rendemen sebesar 0,49%.

Lapisan air yang telah difraksinasi dengan etil asetat difraksinasi kembali menggunakan n-butanol di dalam corong pisah. Fraksinasi dilakukan sebanyak enam kali sampai dengan lapisan n-butanol hampir tidak berwarna. Setelah dilakukan pengocokan dan kedua lapisan terpisah, lapisan n-butanol dipisahkan dengan lapisan air. Baik lapisan air maupun lapisan n-butanol yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan oven vakum dengan suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental masing-masing. Diperoleh ekstrak kental n-butanol sebanyak 34,2 gram dengan rendemen sebesar 0,78%, serta ekstrak kental air sebanyak 51,4 gram dengan rendemen sebesar 1,17%. Data ekstrak kental yang diperoleh dan rendemennya dapat dilihat pada Tabel 4.1.

4.3 Isolasi dan pemurnian ekstrak

Pemisahan selanjutnya dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom, seperti terlihat pada Gambar 4.19. Dilakukan kromatografi lapis tipis terlebih dahulu untuk mengetahui jenis eluen yang cocok untuk pemisahan, yaitu yang dapat memberikan pola pemisahan yang baik. Berdasarkan hasil kromatografi lapis tipis dipilih eluen yang sesuai, yaitu diklorometana : metanol. Pemisahan dilakukan dengan fase gerak yang dinaikkan kepolarnya yaitu disebut elusi gradien. Fase diam yang digunakan yaitu silika gel 60 (0,063-0,200 mm). Penyiapan fase diam dilakukan dengan metode basah, yaitu dengan cara membuat suspensi dari silika gel terlebih dahulu dengan menggunakan eluen. Persiapan sampel dilakukan dengan metode kering, yaitu dengan cara menimbang ekstrak kental dari fraksi etil asetat

sebanyak 15 gram, dilarutkan dengan aseton dan ditambahkan silika gel sebanyak 9 gram, diaduk hingga diperoleh serbuk dari ekstrak.

Pertama-tama, suspensi silika gel dimasukkan ke dalam kolom yang berdiameter 1,7 cm dan tinggi 40,5 cm yang pada bagian bawahnya telah diberi kapas, lalu diketuk-ketuk hingga kompak dan padat lalu dimasukkan kertas saring pada bagian atasnya dan dimasukkan sampel yang telah menjadi serbuk serta kertas saring kembali. Selanjutnya dialirkan eluen yaitu diklorometana : metanol yang dinaikkan kepolarannya. Dilakukan elusi gradien dengan perbandingan lima sebanyak 400 ml untuk masing-masing perbandingan eluen. Fraksi hasil kromatografi kolom ditampung masing-masing sebanyak 18 ml pada tabung reaksi. Diperoleh 584 fraksi yang kemudian digabung dengan melihat profil kromatografi lapis tipis (Gambar 4.23) dan diperoleh 11 fraksi. Fraksi yang memiliki bobot yang banyak, yaitu fraksi A, H, I, J, dan K dilakukan uji aktivitas penghambatan terhadap xantin oksidase. Fraksi yang paling besar aktivitas pengahambatannya dan terdapat kristal, yaitu fraksi A dilakukan rekristalisasi dengan menggunakan satu jenis pelarut, yaitu pelarut n-heksana : diklorometana 2:1. Diperoleh isolat yang berbentuk kristal, berwarna putih kekuningan (seperti terlihat pada Gambar 4.22) sebanyak 50,3 mg. Isolat kemudian diuji kemurnian, uji aktivitas serta dilakukan karakterisasi.

4.4 Uji Kemurnian

4.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Dua Dimensi

Uji kemurnian suatu senyawa dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dua dimensi, yaitu dengan melakukan elusi pada sisi horizontal maupun vertikal. Isolat dilarutkan dalam pelarut diklorometanaa dan ditotolkan pada sisi horizontal plat. Dilakukan elusi dengan eluen diklorometana : metanol dengan perbandingan 9:1. Setelah dielusi dilihat pada sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366nm. Diperoleh hasil hanya terdapat 1 spot dan tidak berekor. Selanjutnya plat tersebut dielusi kembali dengan posisi vertikal dengan menggunakan eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 8:2 dan dilihat kembali pada sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366nm. Diperoleh hasil hanya terdapat satu

spot dan tidak berekor sehingga dapat dikatakan murni (seperti terlihat pada Gambar 4.21).

4.4.2 Penentuan Jarak Lebur

Metode lain untuk menentukan kemurnian yaitu dengan uji jarak lebur. Dilakukan uji jarak lebur pada isolat yaitu dengan cara, isolat dimasukkan ke dalam mikropipiler yang tertutup pada salah satu ujungnya. Mikropipiler dimasukkan ke dalam alat penentu titik lebur dan pemanas diaktifkan. Dilihat jarak lebur senyawa tersebut mulai dari mulai melebur hingga melebur seluruhnya. Diperoleh jarak lebur antara 122-124°C. Selanjutnya panas diatur hingga pada saat mendekati titik lebur kecepatan 1°C/menit sehingga dapat mudah dilakukan pengamatan. Diperoleh hasil jarak lebur isolat adalah 0,5°C yaitu antara 127,0-127,5°C dan dapat dikatakan senyawa tersebut murni karena memiliki jarak lebur yang sempit yaitu 1-2°C atau kurang.

4.5 Identifikasi Golongan Senyawa dari Isolat

Identifikasi golongan senyawa dari isolat dilakukan dengan menggunakan metode semprot dan metode tetes. Identifikasi kualitatif yang dilakukan, yaitu untuk identifikasi flavonoid, alkaloid, glikosida, saponin, antrakuinon dan triterpen. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan metode semprot, yaitu menggunakan pereaksi aluminium klorida 10% dalam etanol, diperoleh hasil negatif karena tidak memberikan warna kuning pada sinar UV 360 nm. Selain itu dilakukan identifikasi flavonoid dengan pereaksi asam borat, asam oksalat dan eter sebagai pelarut, sehingga membentuk kompleks oksaloborat yang akan bereaksi dengan flavonoida dan menimbulkan fluoresensi kuning di bawah sinar tampak pada panjang gelombang 366 nm, tetapi diperoleh hasil negatif. Selain itu dilakukan pula identifikasi golongan glikosida menggunakan reaksi Molish, tetapi diperoleh hasil negatif karena tidak terbentuk cincin berwarna ungu. Dilakukan pula identifikasi triterpen dan saponin

dengan pereaksi anisaldehyd asam sulfat tetapi tidak memberikan warna sehingga diperoleh hasil negatif. Kemudian untuk identifikasi antrakuinon diperoleh juga hasil negatif.

Selanjutnya dilakukan identifikasi golongan alkaloid dengan menggunakan pereaksi semprot Dragendorff, diperoleh hasil positif karena membentuk senyawa yang tidak larut, sehingga terbentuk warna orange pada plat (Gambar 4.20). Setelah dibandingkan dengan standar (*Chinae Cortex*) maka isolat tersebut merupakan golongan alkaloid.

4.6 Karakterisasi senyawa

4.6.1 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis terutama digunakan untuk menganalisa senyawa yang memiliki gugus kromofor (sistem ikatan rangkap terkonjugasi). Sistem kromofor yang berbeda memberikan puncak serapan maksimum dan bentuk kurva serapan yang khas.

Diperoleh spektrum dengan dua puncak, yaitu pada panjang gelombang 310,0 nm dengan serapan sebesar 0,4257 dan pada panjang gelombang 239,0 nm dengan serapan 3,6123 nm. Senyawa pada isolat tersebut mengandung gugus kromofor (Kosela, 2010).

4.6.2 Spektrofotometri IR

Pada spektrum infra merah dapat dilihat pada lampiran, diperoleh adanya gugusan NH pada bilangan gelombang 3480 (cm^{-1}), CH aromatis pada bilangan gelombang 3120 (cm^{-1}), C=O amida pada bilangan gelombang 1640 (cm^{-1}), C=C aromatis pada bilangan gelombang 1450 dan 1720 (cm^{-1}), dan adanya aromatis orto ataupun meta pada bilangan gelombang 690 dan 780 (cm^{-1}) (Harmita, 2006). Berdasarkan hasil spektrum infra merah, sesuai bahwa senyawa tersebut merupakan golongan alkaloid.

4.6.3 Spektrum massa dengan LC-MS

Perbedaan prinsip fisika dapat digunakan untuk memisahkan dan mengukur ion (beban partikel) dengan rasio massa yang berbeda di bawah kondisi vacuum tinggi dan ini menghasilkan spectrum massa. Diperoleh puncak terbaik pada waktu retensi 2,75 atau 2,8 menit dengan nilai m/z sebesar 142,29, dimana nilai tersebut merupakan harga $M+H$, sehingga bobot molekul isolat atau senyawa tersebut adalah 141,29. Selain itu juga terdapat korelasi dari puncak dengan nilai m/z sebesar 164,24 yang merupakan harga $M+Na$, sehingga kemungkinan bobot molekul senyawa tersebut adalah 141,29. Terdapat pengotor dalam isolat, seperti terlihat pada waktu retensi 2,50 menit, tetapi jumlahnya lebih sedikit. Berdasarkan hasil spektrum LC-MS diperoleh bobot molekul 141 (ganjil) merupakan senyawa yang mengandung jumlah nitrogen ganjil (Kosela, 2010), sehingga senyawa tersebut adalah alkaloid.

4.7 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

Prinsip pengukuran uji penghambatan aktivitas xantin oksidase adalah mengukur jumlah asam urat yang terbentuk pada reaksi yang dikatalisis oleh xantin oksidase. Pengujian ini merupakan model pengujian secara *in vitro* yang dilakukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang maksimum. Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase terdiri dari uji pendahuluan penghambatan aktivitas xantin oksidase dan pengujian sampel terhadap penghambatan aktivitas xantin oksidase.

4.7.1 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

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

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk menentukan panjang gelombang pengukuran serapan pada pengujian selanjutnya, termasuk penentuan kondisi optimum dan uji sampel terhadap penghambatan aktivitas xantin oksidase. Panjang gelombang maksimum terdapat pada panjang gelombang 281,5 nm terlihat pada Gambar 4.2. Pada penelitian sebelumnya terdapat pula beberapa panjang gelombang yang digunakan, yaitu pada 284, 290 dan 295 nm.

b. 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. Peningkatan konsentrasi substrat dapat meningkatkan serapan atau v_i , tetapi jika peningkatan konsentrasi substrat tidak meningkatkan v_i , maka enzim telah jenuh oleh substrat (Murray et al, 2006). Diperoleh konsentrasi substrat optimum pada 0,15 mM seperti yang terlihat pada Gambar 4.3. Data serapan penentuan konsentrasi substrat optimum dapat dilihat pada Tabel 4.3.

c. 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 yang lebih besar dibandingkan dengan pada pH lainnya, ini disebabkan adanya keseimbangan antara denaturasi enzim pada pH tinggi atau rendah (Murray et al, 2006) seperti yang terlihat pada Gambar 4.4. Data serapan penentuan pH optimum dapat dilihat pada Tabel 4.4. Pada penelitian sebelumnya terdapat pula beberapa pH yang digunakan dalam pengukuran, yaitu pH 7,5 dan 7,8.

d. Penentuan Suhu Optimum

Pada penentuan suhu optimum, masing-masing larutan uji dilakukan prainkubasi dan inkubasi pada suhu 20, 25, 30, 35 dan 40°C. Prainkubasi dilakukan selama 10 menit di dalam inkubator dan bertujuan untuk menyesuaikan suhu larutan uji dengan suhu inkubasi, dimana enzim dapat bekerja dengan optimum. Setelah dilakukan pengukuran, kondisi optimum ditunjukkan pada suhu 30°C, seperti yang

terlihat pada Gambar 4.5, dimana serapan dan aktivitas yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan pada suhu 20, 25, 35 dan 40°C. Pada suhu di atas 30°C, suhu terlalu tinggi sehingga dapat merusak interaksi non kovalen yang mempertahankan struktur tiga dimensi enzim (Murray et al, 2006). Data serapan penentuan suhu optimum dapat dilihat pada Tabel 4.5. Pada penelitian sebelumnya terdapat pula beberapa suhu yang digunakan dalam pengukuran, yaitu pada suhu ruang, 25 dan 37°C.

Berdasarkan hasil uji pendahuluan pada penghambatan aktivitas xantin oksidase, diperoleh kondisi optimum pada panjang gelombang 281,5 nm, konsentrasi substrat 0,15 mM, pH 7,8 dan suhu 30°C. Dari hasil tersebut, pH, suhu dan panjang gelombang optimum berbeda dari literatur sigma yang menyatakan panjang gelombang maksimum 290 nm, suhu 25°C, dan pH 7,5. Perbedaan hasil tersebut dapat disebabkan oleh berbedanya peralatan yang digunakan.

Pada uji pendahuluan, dihitung aktivitas enzim dengan menggunakan rumus yang terdapat koefisien ekstrinsik asam urat pada 290 nm, sedangkan pada uji pendahuluan panjang gelombang maksimum diperoleh hasil panjang gelombang maksimum 281,5 nm, sehingga aktivitas enzim tidak dapat dihitung menggunakan rumus tersebut. Dalam penggunaan rumus tersebut perlu dilakukan perhitungan ulang untuk memperoleh koefisien ekstrinsik asam urat pada 281,5 nm, tetapi kita tidak memiliki standar asam urat sehingga kami tetap menggunakan rumus tersebut untuk mengetahui aktivitas enzim. Namun, jika dilihat serapan yang dibaca pada alat spektrofotometer sudah dapat dilihat kondisi optimum tanpa harus menggunakan rumus aktivitas tersebut.

