



UNIVERSITAS INDONESIA

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

SKRIPSI

**TRIAS KUSUMA DEWI
0806398783**

**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 n-BUTANOL PADA EKSTRAK AKAR TANAMAN
Acalypha indica Linn.**

SKRIPSI

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

**TRIAS KUSUMA DEWI
0806398783**

**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 ini saya susun tanpa 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, 6 Juli 2012



Trias Kusuma Dewi

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Trias Kusuma Dewi

NPM : 0806398783

Tanda Tangan : 

Tanggal : Juli 2012



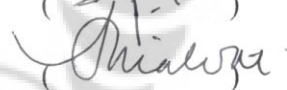
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Trias Kusuma Dewi
NPM : 0806398783
Program Studi : Sarjana Farmasi
Judul Skripsi : Isolasi, Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Fraksi n-Butanol pada Ekstrak Akar Tanaman *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 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 hanya kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia.

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

1. Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.Si, Apt., selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi;
2. Ibu Prof.Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
3. Ibu Dr. Berna Elya M.Si, Apt., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di 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 Fakultas Farmasi UI;
5. Bapak, ibu, mba dhani, mba nuning yang senantiasa memberikan kasih sayang, semangat, dan doa demi kelancaran studi penulis;
6. Semua teman-teman seperjuangan di laboratorium fitokimia (wardah, tice, yudhi, kurniawan, nita, adik ebonk, bian, purwa, elsa, lia, indah, mamik, devin) yang telah banyak memberi masukan dalam mengerjakan penelitian ini.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis berharap Tuhan yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Mudah-mudahan skripsi yang masih membutuhkan banyak masukan dan saran yang bersifat membangun ini, dapat berguna bagi para pembaca.

Penulis

2012



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Trias Kusuma Dewi
NPM : 0806398783
Program Studi : Sarjana Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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

Isolasi, Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Fraksi n-Butanol pada Ekstrak Akar Tanaman *Acalypha indica* Linn.

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 20 Juni 2012

Yang menyatakan



(Trias Kusuma Dewi)

viii

viii

ABSTRAK

Nama : Trias Kusuma Dewi
Program Studi : Farmasi
Judul : Isolasi, Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Senyawa Aktif Dari Fraksi n-Butanol Pada Ekstrak Akar Tanaman *Acalypha indica* Linn.

Hiperurisemia adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kadar asam urat dalam darah. Xantin oksidase berperan dalam oksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat. Salah satu pengobatan hiperurisemia adalah menghambat xantin oksidase dalam proses pembentukan asam urat. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui penghambatan aktivitas xanthine oxidase pada senyawa hasil isolasi. Serbuk simplisia di maserasi dengan metanol, kemudian dilakukan partisi dengan pelarut heksan, kloroform, etil asetat, n-Butanol dan air. Fraksi n-butanol dengan nilai IC_{50} 3,68 $\mu\text{g/mL}$, fraksi ini dilakukan pemisahan secara kromatografi kolom dengan eluen metanol air. Pada uji aktivitas, isolat memiliki aktivitas penghambatan terhadap xantin oksidase sebesar 2,79 $\mu\text{g/mL}$. Uji kinetika enzim menunjukkan bahwa isolat mempunyai aktivitas penghambatan kompetitif. Dari hasil identifikasi yang dilakukan diduga isolat yang diperoleh merupakan glikosida dengan aglikon berupa flavonoid.

Kata kunci : aktivitas penghambatan xantin oksidase, hiperurisemia, *Acalypha indica* L., glikosida flavonoid.
xv + 76 halaman : 26 gambar; 18 tabel; 10 lampiran
Daftar acuan : 38 (1985-2012)

ABSTRACT

Name : Trias Kusuma Dewi
Program Study : Pharmacy
Title : Isolation, Inhibitory Assay of Xanthine Oxidase Activity and Identification Active Compound from n-Buthanol Fraction in Root Ekstract *Acalypha indica* Linn.

Hyperuricemia is increasing of uric acid in blood. Xanthine oxidase is an enzyme that plays a role in the oxidation hypoxanthine and xanthine into uric acid. One of the hyperuricemia remedies is inhibit xantin oxidase to produce uric acid. The purpose of this study was to find inhibitory activity xanthine oxidase of compound from isolation. The sample powder was maserated by methanol solvent, and the extract was partitioned by n-hexane, chloroform, ethyl acetat, and n-buthanol. n-Buthanol fraction with IC_{50} values 3,68 $\mu\text{g/mL}$, this fraction was separated process by column chromatography with methanol/water as eluent. Activity assay showed that the isolate has activity to inhibit xanthine oxidase with IC_{50} values 2,79 $\mu\text{g/mL}$. The result of enzyme kinetics showed that isolate has a competitive inhibitory activity. Phytochemical identification indicated that isolate contained glycoside with flavonoid as aglycon.

Keyword : activity to inhibite xanthine oxidase, hyperuricemia, *Acalypha indica* L., flavonoid glycoside.
xv + 76 pages : 26 figures; 18 tables; 10 appendix
Bibliography : 38 (1985-2012)

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME..... | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS..... | iv |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | v |
| KATA PENGANTAR | vi |
| HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH | vii |
| ABSTRAK | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| DAFTAR ISI..... | x |
| DAFTAR GAMBAR | xiii |
| DAFTAR TABEL..... | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xv |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Tujuan Penelitian | 2 |
| 1.3 Manfaat | 3 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA..... | 4 |
| 2.1 Deskripsi dan Tata Nama..... | 4 |
| 2.1.1 Klasifikasi Tanaman | 4 |
| 2.1.2 Morfologi | 4 |
| 2.1.3 Nama Daerah dan Sinonim..... | 4 |
| 2.1.4 Ekologi dan Penyebaran | 5 |
| 2.1.5 Aktivitas Biologi | 5 |
| 2.1.6 Kandungan Kimia <i>Acalypha indica</i> Linn. | 6 |
| 2.2 Bagian Tnaman yang Digunakan..... | 7 |
| 2.3 Hiperurisemia dan <i>Gout</i> | 7 |
| 2.4 Enzim..... | 9 |
| 2.5 Xantin Oksidase | 14 |
| 2.6 Alopurinol | 15 |
| 2.7 Teknik Pemisahan | 15 |
| 2.8 Spektroskopi..... | 18 |
| 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 |
| 3.5.1 Pembuatan larutan..... | 23 |
| 3.5.2 Pembuatan Larutan Sampel Fraksi, Subfraksi dan Isolat | 24 |
| 3.5.3 Pembuatan Larutan Substrat Xantin | 25 |
| 3.5.4 Pembuatan Larutan Standar Alopurinol | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.5 Pembuatan Larutan Xantin Oksidase..... | 26 |
| 3.6 Cara Kerja | 27 |
| 3.6.1 Penyiapan Bahan..... | 27 |
| 3.6.2 Ekstraksi..... | 27 |
| 3.6.3 Fraksinasi Ekstrak..... | 27 |
| 3.6.4 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase | 28 |
| 3.6.5 Isolasi dan Pemurnian Ekstrak | 30 |
| 3.6.6 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase..... | 31 |
| 3.6.7 Perhitungan Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase (IC ₅₀).... | 33 |
| 3.6.8 Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim | 34 |
| 3.6.9 Identifikasi Golongan Senyawa | 34 |
| 3.6.10 Karakterisasi | 35 |
| | |
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 36 |
| 4.1 Ekstraksi Simplisia..... | 36 |
| 4.2 Fraksinasi Ekstrak | 36 |
| 4.3 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase | 38 |
| 4.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum | 38 |
| 4.3.2 Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum | 38 |
| 4.3.3 Penentuan pH Optimum..... | 40 |
| 4.3.4 Penentuan Suhu Optimum | 40 |
| 4.4 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Standar dan Hasil Fraksinasi Ekstrak | 40 |
| 4.4.1 Pengujian Standar Alopurinol..... | 41 |
| 4.4.2 Pengujian Hasil Fraksinasi Ekstrak | 41 |
| 4.5 Isolasi dan Pemurnian Senyawa..... | 42 |
| 4.6 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase pada Subfraksi Gabungan | 44 |
| 4.6 Karakterisasi | 45 |
| 4.8 Pengujian Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase pada Isolat | 46 |
| 4.9 Uji Kinetika Penghambat Xantin Oksidase pada Isolat..... | 47 |
| | |
| BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN | 48 |
| 5.1 Kesimpulan | 48 |
| 5.2 Saran | 48 |
| | |
| DAFTAR ACUAN..... | 49 |

DAFTAR GAMBAR

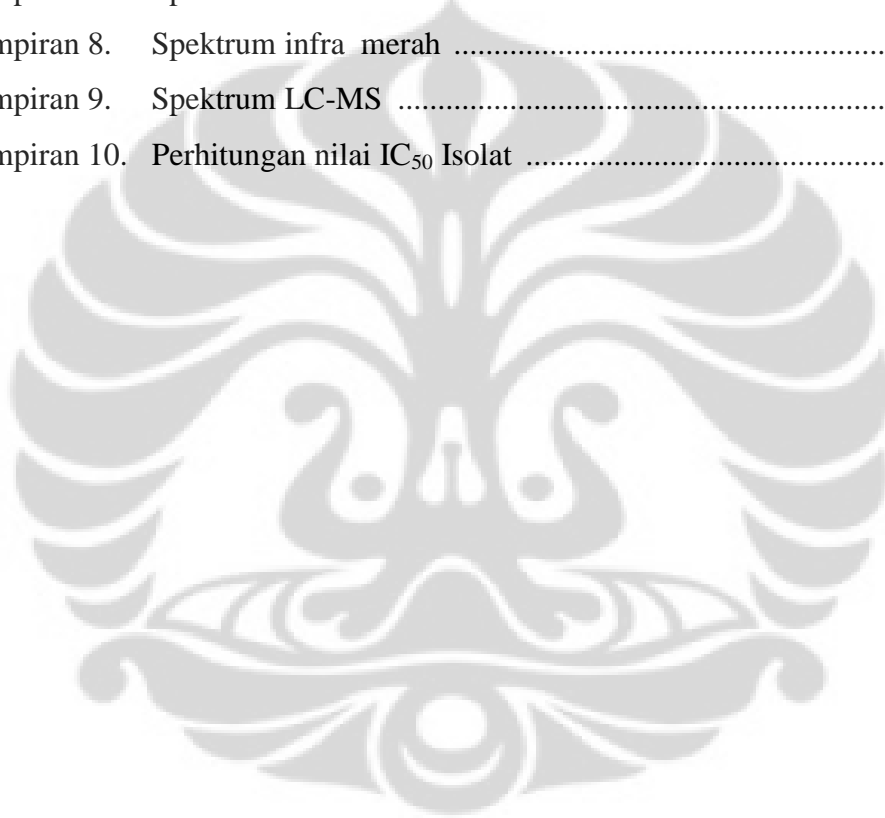
| | | |
|--------------|---|----|
| Gambar 2.1. | Tanaman <i>Acalypha indica</i> L..... | 4 |
| Gambar 2.2. | Struktur kimia glikosida sianogenik dari <i>Acalypha indica</i> L..... | 6 |
| Gambar 2.3. | Struktur kimia (1) Biorobin, (2) Nikotiflorin, (3) Klitorin, (4) Mauritianin..... | 7 |
| Gambar 2.4. | Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan reaksi yang di katalisis oleh enzim..... | 9 |
| Gambar 2.5. | Plot Lineweaver-Burk dari $1/V_i$ terhadap $1/[S]$ | 12 |
| Gambar 2.6. | Plot Lineweaver-Burk yang memperlihatkan inhibisi kompetitif..... | 13 |
| Gambar 2.7. | Plot Lineweaver-Burk yang memperlihatkan inhibisi non kompetitif..... | 14 |
| Gambar 2.8. | Reaksi xantin oksidase yang mengoksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat..... | 14 |
| Gambar 4.1. | Grafik Penentuan Konsentrasi Substrat Xantin pada 0,05mM; 0,1 mM; 0,15mM; 0,2 mM dan 0,25 mM..... | 39 |
| Gambar 4.2. | Kromatografi lapis tipis 2 dimensi isolat..... | 44 |
| Gambar 4.3. | Plot Lineaweaver-Burk isolat dengan Konsentrasi Xantin 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 dan 0,5 mM..... | 47 |
| Gambar 4.4. | Spektrum UV panjang gelombang maksimum pada uji aktivitas xantin oksidase..... | 54 |
| Gambar 4.5. | Grafik pH optimum..... | 55 |
| Gambar 4.6. | Grafik Suhu Optimum..... | 55 |
| Gambar 4.7. | Grafik Regresi Linier Alopurinol..... | 55 |
| Gambar 4.8. | Grafik Regresi Linier fraksi n-heksana..... | 56 |
| Gambar 4.9. | Grafik Regresi Linier Fraksi kloroform..... | 56 |
| Gambar 4.10. | Grafik Regresi Linier Fraksi Etil asetat..... | 56 |
| Gambar 4.11. | Grafik Regresi Linier Fraksi Butanol..... | 57 |
| Gambar 4.12. | Grafik Regresi Linier Fraksi Air..... | 57 |
| Gambar 4.13. | Grafik Regresi Linier subfraksi A..... | 57 |
| Gambar 4.14. | Grafik Regresi Linier subfraksi B..... | 58 |
| Gambar 4.15. | Grafik Regresi Linier subfraksi G..... | 58 |
| Gambar 4.16. | Grafik Regresi Linier Isolat..... | 58 |
| Gambar 4.17. | Uji Subfraksi B..... | 59 |
| Gambar 4.18. | Kromatografi Kolom..... | 59 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabel 3.1. | Reagen dan Volume yang Dibutuhkan pada Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase | 33 |
| Tabel 4.1. | Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh subfraksi A..... | 44 |
| Tabel 4.2. | Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh subfraksi B | 45 |
| Tabel 4.3. | Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh subfraksi G | 45 |
| Tabel 4.4. | Data Uji Penghambatan Isolat | 47 |
| Tabel 4.5. | Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten pada Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase | 47 |
| Tabel 4.6. | Rendemen ekstrak | 60 |
| Tabel 4.7. | Data Serapan Pada Uji Pendahuluan Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum | 60 |
| Tabel 4.8. | Data Serapan Pada Uji Pendahuluan Penentuan pH Optimum | 61 |
| Tabel 4.9. | Data Serapan Pada Uji Pendahuluan Penentuan suhu Optimum | 61 |
| Tabel 4.10. | Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Alopurinol . | 61 |
| Tabel 4.11. | Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Fraksi n-heksana..... | 62 |
| Tabel 4.12. | Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Fraksi Kloroform..... | 62 |
| Tabel 4.13. | Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Fraksi Etil Asetat..... | 62 |
| Tabel 4.14. | Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Fraksi n-butanol..... | 63 |
| Tabel 4.15. | Data Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Oleh Fraksi Air..... | 63 |
| Tabel 4.16. | Data Serapan Tanpa Inhibitor Pada Uji Kinetika | 63 |
| Tabel 4.17. | Data Serapan Inhibitor Pada Uji Kinetika | 64 |
| Tabel 4.18. | Hasil identifikasi golongan senyawa kimia subfraksi B | 64 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|--------------|--|----|
| Lampiran 1. | Skema Kerja | 65 |
| Lampiran 2. | Hasil determinasi tanaman..... | 67 |
| Lampiran 3. | Sertifikat analisis alopurinol..... | 68 |
| Lampiran 4. | Sertifikat analisis xantin oksidase..... | 69 |
| Lampiran 5. | Sertifikat analisis xantin | 70 |
| Lampiran 6. | Hasil pengumpulan subfraksi secara spektrofotometri..... | 71 |
| Lampiran 7. | Spektrum UV isolat | 72 |
| Lampiran 8. | Spektrum infra merah | 73 |
| Lampiran 9. | Spektrum LC-MS | 74 |
| Lampiran 10. | Perhitungan nilai IC ₅₀ Isolat | 76 |



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pemanfaatan tanaman obat di Indonesia secara tradisional semakin diminati karena efek samping lebih kecil dari obat sintesis. Selain itu, mahalnya obat sintetik membuat masyarakat beralih ke tanaman obat. Penggunaan tanaman obat di masyarakat terutama untuk mencegah penyakit, menjaga kesegaran tubuh maupun mengobati penyakit. Tanaman obat adalah tanaman yang mengandung bahan yang dapat digunakan sebagai pengobatan dan bahan aktifnya dapat digunakan sebagai bahan obat sintetik (Pribadi, 2009). Salah satu tanaman obat yang dimanfaatkan adalah dari famili Euphorbiaceae yaitu *Acalypha indica* Linn. Berdasarkan hasil penelitian bagian akar dari *Acalypha indica* Linn., digunakan untuk menurunkan kadar asam urat (Hanani et al, 2007).

Asam urat merupakan hasil akhir dari metabolisme purin dalam tubuh manusia. Produksi yang berlebih dari asam urat menyebabkan terjadinya hiperurisemia (Kong et al, 2000). Hiperurisemia adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kadar asam urat darah diatas normal (Sudoyo et al, 2006). Hiperurisemia merupakan faktor utama untuk risiko perkembangan gout (Huang et al, 2011).