4.7.2 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase oleh Sampel

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

pada panjang gelombang 281,5 nm. Kondisi optimum yang telah diperoleh digunakan pada pengujian sampel.

a. Pengujian Standar Alopurinol

Pada penelitian ini, yang digunakan sebagai standar adalah alopurinol. Konsentrasi yang digunakan pada awalnya yaitu, 1, 5, 10, 20, 50, dan 100 $\mu\text{g/mL}$, tetapi menghasilkan nilai IC_{50} negatif atau terlalu kecil konsentrasinya, sehingga dilakukan pengenceran kembali menjadi konsentrasi 0,1, 0,2, 0,5, dan 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi tersebut diperoleh dari larutan induk dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Diperoleh nilai IC_{50} sebesar 0,02 $\mu\text{g/mL}$. Data serapan, persen inhibisi masing-masing serapan dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Terdapat beberapa perbedaan pada nilai IC_{50} Alopurinol pada penelitian yang telah dilakukan. Nilai IC_{50} tersebut adalah 6,75 $\mu\text{g/mL}$ (Umamaheswari et al., 2006), 6,1 $\mu\text{g/mL}$ (Umamaheswari et al., 2009) dan 1,06 $\mu\text{g/mL}$ (Kong, Zhang, Pan, Tan & Cheng, 2000). Kemungkinan penyebab perbedaan tersebut adalah perbedaan konsentrasi pengujian, perbedaan asal standar tersebut dan juga ketelitian pengerjaan. Tetapi, terdapat salah satu penelitian yang memiliki IC_{50} alopurinol sebesar 0,022 $\mu\text{g/mL}$ yang tidak jauh berbeda dengan hasil yang diperoleh (Murugaiyah, 2008).

b. Pengujian Sampel

Pengujian sampel terdiri dari pengukuran penghambatan ekstrak terhadap aktivitas xantin oksidase, pengukuran kontrol sampel, blanko, dan kontrol blanko yang dilakukan secara spektrofotometri. Pengukuran kontrol sampel dilakukan sebagai faktor koreksi apabila ekstrak yang diuji memberikan serapan yang dihasilkan pada panjang gelombang maksimum pengukuran.

Masing-masing ekstrak yang dihasilkan dari fraksinasi diukur penghambatannya terhadap aktivitas xantin oksidase. Ekstrak tersebut adalah fraksi n-heksana, kloroform, etil asetat, n-butanol dan air. Masing-masing ekstrak kental ditimbang 10 mg dan ditambahkan tiga tetes DMSO hingga larut dan dicukupkan volumenya menggunakan aquademin bebas CO_2 sebanyak 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 1000 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi dimetil sulfoksida yang

digunakan dalam total volume larutan yaitu antara 1-5%, karena tidak memberikan penghambatan terhadap xantin oksidase (Murugaiyah, 2008).

Masing-masing fraksi ekstrak dibuat konsentrasi 1, 5, 10, 20, 50, dan 100 $\mu\text{g/mL}$ yang diencerkan dari larutan induk 1000 $\mu\text{g/mL}$. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan aquademin bebas CO_2 dan dicukupkan volumenya di dalam labu ukur 10,0 mL.

Pada uji penghambatan fraksi n-heksana, kloroform, etil asetat, n-butanol dan air diperoleh nilai IC_{50} secara berurutan sebesar 4,67, 3,79, 2,49, 3,68, 7,85 $\mu\text{g/mL}$. Serapan dan persen inhibisi masing-masing konsentrasi fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, dan Tabel 4.11.

Selanjutnya masing-masing fraksi hasil kromatografi kolom dengan bobot yang besar diukur penghambatannya terhadap aktivitas xantin oksidase. Fraksi tersebut adalah fraksi A, H, I, J, dan K. Masing-masing fraksi kental ditimbang 10 mg dan ditambahkan tiga tetes DMSO hingga larut dan dicukupkan volumenya menggunakan aquademin bebas CO_2 sebanyak 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 1000 $\mu\text{g/mL}$.

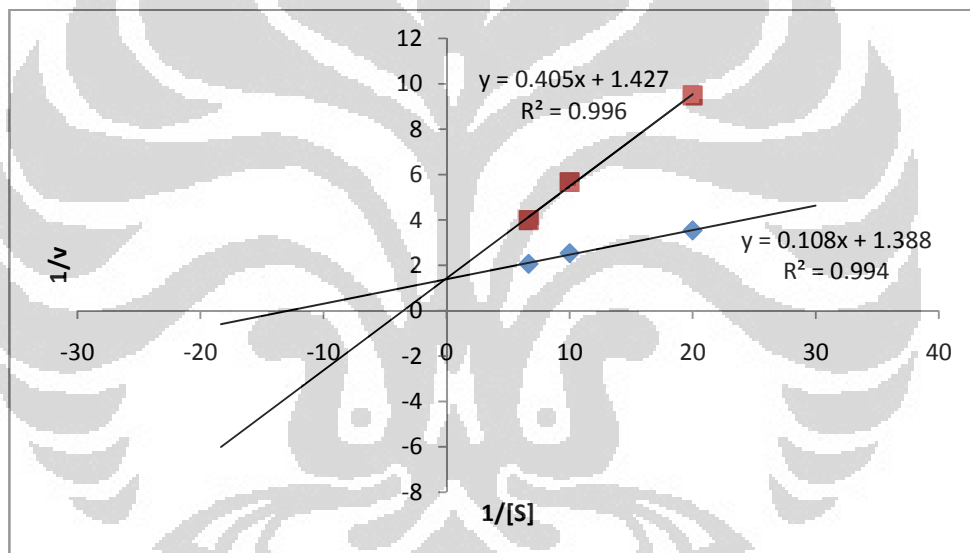
Masing-masing fraksi ekstrak dibuat konsentrasi 1, 5, 10, 20, 50, dan 100 $\mu\text{g/mL}$ yang diencerkan dari larutan induk 1000 $\mu\text{g/mL}$. Pada uji penghambatan fraksi A, H, I, J, dan K nilai IC_{50} secara berurutan sebesar 1,84, 3,73, 5,28, 13,13, dan 7,07 $\mu\text{g/mL}$. Serapan dan persen inhibisi masing-masing konsentrasi fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 dan Tabel 4.16.

Kemudian isolat yang dihasilkan diukur penghambatannya terhadap aktivitas xantin oksidase. Isolat ditimbang 10 mg dan ditambahkan tiga tetes DMSO hingga larut dan dicukupkan volumenya menggunakan aquademin bebas CO_2 sebanyak 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 1000 $\mu\text{g/mL}$. Dibuat pengenceran menjadi konsentrasi 1, 5, 10, 20, 50, dan 100 $\mu\text{g/mL}$ dari larutan induk 1000 $\mu\text{g/mL}$. Diperoleh nilai IC_{50} yaitu 1,21 $\mu\text{g/mL}$. Bila dibandingkan dengan IC_{50} alopurinol (0,02), nilai IC_{50} isolat masih terlalu besar sehingga daya penghambatan terhadap xantin oksidase masih kurang, tetapi sudah cukup memiliki aktivitas. Serapan dan persen inhibisi isolat dapat dilihat pada Tabel 4.17. Masing-masing standar dan sampel dilakukan

perhitungan regresi linier untuk menghitung IC_{50} , seperti terlihat pada Gambar 4.6 sampai 4.17.

4.8 Uji Kinetika Penghambatan Xantin Oksidase

Analisis kinetika penghambatan xantin oksidase dilakukan menggunakan plot Lineweaver-Burk. Sampel yang digunakan adalah isolat, dengan nilai IC_{50} yaitu 1,21 $\mu\text{g/mL}$. Uji kinetika penghambatan digunakan untuk mengetahui mekanisme penghambatan dari senyawa tersebut. Dilakukan pada beberapa konsentrasi substrat xantin 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; dan 0,25 mM.



Keterangan : \blacksquare = tanpa inhibitor \blacklozenge = isolat

Gambar 4.18 Plot Lineweaver-Burk isolat konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ dengan konsentrasi xantin 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 dan 0,25 mM.

Berdasarkan hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten menunjukkan bahwa nilai V_{maks} isolat dan tanpa inhibitor hampir sama, sedangkan nilai K_m berbeda. Sehingga dapat disimpulkan jenis kinetika penghambatan isolat 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 atau disebut analog sustrat (Murray et al, 2006), sesuai dengan senyawa alkaloid yang memiliki struktur mirip dengan substrat.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil isolasi pada fraksi etil asetat pada akar tanaman *Acalypha indica* Linn., diperoleh hasil sebagai berikut :

- a. Hasil isolasi dari fraksi etil asetat pada tumbuhan *Acalypha indica* L. diperoleh isolat yang berbentuk kristal putih kekuningan sebanyak 50,3 mg.
- b. Hasil uji penghambatan aktivitas xantin oksidase dari isolat memberikan penghambatan aktivitas dengan nilai IC_{50} sebesar 1,21 $\mu\text{g/mL}$ dan merupakan inhibitor kompetitif.
- c. Berdasarkan hasil karakterisasi dan identifikasi, isolat merupakan senyawa alkaloid, dengan adanya gugus aromatis, NH dan karbonil, serta memiliki bobot molekul 141.

5.2 Saran

Sebaiknya perlu dilakukan karakterisasi senyawa menggunakan ^1H NMR dan ^{13}C NMR agar dapat mengetahui rumus struktur senyawa tersebut.

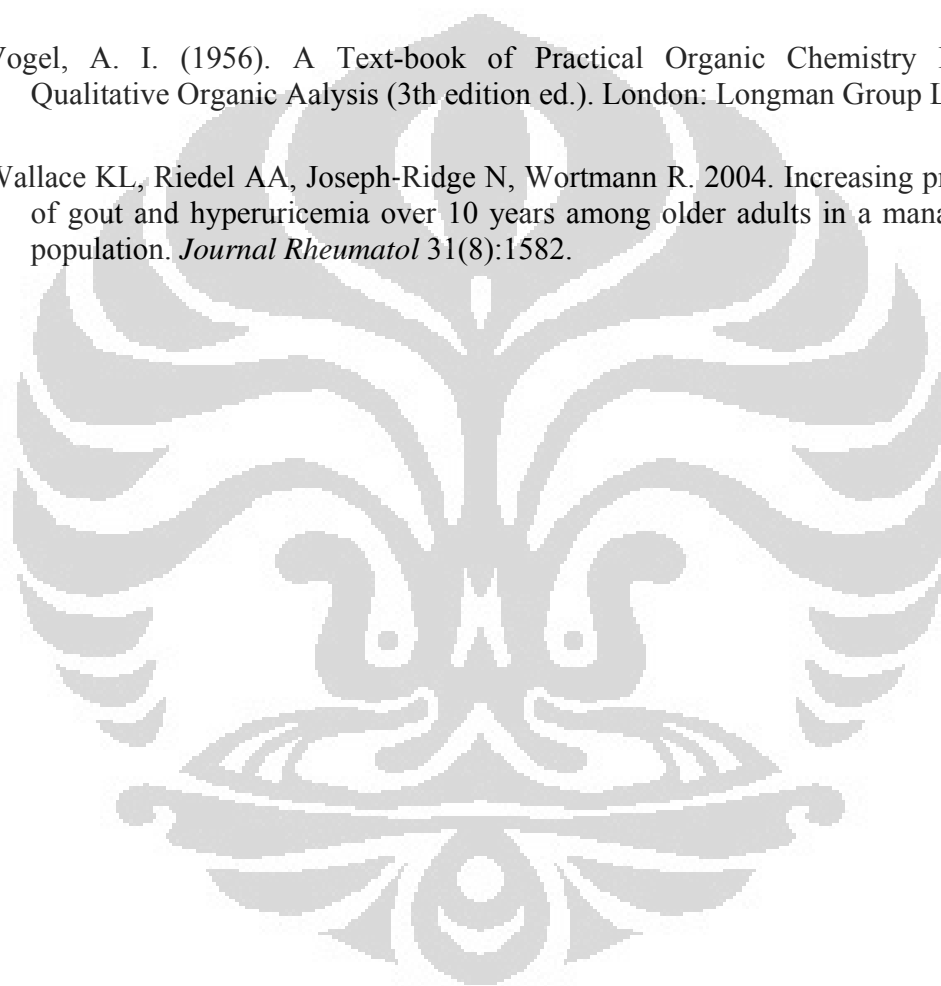
DAFTAR ACUAN

- Anonim. 1995. *Materia Medika Indonesia* Jilid VI. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta : X, 333-337.
- Anonim. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta : 9-12.
- Apaya, Karmella L. and Christine L. Chichioco-Hernandez. 2011. Xanthine Oxidase Inhibition of Selected Philippine Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (2) : 289-292.
- Azizahwati, Sumali Wiryowidagdo, Kartika Prihandini. 2005. Efek Penurunan Kadar Asam Urat dalam Darah pada Tikus Putih Jantan dari Rebusan Akar Tanaman Akar Kucing (*Acalypha indica* Linn). *Jurnal Bahan Alam Indonesia* 4 (1) : 213-218.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2010. *Acuan Sediaan Herbal Volume Kelima Edisi Satu*. Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Materia Medika Indonesia* Jilid VI. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Djarwaningsih, Tutie. Jenis-jenis Euphorbiaceae (Jarak-jarakan) yang Berpotensi Sebagai Obat Tradisional. "Herbarium Bogoriense" Bidang Botani, Puslit Biologi – LIPI, Cibinong Science Centre.
- Fitriani, Nurlaila. 2012. Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Ekstrak Akar *Acalypha indica* L. dan Identifikasi Golongan Senyawa Pada Fraksi Aktif. [Skripsi]. Depok : Program Studi Ekstensi Farmasi, Universitas Indonesia.

- Govindarajan, M., A. Jebanesan, D. Reetha, R. Amsath, T. Pushpanathan, K. Samidurai. 2008. Antibacterial activity of *Acalypha indica* L. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 12 : 299-302.
- Gritter, R., Bobbit, J., Schwarting, A. (1985). Pengantar Kromatografi. Terbitan Kedua. Terj dari *Introduction to chromatography* oleh Padmawinata K. ITB Bandung.
- Harborne, J.B.(1987). Metode Fitokimia. Ter. dari *Phytochemical Methods* oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: Penerbit ITB
- 49
- Harmita. 2006. Buku Ajar Analisis Toksikologi. Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok : 205-268.
- Harmita. 2007. Buku Elusidasi Struktur. Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
- Hiremath, Shivayogi P., K. Rudresh, Shrishailappa Badami, Saraswati B. Patil, Somanath R. Patil. 1999. Post-coital antifertility activity of *Acalypha indica* L. *Journal of Ethnopharmacology* 67 : 253–258.
- Hungeling, Monika, Matthias Lechtenberg, Frank R. Fronczek, Adolf Nahrstedt. 2009. Cyanogenic and non-cyanogenic pyridone glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 70 : 270–277.
- Kazakevich, Yuri, Rosario LoBrutto (2007). HPLC For Pharmaceutical Scientists. New York Jhon Wiley & Sons, Inc.
- Kong, L.D., Cai, Y., Huang, W.W., Cheng, C.H.K., Tan, R.X. 2000. Inhibition of Xanthine Oxidase by Some Chinese Medicinal Plants Used to Treat Gout. *Journal of Ethnopharmacology*.73:199–207.
- Krisnatuti D, Yenrina R, Urip V. 2001. Menu Planning for The Hyperuricemia Patient. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Laurens, Deddy Rifandi. 2010. Skrining dan Identifikasi Aktivitas Penghambatan Enzim Xantin Oksidase oleh Beberapa Tanaman Obat di Indonesia yang Berkhasiat Sebagai Anti Hiperurisemia [Skripsi]. Depok : Program Studi Ekstensi Farmasi, Universitas Indonesia.
- Marks, Dawn B., Allan D. Marks, Colleen M. Smith. Basic Medical Biochemistry : A clinical approach. William and Wilkins.

- Masih, Manisha, Tanushree Banerjee, Bhaskar Banerjee, Anita Pal. 2011. Antidiabetic Activity of *Acalypha indica* L. on Normal and Alloxan Induced Diabetic Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3 (3).
- Murray, R.K., Granner, D.K., Rodwell, V.W. 2009. Biokimia Harper terjemahan dari Harper's Illustrated Biochemistry 27th ed oleh Brahm U dan Nanda Wulandari. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG.
- Murugaiyah, Vikneswaran, Kit-Lam Chan. 2008. Mechanisme of Antihyperuricemic Effect of *Phyllanthus niruri* and Its Lignan Constituen. *Journal of Ethnopharmacology* 124 : 233-239.
- Nahrstedt, A., M. Hungeling, F. Petereit. 2006. Flavonoids from *Acalypha indica*. *Fitoterapia* 77 : 484-486.
- Niu, Yanfen, Huajie Zhu, Jia Liu, Huafang Fan, Ling Sun, Wei Lu, Xu Liu, Ling Li. 2010. 3,5,2,4-Tetrahydroxychalcone, a new non-purine xanthine oxidase inhibitor. *Jurnal Chemico-Biological Interactions*.
- Porter. C. L. 1959. Taxonomi of Flowering Plants. W.H. Freeman and Company. London 88-94.
- Purwaningsih et al. 2010. The nerve protection and in vivo therapeutic effect of *Acalypha indica* extract in frogs. *Medical Journal Indonesia* 19 (2).
- Purwatiningsih, Arief Rahman Hakim, Indah Purwantini. 2010. Antihyperuricemic Activity of The Kepek *Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook. F.& Th. Leaves Extract and Xanthine Oxidase Inhibitory Study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2 (2).
- Rahman, Maminur, Sitiesh C Bachar, Mohammed Rahmatullah. 2010. Analgesic and Antiinflammatory Activity of Methanolic Extract of *Acalypha indica* L. *Journal Pharmaceutical Science.*, 23 (3) : 256-258.
- Sudoyo, Aru W., Bambang Setiyohadi, Idrus Alwi, Marcellus Simadibrata K., Siti Setiati. 2006. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Supratman, Unang. 2010. Elusidasi Struktur Senyawa Organik (Metode Spektroskopi untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik. Bandung : Widya Padjadjaran.

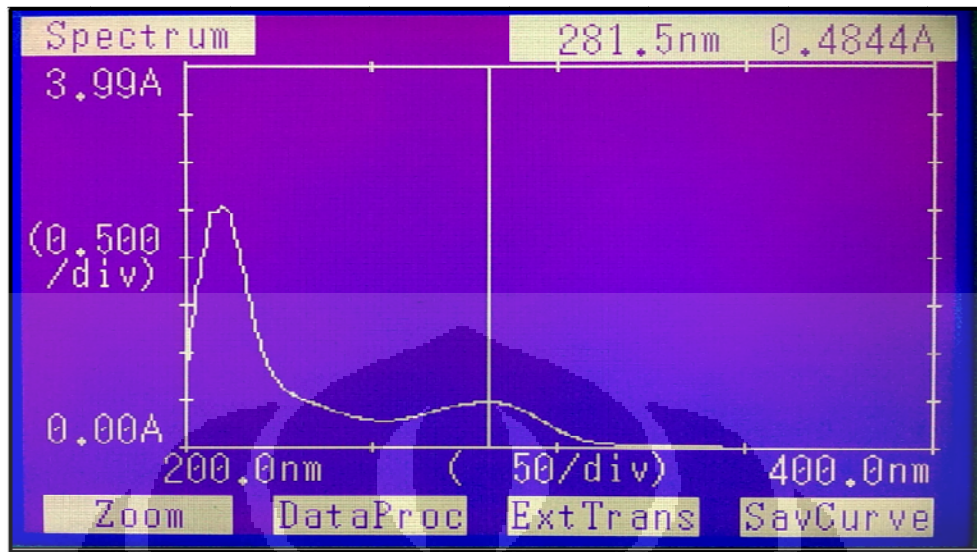
- Umamaheswari, M., AsokKumar, K., Sivashanmugam, A.T., Remyaraju, A., Subhadradevi, V., & Ravi, T.K. 2006. Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 109 : 547-551
- Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmugam, A.T., Remyaraju, A., Subhadradevi, V., & Ravi, T.K. 2009. In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology*, 124 : 646–648.
- Vogel, A. I. (1956). A Text-book of Practical Organic Chemistry Including Qualitative Organic Aalysis (3th edition ed.). London: Longman Group Limited.
- Wallace KL, Riedel AA, Joseph-Ridge N, Wortmann R. 2004. Increasing prevalence of gout and hyperuricemia over 10 years among older adults in a managed care population. *Journal Rheumatol* 31(8):1582.



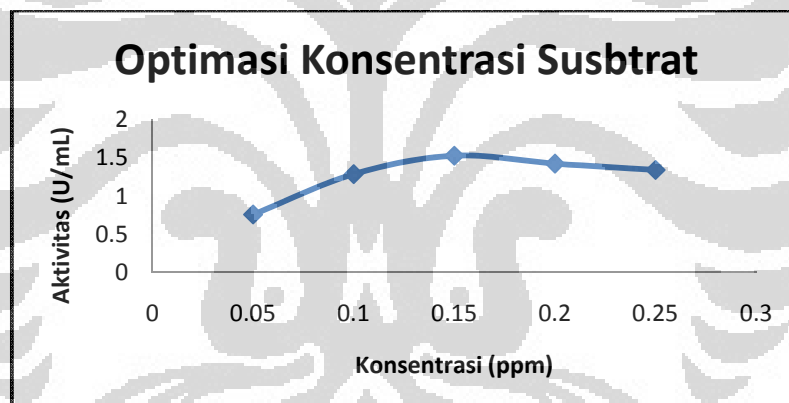




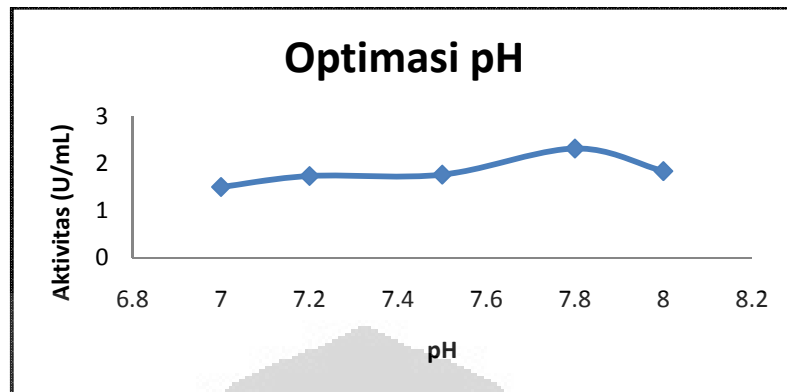
Gambar 4.1 Tanaman *Acalypha indica*



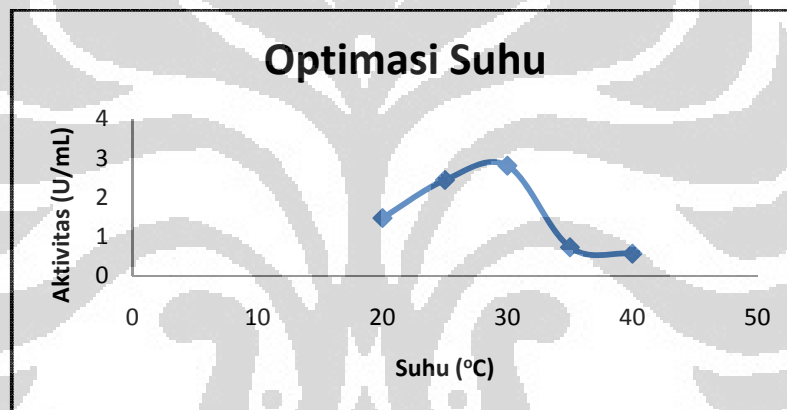
Gambar 4.2 Spektrum serapan pada optimasi lamda



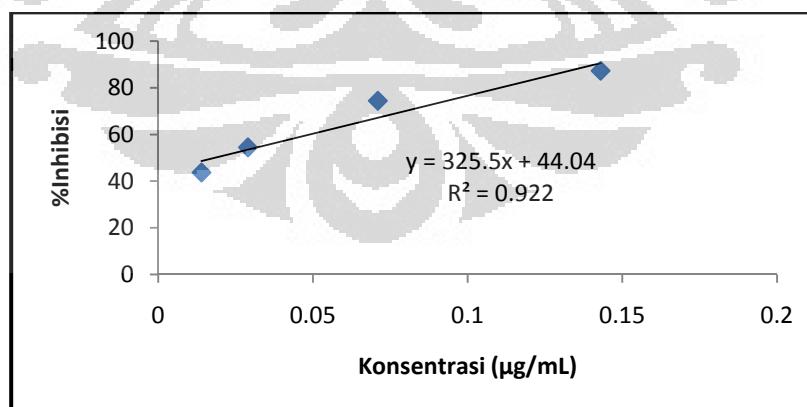
Gambar 4.3 Grafik pada optimasi konsentrasi substrat



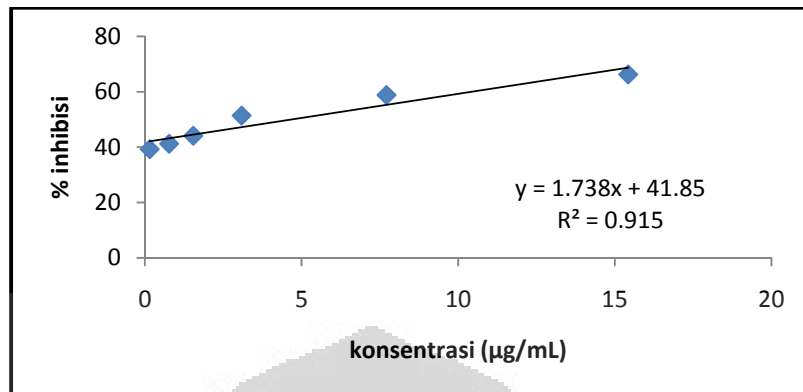
Gambar 4.4 Grafik pada optimasi pH optimum



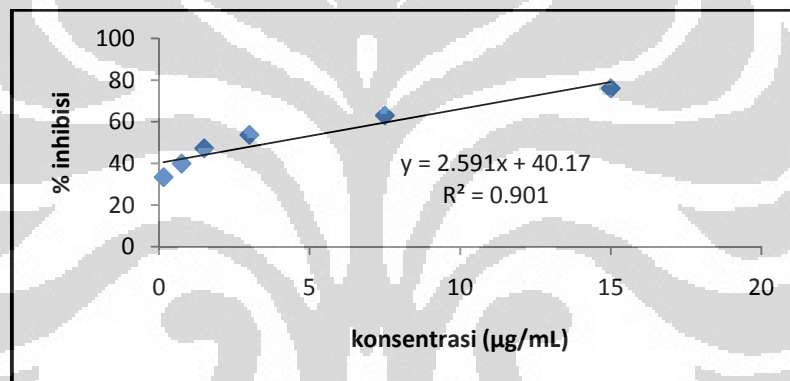
Gambar 4.5 Grafik pada optimasi suhu optimum