Gout atau pirai adalah penyakit akibat adanya penumpukan kristal monosodium urat pada jaringan akibat peningkatan kadar asam urat (Sudoyo et al, 2006). Ketika kadar asam urat serum melebihi batas, terjadilah kristalisasi natrium urat di jaringan dan sendi sehingga menimbulkan reaksi inflamasi yaitu artritis gout (Murray et al, 2009). Xantin oksidase (XOD) merupakan enzim yang berperan dalam mengkatalisis oksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat. Penghambatan xantin oksidase (XOD) dapat menghambat sintesis asam urat dalam tubuh yang menjadi salah satu pendekatan terapeutik untuk pengobatan hiperurisemia (Wang et al, 2008). Dengan demikian, salah satu pendekatan terapi untuk mengobati asam urat adalah penggunaan penghambat xantin oksidase yang menghambat produksi asam urat (Kong et al, 2000).

Alopurinol merupakan penghambat xantin oksidase yang digunakan secara klinis pada tiga dekade terakhir (Kong et al, 2000). Dalam penggunaannya obat ini tidak lepas dari adanya efek samping hipersensitivitas, sindrom Steven-johnson dan toksisitas ginjal (Umamaheswari et al, 2009).

Sebagai upaya pencarian pengobatan hiperurisemia secara alami, penelitian mengenai khasiat tanaman obat *Acalypha indica* L. sebagai penghambat xantin oksidase telah dilakukan. Bagian akar secara tradisional digunakan sebagai ekspektoran, asma, pneumonia, emetik, antelmintik (Hungeling et al, 2009). Penelitian lainnya menunjukkan bahwa, akar *Acalypha indica* dapat menurunkan kadar asam urat pada tikus putih jantan dengan kenaikan dosis yang diberikan, diperoleh hasil terbaik yang dapat menurunkan kadar asam urat adalah 10,8 g / 200 g bb (Azizahwati et al, 2005).

Beberapa jenis tanaman Indonesia telah dilakukan skrining terhadap uji aktivitas penghambatan xanthin oksidase, termasuk *Acalypha indica* L. dari suku Euphorbiaceae. Hasil skrining aktivitas penghambatan enzim 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). Ekstrak butanol dari akar *Acalypha indica* L. menunjukkan adanya aktivitas sebagai penghambat xantin oksidase dengan nilai IC₅₀ sebesar 0,38 (Fitriani, 2012).

Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan uji aktivitas dari fraksi n-butanol terhadap penghambatan enzim xantin oksidase yang berkhasiat sebagai anti hiperurisemia.

1.2 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi senyawa aktif yang diuji penghambatan aktivitas xantin oksidase dari fraksi n-butanol akar kucing (*Acalypha indica* Linn.).

1.3 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah diperolehnya isolat dari akar *Acalypha indica* L. yang menghambat aktivitas xantin oksidase, diharapkan dapat dijadikan dasar pengembangan obat baru untuk hiperurisemia.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi dan Tata Nama

2.1.1 Klasifikasi Tanaman

| | |
|------------|--|
| Kerajaan | : Plantae |
| Divisi | : Spermatophyta |
| Sub divisi | : Angiospermae |
| Kelas | : Dicotyledoneae |
| Bangsa | : Euphorbiales |
| Suku | : Euphorbiaceae |
| Marga | : Acalypha |
| Jenis | : <i>Acalypha indica</i> Linn (Tjitrosoepomo, 1991). |

2.1.2 Morfologi

Tinggi tanaman sekitar 1,5 meter dengan batang tegak, bular, berambut halus, dan berwarna hijau. Daun merupakan daun tunggal berbentuk belah ketupat dan pangkal membulat, tepi bergerigi, ujung-ujungnya runcing dan pertulangan menyirip. Panjang daun mencapai 4 cm dan lebar sampai 3 cm. Tangkai daun berbentuk silindris dengan panjang 3-4 cm berwarna hijau. Bunga merupakan bunga majemuk berbentuk bulir dan berkelamin satu, terletak di ketiak daun dan ujung cabang. Mahkota bunga berbentuk bulat telur, berambut, dan berwarna merah. Buah berbentuk kotak berwarna hitam dengan biji bulat panjang berwarna coklat. Akar merupakan akar tunggang berwarna putih kotor (Gambar 2.1.) (Mun'im et al, 2011).

2.1.3 Nama Daerah dan Sinonim

Jawa: Ceka mas, lelatang, rumput bolong-bolong, rumput kokosongan. *Sunda*: Akar kucing, Kucing-kucingan, Rumput kokowongan. *Inggris*: Indian nettle, cat's nettle. Sinonim: *A. spicata* L., *A. ciliata* L., *A. canescana* L., *A. australis* L., *A. canescens* Wall (BPOM RI, 2010).

2.1.4 Ekologi dan Penyebaran

Tanaman ini tersebar secara luas di daerah tropis seluruh dunia mulai dari bagian barat Afrika sampai ke India. Begitu juga daerah Indocina sampai Filipina dan Pulau Jawa. Tanaman ini sedikit tersebar pada daerah Borneo dan langka di Malesia Bagian Timur (Vakenburg, 2002).

2.1.5 Aktivitas Biologi

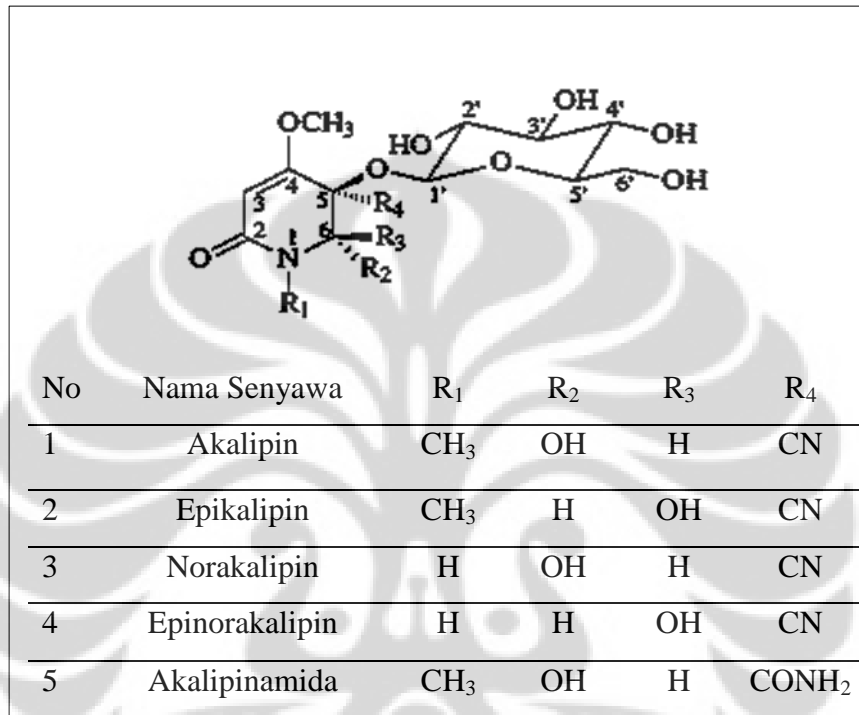
Beberapa uji aktivitas yang telah dilakukan, yaitu :

- a. Ekstrak etanol dari herba *Acalypha indica* L. memiliki aktivitas antifertilitas oleh dua kandungan flavonoid *chrysin* dan galangin (Hiremath et al, 1999).
- b. Ekstrak heksan, kloroform, etil asetat dan metanol dari daun akar kucing memiliki aktivitas sebagai anti bakteri gram positif *Streptococcus faecalis* dan gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*, dengan kadar hambat minimum (KHM) antara 0,156 – 2,5 mg/mL. Ekstrak aseton dan etanol dari daun akar kucing juga menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherecia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *S. aureus*, *Proteus sp.* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan KHM untuk ekstrak aseton berturut-turut 40; 80; 40; 20 dan 60 µg/0,1mL dan untuk ekstrak etanol berturut-turut 20; 90; 60; 60 dan 40 µg/0,1mL. Ekstrak air daun akar kucing menunjukkan aktivitas melawan isolat *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap berbagai macam obat (*Multi Drugs Resistance*) (BPOM RI, 2010).
- c. Ekstrak metanol dan aseton dari daun *Acalypha indica* L. telah dievaluasi memiliki aktivitas sebagai antidiabetik (Masih et al, 2011).
- d. Akar *Acalypha indica* dapat menurunkan kadar asam urat pada tikus putih jantan dengan kenaikan dosis yang diberikan, diperoleh hasil terbaik yang dapat menurunkan kadar asam urat adalah 10,8 g / 200 g bb (Azizahwati et al, 2005).
- e. Ekstrak n-butanol dari akar *Acalypha indica* L. memiliki aktivitas penghambatan terhadap xantin oksidase dengan nilai IC₅₀ 0,38 (Fitriani, 2012).

2.1.6 Kandungan Kimia *Acalypha indica* Linn.

Acalypha indica Linn. mengandung:

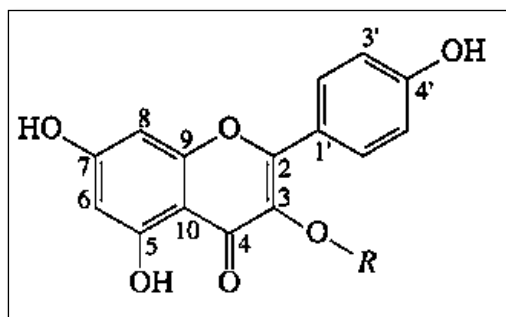
- a. Glikosida sianogenik dari derivat sianopiridon, yaitu akalipin, epikalipin, norakalipin, epinorakalipin, akalipinamida. Senyawa tersebut terdapat pada bagian daun *Acalypha indica* dari ekstrak metanol.



[Sumber: Hungeling et al, 2009]

Gambar 2.2. Struktur kimia glikosida sianogenik dari *Acalypha indica* L.

- b. Tanin yaitu asam tri-o-metil elagat (BPOM RI, 2011).
- c. Pyranoquinolinone alkaloid flindersin (Hiremath et al, 1999)
- d. Flavonoid: Krisin dan galangin, mauritianin, klitorin, nikotiflorin dan biorobin. Senyawa tersebut terdapat pada bagian bunga dan daun *Acalypha indica* yang diperoleh dari ekstrak metanol.



| No | R | Nama |
|----|--|--------------|
| 1 | $R = \alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Gal}$ | Biorobin |
| 2 | (2) $R = \alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glc}$ | Nikotiflorin |
| 3 | (3) $R = \alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glc}$ | Klitorin |
| 4 | (3) $R = \alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Gal}$ | Mauritianin |

[Sumber: Nahrstedt et al, 2006]

Gambar 2.3. Struktur kimia (1) Biorobin, (2) Nikotiflorin, (3) Klitorin (4) Mauritianin.

2.2 Bagian Tanaman yang Digunakan

Pada penelitian ini bagian tanaman *Acalypha indica* Linn. yang digunakan adalah akar.

2.3 Hiperurisemia dan Gout

Hiperurisemia adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kadar asam urat darah di atas normal. Asam urat adalah hasil produksi oleh tubuh, merupakan hasil akhir metabolisme purin. Hiperurisemia yang berkepanjangan dapat menyebabkan *gout* atau pirai. Penyakit *gout* adalah salah satu tipe dari artritis yang disebabkan banyak atau tidak normalnya kadar asam urat di dalam tubuh karena tubuh tidak bisa men ekskresikan asam urat secara normal. *Gout* atau pirai

adalah penyakit akibat adanya penumpukan kristal monosodium urat pada jaringan akibat peningkatan kadar asam urat (Sudoyo, 2006; Misnadiarly, 2008).

Penyebab hiperurisemia dibedakan menjadi hiperurisemia primer, hiperurisemia sekunder, dan hiperurisemia idiopatik. Hiperurisemia primer adalah hiperurisemia tanpa disebabkan penyakit atau penyebab lain. Hiperurisemia sekunder adalah hiperurisemia yang disebabkan karena penyakit lain atau penyebab lain. Hiperurisemia idiopatik adalah hiperurisemia yang tidak jelas penyebab primer, kelainan genetik, tidak ada kelainan fisiologi atau anatomi yang jelas (Sudoyo, 2006).

Makanan dan minuman dapat menjadi faktor penyebab meningkatnya kadar asam urat dalam darah. Minuman yang mengandung kafein seperti kopi dan teh yang mengandung purin dapat menjadi faktor pemicu meningkatnya kadar asam urat dalam darah. Jika kadar xantin dalam darah cukup tinggi maka mampu memicu terbentuknya asam urat yang lebih banyak karena kerja dari xantin oksidase (Carter, 2005).

Pengobatan asam urat bisa dapat digolongkan menjadi dua jenis golongan obat yaitu obat golongan urikostatik dan obat golongan urikosurik. Obat golongan urikostatik bekerja sebagai inhibitor xantin oksidase, yang merupakan golongan ini adalah alopurinol. Alopurinol adalah obat yang diakui sebagai penghambat pembentukan asam urat dari prekursornya, yaitu xantin dan hipoxantin. Obat golongan urikosurik dapat menurunkan kadar asam urat dengan cara meningkatkan ekskresi asam urat dan menginhibisi reabsorpsi asam urat di tubulus ginjal. Obat yang biasa digunakan adalah probenesid dan sulfinpirazon (Wilmana, 2007).

2.4 Enzim

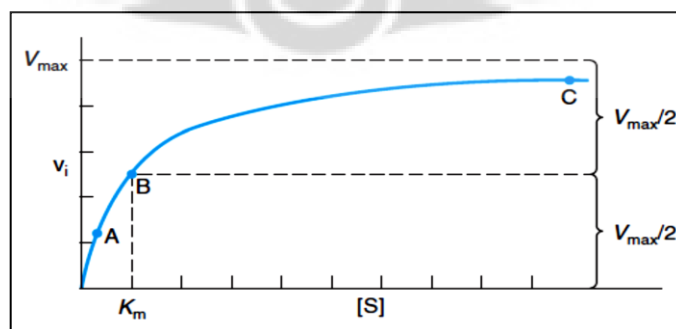
Enzim adalah polimer biologis yang mengkatalisis reaksi kimia yang memungkinkan berlangsungnya kehidupan. Enzim yang mengatalisis perubahan satu atau lebih senyawa (substrat) menjadi satu atau lebih senyawa lain (produk) meningkatkan laju reaksi setidaknya 10^6 kali dibandingkan jika tidak dikatalisis. Enzim adalah katalis yang selektif dan sangat spesifik (Murray et al, 2006).

Banyak enzim mengandung berbagai molekul non protein kecil dan ion logam yang ikut serta secara langsung dalam katalisis atau pengikatan substrat. Molekul ini yang disebut gugus prostetik, kofaktor dan koenzim. Gugus prostetik terintegrasi erat ke dalam struktur enzim yang terikat secara stabil. Kofaktor memiliki fungsi serupa dengan gugus prostetik tetapi berikatan secara transien dan mudah terlepas dengan enzim atau substrat. Koenzim berfungsi sebagai pengangkut bahan atau pemindah gugus dan memindahkan substrat dari tempat pembentukannya ke tempat pemakaiannya. Ikatan dengan koenzim juga menstabilkan substrat.

2.4.1 Faktor – faktor yang memengaruhi enzim

a. Konsentrasi substrat

Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan kecepatan V_i hingga tercapai nilai maksimal V_{max} . Jika peningkatan lebih lanjut konsentrasi tidak meningkatkan V_i , enzim dikatakan jenuh oleh substrat.



[Sumber : Murray et al, 2006]

Gambar 2.4. Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim

Pada setiap saat, hanya molekul substrat yang berikatan dengan enzim dalam bentuk kompleks ES yang dapat diubah menjadi produk. Kedua, konstanta keseimbangan untuk pembentukan kompleks enzim-substrat tidak besar. Oleh karena itu, jika terdapat kelebihan substrat (pada titik A dan B) hanya sebagian enzim yang mungkin dalam bentuk kompleks ES. Dengan demikian, di titik A atau B, peningkatan atau penurunan $[S]$ akan meningkatkan atau menurunkan jumlah kompleks ES disertai perubahan yang sesuai di V_i . Di titik C, semua enzim terdapat dalam bentuk kompleks ES. Karena tidak ada enzim bebas yang tersedia untuk membentuk ES, peningkatan lebih lanjut $[S]$ tidak dapat meningkatkan laju reaksi (Murray et al, 2006).

b. Suhu

Peningkatan suhu akan meningkatkan laju, baik reaksi yang tidak dikatalisis maupun yang dikatalisis enzim dengan meningkatkan energi kinetik dan frekuensi tumbukkan molekul-molekul yang bereaksi (Murray et al, 2006).

c. pH

Laju hampir semua reaksi yang dikatalisis oleh enzim memperlihatkan ketergantungan signifikan pada konsentrasi ion hidrogen. Hubungan 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 (Murray et al, 2006).

2.4.2 Persamaan Michaelis-Menten

Persamaan Michaelis-Menten menghubungkan kecepatan awal reaksi yang dikatalisis enzim V_i , dengan konsentrasi substrat S , dan dua tolok ukur, K_m dan V_{max} (Marks et al, 1996).

Persamaan Michaelis – Menten memperlihatkan secara matematis hubungan antara kecepatan awal reaksi V_i dan konsentrasi substrat $[S]$ yang secara grafis diperlihatkan pada gambar 2.4.