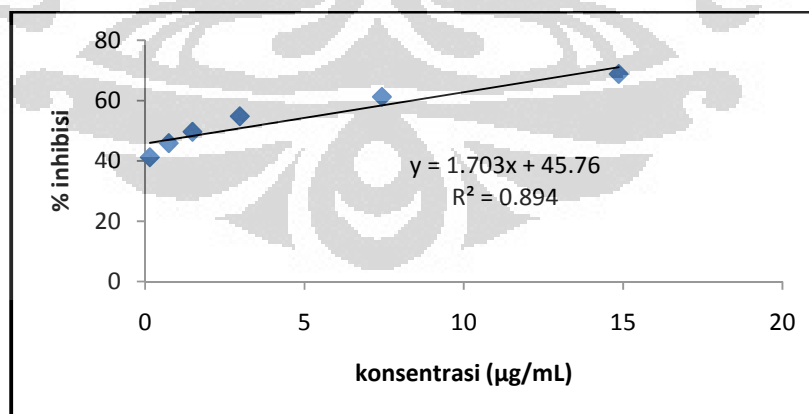
Gambar 4.6 Grafik regresi linier Alopurinol



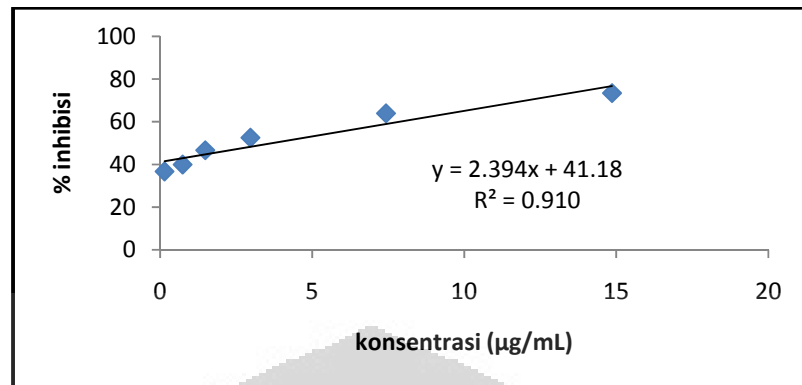
Gambar 4.7 Grafik regresi linier fraksi n-heksana



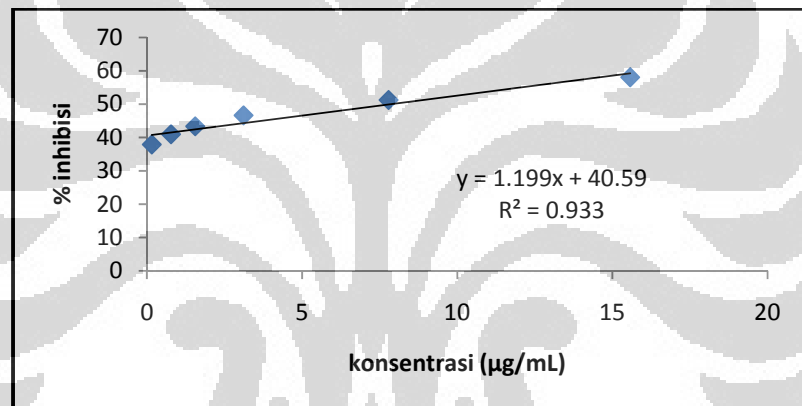
Gambar 4.8 Grafik regresi linier fraksi kloroform



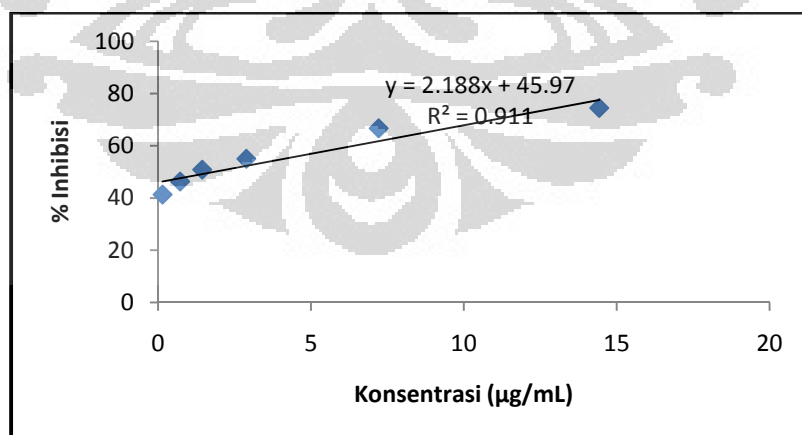
Gambar 4.9 Grafik regresi linier fraksi etil asetat



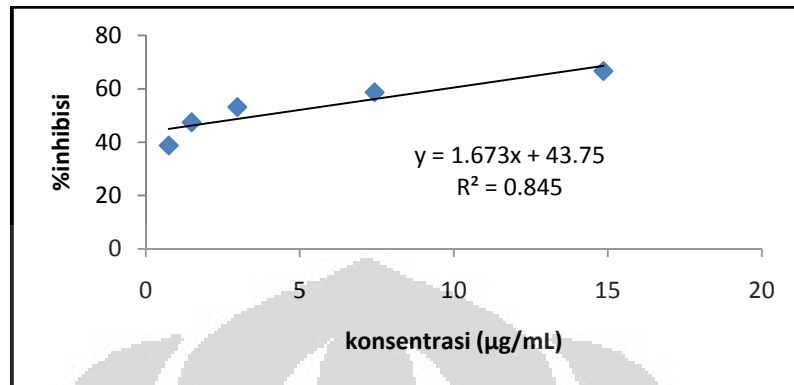
Gambar 4.10 Grafik regresi linier fraksi n-butanol



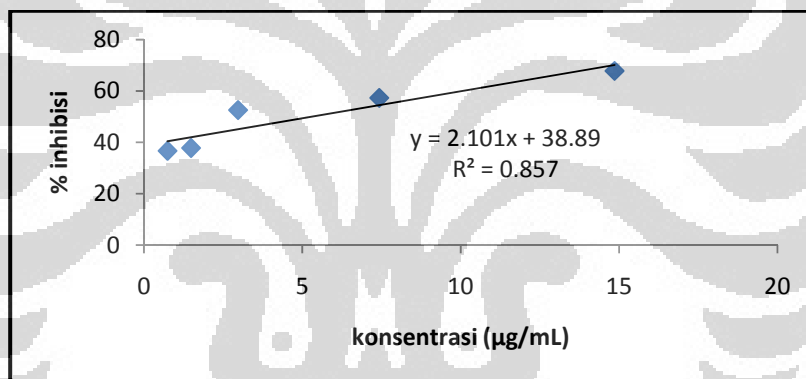
Gambar 4.11 Grafik regresi linier fraksi air



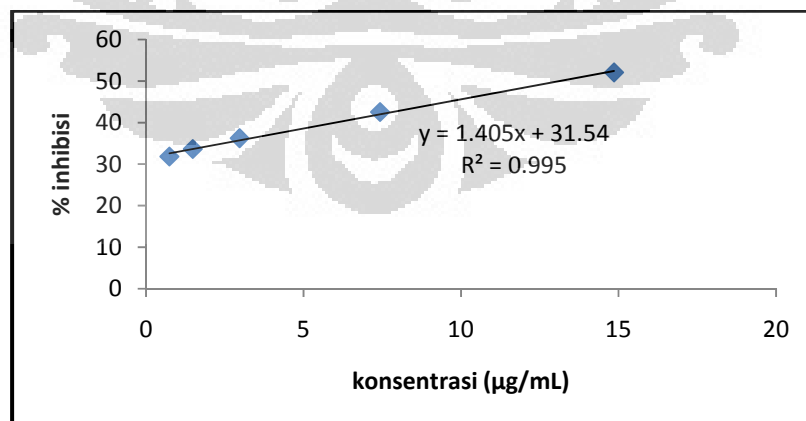
Gambar 4.12 Grafik regresi linier fraksi A



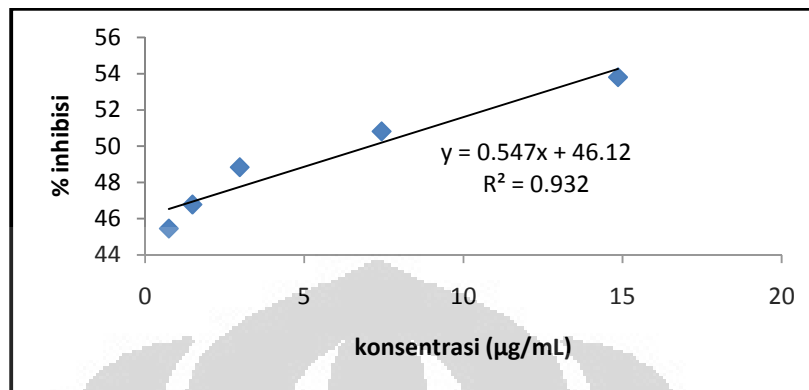
Gambar 4.13 Grafik regresi linier fraksi H



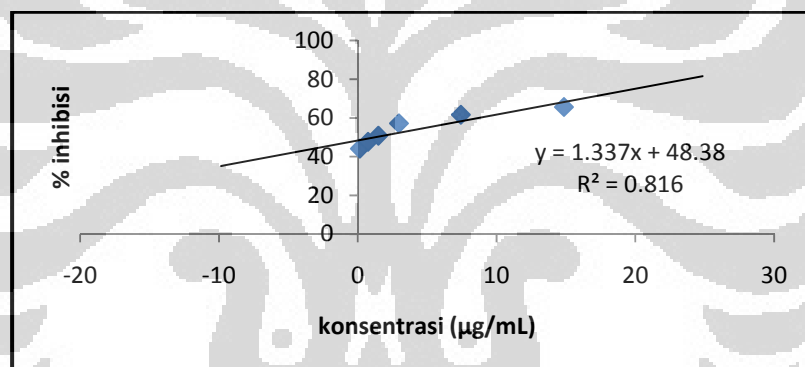
Gambar 4.14 Grafik regresi linier fraksi I



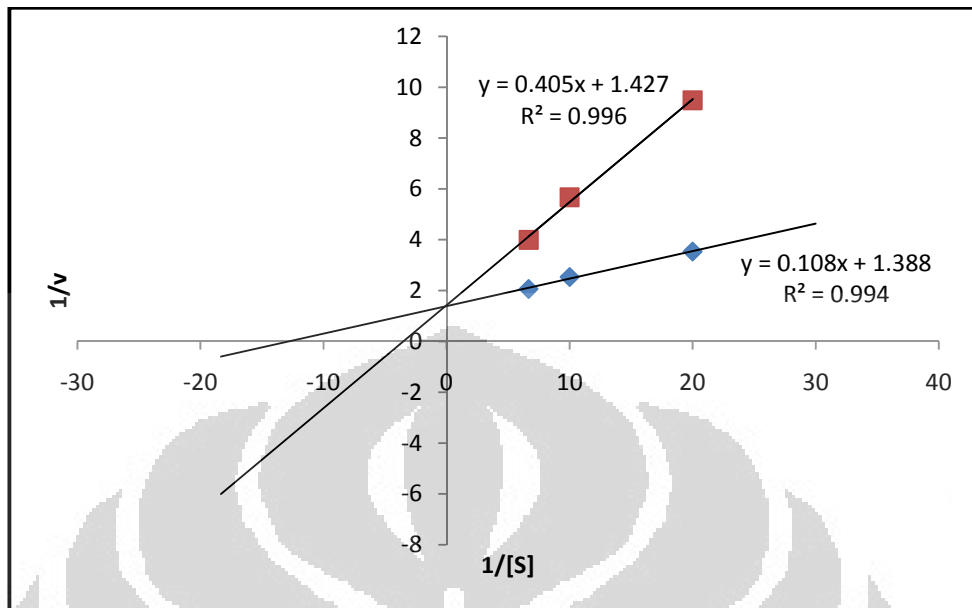
Gambar 4.15 Grafik regresi linier fraksi J



Gambar 4.16 Grafik regresi linier fraksi K



Gambar 4.17 Grafik regresi linier isolat



Keterangan : ◆ = tanpa inhibitor ■ = isolat

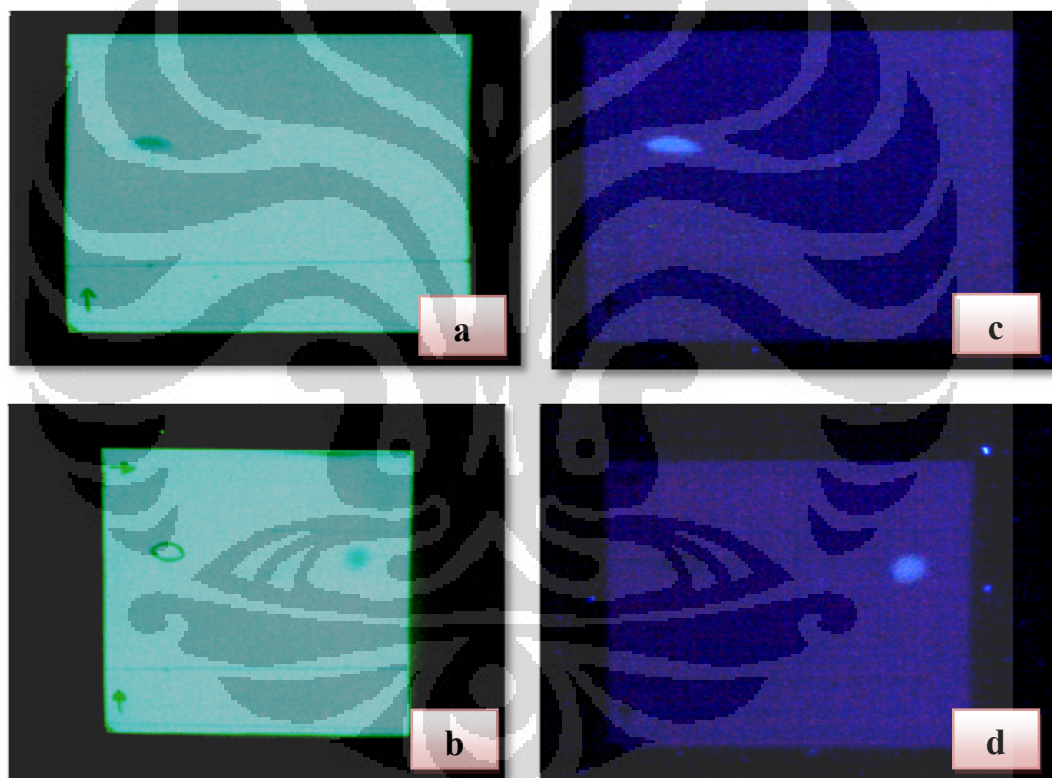
Gambar 4.18 Grafik kinetika isolat dibandingkan dengan tanpa inhibitor



Gambar 4.19 Kromatografi kolom



Gambar 4.20 Identifikasi Alkaloid

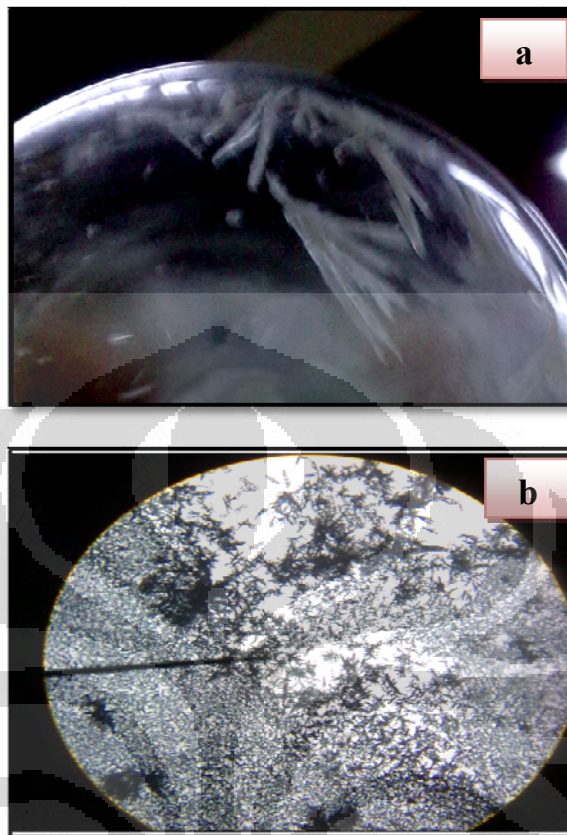


Gambar 4.21 KLT dua dimensi

Keterangan :

a = KLT horizontal pada 254 nm, b = KLT vertikal pada 254 nm

c = KLT horizontal pada 366 nm, d = KLT vertikal pada 366 nm

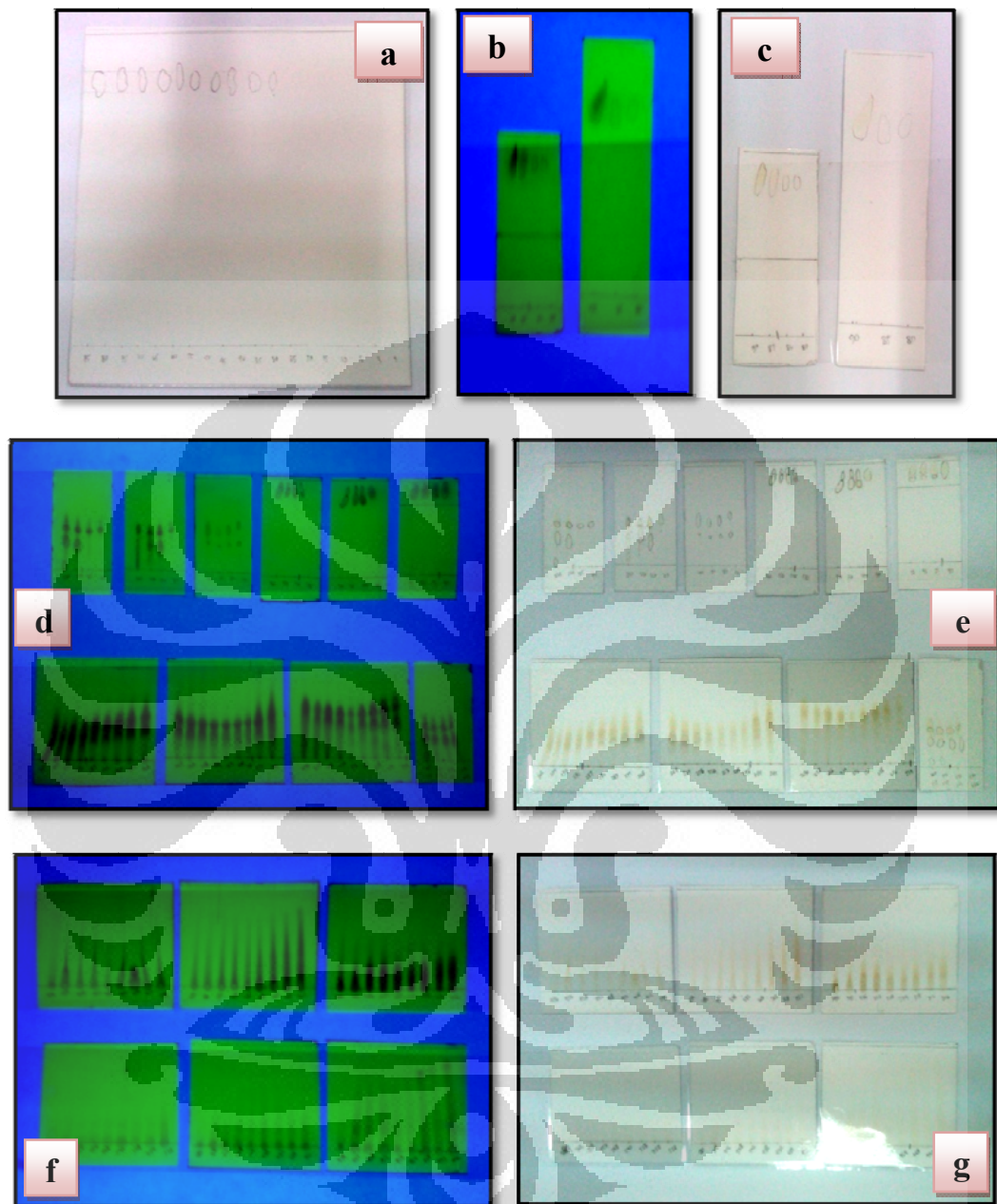


Gambar 4.22 Bentuk kristal isolat W1

Keterangan :

a = bentuk isolat dilihat pada sinar tampak

b = bentuk isolat dilihat pada mikroskop



Gambar 4.23 KLT Penggabungan Fraksi Hasil KK

Keterangan :

a, c, e, g = KLT dari fraksi 1-584 pada sinar tampak

b, d dan f = KLT fraksi 80-584 pada sinar UV 254 nm

TABEL

Tabel 4.1 Rendemen ekstrak

| Ekstrak | Bobot ekstrak kental (gram) | Rendemen (%) |
|--------------------|--|-------------------------|
| metanol | 310,6 | 7,09 |
| n-heksana | 50,4 | 1,15 |
| kloroform | 11,7 | 0,27 |
| etil asetat | 21,4 | 0,49 |
| n-butanol | 34,2 | 0,78 |
| Air | 51,4 | 1,17 |

Keterangan : Berat serbuk simplisia akar *Acalypha indica* L. adalah 4,380 kg

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

Tabel 4.2 Data Bobot fraksi hasil kromatografi kolom

| Fraksi | No.Fraksi | Bobot | Warna |
|---------------|------------------|--------------|-------------------|
| A | 1-86 | 0,4537 | Kuning |
| B | 87-90 | 0,1672 | Kuning kecoklatan |
| C | 91-135 | 0,1243 | Kuning kecoklatan |
| D | 136-217 | 0,3183 | Kuning kecoklatan |
| E | 218-223 | 0,1098 | Kuning kecoklatan |
| F | 224-244 | 0,2565 | Orange kecoklatan |
| G | 245-290 | 0,3943 | Orange kecoklatan |
| H | 291-337 | 1,5475 | Orange kecoklatan |
| I | 338-364 | 2,6412 | Coklat |
| J | 365-450 | 2,1632 | Coklat |
| K | 451-584 | 3,5211 | Coklat |

Tabel 4.3 Data serapan pada uji pendahuluan penentuan konsentrasi substrat optimum

| Kons.substrat | Absorbansi | | | Aktivitas (Unit/ml) |
|---------------|------------|-------------------|-------|------------------------|
| | Blanko | Kontrol blanko | 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 4.4 Data serapan pada uji pendahuluan penentuan pH optimum

| pH | Absorbansi | | | Aktivitas (Unit/ml) |
|-----|------------|-------------------|--------|------------------------|
| | Blanko | Kontrol blanko | 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 4.5 Data serapan pada uji pendahuluan penentuan suhu optimum

| Suhu | Absorbansi | | | Aktivitas (Unit/ml) |
|------|------------|----------------|--------|------------------------|
| | Blanko | Kontrol blanko | 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 4.6 Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh Alopurinol

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % | IC ₅₀ |
|---------------------------|------------|-----------------|---------|--------|----------|------------------|
| µg/mL | Kons.akhir | Kontrol Standar | Standar | S - KS | Inhibisi | |
| 0,1 | 0,014 | 0,0228 | 0,3334 | 0,3106 | 43,691 | 0,02 |
| 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 | |
| Blanko | | 0,0646 | 0,6162 | | | |
| y=44,043 + 325,49x | | | | | | |

Tabel 4.7 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi n-heksana

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % | IC ₅₀ |
|-----------------------------|-------------|-------------|----------------|--------|----------|------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S - KS | Inhibisi | |
| 1,08 | 0,154 | 0,4032 | 0,0685 | 0,335 | 39,258 | 4,69 |
| 5,4 | 0,771 | 0,3983 | 0,0744 | 0,324 | 41,198 | |
| 10,8 | 1,543 | 0,3565 | 0,0486 | 0,308 | 44,102 | |
| 21,6 | 3,086 | 0,3321 | 0,0643 | 0,268 | 51,397 | |
| 54 | 7,714 | 0,3121 | 0,0853 | 0,227 | 58,802 | |
| 108 | 15,429 | 0,2908 | 0,1042 | 0,186 | 66,243 | |
| blanko | | 0,6097 | 0,0587 | | | |
| y = 41,851 + 1,739 x | | | | | | |

Tabel 4.8 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi kloroform

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % | IC ₅₀ |
|----------------------------|-------------|-------------|----------------|--------|----------|------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S - KS | Inhibisi | |
| 1,05 | 0,15 | 0,4353 | 0,0682 | 0,367 | 33,387 | 3,79 |
| 5,25 | 0,75 | 0,4103 | 0,0793 | 0,331 | 39,927 | |
| 10,5 | 1,5 | 0,3952 | 0,1045 | 0,291 | 47,251 | |
| 21 | 3 | 0,3751 | 0,1201 | 0,255 | 53,729 | |
| 52,5 | 7,5 | 0,3513 | 0,1475 | 0,204 | 63,019 | |
| 105 | 15 | 0,3254 | 0,1932 | 0,132 | 76,048 | |
| Blanko | | 0,6154 | 0,0643 | | | |
| y = 40,178 + 2,591x | | | | | | |

Tabel 4.9 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi etil asetat

| Sampel | | Serapan (A) | | % | IC ₅₀ |
|--------------------------|-----------------|-------------|----------------|----------|------------------|
| Kons (ppm) | Kons. Akhir (x) | Sampel | Kontrol Sampel | Inhibisi | |
| 1,04 | 0,148 | 0,4397 | 0,0813 | 41,21 | 2,49 |
| 5,2 | 0,743 | 0,4156 | 0,0858 | 45,90 | |
| 10,4 | 1,486 | 0,3965 | 0,0895 | 49,64 | |
| 20,8 | 2,971 | 0,3682 | 0,0927 | 54,81 | |
| 52 | 7,429 | 0,3338 | 0,0976 | 61,25 | |
| 104 | 14,857 | 0,3007 | 0,1106 | 68,82 | |
| blanko | | 0,6829 | 0,0733 | | |
| $y = 45,7599 + 1,7033 x$ | | | | | |

Tabel 4.10 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi n-Butanol

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % | IC ₅₀ |
|-----------------------|-------------|-------------|----------------|--------|----------|------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S - KS | Inhibisi | |
| 1,04 | 0,148 | 0,4292 | 0,0793 | 0,349 | 36,727 | 3,68 |
| 5,2 | 0,743 | 0,4174 | 0,0855 | 0,332 | 39,969 | |
| 10,4 | 1,486 | 0,3868 | 0,0919 | 0,295 | 46,655 | |
| 20,8 | 2,971 | 0,3686 | 0,1062 | 0,262 | 52,550 | |
| 52 | 7,429 | 0,3445 | 0,1452 | 0,199 | 63,960 | |
| 104 | 14,857 | 0,3012 | 0,1539 | 0,147 | 73,417 | |
| Blanko | | 0,6061 | 0,0531 | | | |
| $y = 41,187 + 2,393x$ | | | | | | |