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

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

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

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

- Bila $[S]$ jauh lebih kecil dari K_m atau konsentrasi substrat di bawah konsentrasi yang diperlukan untuk menghasilkan separuh-percepatan maksimal (nilai K_m), maka percepatan awal (V_i), akan bergantung pada konsentrasi substrat $[S]$. Pada gambar 2.4 dapat dilihat sebagai titik A.
- Bila konsentrasi substrat $[S]$ jauh melampaui K_m , maka percepatan awal V_i , merupakan percepatan maksimal (V_{maks}). Pada gambar 2.4 dapat dilihat sebagai titik C.
- Bila konsentrasi substrat sama dengan nilai K_m , maka percepatan awal V_i separuh dari percepatan maksimal. Pada gambar 2.4 dapat dilihat sebagai titik B (Murray et al, 2006).

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

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:

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

Persamaan dibalik
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\text{maks}} [S]} \quad (2.2)$$

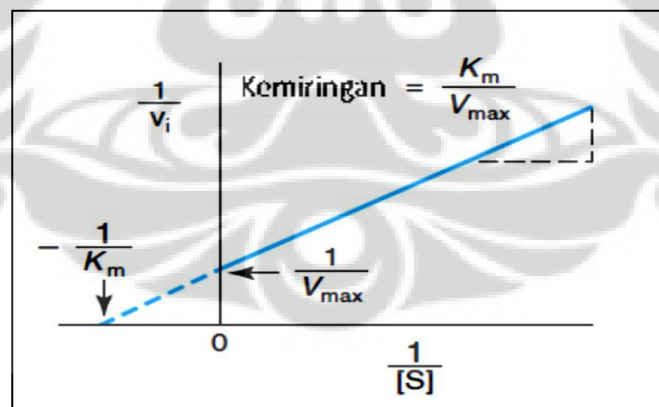
Difaktorkan
$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_{\text{maks}}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V_{\text{maks}} [S]} \quad (2.3)$$

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

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 $1/V_{\text{maks}}$ dengan kecuraman K_m/V_{maks} . Plot tersebut disebut dengan Plot Lineweaver-Burk. Dengan menempatkan y pada persamaan 2.5 di nol dan menghitung x diperoleh bahwa garis memotong di $-1/K_m$.

$$0 = ax + b; \text{ maka } x = -\frac{b}{a} = -\frac{1}{K_m} \quad (2.5)$$

Oleh karena itu, K_m mudah dihitung dari nilai negatif garis memotong sumbu x .



[Sumber : Murray et al., 2006]

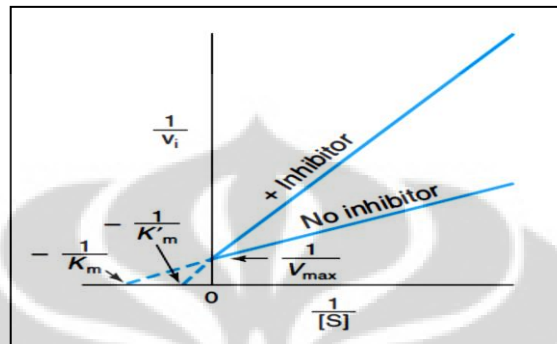
Gambar 2.5. Plot Lineweaver Burk dari $1/V_i$ terhadap $1/[S]$

2.4.4 Analisis Kinetik Membedakan Inhibisi Kompetitif dan Non Kompetitif

Plot Lineweaver-Burk membedakan antara inhibitor kompetitif dan nonkompetitif serta mempermudah evaluasi konstanta inhibisi.

a. Inhibisi Kompetitif

Untuk inhibisi kompetitif, garis yang menghubungkan titik-titik data eksperimen bertemu di sumbu y (Gambar 2.6). Karena perpotongan garis disumbu y sama dengan $1/V_{max}$, pola ini menunjukkan bahwa jika $1/[S]$ mendekati 0, V_i tidak berantung pada keberadaan inhibitor.



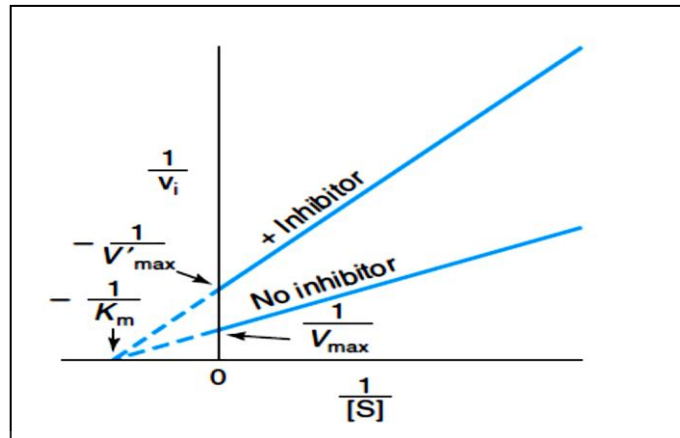
[Sumber : Murray et al., 2006]

Gambar 2.6. Plot Lineweaver Burk yang memperlihatkan inhibisi kompetitif.

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

b. Inhibisi Non Kompetitif

Pada inhibisi non kompetitif, pengikatan inhibitor tidak memengaruhi pengikatan substrat. Di dalam inhibisi nonkompetitif tidak terjadi persaingan antara substrat dengan inhibitor. Struktur inhibitor biasanya sedikit atau tidak mirip dengan substrat. Karena inhibitor dan substrat dapat berikatan di tempat yang berlainan, pembentukkan enzim-inhibitor dan kompleks enzim-substrat (Murray et al., 2006).

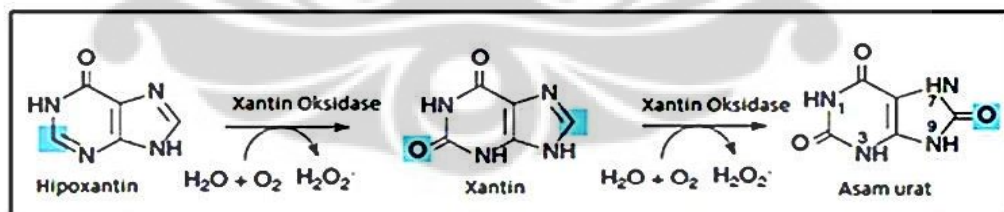


[Sumber : Murray et al, 2006]

Gambar 2.7. Plot Lineweaver Burk untuk inhibisi nonkompetitif

2.5 Xantin Oksidase

Xantin oksidase ialah enzim yang mengoksidasi hipoxantin menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat pada jalannya degradasi purin (Marks et al, 1996). Xantin oksidase adalah enzim flavoprotein yang terdapat di dalam susu, dan beberapa organ dan jaringan (Bergmeyer, 1965). Xantin oksidase mengandung sebuah kompleks molibdenum sulfida (Mo-S) yang mengikat substrat (Marks, 1996).



[Sumber : Murray et al., 2003]

Gambar 2.8. Reaksi xantin oksidase yang mengoksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat

2.6 Alopurinol

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

Alopurinol berguna untuk mengobati penyakit pirai karena menurunkan kadar asam urat. Alopurinol adalah penghambat xantin oksidase, enzim yang mengubah hipoxantin menjadi xantin. Alopurinol merupakan analog struktural hipoxantin yang mengalami oksidasi oleh xantin oksidase menjadi oksipurinol, suatu analog xantin. Apabila telah terbentuk, oksipurinol akan tetap terikat ke kompleks molibdenum sulfida, dan tidak dapat dihasilkan kompleks molibdenum-sulfida yang tereduksi. Akibatnya, asam urat yang terbentuk menjadi berkurang (Marks, 1996).

Alopurinol memiliki efek samping yang sering terjadi ialah reaksi kulit, reaksi alergi berupa demam, mengigil. Selain itu, gangguan saluran cerna juga sering terjadi (Wilmana, 2007).

2.7 Teknik Pemisahan

2.7.1 Ekstraksi dan ekstrak

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, infus, dekok (Depkes RI, 2000).

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang diperoleh diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Anonim, 1995).

2.7.1.1 Cara Dingin

a. Maserasi

Maserasi adalah proses mengekstrakkan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperaturruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

2.7.1.2 Cara Panas

a. Refluks

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

b. Soxhlet

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

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50⁰C.

d. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98⁰C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ($\geq 300^{\circ}\text{C}$) dan temperatur air (Anonim, 2000).

2.7.2 Pemisahan

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas) (Harmita, 2006).

Teknik kromatografi yang sering digunakan yaitu kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, kromatografi kertas dan kromatografi gas. Sebagai adsorban selain kertas digunakan juga zat penjerap berpori misalnya aluminium oksida, silika gel, dan selulosa. Kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis umumnya digunakan untuk identifikasi, karena cara ini khas dan mudah dilakukan untuk senyawa yang mudah menguap dan untuk identifikasi dan penetapan kadar, sedangkan kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan senyawa dalam jumlah yang lebih banyak (Harborne, 1987).

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penjerapan, partisi (pembagian) atau gabungannya. Kromatografi lapis tipis biasanya digunakan untuk pengecekan yang cepat terhadap komposisi campuran, menentukan kondisi percobaan dari kromatografi kolom, mengetahui kesempurnaan suatu reaksi, dan untuk identifikasi obat, ekstrak tanaman, preparat biokimia, serta mendeteksi kontaminan dan pemalsuan. Teknik kromatografi lapis tipis dapat dilakukan dengan dengan peralatan sederhana dan waktu yang cukup singkat (15-60 menit), dengan jumlah sampel yang cukup kecil. Metode pemisahan didasarkan atas penjerapan, partisi atau gabungannya (Harmita, 2006).

Kromatografi kolom merupakan metode kromatografi cair yang baik digunakan untuk pemisahan campuran dengan skala besar yaitu lebih dari 1 gram. Pada kromatografi kolom, campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita pada bagian atas kolom penjerap yang berada dalam tabung kaca. Kromatografi kolom terbagi dua jenis yaitu kromatografi kolom lambat dan kromatografi kolom dipercepat. 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).

2.7.3 Pemurnian

Kristalisasi merupakan proses presipitasi suatu komponen padat dalam bentuk kristal dari larutan jenuh. Kejenuhan biasanya dilakukan melalui pendinginan atau penguapan. Kristalisasi adalah peristiwa pembentukan partikel-partikel zat padat dalam dalam suatu fase homogen. Kristalisasi dari larutan dapat terjadi jika padatan terlarut dalam keadaan berlebih (di luar kesetimbangan, maka sistem akan mencapai kesetimbangan dengan cara mengkristalkan padatan terlarut (Dewi et al, 2003).

Rekristalisasi merupakan dasar yang secara umum efektif jika suatu substansi harus murni, artinya terdapat satu komponen primer.

Pemurnian dengan rekristalisasi bergantung pada:

- a. Perbedaan padatan maka akan memiliki perbedaan kelarutan pada pelarut yang diberikan.
- b. Semakin padat maka akan lebih larut pada pelarut panas dibanding pelarut dingin.

2.8 Spektroskopi

2.8.1 Spektrofotometri

Spektrum UV-Vis merupakan hasil interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan molekul. REM merupakan bentuk energi radiasi yang mempunyai sifat gelombang dan partikel (foton). Spektrofotometer UV-Vis digunakan terutama untuk analisa kuantitatif, tetapi dapat juga untuk analisa

kualitatif. Untuk analisa kualitatif yang diperhatikan adalah membandingkan λ maksimum, serapan, daya serap dan spektrum serapannya. Pengukuran serapan dapat dilakukan pada panjang gelombang daerah ultraviolet (panjang gelombang 190 nm – 380 nm) atau pada daerah cahaya tampak (panjang gelombang 380 nm – 780 nm) (Harmita, 2006).

Pengukuran serapan dapat dilakukan pada panjang gelombang daerah ultraviolet (panjang gelombang 190 nm – 380 nm) atau pada daerah cahaya tampak (panjang gelombang 380 nm – 780 nm). Pengukuran serapan dari suatu sampel dapat dilakukan dengan perhitungan Lambert-Beer sebagai berikut:

$$A = \frac{\log I_0}{\log I_t} = \epsilon \cdot b \cdot c = a \cdot b \cdot c \quad (2.6)$$

dimana : A= serapan

a = daya serap

b = tebal lapisan zat yang menyerap sinar (cm)

c = kadar (g/L)

ϵ = absorpsivitas molekuler (mol.cm.L^{-1})

I_0 = Intensitas sinar datang

I_t = Intensitas sinar yang diteruskan

Pemilihan pelarut yang digunakan dalam spektrofotometer UV sangat penting, pelarut tidak boleh mengabsorpsi cahaya pada daerah panjang gelombang dimana dilakukan pengukuran sampel. Umumnya pelarut yang tidak mengandung sistem terkonjugasi sesuai untuk digunakan dalam spektrofotometer UV-Vis. Pelarut yang umum digunakan adalah air, etanol, metanol, dan n-heksan, karena pelarut ini transparan pada daerah UV (Harmita, 2006).

2.8.2 Spektroskopi Inframerah

Dua molekul senyawa yang berbeda struktur kimianya akan berbeda pada spektrum infra merahnya. Hal ini dapat dimengerti, karena macam ikatan yang berbeda, frekuensi vibrasinya tidak sama, serta walaupun macam ikatan sama, tetapi mereka berada dalam dua senyawa yang berbeda, frekuensi vibrasinya juga berbeda (karena kedua ikatan yang sama tersebut berada dalam lingkungan yang berbeda) (Harmita,2006).

Daerah inframerah (IR) dibagi menjadi 3 sub daerah, yaitu sub daerah IR dekat ($\lambda = 780 \text{ nm} - 2,5 \text{ }\mu\text{m}$ atau $\nu = 14290 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), sub daerah IR sedang ($\lambda = 2,5 \text{ }\mu\text{m} - 15 \text{ }\mu\text{m}$ atau $\nu = 4000 - 666 \text{ cm}^{-1}$), dan sub daerah IR jauh ($\lambda = 15 \text{ }\mu\text{m} - 50 \text{ }\mu\text{m}$ atau $\nu = 666 - 200 \text{ cm}^{-1}$). Dari ketiga sub daerah tersebut, hanya sub daerah IR sedang yang lazim digunakan untuk elusidasi struktur senyawa organik (Harmita, 2006).

Terdapat dua macam getaran molekul, yaitu vibrasi ulur (stretching) dan vibrasi tekuk (bending). Vibrasi ulur adalah suatu gerakan berirama di sepanjang sumbu ikatan sehingga jarak antar atom bertambah atau berkurang. Vibrasi tekuk dapat terjadi karena perubahan sudut-sudut ikatan antara ikatan-ikatan pada sebuah atom, atau karena gerakan sebuah gugusan atom terhadap sisa molekul tanpa gerakan nisbi atom-atom di dalam gugusan (Silverstein, et al, 2005).

2.8.3 Spektroskopi Massa

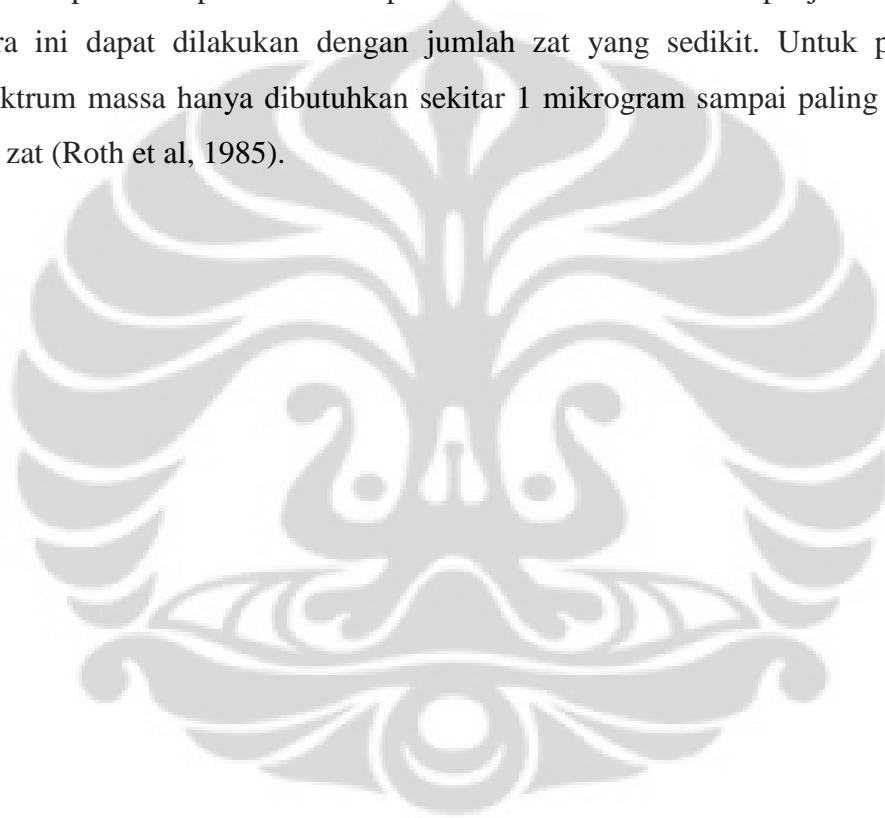
Spektrometer massa dapat digunakan untuk mengukur perbandingan massa ion terhadap muatan, untuk menetapkan kelimpahan ion dan untuk mempelajari proses ionisasi. Selain itu, juga dimungkinkan untuk mempelajari reaksi ion dalam fase gas seperti proses dekomposisi unimolekuler dan reaksi ion molekul.

Spektrometer massa adalah suatu instrumen yang menghasilkan berkas ion dari suatu zat uji, memilah ion tersebut menjadi spektrum sesuai dengan perbandingan massa terhadap muatan (m/e) dan merekam kelimpahan relatif tiap jenis ion yang ada. Umumnya ion positif yang dipelajari, karena ion negatif yang dihasilkan dari sumber tumbukan elektron umumnya sedikit. Dengan diperkenalkannya teknik ionisasi kimia dan tembakan atom cepat yang keduanya

dapat menghasilkan ion negatif yang banyak, maka perhatian terhadap analisis ion negatif meningkat.

Secara umum, spektroskopi massa terdiri dari tiga komponen, yaitu sumber ion untuk menghasilkan ion berbentuk gas dari zat uji, penganalisis untuk memisahkan ion menjadi komponen massa yang khas sesuai dengan perbandingan massa terhadap muatan dari ion yang ada, dan sistem detektor untuk merekam kelimpahan relatif atau intensitas tiap jenis ion yang dipisahkan (Harmita, 2006).

Spektroskopi massa merupakan metode standar untuk penjelasan struktur. Cara ini dapat dilakukan dengan jumlah zat yang sedikit. Untuk pembuatan spektrum massa hanya dibutuhkan sekitar 1 mikrogram sampai paling tinggi 0,5 mg zat (Roth et al, 1985).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia Departemen Farmasi Universitas Indonesia Depok. Penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai dengan bulan Mei 2012.

3.2 Bahan Uji

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

3.3 Bahan Kimia

Metanol (Bratachem), kloroform (Bratachem), etil asetat (Bratachem), butanol (Harum Kimia), air suling demineralisata (diperoleh dari (Bratachem), lempeng kromatografi lapis tipis silica gel 60 F₂₄₅ (Merck, Jerman), Sephadex LH 20, Alopurinol yang berasal dari Kimia Farma, xantin (Sigma Aldrich), xantin oksidase (Sigma Aldrich), dimetil sulfoksida (Merck, Jerman), HCl, natrium sulfat anhidrat (Merck, Jerman), asam sulfat P, asam asetat anhidrat, serbuk seng (Merck, Jerman), serbuk magnesium (Merck, Jerman), natrium karbonat (Merck, Jerman), kalium dihidrogen fosfat (Analar), NaCl, benzen (Merck, Jerman).

3.4 Alat

Alat penguap vakum putar (Buchi[®] R11, Switzerland), *Mechanical shaker*, *freezer* (Sanyo), pipet mikro 100-1000 µl (Eppendorf) dan 10-100 µl (Thermo), spektrofotometer UV Vis (Shimadzu), kuvet kuarsa (Quartz cell) penguap putar vakum (Janke & Kunkel IKA), pHmeter (Eutech pH-510), bejana kromatografi, vortex mixer (Health), timbangan digital (And), penangas air (Imperial IV) dan alat gelas lainnya.

3.5 Pembuatan Pelarut dan Larutan untuk Reaksi

3.5.1 Pembuatan larutan

3.5.1.1 Pembuatan larutan Dikalium Hidrogen Fosfat (K_2HPO_4) 1 M

Ditimbang 87,09 gram K_2HPO_4 dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi 500,0 mL yang telah diisi aqua demineralisata bebas CO_2 250 mL diaduk rata kemudian volume dicukupkan hingga volume akhir.

3.5.1.2 Pembuatan larutan Kalium Dihidrogen Fosfat (KH_2PO_4) 1 M

Ditimbang 68,045 gram KH_2PO_4 dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi 500,0 mL yang telah diisi aqua demineralisata bebas CO_2 250 mL diaduk rata kemudian volume dicukupkan hingga volume akhir.

3.5.1.3 Pembuatan Dapar fosfat 0,05 M pH 7

Dipipet 61,5 ml larutan K_2HPO_4 1 M dan 38,5 ml larutan KH_2PO_4 dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi 2000,0 mL dan telah diisi 500 mL aqua demineralisata bebas CO_2 , aduk rata kemudian volumenya dicukupkan hingga volume akhir. pH larutan diperiksa dengan pH meter dan di adjust dengan larutan K_2HPO_4/ KH_2PO_4 .

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

Dipipet 71,7 ml larutan K_2HPO_4 1 M dan 28,3 ml larutan KH_2PO_4 dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi 2000,0 mL dan telah diisi 500 mL aqua demineralisata bebas CO_2 , aduk rata kemudian volumenya dicukupkan hingga volume akhir. pH larutan diperiksa dengan pH meter dan di adjust dengan larutan K_2HPO_4/ KH_2PO_4 .

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

Dipipet 81,4 ml larutan K_2HPO_4 1 M dan 18,6 ml larutan KH_2PO_4 dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi 2000,0 mL dan telah diisi 500 mL aqua demineralisata bebas CO_2 , aduk rata kemudian volumenya

dicukupkan hingga volume akhir. pH larutan diperiksa dengan pH meter dan di adjust dengan larutan K_2HPO_4/KH_2PO_4 .

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

Dipipet 90,8 ml larutan K_2HPO_4 1 M dan 9,2 ml larutan KH_2PO_4 , dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi 2000,0 mL dan telah diisi 500 mL aqua demineralisata bebas CO_2 , aduk rata kemudian volumenya dicukupkan hingga volume akhir. pH larutan diperiksa dengan pH meter dan di adjust dengan larutan K_2HPO_4/KH_2PO_4 .

3.5.1.7 Pembuatan Dapar Fosfat 0,05 M pH 8

Dipipet 94,0 ml larutan K_2HPO_4 1 M dan 6,0 ml larutan KH_2PO_4 , dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi 2000,0 mL dan telah diisi 500 mL aqua demineralisata bebas CO_2 , aduk rata kemudian volumenya dicukupkan hingga volume akhir. pH larutan diperiksa dengan pH meter dan di adjust dengan larutan K_2HPO_4/KH_2PO_4 .

3.5.1.8 Pembuatan Larutan HCl 1 N

Dipipet 9 mL $HCl_{(P)}$ dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi 100,0 mL dan telah terisi dengan 50 mL aqua bebas CO_2 , aduk rata kemudian volume dicukupkan hingga volume akhir.

3.5.1.9 Pembuatan Larutan NaOH 0,05 M

Ditimbang 0,2 gram dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah dikalibrasi 100,0 mL dan telah terisi dengan 50 mL aqua bebas CO_2 , aduk rata kemudian volume dicukupkan hingga volume akhir

3.5.2 Pembuatan Larutan Sampel Fraksi, Subfraksi dan Isolat

Fraksi n-butanol yang ditimbang sebanyak 10 mg menggunakan botol timbang, ditambahkan 5 tetes DMSO hingga larut kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Setelah itu diencerkan dengan air suling demineral bebas CO_2 sampai batas dan diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 $\mu g/mL$.

Larutan uji dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga diperoleh konsentrasi 100 µg/mL, 50 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL dan 5 µg/mL.

Subfraksi yang ditimbang sebanyak 5 mg menggunakan botol timbang, ditambahkan 5 tetes DMSO hingga larut kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL. Setelah itu diencerkan dengan air suling demineral bebas CO₂ sampai batas dan diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Larutan uji dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga diperoleh konsentrasi 100 µg/mL, 50 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL dan 5 µg/mL.

Isolat yang ditimbang sebanyak 5 mg menggunakan botol timbang, ditambahkan 5 tetes DMSO hingga larut kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL. Setelah itu diencerkan dengan air suling demineral bebas CO₂ sampai batas dan diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Larutan uji dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga diperoleh konsentrasi 100 µg/mL, 50 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL dan 5 µg/mL.

3.5.3 Pembuatan larutan Substrat xantin

Xantin, BM = 152,1 (Sigma Aldrich)

Substrat xantin yang ditimbang = 15,21 mg

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

Dilartkan dengan 5 tetes NaOH 1 M dan encerkan dengan aquadest sampai dengan 100 ml (0,1 liter)

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

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

3.5.4 Pembuatan Larutan Standar Alopurinol

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

3.5.5 Pembuatan Larutan Xantin Oksidase

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 % x 45,45 mg solid = 6,408 mg protein
- b. Jumlah total enzim dalam satu kemasan :
0,8 Unit/mg protein x 6,408 mg protein = 5,126 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 menggunakan botol timbang, ditambahkan 10 tetes dapar fosfat hingga larut yang dilakukan pada kotak es. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan dilarutkan ke dalam dapar fosfat sampai dengan 25,0 mL.

3.6 Cara kerja

3.6.1 Penyiapan bahan

Pertama-tama bagian akar tanaman *Acalypha indica* L. dikumpulkan. Selanjutnya dilakukan sortasi basah dengan memisahkan kotoran atau tanah yang masih menempel pada bagian akar tanaman, pencucian untuk membersihkan kotoran yang masih menempel pada akar tanaman yang telah disortasi basah, perajangan untuk memperkecil ukuran akar sehingga mempermudah proses pengeringan dan penggilingan. Setelah pengeringan, bagian akar tanaman *Acalypha indica* L. dihaluskan menggunakan penggiling.

3.6.2 Ekstraksi

Ditimbang Serbuk herba *Acalypha indica* L. sebanyak 4 kg dan dimasukkan masing-masing 500 gram ke dalam botol maserasi kemudian ditambahkan metanol sampai seluruh serbuk terendam seluruhnya atau hingga 2/3 tinggi 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 lapisan metanol tidak berwarna. Ekstrak yang diperoleh kemudian pekatkan sampai dapat dituang dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 50°C dan kecepatan 45 rpm.

3.6.3 Fraksinasi ekstrak

Ekstrak yang diperoleh dipartisi berkali-kali dengan menggunakan corong pisah. Pertama ekstrak didispersikan dalam air, kemudian ditambahkan heksan kemudian dikocok, didiamkan hingga memisah dan dipisahkan lapisan heksannya. Partisi dilakukan berkali-kali hingga lapisan heksan menjadi tidak berwarna. Diperoleh fraksi heksan dan fraksi air. Fraksi aqueous dipartisikan dengan kloroform. Diperoleh fraksi kloroform dan fase air. Fraksi aqueous dipartisikan dengan etil asetat. Diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. dipartisikan dengan n-butanol, hingga diperoleh fraksi n-butanol dan fraksi aqueous. Masing-masing fraksi dipekatkan sampai dapat dituang dengan

menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 45 rpm hingga menjadi ekstrak kental. Namun, untuk fraksi n-butanol dan fraksi air dipisahkan sampai dapat dituang, kemudian diuapkan hingga menjadi ekstrak kental menggunakan oven vakum.

3.6.4 Uji Pendahuluan Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

3.6.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebelum dilakukan optimasi konsentrasi substrat, suhu dan pH 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 preinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Setelah preinkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan selama 1 menit 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.

3.6.4.2 Penentuan Konsentrasi Substrat Xantin Optimum

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH optimum sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 dan 0,25 mM kemudian dilakukan preinkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah preinkubasi 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.

3.6.4.3 Penentuan pH Optimum

Larutan dapar fosfat 0,05 M pada pH 7 ; 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.

3.6.4.4 Penentuan 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 prainkubasi masing-masing pada suhu 20, 25, 30, 35 dan 40°C selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Campuran diinkubasi pada suhu 20, 25, 30, 35 dan 40 °C selama 30 menit. Kemudian segera tambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

3.6.4.5 Perhitungan Aktivitas Enzim

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

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

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

Satu unit xantin oksidase akan mengkonversi 1,0 μmol xantin menjadi asam urat per menit pada pH 7,5 dan suhu 25⁰C. (Sigma Aldrich, 1994).

3.6.5 Isolasi dan pemurnian ekstrak

Timbang ekstrak kental dari fraksi n-butanol sebanyak 5 gram, kemudian difraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom, fase diam sephadex LH 20 dan fase gerak metanol 50% yang ditingkatkan kepolarannya (elusi gradien). Kemudian masing-masing subfraksi dikumpulkan, dan diuji aktivitas penghambatan terhadap xantin oksidase. Subfraksi yang paling besar aktivitas penghambatannya kemudian dilakukan kristalisasi yang menghasilkan isolat. Isolat dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT), jika hanya terdapat satu bercak dapat langsung dianalisis, jika masih terdapat beberapa bercak dilakukan kembali kromatografi kolom hingga diperoleh satu bercak. Selanjutnya, dilakukan kristalisasi dan identifikasi (karakterisasi) senyawa dengan menggunakan spektrofotometer infra merah (IR), spektrofotometer massa (MS).

Penentuan spektrum infra merah, yaitu kurang lebih 2 mg kristal yang dihasilkan digerus dan dicampur dengan 98 mg KBr yang telah dikeringkan selama 24 jam pada temperatur 105⁰C, dibuat *baseline* dengan menggunakan KBr kemudian sampel dianalisis hingga diperoleh spektrum. Spektrum tersebut kemudian dilakukan analisis untuk mengetahui rumus struktur senyawa atau dapat dibandingkan dengan standar.

3.6.6 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

3.6.6.1 Pengujian Standar

Larutan standar alopurinol sebanyak 1 mL (konsentrasi 5; 10; 20; 50 dan 100 $\mu\text{g/mL}$) dtambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum, kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer selama 20 detik. 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.

3.6.6.2 Pengujian Kontrol Standar

Larutan standar alopurinol sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 5; 10; 20; 50 dan 100 $\mu\text{g/mL}$ ditambahkan 3,0 mL dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum. Larutan dilakukan prainkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan larutan HCl 1 N . Larutan campuran kemudian diinkubasikan pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai, larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

3.6.6.3 Pengujian Sampel

Fraksi n-butanol, serta subfraksi gabungan hasil kromatografi kolom diukur penghambatannya terhadap aktivitas xantin oksidase. Pengujian dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer di bawah kondisi aerob. Larutan uji sebanyak 1 mL dtambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH optimum dan 2 mL larutan substrat xantin pada konsentrasi optimum kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu optimum selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer selama 20 detik. 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.

3.6.6.4 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.

3.6.6.5 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 selama 20 detik. 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.

3.6.6.6 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 1 mL 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.

| Reagen | Volume | | | |
|--|----------|----------------|--------|----------------|
| | Blanko | Kontrol Blanko | Sampel | Kontrol Sampel |
| Sampel (inhibitor) | - | - | 1 mL | 1mL |
| Dapar | 3,9 mL | 4,0 mL | 2,9 mL | 3,0 mL |
| Substrat Xantin | 2 mL | 2 mL | 2 mL | 2 mL |
| Inkubasi (suhu optimum) | 10 menit | | | |
| Enzim | 0,1 mL | - | 0,1 mL | - |
| HCl 1 N | - | 1 mL | - | 1 mL |
| Inkubasi (suhu optimum) | 30 menit | | | |
| HCl 1N | 1 mL | - | 1 mL | |
| Serapan diukur menggunakan panjang gelombang maksimum 281,5 nm | | | | |

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

3.6.7 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 *A.indica*
Blanko (abs dengan enzim) – Kontrol blanko (abs tanpa enzim)
- B : Perubahan absorbansi larutan uji dengan ekstrak akar *A. Indica*
Sampel (abs dengan enzim) – Kontrol sampel (abs tanpa enzim)

Sebagai kontrol positif digunakan Alopurinol dengan konsentrasi 0,1; 0,25; 0,5 dan 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} dihitung menggunakan rumus persamaan regresi : $y = a + bx$, pada beberapa konsentrasi larutan sampel. Sebagai variabel x adalah konsentrasi sampel dan sebagai variabel y adalah % inhibisi. Setelah diketahui rumus persamaan regresi, nilai IC_{50} dicari dengan cara mensubstitusi nilai y dengan 50, kemudian dicari nilai x ($\mu\text{g/mL}$).

3.6.8 Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim

Uji kinetika dilakukan dengan menggunakan beberapa konsentrasi xantin sebagai substrat. Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten. Tetapan kinetika Michaelis-Menten (K_m) dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + b x$, dimana x adalah konsentrasi substrat $[S]$ dan y adalah absorbansi sampel (Murray et al, 2006).

3.6.9 Identifikasi Golongan Senyawa

Identifikasi golongan dapat dilakukan dengan reaksi warna dan kromatografi lapis tipis. Pada kromatografi lapis tipis menggunakan plat KLT yang ditotolkan sampel uji dengan menggunakan pipa kapiler, kemudian dimasukkan ke dalam bejana.

3.6.9.1 Identifikasi alkaloid

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

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

3.6.9.2 Identifikasi glikon

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

3.6.9.3 Identifikasi saponin

- a. 20% larutan antimonium-klorida dalam kloroform atau etanol. Plat KLT disemprot dengan 15-20 ml reagen kemudian dipanaskan selama 5-6 menit pada 110°C. Dievaluasi pada daerah UV 366 nm.
- b. Vanilin asam sulfat atau anis aldehid menimbulkan warna biru violet
- c. Sampel seberat 500 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL air suling panas, dinginkan, kocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 19 cm, pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N, buih tidak hilang.