Tabel 4.11 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi Air

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % | IC ₅₀ |
|-----------------------|-------------|-------------|----------------|--------|----------|------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S - KS | Inhibisi | |
| 1,09 | 0,156 | 0,4143 | 0,0734 | 0,341 | 37,905 | 7,85 |
| 5,45 | 0,778 | 0,4027 | 0,0791 | 0,324 | 40,984 | |
| 10,9 | 1,557 | 0,3993 | 0,0874 | 0,312 | 43,376 | |
| 21,8 | 3,114 | 0,3874 | 0,0945 | 0,293 | 46,648 | |
| 54,5 | 7,786 | 0,3747 | 0,1072 | 0,268 | 51,275 | |
| 109 | 15,571 | 0,3592 | 0,1228 | 0,230 | 58,087 | |
| Blanko | | 0,6129 | 0,0639 | | | |
| $y = 40,591 + 1,199x$ | | | | | | |

Tabel 4.12 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi A

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % | IC ₅₀ |
|---------------------|-------------|-------------|----------------|--------|----------|------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S - KS | Inhibisi | |
| 1,01 | 0,144 | 0,3607 | 0,0785 | 0,2822 | 41,281 | 1,84 |
| 5,05 | 0,721 | 0,3462 | 0,0881 | 0,2581 | 46,296 | |
| 10,1 | 1,443 | 0,3344 | 0,0981 | 0,2363 | 50,832 | |
| 20,2 | 2,886 | 0,3293 | 0,1130 | 0,2163 | 54,994 | |
| 50,5 | 7,214 | 0,2886 | 0,1286 | 0,1600 | 66,708 | |
| 101 | 14,429 | 0,2587 | 0,1361 | 0,1226 | 74,490 | |
| Blanko | | 0,5342 | 0,0536 | 0,4806 | | |
| $y=45,977 + 2,188x$ | | | | | | |

Tabel 4.13 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi H

| Sampel | | Serapan (A) | | % | IC ₅₀ |
|------------|-----------------|-------------|----------------|----------|------------------|
| Kons (ppm) | Kons. Akhir (x) | Sampel | Kontrol Sampel | Inhibisi | |
| 5,45 | 0,743 | 0,4544 | 0,0812 | 38,78 | 3,73 |
| 10,9 | 1,486 | 0,4044 | 0,0841 | 47,46 | |
| 21,8 | 2,971 | 0,3736 | 0,0882 | 53,18 | |
| 54,5 | 7,429 | 0,3552 | 0,1034 | 58,69 | |
| 109 | 14,857 | 0,3178 | 0,1146 | 66,67 | |
| Blanko | | 0,6829 | 0,0733 | | |

$$y = 43,7553 + 1,6737 x$$

Tabel 4.14 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi I

| Sampel | | Serapan (A) | | % | IC ₅₀ |
|------------|-----------------|-------------|----------------|----------|------------------|
| Kons (ppm) | Kons. Akhir (x) | Sampel | Kontrol Sampel | Inhibisi | |
| 5,45 | 0,743 | 0,4623 | 0,0764 | 36,70 | 5,28 |
| 10,9 | 1,486 | 0,4597 | 0,0806 | 37,81 | |
| 21,8 | 2,971 | 0,3876 | 0,0985 | 52,58 | |
| 54,5 | 7,429 | 0,3633 | 0,1031 | 57,32 | |
| 109 | 14,857 | 0,3098 | 0,1137 | 67,83 | |
| blanko | | 0,6829 | 0,0733 | | |

$$y = 38,8970 + 2,1013 x$$

Tabel 4.15 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi J

| Sampel | | Serapan (A) | | % | IC ₅₀ |
|------------|-----------------|-------------|----------------|------------|------------------|
| Kons (ppm) | Kons. Akhir (x) | Sampel | Kontrol Sampel | Inhibisi i | |
| 5,45 | 0,743 | 0,5089 | 0,0934 | 31,84 | |
| 10,9 | 1,486 | 0,5022 | 0,0977 | 33,65 | 13,13 |
| 21,8 | 2,971 | 0,4934 | 0,1048 | 36,25 | |
| 54,5 | 7,429 | 0,4635 | 0,1133 | 42,55 | |
| 109 | 14,857 | 0,4172 | 0,1251 | 52,08 | |
| blanko | | 0,6829 | 0,0733 | | |

$$y = 31,5475 + 1,4055 x$$

Tabel 4.16 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi K

| Sampel | | Serapan (A) | | % | IC ₅₀ |
|------------|-----------------|-------------|----------------|----------|------------------|
| Kons (ppm) | Kons. Akhir (x) | Sampel | Kontrol Sampel | Inhibisi | |
| 5,45 | 0,743 | 0,4166 | 0,0841 | 45,45 | |
| 10,9 | 1,486 | 0,4125 | 0,0881 | 46,78 | 7,07 |
| 21,8 | 2,971 | 0,4068 | 0,0949 | 48,84 | |
| 54,5 | 7,429 | 0,4022 | 0,1024 | 50,82 | |
| 109 | 14,857 | 0,3992 | 0,1176 | 53,81 | |
| blanko | | 0,6829 | 0,0733 | | |

$$y = 46,1288 + 0,5478 x$$

Tabel 4.17 Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh isolat / kristal

| Sampel | | Serapan (A) | | % | IC ₅₀ |
|------------|-----------------|-------------|----------------|----------|------------------|
| Kons (ppm) | Kons. Akhir (x) | Sampel | Kontrol Sampel | Inhibisi | |
| 1,04 | 0,148 | 0,3894 | 0,0817 | 44,16 | 1,21 |
| 5,2 | 0,743 | 0,3711 | 0,0828 | 47,68 | |
| 10,4 | 1,486 | 0,3585 | 0,0875 | 50,82 | |
| 20,8 | 2,971 | 0,3302 | 0,0946 | 57,24 | |
| 52 | 7,429 | 0,3098 | 0,0986 | 61,67 | |
| 104 | 14,857 | 0,2987 | 0,1096 | 65,68 | |
| blanko | | 0,6342 | 0,0832 | | |

$y = 48,3831 + 1,3372 x$

Tabel 4.18 Data serapan tanpa inhibitor pada uji kinetika penghambatan aktivitas xantin oksidase

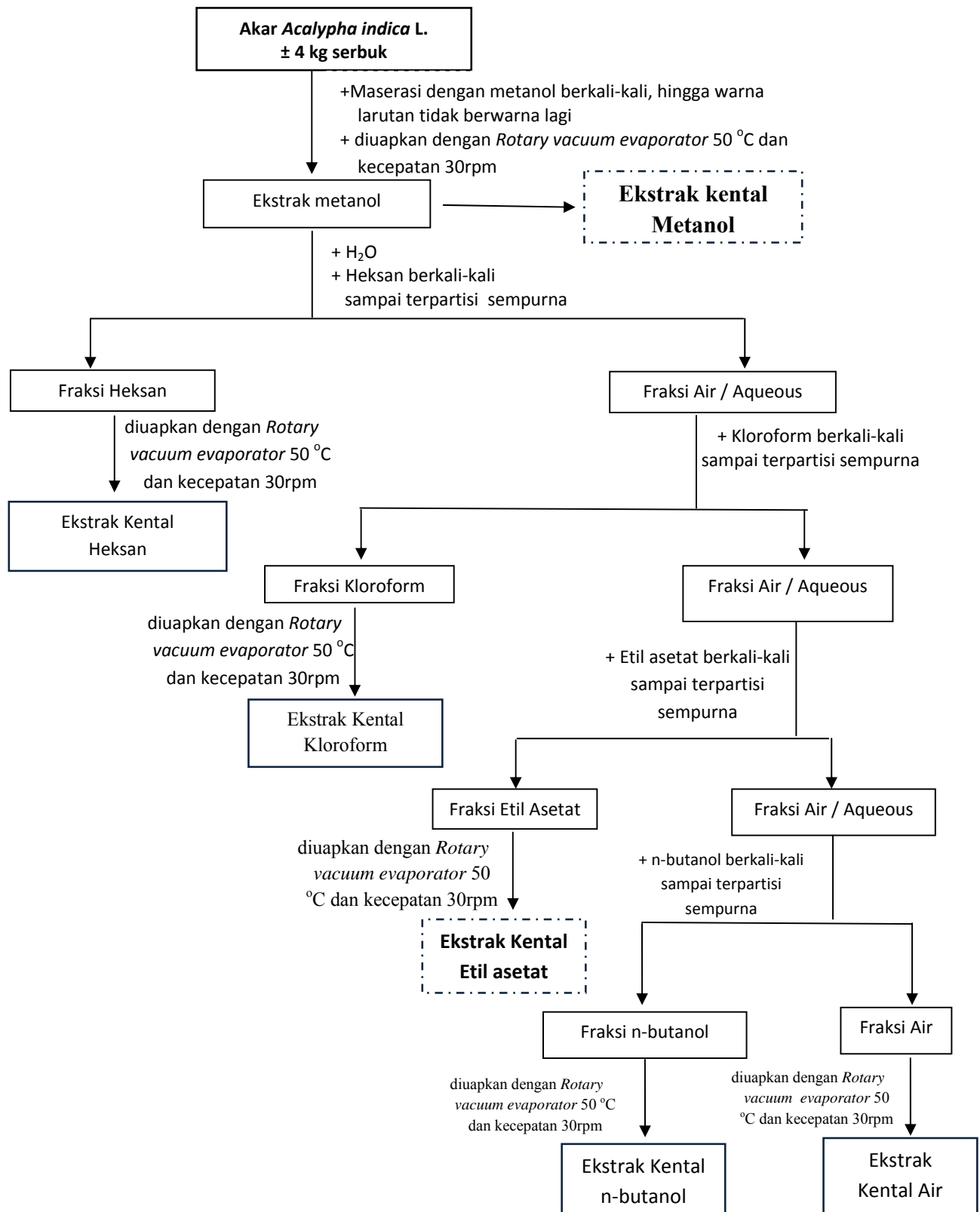
| Konsentrasi xantin (S) | Serapan | | | 1/S | 1/V |
|------------------------|------------|---------------------|--------|--------|--------|
| | Blanko (B) | Kontrol Blanko (KB) | B-KB | | |
| 0,05 mM | 0,3078 | 0,0251 | 0,2827 | 20 | 3,5373 |
| 0,1 mM | 0,4750 | 0,0804 | 0,3946 | 10 | 2,5342 |
| 0,15 mM | 0,5079 | 0,0230 | 0,4849 | 6,6667 | 2,0623 |
| 0,2 mM | 0,5298 | 0,0666 | 0,4632 | 5 | 2,1589 |
| 0,25 mM | 0,6453 | 0,2078 | 0,4375 | 4 | 2,2857 |

Tabel 4.19 Data serapan isolat konsentrasi 10 µg/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 | 0,2078 | 0,1024 | 0,1054 | 20 | 9,4877 |
| 0,1 mM | 0,3069 | 0,1305 | 0,1764 | 10 | 5,6689 |
| 0,15 mM | 0,4159 | 0,1652 | 0,2507 | 6,6667 | 3,9888 |
| 0,2 mM | 0,4555 | 0,2242 | 0,2313 | 5 | 4,3234 |
| 0,25 mM | 0,4049 | 0,1903 | 0,2146 | 4 | 4,6598 |

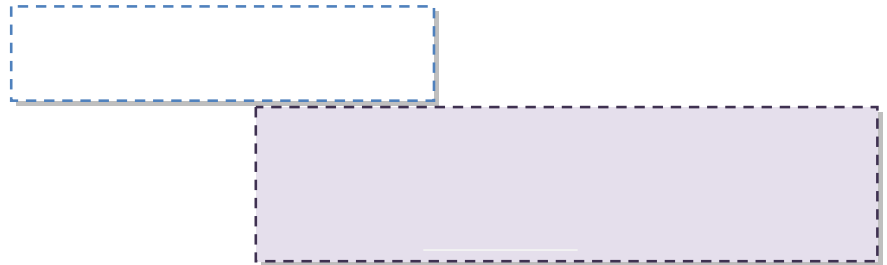
LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja ekstraksi dan fraksinasi akar *Acalypha indica* L.



Universitas Indonesia

Lampiran 2. Isolasi ekstrak etil asetat, pemurniaan, karakterisasi senyawa aktif yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim xantin oksidase.



Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom
dikumpulkan

Dilakukan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Penggabungan fraksi berdasarkan hasil
KLT

Fraksi dengan bobot besar, memiliki
aktivitas besar dan terdapat kristal

Kristalisasi /Penguapan dari pelarut
organik

Kristal (masih terdapat pengotor)

Rekristalisasi senyawa dengan
menggunakan satu jenis pelarut
(heksan: diklorometana 2:1)

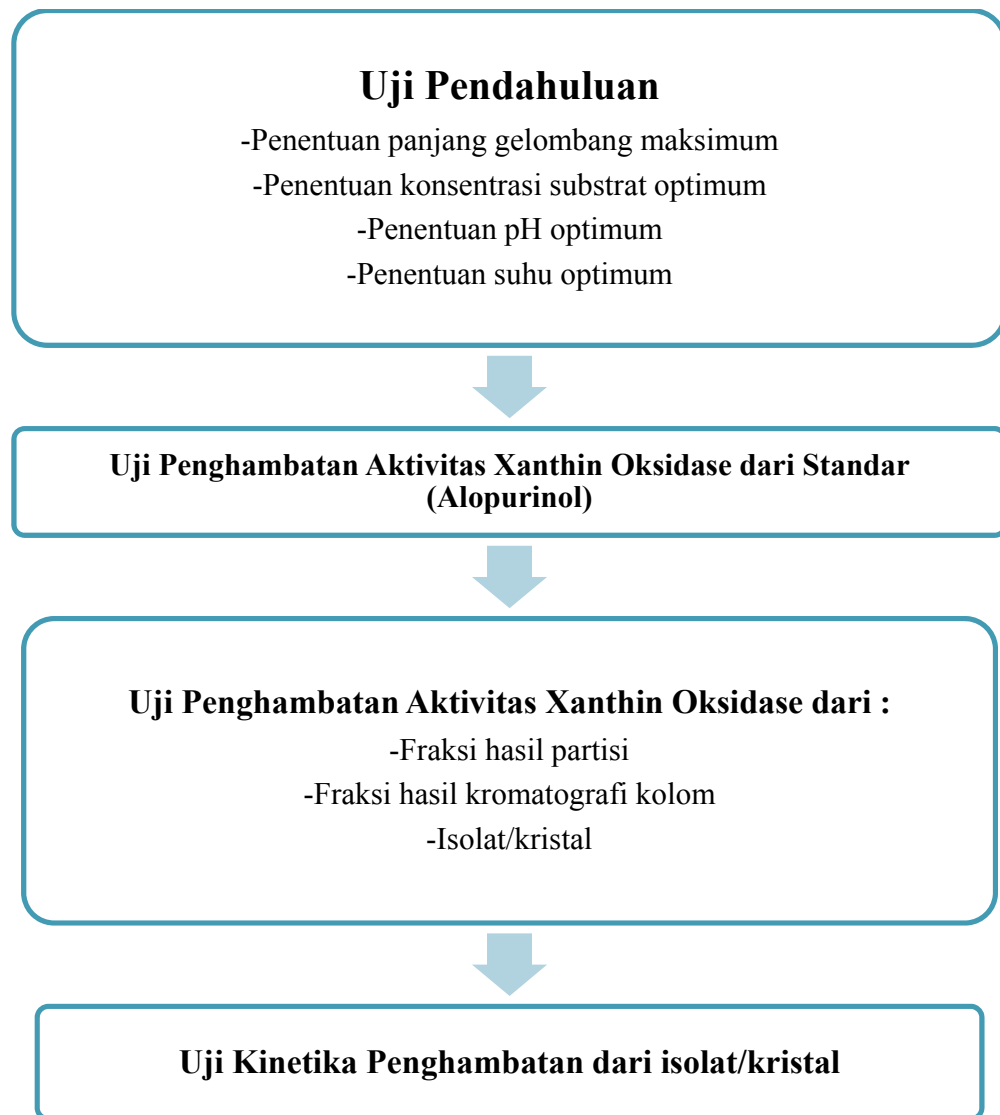
Senyawa murni

Uji Kemurnian Senyawa:
-KLT dua dimensi
-Jarak lebur

Karakterisasi senyawa dengan
menggunakan Spektrofotometer UV,
IR,dan Spektrometer Massa

Universitas Indonesia

Lampiran 3. Skema pengujian penghambatan aktivitas xantin oksidase.



Lampiran 4. Perhitungan dan pembuatan larutan xantin oksidase 0,1 Unit/mL.

Satu kemasan enzim mengandung 45,45 mg solid :

- a. 0,8 Unit / mg protein
- b. 0,11 Unit / mg solid

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

a. Jumlah total mg protein dalam satu kemasan:

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

b. Jumlah total unit enzim dalam satu kemasan:

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

Maka dalam satu kemasan terdapat:

- a. 5,126 Unit / 6,408 mg protein
- b. 6,408 mg protein / 45,45 mg solid
- c. 5,126 Unit / 45,45 mg solid

Oleh karena itu ditimbang enzim sebesar:

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

Cara pembuatan, ditimbang 22,17 mg xantin oksidase dengan menggunakan botol timbang dan sendok tanduk, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan dapar fosfat di dalam labu ukur, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas dan diperoleh larutan xantin oksidase 0,1 unit/mL. Dilakukan pada kotak es (memerlukan perlakuan khusus)

Lampiran 5. Perhitungan dan pembuatan larutan xantin

Perhitungan larutan substrat xantin

Xantin , BM = 152,1 (Sigma Aldrich)

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

$$\text{mmol xantin} = \frac{\text{mg}}{\text{BM}} = 0,1 \text{ mmol}$$

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

$$\text{mg} = 15,21 \text{ mg}$$

Substrat xantin yang ditimbang = 15,21 mg, dilarutkan ke dalam 100 ml aquademin bebas CO₂.

Lampiran 6. Contoh Perhitungan Nilai IC₅₀ Isolat

Perhitungan nilai IC₅₀ isolat :

| Sampel | | Serapan (A) | | % Inhibisi | IC ₅₀ |
|------------|-----------------|-------------|----------------|------------|------------------|
| Kons (ppm) | Kons. Akhir (x) | Sampel | Kontrol Sampel | | |
| 1,04 | 0,148 | 0,3894 | 0,0817 | 44,16 | 1,21 |
| 5,2 | 0,743 | 0,3711 | 0,0828 | 47,68 | |
| 10,4 | 1,486 | 0,3585 | 0,0875 | 50,82 | |
| 20,8 | 2,971 | 0,3302 | 0,0946 | 57,24 | |
| 52 | 7,429 | 0,3098 | 0,0986 | 61,67 | |
| 104 | 14,857 | 0,2987 | 0,1096 | 65,68 | |
| blanko | | 0,6342 | 0,0832 | | |

Konsentrasi Akhir = faktor pengenceran x konsentrasi awal

$$= \frac{1}{7} \times 1,04 = 0,148 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ inhibisi} = 1 - \frac{\text{sampel} - \text{k.sampel}}{\text{blanko} - \text{k.blanko}} \times 100\%$$

$$= 1 - \frac{0,3894 - 0,0817}{0,6342 - 0,0832} \times 100\%$$

$$= 44,16\%$$

Berdasarkan data tersebut, dimana nilai x adalah konsentrasi akhir larutan sampel dan nilai y adalah nilai % inhibisi masing-masing konsentrasi larutan, dicari persamaan regresi linier menggunakan kalkulator, diperoleh hasil :

$$y = 48,3831 + 1,3372 x$$

Nilai y disubsitusi dengan 50, maka :

$$50 = 48,3831 + 1,3372 x$$

$$x = 1,21 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 7. 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, 29 Februari 2012

Nomor : 79/IPH.1.02/IF.8/II/2012
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk. Ibu Sdr.(i). Wardah
Mhs. Univ. Indonesia
Depok

Dengan hormat,

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

| No. | No. Kol. | Jenis | Suku |
|-----|-------------|---------------------------|---------------|
| 1 | Akar Kacang | <i>Acalypha indica</i> L. | Euphorbiaceae |

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.



Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
Dr. Jemi Setijoc Rahajoe
NIP. 196706241993032004

D:\Ident 2012\Wardah.doc\Wardah-DG Page 1 of 1

Lampiran 8. 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

Universitas Indonesia

Lampiran 9. 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.

Universitas Indonesia

Lampiran 10. Sertifikat analisis alopurinol

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% |

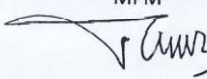
Pustaka : BP 1993, USP 32

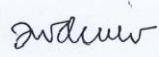
Kesimpulan : Memenuhi Syarat

Bandung,, 13 Juli 2011

Penanggung Jawab :
MPM

AMPM


(Dra. Titin Supiamah)


(Dra. Endang Widiastuti)

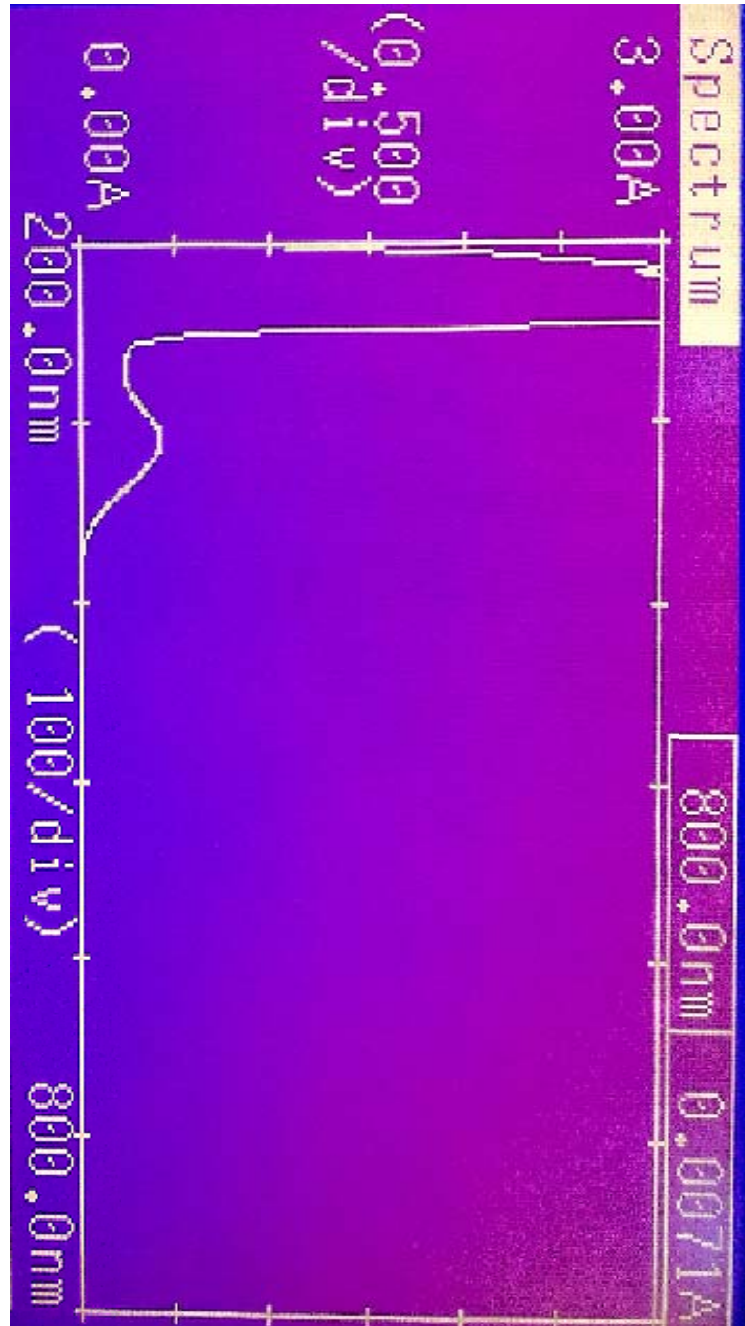
Lampiran 11. Skema Tabel Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase

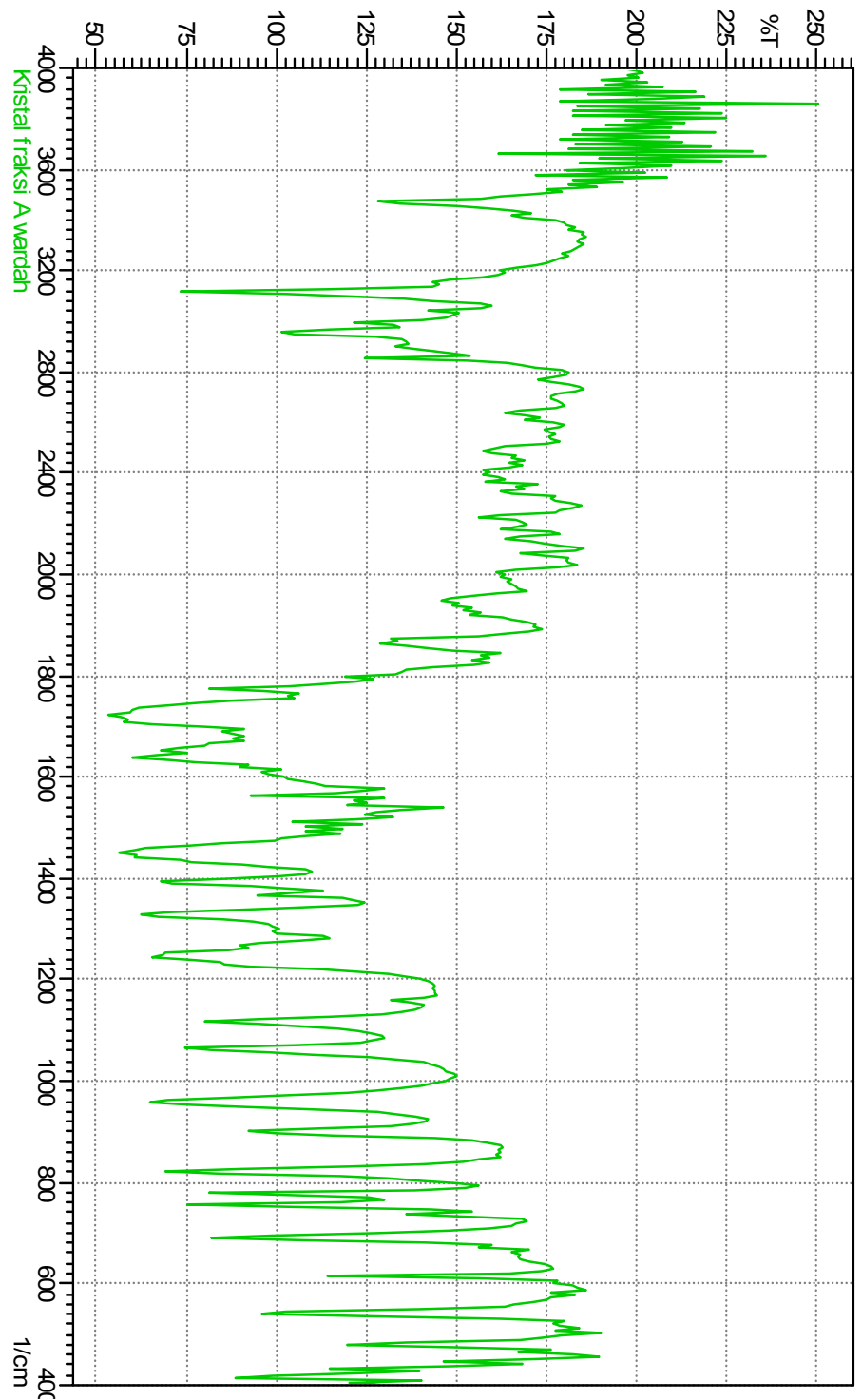
| Reagen | Volume (mL) | |
|---|-------------|----------------|
| | Blanko | Kontrol blanko |
| Dapar | 3,9 | 4,0 |
| Substrat Xantin | 2,0 | 2,0 |
| Inkubasi | 10 menit | |
| Enzim | 0,1 | - |
| HCl | - | 1,0 |
| Inkubasi | 30 menit | |
| HCl | 1,0 | - |
| Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada λ maksimum | | |