3.6.9.4 Identifikasi flavonoid

- a. Semprot plat dengan larutan aluminium klorida dalam 1% etanol. Hasilnya, berfluoresensi kuning pada panjang gelombang sinar UV 366 nm.
- b. Ekstrak ditambahkan aseton, dilarutkan. Kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat dan asam oksalat, dipanaskan hati-hati dan hindari pemanasan berlebihan. Kemudian ditambahkan 10 ml eter. Diamati dengan sinar ultraviolet 366 nm. Larutan akan berfluoresensi kuning intensif (positif flavonoid).

3.6.10 Karakterisasi

- a. Spektrofotometri UV
Sampel dilarutkan dalam pelarut metanol pro analisis, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang UV-VIS.
- b. Spektroskopi IR
Penggunaan alat spektrofotometer IR yaitu dengan cara menggerus sejumlah 1 mg sampel dengan 100 mg KBr secara homogen. Campuran dikempa sehingga terbentuk sebuah pelet yang tipis kemudian diukur serapan infra merahnya.
- c. Spektrum massa dengan LC-MS
Penggunaan alat dilakukan dengan cara sebanyak 1 mg kristal dalam pelarut yang sesuai. Diambil 10 µL sampel dan disuntikkan pada LC-MS melalui kolom C-18 (2 x 150 mm) dengan kecepatan alir 0,5 mL/menit

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Simplisia

Simplisia yang digunakan adalah bagian akar *Acalypha indica* L. yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik dan dideterminasi oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (Lampiran 2). Hasil determinasi menunjukkan bahwa simplisia akar benar merupakan tanaman *Acalypha indica* L. Simplisia diekstraksi menggunakan cara maserasi yaitu cara dingin untuk menghindari pemanasan sehingga senyawa dalam tanaman *Acalypha indica* Linn. yang tidak tahan panas tidak rusak.

Serbuk simplisia *Acalypha indica* L. diekstraksi sebanyak 4,380 kg dan pelarut yang digunakan adalah metanol 20 liter. Serbuk simplisia dibagi menjadi 8 bagian kemudian dimasukkan ke dalam botol coklat. Botol yang telah dimasukkan serbuk simplisia ditambahkan metanol hingga simplisia terendam, kemudian dilakukan maserasi selama 6 jam dengan menggunakan alat *mechanical shaker* dan didiamkan selama 12 jam agar kandungan yang terdapat dalam tanaman dapat terekstraksi sempurna, selain itu agar memudahkan pada saat penyaringan sehingga tidak ada serbuk simplisia yang terbawa pada maserat yang tersaring karena serbuk simplisia mengendap di dasar botol maserasi.

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 17 kali. Larutan hasil maserasi dikumpulkan dan diuapkan menggunakan penguap putar vakum, hingga diperoleh ekstrak yang pekat. Ekstrak kental metanol diperoleh sebanyak 310,6 gram dengan rendemen 7,09%.

4.2 Fraksinasi ekstrak

Ekstrak kental metanol yang diperoleh kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan empat pelarut yang memiliki perbedaan kepolaran. Fraksinasi dimulai dengan menggunakan pelarut yang bersifat non polar, kemudian diikuti dengan pelarut yang bersifat semipolar, setelah itu menggunakan pelarut yang

lebih polar. Pelarut yang digunakan pada fraksinasi secara berurutan adalah heksan, kloroform, etil asetat, dan n-butanol, dan air. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa polar dari senyawa yang kurang polar, sehingga pada fraksi n-butanol senyawa yang kurang polar sudah tidak terkandung didalamnya melainkan sudah tertarik pada pelarut non polar yang sebelumnya digunakan.

Sebelum dilakukan proses fraksinasi, ekstrak kental metanol ditambahkan aqua demineralisata sebanyak 300 mL kemudian diaduk hingga bercampur homogen. Tujuan penambahan ini adalah agar ekstrak metanol dapat terdispersi di dalam air suling sehingga mempermudah distribusi senyawa berdasarkan kelarutannya yang terjadi selama fraksinasi.

Setelah didispersikan menggunakan aqua demineralisata, 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 larutan berwarna hijau dan dipekatkan menggunakan evaporator vakum pada suhu 50°C.

Lapisan air yang telah dipisahkan dengan heksan kemudian difraksinasi kembali menggunakan kloroform sebanyak 500 mL. Fraksinasi dilakukan sebanyak empat kali sampai dengan lapisan kloroform hampir tidak berwarna. Setelah dilakukan pengocokan dan kedua lapisan terpisah, lapisan etil asetat dipisahkan dengan lapisan air. Hasil fraksinasi berupa larutan yang berwarna hijau kecoklatan dan dipekatkan dengan evaporator vakum pada suhu 50°C sampai kental.

Lapisan air yang telah difraksinasi dengan kloroform difraksinasi kembali menggunakan etil asetat di dalam corong pisah. 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 hijau kecoklatan dan dipekatkan dengan evaporator vakum pada suhu 50°C sampai kental.

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 etil asetat hampir tidak berwarna. Baik lapisan air maupun lapisan butanol dipisahkan dengan evaporator vakum, namun pada proses pengentalan sangat sulit dengan menggunakan evaporator, oleh karena itu dilakukan proses penguapan dengan menggunakan oven vakum pada suhu 60°C hingga kental. Masing-masing ekstrak kental yang diperoleh dan rendemennya dapat dilihat pada Tabel 4.6.

4.3 Uji Pendahuluan 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.

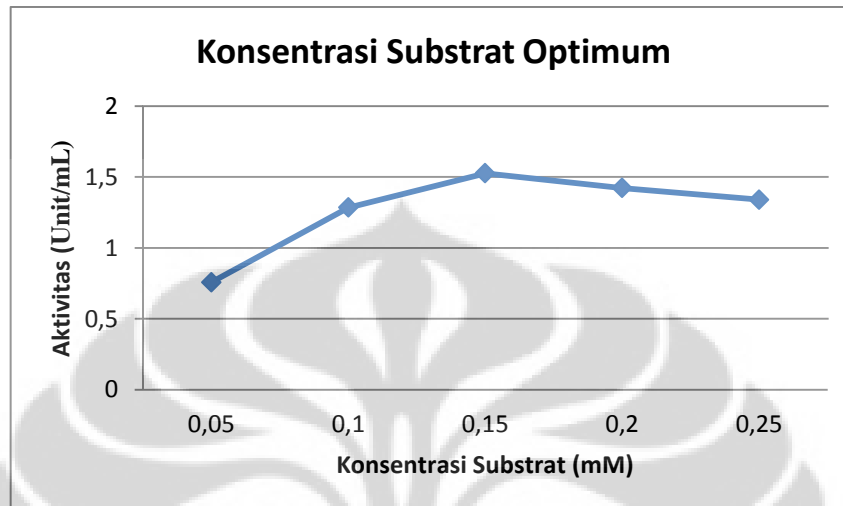
Uji pendahuluan penghambatan aktivitas xantin oksidase dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum yaitu konsentrasi substrat yang digunakan, pH yang digunakan untuk larutan uji dan suhu yang dipakai pada proses inkubasi dan pra-inkubasi. Kondisi optimum dibutuhkan agar enzim dapat memiliki aktivitas yang optimum. Serapan yang dihasilkan semakin besar maka semakin banyak produk yang dihasilkan, oleh karena itu aktivitas semakin besar.

4.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum untuk menentukan panjang gelombang maksimum yang akan digunakan pada pengujian selanjutnya yaitu pada menentukan kondisi optimum dan uji aktivitas xantin oksidase terhadap sampel. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 281,5 nm (Gambar 4.4.).

4.3.2 Penentuan konsentrasi substrat Optimum

Uji konsentrasi substrat dilakukan untuk mengetahui konsentrasi substrat optimum yang sesuai dengan enzim yang digunakan. Konsentrasi substrat yang diuji adalah 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 dan 0,25 mM. Diperoleh hasil dengan grafik aktivitas sebagai berikut:



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

Berdasarkan grafik diatas, seiring meningkatnya konsentrasi substrat terjadi peningkatan aktivitas enzim. Namun, ketika mencapai konsentrasi substrat optimum terjadi penurunan aktivitas enzim. Oleh karena itu, aktivitas enzim terbesar pada konsentrasi substrat 0,15 mM yaitu 1,526 Unit/ml. Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan laju reaksi hingga tercapai nilai maksimal V_{max} . Jika peningkatan lebih lanjut konsentrasi substrat tidak meningkatkan laju reaksi karena enzim telah jenuh oleh substrat (Murray et al, 2006)

Pada Gambar 4.1 setelah konsentrasi substrat optimum diperoleh, terjadi penurunan aktivitas pada konsentrasi substrat 0,2 mM dan terjadi penurunan kembali pada penambahan substrat dengan konsentrasi 0,25 mM. Penurunan aktivitas ini disebabkan oleh penghambatan aktivitas enzim oleh produk, yaitu asam urat. Penghambatan oleh produk tidak selalu konstan, tetapi

penghambatannya dapat meningkat seiring dengan meningkatnya pembentukan produk (Bisswanger, 2002).

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

4.3.3 Penentuan pH Optimum

Pada uji optimasi pH, variasi yang digunakan adalah pada pH 7,0 ; 7,2; 7,5; 7,8 dan 8,0. Kondisi optimum ditunjukkan pada pH 7,8 dengan serapan dan nilai aktivitas yang lebih besar dibandingkan dengan pada pH 7,0 , pH 7,2, pH 7,5 dan pH 8,0. Nilai pH yang diperoleh pada uji pendahuluan akan digunakan pada saat pengujian selanjutnya, yaitu pada saat pengujian sampel. Data serapan penentuan pH optimum dapat dilihat pada Tabel 4.8 dan grafik aktivitas dilihat pada Gambar 4.5.

4.3.4 Penentuan Suhu Optimum

Uji kondisi suhu optimum dilakukan pada suhu 20, 25 ,30, 35 dan 40°C. Prainkubasi dilakukan selama 10 menit di dalam inkubator dan bertujuan untuk menyesuaikan suhu larutan uji dengan suhu inkubasi, dimana enzim dapat bekerja dengan optimum. Setelah dilakukan pengukuran, kondisi optimum ditunjukkan pada suhu 30°C, dimana serapan dan aktivitas yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan pada suhu 20, 25, 30 dan 35°C. Suhu optimum yang diperoleh digunakan pada prainkubasi dan inkubasi pada saat pengujian sampel. Data serapan penentuan suhu optimum dapat dilihat pada Tabel 4.9 dan grafik aktivitas dilihat pada Gambar 4.6.

4.4 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase Standar dan Hasil Fraksinasi Ekstrak

Pada uji penghambatan aktivitas xantin oksidase, dilakukan pengujian terhadap standar alopurinol, sampel ekstrak, fraksi hasil kolom terbanyak dan isolat dari 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.

4.4.1 Pengujian Standar Alopurinol

Pada pengujian aktivitas penghambatan xantin oksidase menggunakan standar yaitu alopurinol. Konsentrasi alopurinol yang digunakan adalah 0,1; 0,25; 0,5 dan 1 $\mu\text{g/mL}$, diperoleh nilai IC_{50} 0,02 $\mu\text{g/mL}$. Data serapan, persen inhibisi masing-masing konsentrasi dapat dilihat di Tabel 4.5 dan grafik linier alopurinol (Gambar 4.7).

Nilai IC_{50} yang diperoleh sama dengan nilai IC_{50} yang diperoleh pada penelitian sebelumnya. Nilai IC_{50} tersebut adalah 0,018 $\mu\text{g/mL}$ (Fitriani, 2012); 24,4 μM (Kong, Zhang, Pan, Tan & Cheng, 2000); 30,7 μM (Kazuya et al., 2009), 6,75 $\mu\text{g/mL}$ (Umamaheswari et al., 2007).

4.4.2 Pengujian Hasil Fraksinasi Ekstrak

Fraksi yang dihasilkan dari fraksinasi diukur penghambatannya terhadap aktivitas xantin oksidase. Fraksi tersebut adalah fraksi n-heksana, fraksi kloroform, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol dan fraksi air. Masing-masing ekstrak kental ditimbang 10 mg dan ditambahkan satu hingga lima tetes DMSO hingga larut dan dicukupkan volumenya menggunakan aquadest bebas CO_2 sampai 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 1000 $\mu\text{g/mL}$. Penggunaan DMSO sampai dengan 5% pada konsentrasi akhir tidak mengganggu pengukuran penghambatan aktivitas xantin oksidase (Kong et al, 2000).

Masing-masing fraksi dibuat konsentrasi 1,10, 20, 50, dan 100 $\mu\text{g/mL}$ yang diencerkan dari larutan induk 1000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan yang akan diencerkan dipipet dengan menggunakan pipet volume atau pipet mikro 100-1000 dan 10-100 μL . Pengenceran dilakukan dengan menggunakan aquadest bebas CO_2 dan dicukupkan volumenya di dalam labu ukur 10,0 mL.

Pada uji penghambatan fraksi n-heksana diperoleh IC_{50} sebesar 4,69 $\mu\text{g/mL}$, pada uji penghambatan fraksi kloroform diperoleh IC_{50} sebesar 3,79 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan pada uji penghambatan fraksi etil asetat diperoleh nilai IC_{50}

sebesar 1,84 $\mu\text{g/mL}$, pada fraksi n-butanol diperoleh IC_{50} sebesar 3,68 $\mu\text{g/mL}$, dan pada fraksi air diperoleh IC_{50} sebesar 7,85 $\mu\text{g/mL}$. Serapan dan persen inhibisi masing-masing konsentrasi fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.11 – Tabel 4.15 dan grafik linier fraksi Gambar 4.8 – Gambar 4.12.

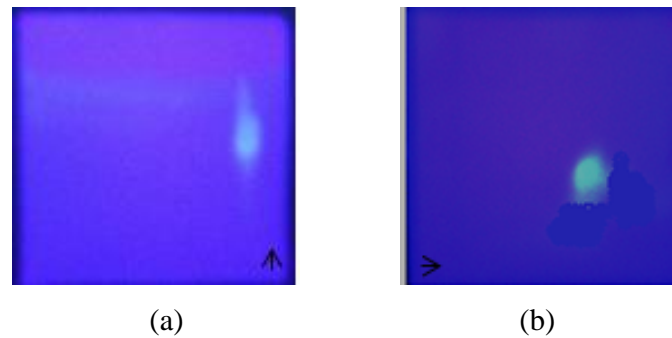
Setelah dilakukan pengujian ekstrak kental masing-masing fraksi terhadap aktivitas xantin oksidase, diperoleh hasil bahwa masing-masing fraksi dapat menghambat xantin oksidase. Nilai IC_{50} secara berurutan adalah fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} 2,49 $\mu\text{g/mL}$, fraksi n-butanol dengan nilai IC_{50} 3,68 $\mu\text{g/mL}$, fraksi kloroform dengan nilai IC_{50} 3,79 $\mu\text{g/mL}$, fraksi heksan dengan nilai IC_{50} 4,69 $\mu\text{g/mL}$ dan fraksi air dengan nilai IC_{50} 7,85 $\mu\text{g/mL}$.

4.5 Isolasi dan Pemurnian Senyawa

Setelah mengetahui aktivitas penghambatan aktivitas xantin oksidase dari masing-masing fraksi hasil partisi didapatkan ekstrak etil asetat dan n-butanol memberikan aktivitas terbesar dalam menghambat xantin oksidase dalam memproduksi asam urat. Oleh karena itu, dilakukan isolasi senyawa dari fraksi n-butanol. Isolasi dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom. Kromatografi kolom dengan diameter dan tinggi kolom 3,7 x 34 cm, menggunakan fase diam sephadex LH-20 dengan fase gerak metanol air 50% sampai metanol 100% (Gambar 4.18). Sephadex LH-20 didesain untuk pelarut organik atau campuran pelarut organik dengan air. Sephadex LH-20 dapat digunakan untuk pemisahan flavonoid (Kho K.F, 1975). Digunakan sampel sebanyak 5 gram, yang dimasukkan secara basah yaitu sampel dilarutkan terlebih dahulu pada metanol air 50%. Pergantian eluen dilakukan dengan cara berdasarkan menurunnya pita. Apabila pita pemisahan pada kromatografi kolom sudah tidak dapat turun kembali maka eluen diganti kembali dengan peningkatan kepolaran. Dari hasil kromatografi kolom diperoleh 97 subfraksi, kemudian dilakukan pengelompokan subfraksi dengan metode spektrofotometri pada rentang panjang gelombang 250 nm hingga 350 nm, sehingga diperoleh delapan subfraksi gabungan yaitu subfraksi “A-H”. Subfraksi gabungan B merupakan gabungan subfraksi 8-13 pada eluen metanol air 50% yang dilakukan uji aktivitas

dengan perolehan nilai IC_{50} paling tinggi, oleh karena itu subfraksi gabungan B dilakukan kristalisasi.

Sebelumnya subfraksi gabungan B dilakukan identifikasi, subfraksi B mengandung fenol, flavonoid dan glikosida (Gambar 4.18). Subfraksi gabungan B menghasilkan kristal sebanyak 44,1 mg. Isolat yang diperoleh dilakukan uji fitokimia yaitu uji untuk glikosida dengan menggunakan reaksi molisch, hasil positif dengan terbentuknya cincin berwarna ungu. Isolat yang diperoleh merupakan glikosida, oleh karena itu perlu diketahui senyawa yang terikat dengan gula. Isolat tersebut dilakukan kromatografi lapis tipis dua dimensi dengan dua eluen yang berbeda yaitu asam asetat glasial 1% dan butanol : asam asetat : air (4 : 1: 5). Pada eluen asam asetat 1% senyawa terelusi, dimana hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat senyawa yang terikat dengan gula karena senyawa yang tersebut dapat terelusi dalam asam asetat 1%. Diperoleh nilai R_f sebesar 0,45, namun bercak yang dihasilkan sedikit berekor, sehingga diduga isolat yang diperoleh kurang murni. Kemudian bercak tersebut dielusi kembali dengan eluen butanol : asam asetat : air (4:1:5), bercak tersebut tdielusi kembali, dimana bercak yang terelusi tersebut diduga merupakan aglikonnya. Diperoleh nilai R_f 0,29. Untuk identifikasi flavonoid yang terikat dengan gula berdasarkan hasil penelitian, digunakan kromatografi lapis tipis dan kromatografi kertas dua dimensi dengan pengembang yang berbeda yaitu asam asetat 50 % dan n-butanol : asam asetat : air (Soediro et al, 1985). Hasil kromatografi lapis tipis tersebut dilihat dibawah fluoresensi 366 nm, kemudian disemprot dengan $AlCl_3$ terbentuk warna agak kekuningan. Sehingga diduga senyawa yang terikat dengan gula merupakan flavonoid.



Keterangan:

Gambar (a): Isolat dielusi pada eluen asam asetat glasial 1%. Bercak dilihat pada sinar uv 366 nm, terlihat satu bercak noda. Bercak diperoleh harga Rf sebesar 0,45. Gambar (b): Bercak yang diperoleh dari elusi pertama (gambar.a) dielusi kembali dengan eluen butanol:asam asetat:air (4:1:5). Bercak disemprot dengan AlCl₃ terlihat warna kuning pada sinar uv 366 nm. Bercak diperoleh harga Rf sebesar 0,29.

Gambar 4.2. Kromatografi lapis tipis 2 dimensi isolat

4.6 Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase pada Subfraksi Gabungan

Fraksi hasil partisi yang dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi kolom adalah fraksi n-butanol. Hasil kromatografi kolom diperoleh 97 subfraksi dimana masing-masing subfraksi dilakukan penggabungan dengan menggunakan metode spektrofotometri sehingga diperoleh 8 subfraksi gabungan yaitu subfraksi gabungan A sampai H. Dari kedelapan subfraksi tersebut tidak dilakukan pengujian aktivitas penghambatan xantin oksidase untuk masing-masing subfraksi gabungan tersebut, pengujian hanya dilakukan pada fraksi dengan jumlah subfraksi gabungan lebih dari 100 mg. Oleh karena itu dipilih subfraksi A,B dan G. Masing-masing fraksi gabungan ditimbang 5,0 mg kemudian ditambahkan 3 tetes DMSO dan dilarutkan dengan aquades demineralisata bebas CO₂ hingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL. Pengujian dilakukan pada konsentrasi 5, 10, 20, 50 dan 100 µg/mL. Masing-masing subfraksi A,B dan G diperoleh IC₅₀ sebesar 6,07; 2,89; 5,60 µg/mL. Subfraksi B memiliki nilai IC₅₀ paling besar oleh karena itu dilakukan kristalisasi. Selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.1-4.3 dan grafik linier dilihat pada Gambar 4.12 – Gambar 4.15.

Tabel 4. 1. Data uji aktivitas penghambatan xantin oksidase oleh subfraksi “A”

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % Inhibisi | IC ₅₀ 6,07 |
|------------------------|-------------|-------------|-------------------------|--------|------------|--------------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S – KS | | |
| 5,1 | 0,743 | 0,4704 | 0,0983 | 0,372 | 37,056 | |
| 10,2 | 1,486 | 0,4685 | 0,1232 | 0,356 | 41,574 | |
| 20,4 | 2,971 | 0,4496 | 0,1445 | 0,305 | 48,375 | |
| 50,1 | 7,429 | 0,4291 | 0,1632 | 0,266 | 55,008 | |
| 102 | 14,857 | 0,3963 | 0,1781 | 0,218 | 63,114 | |
| Blanko: 0,6730 | | | Kontrol blanko : 0,0821 | | | |
| $Y = 39,682 + 1,698 x$ | | | | | | |

Tabel 4.2. Data uji aktivitas penghambatan xantin oksidase oleh Subfraksi “B”

| Konsentrasi (µg/mL) | | Absorbansi | | | % Inhibisi | IC ₅₀ 2,89 |
|------------------------|-------------|------------|-------------------------|--------|------------|--------------------------|
| Sampel | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S – KS | | |
| 5 | 0,174 | 0,3789 | 0,0471 | 0,332 | 43,475 | |
| 10 | 1,429 | 0,3534 | 0,0526 | 0,301 | 48,757 | |
| 20 | 2,857 | 0,3294 | 0,054 | 0,275 | 53,083 | |
| 50 | 7,143 | 0,2838 | 0,052 | 0,232 | 60,511 | |
| 100 | 14,286 | 0,2197 | 0,0686 | 0,151 | 74,259 | |
| Blanko : 0,6291 | | | Kontrol blanko : 0,0421 | | | |
| $Y = 43,514 + 2,242 x$ | | | | | | |

Tabel 4.3. Data uji aktivitas penghambatan xantin oksidase oleh Sub fraksi “G”

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % Inhibisi | IC ₅₀ 5,60 |
|------------------------|-------------|-------------|-------------------------|--------|------------|--------------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S – KS | | |
| 5,1 | 0,743 | 0,5862 | 0,1203 | 0,466 | 30,962 | |
| 10,2 | 1,486 | 0,5413 | 0,1320 | 0,409 | 39,407 | |
| 20,4 | 2,971 | 0,4825 | 0,1543 | 0,328 | 51,407 | |
| 50,1 | 7,429 | 0,4511 | 0,1605 | 0,291 | 56,889 | |
| 102 | 14,857 | 0,3742 | 0,1722 | 0,202 | 70,074 | |
| Blanko : 0,7820 | | | Kontrol Blanko : 0,1071 | | | |
| $Y = 36,423 + 2,424 x$ | | | | | | |

4.7 Karakterisasi Isolat

4.7.1 Spektrofotometri UV

Dalam uji ini, isolat dilarutkan dalam pelarut metanol yang dibaca dalam spektrofotometer UV untuk memastikan bahwa isolat yang diperoleh merupakan senyawa organik, diperoleh serapan pada panjang gelombang 270 dan 216 nm dengan serapan masing-masing 0,5490 dan 3,1749 (Lampiran.7). Senyawa yang dapat dibaca melalui spektrofotometer menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki gugus kromofor, sehingga dapat diketahui senyawa uji merupakan senyawa organik.

4.7.2 Spektroskopi Infra Merah (FT-IR)

Isolat ditimbang sebesar 2 mg yang dicampur dengan KBr, kemudian dilakukan pembacaan dalam spektroskopi IR. Data IR memberikan pita serapan pada daerah bilangan gelombang $825,56\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan aromatis disubstitusi posisi para, 1763 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur C=O dan 3115 cm^{-1} adanya =C-H aromatis (Lampiran.8).

4.7.3 LC-MS (Spektrum Massa)

Isolat diuji bobot molekulnya dengan menggunakan LC-MS, diperoleh satu puncak dengan waktu retensi t_R 2,2 menit. Dari hasil LC-MS diduga terdapat tiga bobot molekul senyawa yaitu m/z 137 $[M+H]^+$, m/z 252 $[M+H]^+$ dan m/z 325 $[M+H]^+$. Oleh karena itu, isolat yang diperoleh kurang murni, namun terdapat satu bobot molekul dengan intensitas paling tinggi yaitu bobot molekul m/z 325 $[M+H]^+$ (Lampiran.9).

4.8 Pengujian Aktivitas Penghambatan Xantin oksidase pada Isolat

Pada pengujian aktivitas penghambatan xantin oksidase ini adalah menguji isolat yang diperoleh dari proses rekristalisasi dua pelarut pada subfraksi B. Isolat yang diperoleh yaitu sebesar 44,1 mg. Isolat yang digunakan untuk pengujian ialah sebanyak 5,0 mg ditambahkan tiga tetes DMSO kemudian ditambahkan aquadest bebas CO_2 pada labu ukur 5,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan induk diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 1, 5, 10, 50 dan

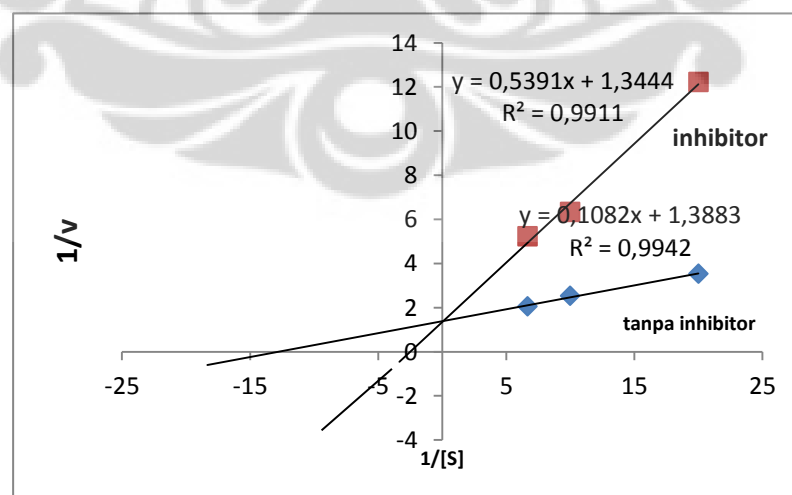
100 µg/mL. Diperoleh nilai IC_{50} sebesar 2,79. Data hasil uji penghambatan aktivitas xantin oksidase dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan grafik linier isolat pada Gambar 4.17.

Tabel 4.4. Hasil uji penghambatan xantin oksidase oleh isolat.

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % Inhibisi | IC_{50} 2,79 |
|------------------------|-------------|------------------------|----------------|--------|------------|-------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S – KS | | |
| 5,4 | 0,771 | 0,4102 | 0,0993 | 0,311 | 46,007 | |
| 10,8 | 1,543 | 0,4023 | 0,1023 | 0,300 | 47,916 | |
| 21,6 | 3,086 | 0,3922 | 0,1121 | 0,28 | 51,389 | |
| 50,4 | 7,2 | 0,3683 | 0,1215 | 0,247 | 57,119 | |
| 108 | 15,429 | 0,3324 | 0,1563 | 0,176 | 69,444 | |
| Blanko: 0,6545 | | Kontrol blanko: 0,0784 | | | | |
| $Y = 45,630 + 1,563 x$ | | | | | | |

4.9 Uji Kinetika Penghambatan Xantin Oksidase pada Isolat

Analisis kinetika penghambatan xantin oksidase dilakukan menggunakan plot Lineweaver-Burk. Sampel yang digunakan adalah isolat yang diperoleh. Konsentrasi substrat xantin pada uji kinetika penghambatan xantin oksidase adalah 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; dan 0,25 mM.



Gambar 4.3. Plot Lineweaver-Burk Isolat dengan konsentrasi xantin 10 µg/mL, 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 dan 0,25 mM.

Pada gambar 4.3. perpotongan garis regresi linier tanpa inhibitor dan isolat terletak pada sumbu y, sehingga dapat disimpulkan bahwa jenis kinetika penghambatan isolat terhadap aktivitas xantin oksidase adalah inhibisi kompetitif.

Pada uji kinetika ekstrak n-butanol pada penelitian sebelumnya menunjukkan hasil inhibisi kompetitif (Fitriani, 2012). Pada penghambatan jenis ini, inhibitor yang memiliki mekanisme penghambatan kompetitif adalah senyawa yang memiliki struktur menyerupai struktur substrat (Murray et al, 2006).

Tabel 4.5. Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten pada Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase

| Sampel | Tanpa inhibitor | Isolat 10 $\mu\text{g/mL}$ |
|--------|-----------------|----------------------------|
| A | 1,388 | 1,344 |
| B | 0,108 | 0,539 |
| R | 0,994 | 0,991 |
| Km | 0,079 | 0,401 |
| Vmaks | 0,720 | 0,744 |

Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten menunjukkan bahwa nilai Vmaks isolat dan tanpa inhibitor hampir sama, sedangkan nilai Km berbeda. Kecepatan pembentukan produk hanya bergantung pada konsentrasi enzim-substrat. Fraksi butanol memiliki nilai Km yang lebih besar, karena berikatan kurang erat dengan enzim dalam konsentrasi yang sama, sehingga tidak akan menurunkan kecepatan reaksi yang dikatalisis (Murray et al, 2006).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan pengujian penghambatan terhadap aktivitas xantin oksidase oleh akar tanaman *Acalypha indica* L, semua subfraksi hasil kromatografi kolom fraksi n-butanol merupakan fraksi aktif. Isolat yang diperoleh dari hasil kromatografi kolom diduga merupakan glikosida flavonoid yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 2,79 $\mu\text{g/mL}$. Puncak spektrum UV isolat terdapat pada 216 nm dan 270 nm dengan serapan 3,1749 dan 0,5490. Spektrum IR isolat adanya serapan pada daerah bilangan gelombang 825,56 cm^{-1} yang merupakan aromatis disubstitusi posisi para, 1763 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur C=O dan 3115 cm^{-1} adanya =C-H aromatis. Bobot molekul isolat diduga sebesar 324.

5.2 Saran

Dalam melakukan kristalisasi sebaiknya menggunakan pelarut yang baik dan bersih untuk memperkecil terjadinya masuknya pengotor dalam larutan kristal, sehingga dapat diperoleh isolat yang murni. Perlu dilakukan uji selanjutnya untuk mengetahui struktur dari isolat dengan menggunakan $^{13}\text{C-NMR}$ dan $^1\text{H-NMR}$.

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
- Azizahwati, Sumali, W., Kartika P., (2005). Efek Penurunan Kadar Asam Urat dalam Darah pada Tikus Putih Jantan dari Rebusan Akar Tanaman Akar Kucing (*Acalypha indica* Linn). *Jurnal Bahan Alam Indonesi*, 4 (1);213-218
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. (2010). *Acuan Sediaan Herbal Volume Kelima Edisi Satu*. Jakarta.
- Bergmeyer, H.U. (1965). *Methods Of Enzymatic Analysis*. New York: Verlag Chemie
- Carter, M. A. (Ed.). (2005). Gout. Dalam S. A. Price dan L. M. Wilson. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-proses Penyakit* (Ed. ke-6 Vol. 2). (Huriawati Hartanto, Natalia Susi, Pita Wulansari, dan Dewi Asih Mahanani, Penerjemah). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC, 1402-1405
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V. (1998). Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *Journal of Natural Product.*, 61; 71-76
- Fitriani, N. (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: 48-55
- Gritter, R., Bobbit, J., Schwarting, A. (1985). *Pengantar Kromatografi*. Terbitan Kedua Introduction to chromatography oleh Padmawinata K. ITB Bandung

- Hanani, E., Azizahwati, Iskandarsyah. (2007). Sediaan Kapsul Campuran Ekstrak Tanaman Akar Kucing (*Acalypha indica*) dan Susuruhan (*Peperomia pellucida*) sebagai Penurun Kadar Asam Urat [Abstrak]. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
- Harborne, J.B. (1987). Metode Fitokimia. Ter. Dari Phytochemical Methods oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: Penerbit ITB: 57-71
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok: 205-268
- Hidayat, R. (2009). *Gout dan Hiperurisemia*. Jakarta : Divisi Reumatologi, Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia: 47-48
- 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
- Huang, J., Wang, S., Zhu, M., Chen J., Zhu, X. (2011). Effects of Genistein, Apigenin, Quercetin, Rutin and Astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 49; 1943-1947
- Hungeling, M., Matthia, L., Frank, R.F., Adolf, N. (2009). Cyanogenic and non-cyanogenic pyridone glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry*, 70; 270–277
- 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
- Laurens, D.R., (2010). Skrining dan Identifikasi Aktivitas Penghambatan Enzim Xantin Oksidase oleh Beberapa Tanaman Obat di Indonesia yang Berkhasiat Sebagai Anti Hiperurisemia [Skripsi]. Depok : Program Studi Ekstensi Farmasi, Universitas Indonesia; 27
- Marks, Dawn B., Allan D. Marks, Colleen M. Smith. (1996). *Basic Medical Biochemistry :A clinical approach*. William and Wilkins; 131-133