Lampiran 12. Skema Tabel Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Standar dan Sampel

| Reagen | Volume | | | |
|--|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---|
| | Blanko (A ₁) | Kontrol Blanko (A ₂) | Sampel/ Standar (B ₁) | Kontrol sampel /standar (B ₂) |
| Sampel ekstrak(i nhibitor) atau standar | - | - | 1 mL | 1mL |
| Dapar | 3,9 mL | 4,0 mL | 2,9 mL | 3,0 mL |
| Substrat Xantin 0,15mM | 2 mL | 2 mL | 2 mL | 2 mL |
| Inkubasi (30°C) | 10 menit | | | |
| Enzim | 0,1 mL | - | 0,1 mL | - |
| HCl 1 N | - | 1 mL | - | 1 mL |
| Inkubasi (30°C) | 30 menit | | | |
| HCl 1N | 1 mL | - | 1 mL | |
| Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada λ 281,5 | | | | |

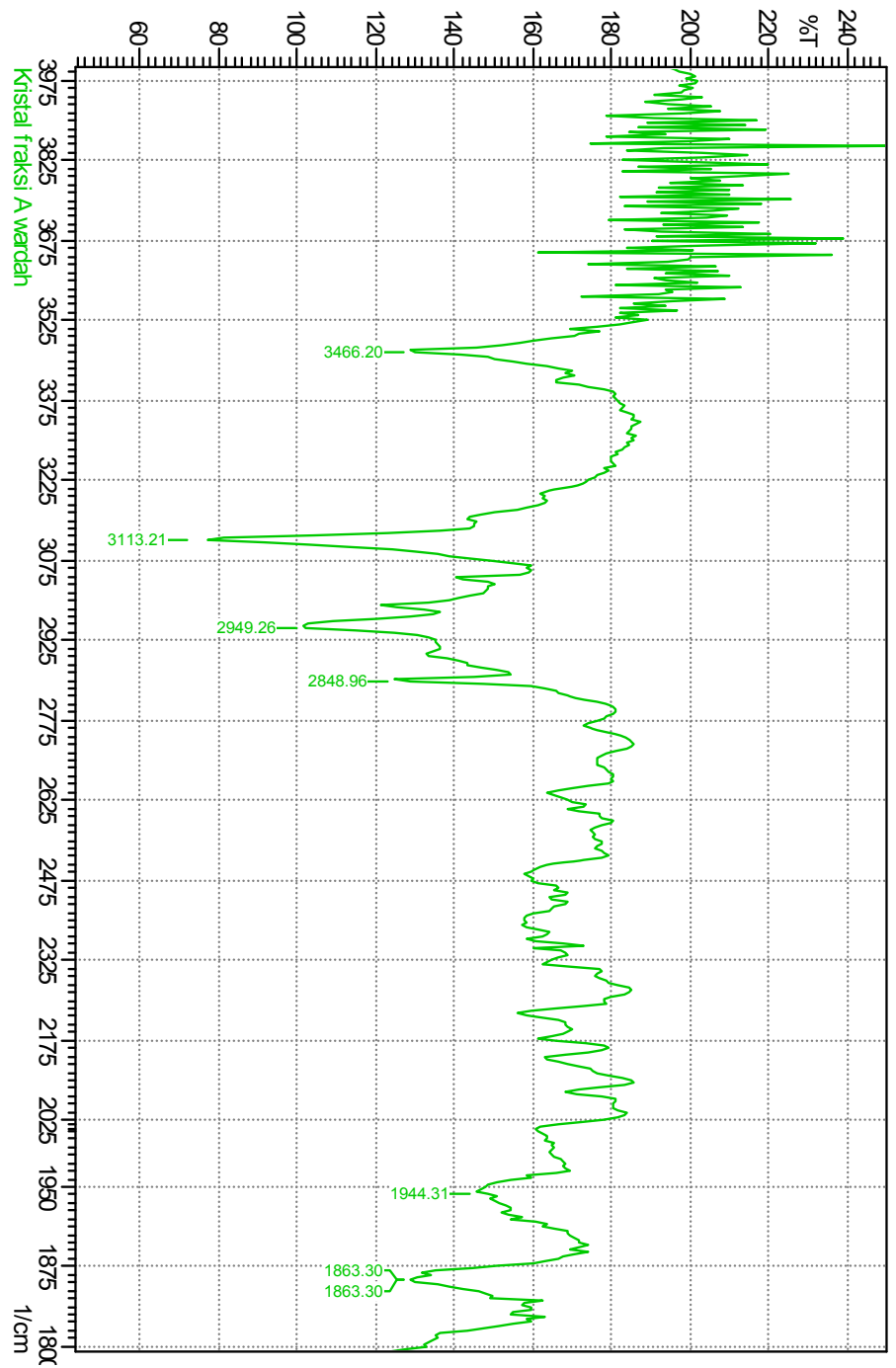
Lampiran 13. Spektrum UV isolat W1



Lampiran 14. Spektrum infra merah isolat

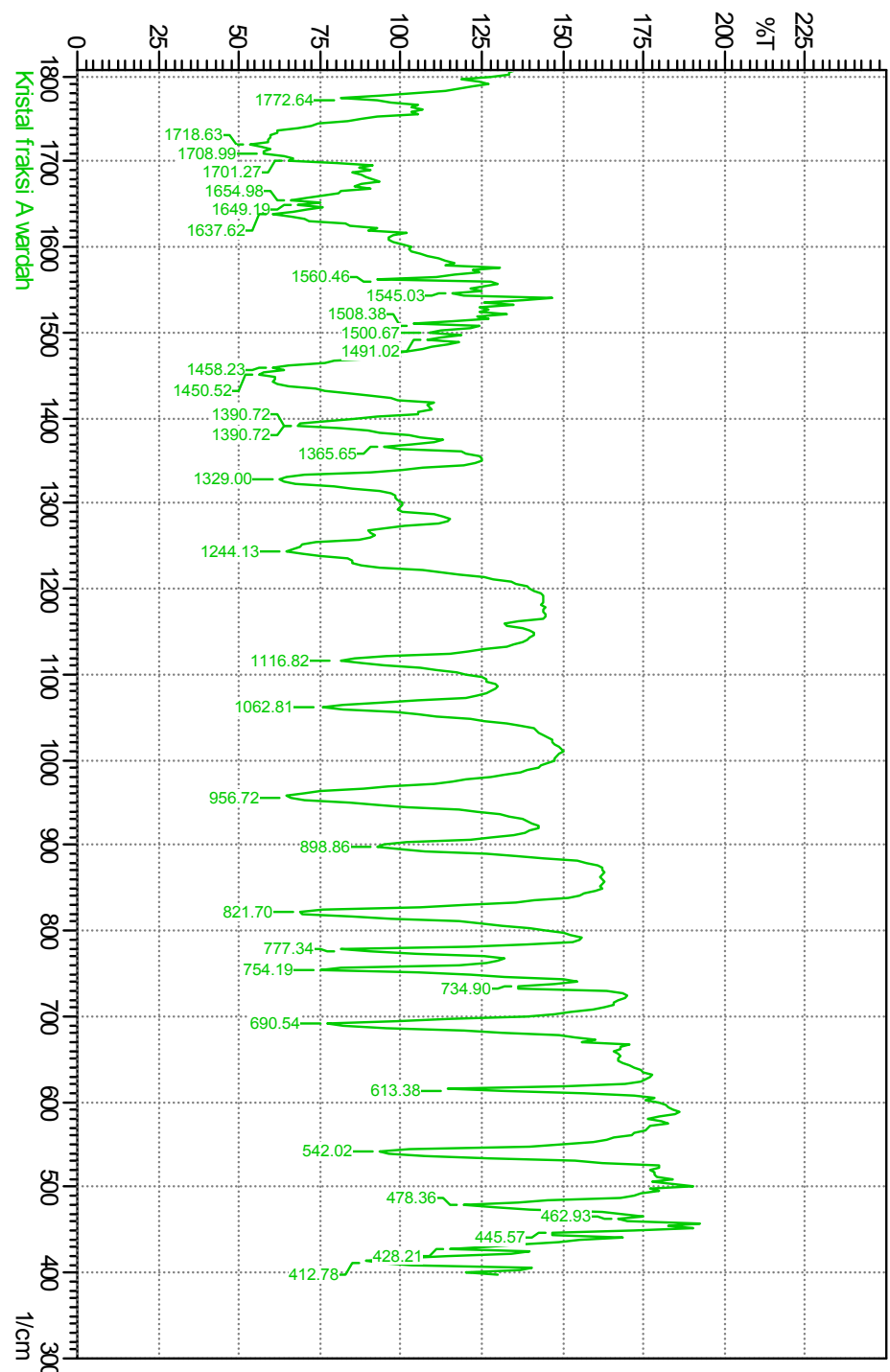
Universitas Indonesia

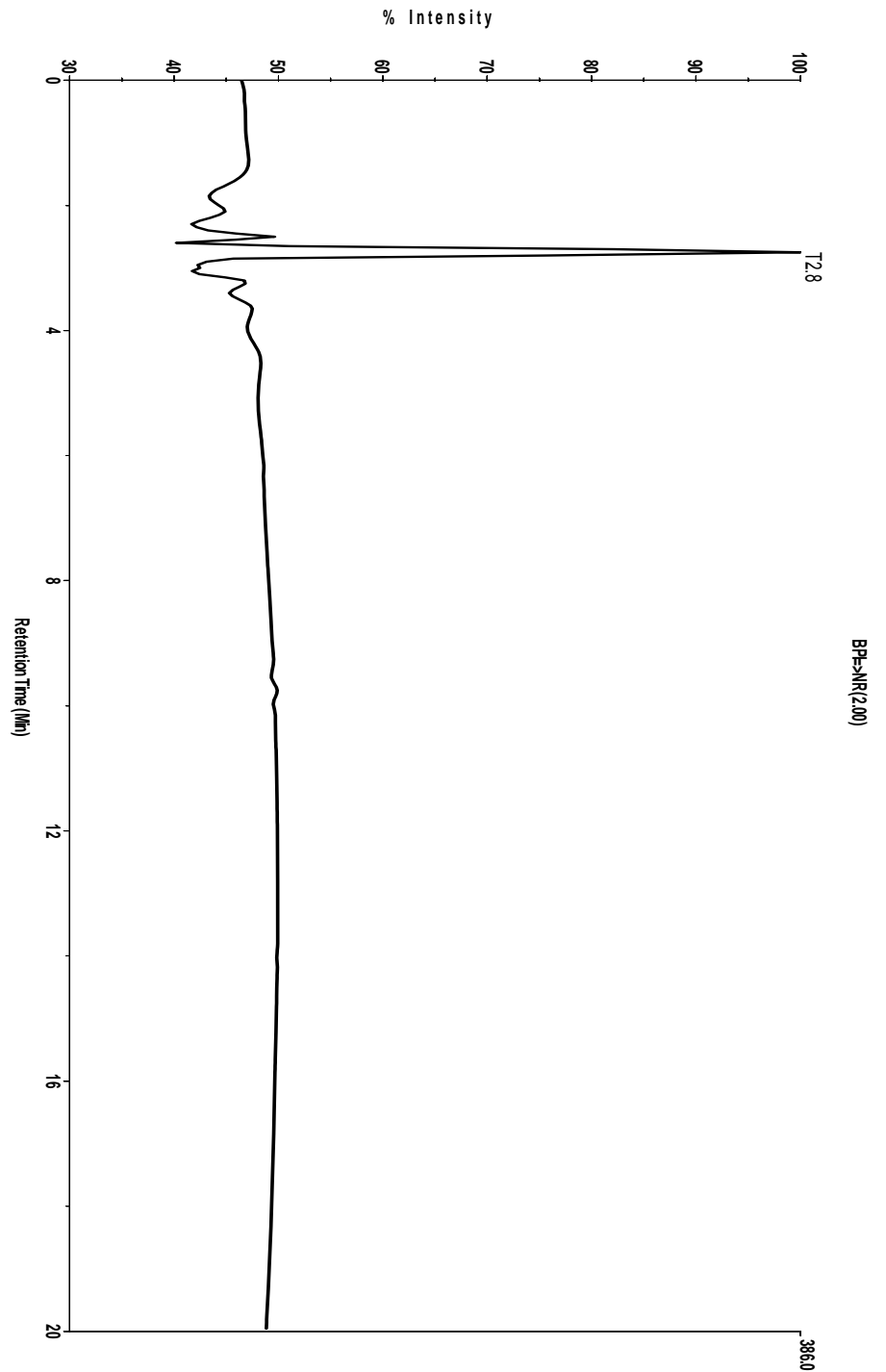
Lampiran 14. Spektrum infra merah isolat (Lanjutan)



Universitas Indonesia

Lampiran 14. Spektrum infra merah isolat (Lanjutan)



Lampiran 15. Spektrum LC-MS isolat

Universitas Indonesia