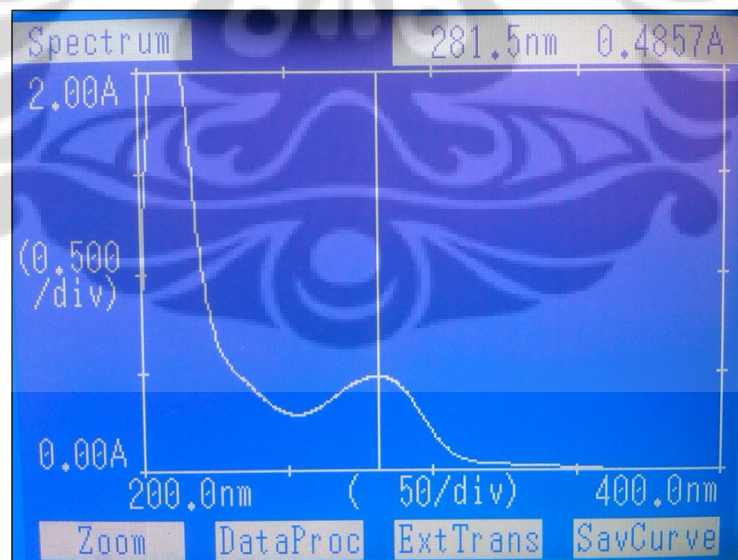
- Masih, M., Tanushree B., Bhaskar B., Anita P. (2011). Antidiabetic Activity of *Acalypha indica* L. on Normal and Alloxan Induced Diabetic Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* .
- Misnadiarly, AS. (2008). *Mengenal Penyakit Arthritis*. 15 Desember 2010.
<http://perpustakaan.depkes.go.id:8180/bitstream/123456789/603/23/y%20MediakomXII-6-08%20Hal57.pdf>
- Mun'im, A., Hanani, E.,. (2011). *Fitoterapi Dasar*. Dian Rakyat. Jakarta: 269
- Murray, R.K., Granner, D.K., Rodwell, V.W. (2006). Biokimia Harper terjemahan dari Harper's Illustrated Biochemistry 27thed oleh Brahm U dan Nanda Wulandari. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG, 65-77
- Nahrstedt, A., M. Hungeling, F. Petereit. (2006). Flavonoids from *Acalypha indica*. *Fitoterapia*. 77; 484-486
- Pribadi, E.R. (2009). Pasokan dan Permintaan Tanaman Obat Indonesia Serta Arah Penelitian dan Pengembangannya. Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik, Perspektif Vol 8, 52-54
- Robinson, Trevor. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi* (Kosasih Padmawinata, Penerjemah). Institut Teknologi Bandung. Bandung; 191-193
- Ross S.A., ElSohly M.A., Sultana G.N.N., (2005). Flavonoid Glycosides and Cannabinoids from the Pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochemical Analysis*, 16; 45-48
- Roth, Hermann J., Blaschke, Gottfried. *Analisis Farmasi*. (1985). Gajah Mada University Press. Yogyakarta: 398-399
- Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* seventh edition. John Wiley & Sons. New York: 80
- Soediro I., Aman S., Moesdarsono. (1985). *Pemeriksaan Beberapa Komponen Kimia Rimpang Pakisnaga (*Polypodium feei* Mett, Polypodiaceae)* [Abstrak]. Sekolah Farmasi ITB. Bandung
- Sudoyo, A.W., Bambang S., Idrus A., Marcellus S.K., Siti S. (2006). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta :1213-1214

- Tjitrosoepomo, G., (1991). *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press : 152-155
- Umamaheswari, M., AsokKumar, K., Sivashanmugam, A.T., Remyaraju, A., Subhadradevi, V., & Ravi, T.K. (2007). Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 547-551
- Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmugam, A.T., Remyaraju, A., Subhadradevi, V., & Ravi, T.K. (2009). In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology*, 124; 646–648
- Unno, T., Sugimoto, A., Kakuda, T.(2004). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. *Journal of Ethnopharmacology*, 93; 391-395
- Van Vakenburg, JLCH and Banyupraphatsara, N. (Editor). (2002). *Plant Resources of South East Asia* No 12(2). Medicinal and Poisonous Plants 2. Bogor: PROSEA Foundation, 34
- Wagner, H., Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Newyork: 359-364
- Wang, S.Y., Yanga, C.W., Liaob, J.W., Zhena, W.W., Chuc, F.H., & Chang S.T. (2008). Essential Oil From Leaves of *Cinnamomum Osmophloeum* Acts as a Xanthine Oxidase Inhibitor and Reduces the Serum Uric Acid Levels in Oxonate-Induced Mice. *Phytomedicine*, 15; 940-945
- Wilmana et al. (2007). *Farmakologi dan Terapi*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta:242-246

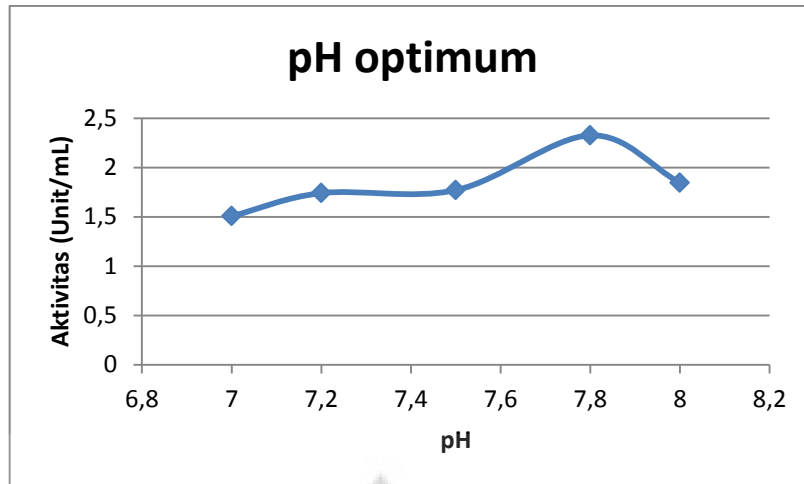
GAMBAR



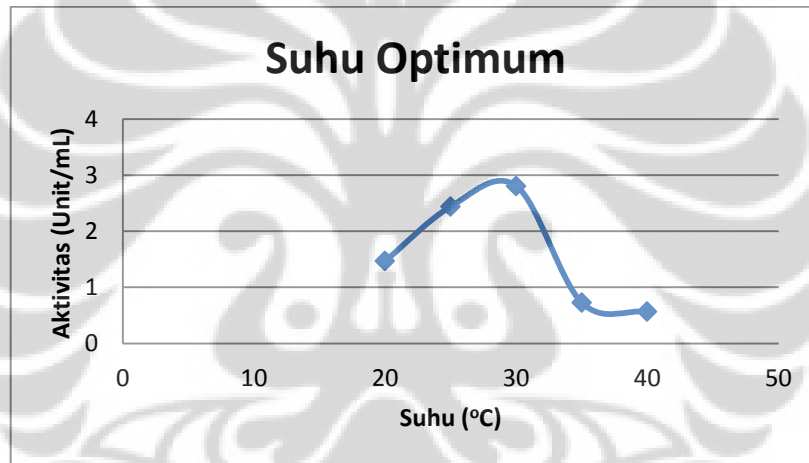
Gambar 2.1. Tanaman *Acalypha indica* L.



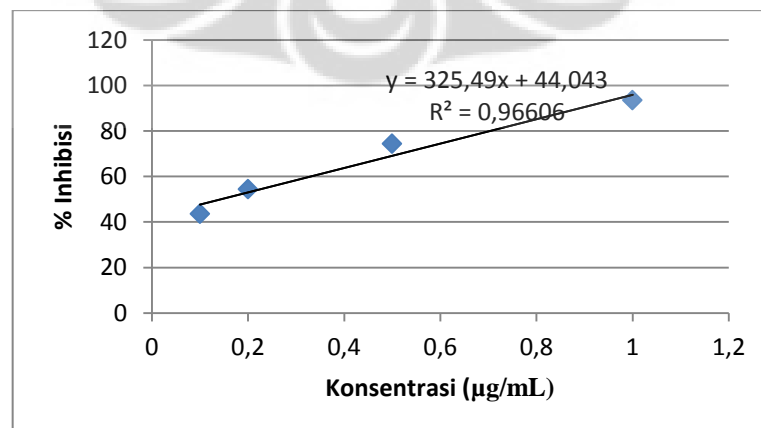
Gambar 4.4. Spektrum UV panjang gelombang maksimum pada uji aktivitas xantin oksidase



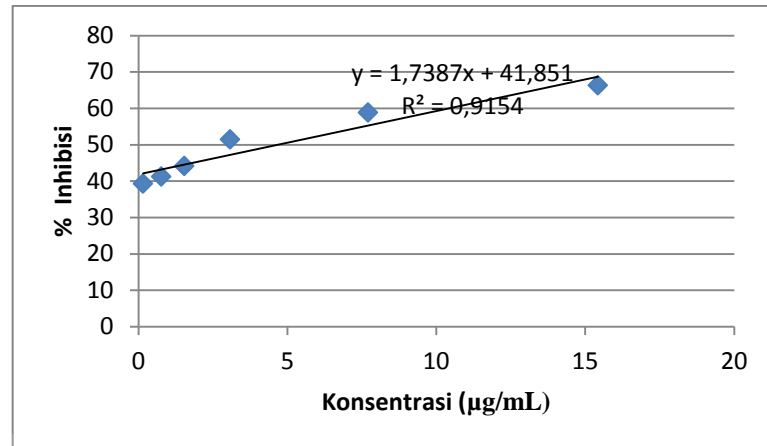
Gambar 4.5. Grafik Optimasi pH



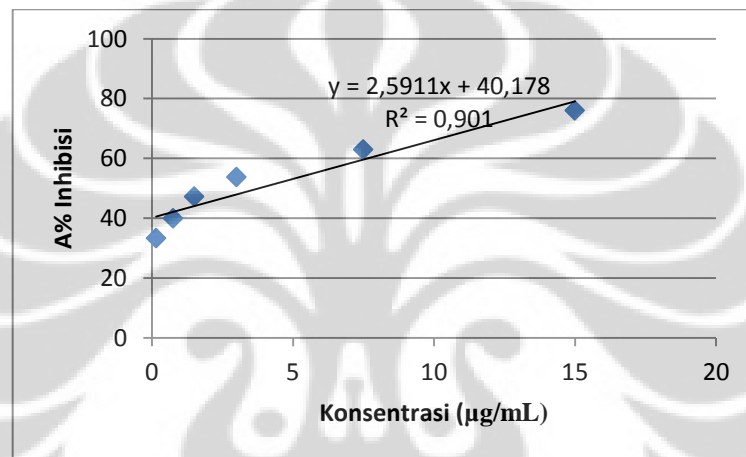
Gambar 4.6. Grafik Optimasi Suhu



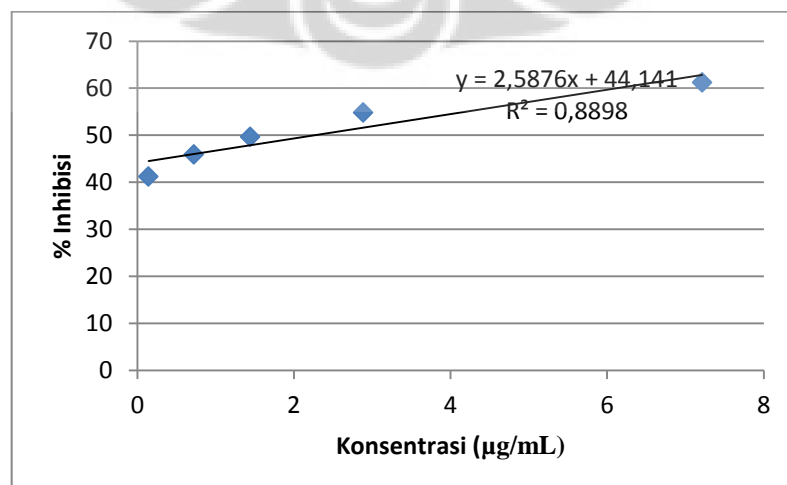
Gambar 4.7. Gambar grafik linier Alopurinol



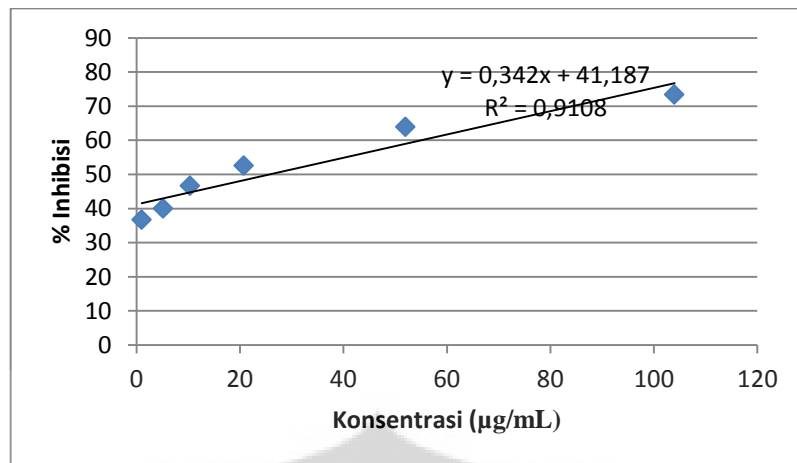
Gambar 4.8. Gambar grafik linier fraksi n-heksana



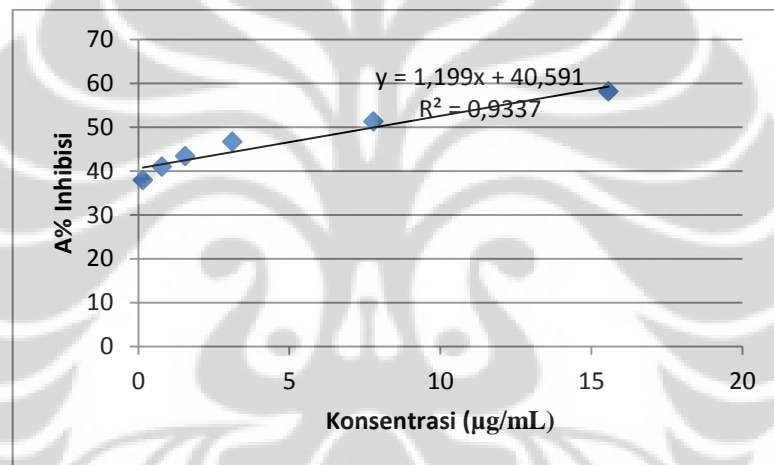
Gambar 4.9. Gambar grafik linier fraksi kloroform



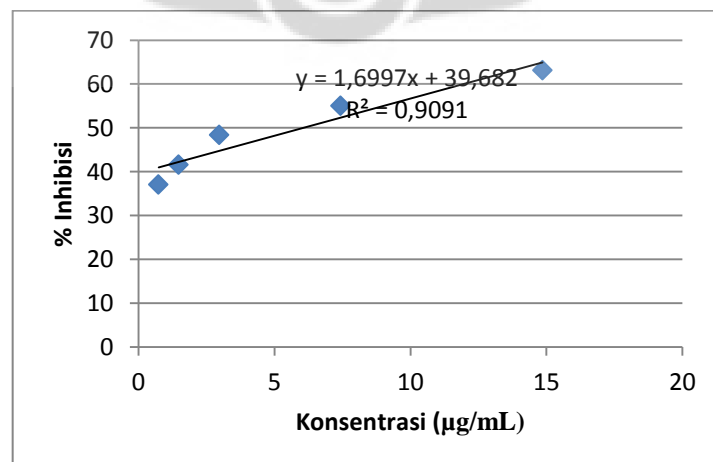
Gambar 4.10. Gambar grafik linier fraksi etil asetat



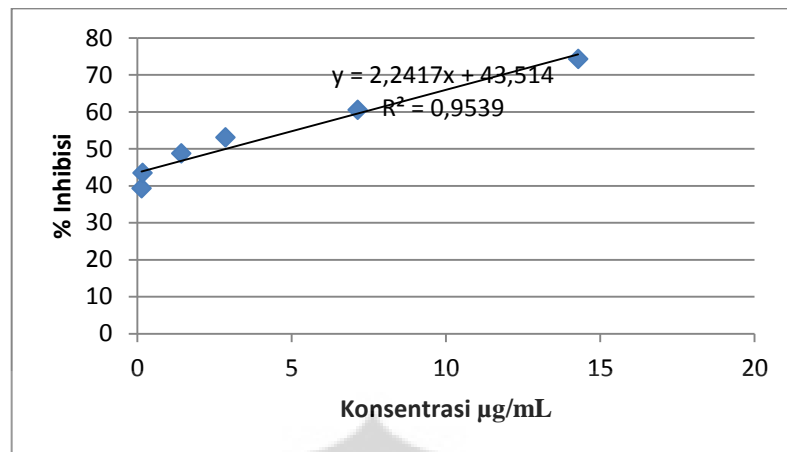
Gambar 4.11. Gambar grafik linier fraksi n-butanol



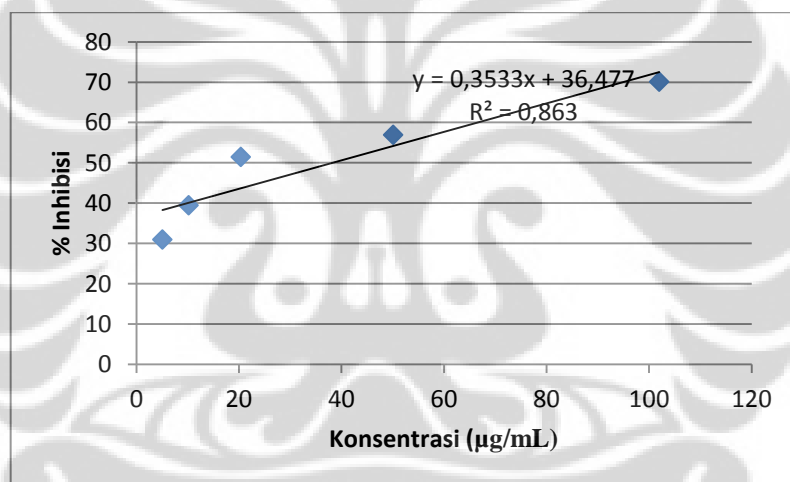
Gambar 4.12. Gambar grafik linier fraksi air



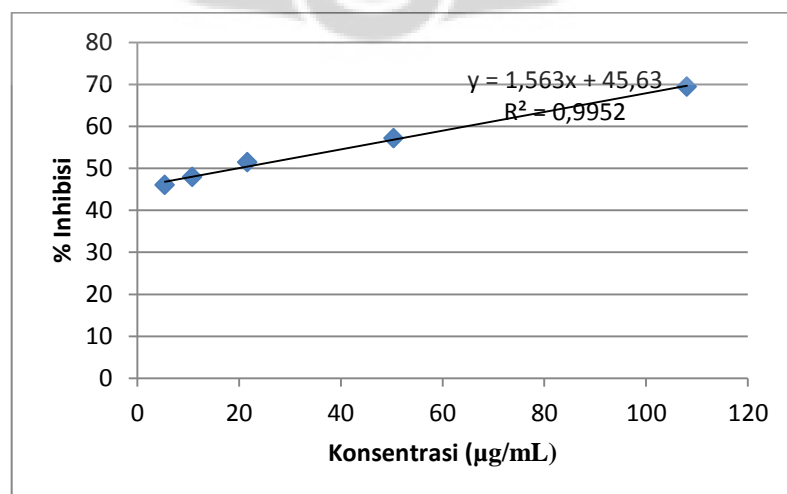
Gambar 4.13. Gambar grafik linier subfraksi A




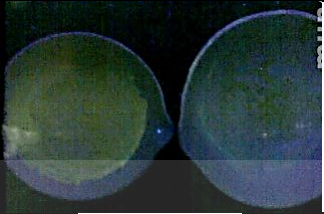
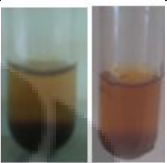
Gambar 4.14. Gambar grafik linier subfraksi B

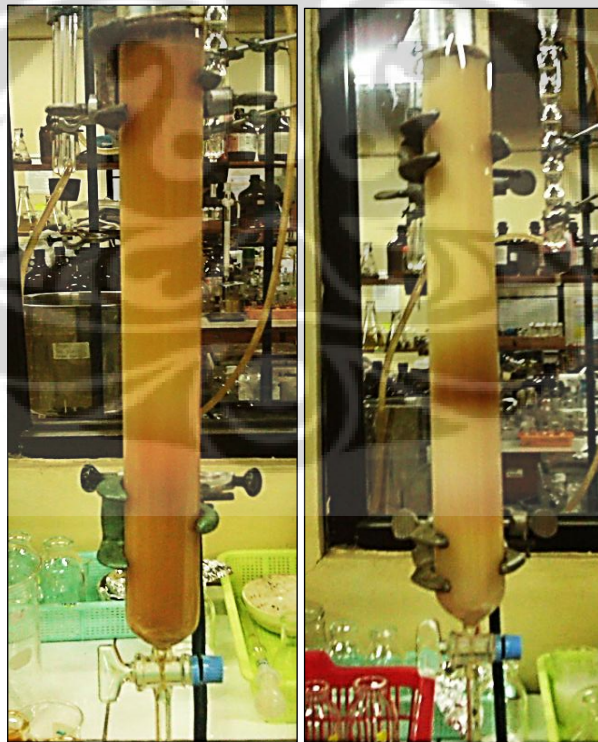


Gambar 4.15. Gambar grafik linier fraksi kolom G



Gambar 4.16. Gambar grafik linier Isolat

| | |
|--|---|
| Uji subfraksi B Uji Fenol dengan FeCl_3 |  |
| Gambar Uji subfraksi B Uji Flavonoid dengan Asam Borat + Asam Oksalat + Eter |  |
| Gambar Uji Sub Uji Glikosida dengan Peraksi Molisch |  |

Gambar 4.17. Uji Identifikasi Subfraksi B

Keterangan : Fase diam : sephadex 3,7 x 34 cm
 Fase gerak : MeOH air 50%

Gambar 4.18. Kromatografi kolom

TABEL

Tabel 4.6. 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 4.7. Data serapan pada uji pendahuluan penentuan konsentrasi substrat Optimum

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

Tabel 4.8. Data serapan pada uji pendahuluan penentuan pH optimum

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

Tabel 4.9. Data serapan pada uji pendahuluan penentuan suhu optimum

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

Tabel 4.10. Uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh Alopurinol

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % Inhibisi | IC ₅₀ |
|-------------------------|------------|-----------------|---------|--------|------------|------------------|
| µg/mL | Kons.akhir | Kontrol Standar | Standar | S - KS | | |
| 0,1 | 0,014 | 0,0228 | 0,3334 | 0,3106 | 43,691 | 0,018 |
| 0,25 | 0,036 | 0,0244 | 0,2756 | 0,2512 | 54,460 | |
| 0,5 | 0,071 | 0,0282 | 0,1694 | 0,1412 | 74,402 | |
| 1,0 | 0,143 | 0,0341 | 0,1043 | 0,0702 | 87,273 | |
| Kontrol | | 0,0646 | 0,6162 | | | |
| $y = 44,043 + 325,49 x$ | | | | | | |

Tabel 4.11. Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi n-Heksana

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % Inhibisi | IC ₅₀ |
|------------------------|-------------|-------------|----------------|--------|------------|------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S - KS | | |
| 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 | |
| Kontrol | | 0,6097 | 0,0587 | | | |
| $y = 41,851 + 1,739 x$ | | | | | | |

Tabel 4.12. Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi Kloroform

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % Inhibisi | IC ₅₀ |
|-----------------------|-------------|-------------|----------------|--------|------------|------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S - KS | | |
| 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 | |
| Kontrol | | 0,6154 | 0,0643 | | | |
| $y = 40,178 + 2,591x$ | | | | | | |

Tabel 4.13. Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi Etil Asetat

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % Inhibisi | IC ₅₀ |
|------------------------|-------------|-------------|----------------|--------|------------|------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S - KS | | |
| 1,01 | 0,144 | 0,4397 | 0,0813 | 0,3584 | 41,21 | 2,49 |
| 5,05 | 0,721 | 0,4156 | 0,0858 | 0,3298 | 45,90 | |
| 10,1 | 1,443 | 0,3965 | 0,0895 | 0,307 | 49,64 | |
| 20,2 | 2,886 | 0,3682 | 0,0927 | 0,2755 | 54,81 | |
| 50,5 | 7,214 | 0,3338 | 0,0976 | 0,2362 | 61,25 | |
| Kontrol | | 0,6829 | 0,0733 | | | |
| $y = 2,5876x + 44,141$ | | | | | | |

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

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % Inhibisi | IC ₅₀ |
|-----------------------|-------------|-------------|----------------|--------|------------|------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S - KS | | |
| 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 | |
| Kontrol | | 0,6061 | 0,0531 | | | |
| $y = 41,187 + 2,393x$ | | | | | | |

Tabel 4.15. Data uji penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh fraksi Air

| Konsentrasi | | Serapan (A) | | | % Inhibisi | IC ₅₀ |
|-----------------------|-------------|-------------|----------------|--------|------------|------------------|
| µg/mL | Kons. Akhir | Sampel | Kontrol Sampel | S - KS | | |
| 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 | |
| Kontrol | | 0,6129 | 0,0639 | | | |
| $y = 40,591 + 1,199x$ | | | | | | |

Tabel 4.16. Data serapan tanpa inhibitor pada uji kinetika

| 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 4.17. Data uji kinetika enzim isolat

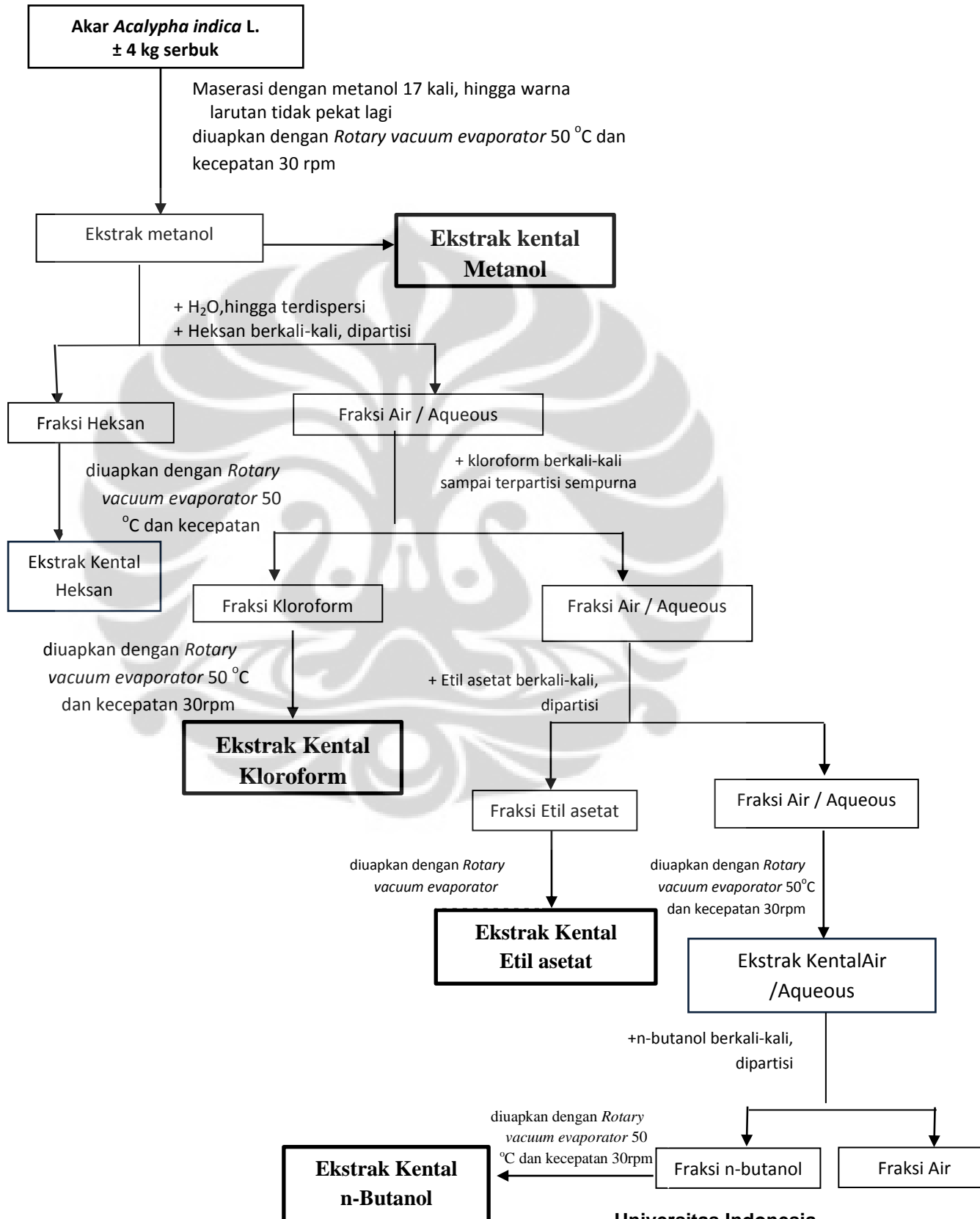
| Konsentrasi xantin (S) | Serapan | | | 1/S | 1/V |
|------------------------------|---------------|------------------------|--------|--------|---------|
| | Blanko (B) | Kontrol Blanko (KB) | B-KB | | |
| 0,05 mM | 0,1233 | 0,0415 | 0,0818 | 20 | 12,2249 |
| 0,1 mM | 0,2294 | 0,0717 | 0,1577 | 10 | 6,3412 |
| 0,15 mM | 0,2973 | 0,1063 | 0,1910 | 6,6667 | 5,2341 |
| 0,2 mM | 0,3424 | 0,1544 | 0,1880 | 5 | 5,3190 |
| 0,25 mM | 0,3038 | 0,1274 | 0,1764 | 4 | 5,6689 |

Tabel 4.18 Hasil identifikasi golongan senyawa kimia Subfraksi B

| Golongan Senyawa | Pereaksi Kimia | Isolat |
|------------------|---|--------|
| Alkaloid | Mayer | - |
| | Bouchardat | - |
| | Dragendorf | - |
| Antrakuinon | Benzen dan NaOH 2 N | - |
| Flavonoid | Serbuk As.Oksalat + As.Borat +Eter (p) | + |
| Glikosida | Reksi Molisch | + |
| Saponin | Air Panas | - |
| Fenol | FeCl ₃ | + |
| Tanin | Gelatin-NaCl | - |
| | Gelatin 10% | - |
| Terpen | Lieberman-Bouchard | - |

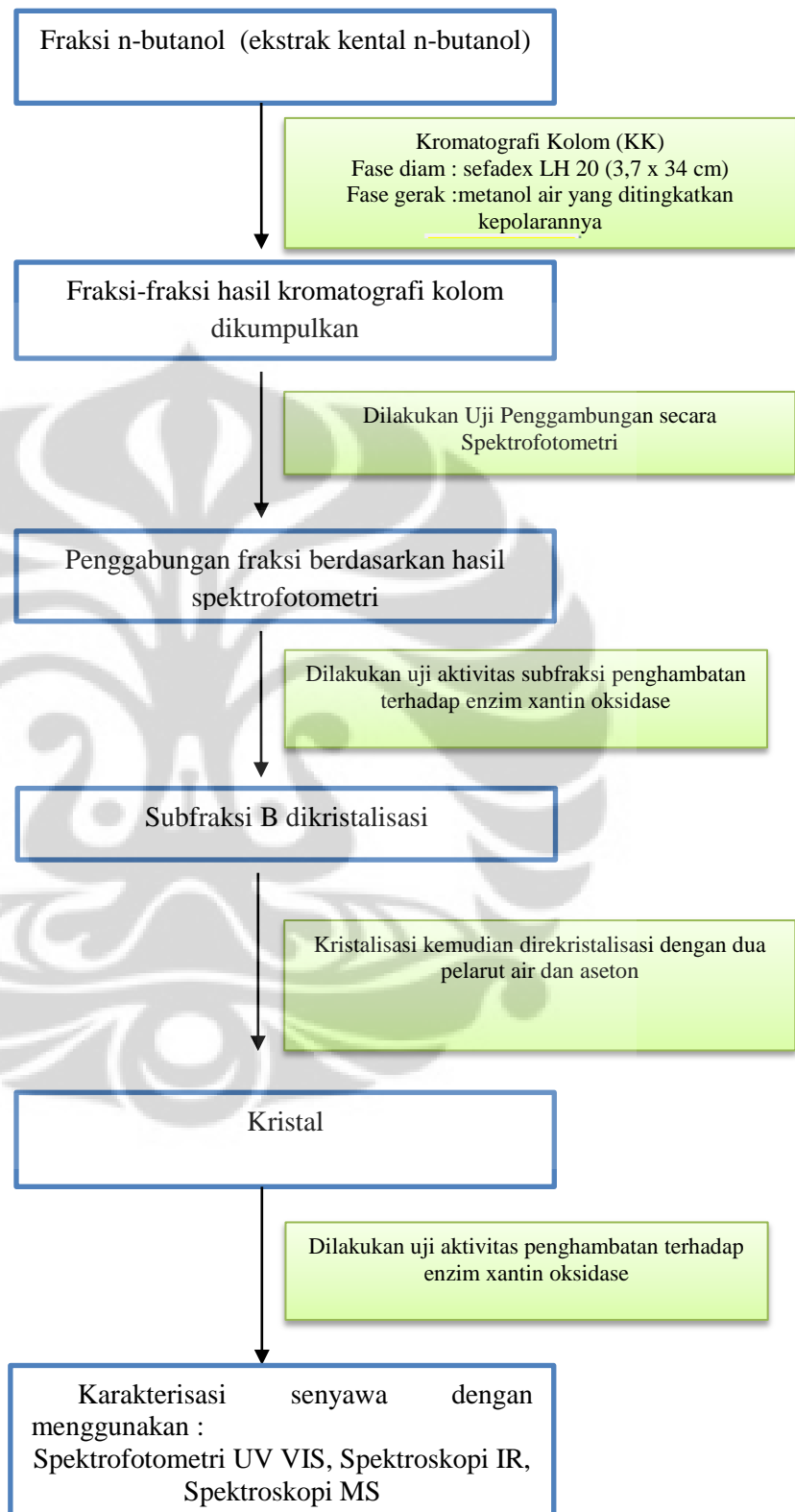
LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja

1. Ekstraksi dan partisi akar *Acalypha indica* L.

Universitas Indonesia

2. Fraksinasi ekstrak n-butanol, pemurniaan, identifikasi senyawa aktif yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim xantin oksidase.



Lampiran 2. Determinasi tanaman *Acalypha indica* L.

| | | | |
|---|--|--|---------------|
|  | | LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA (Indonesian Institute of Sciences) PUSAT PENELITIAN BIOLOGI (Research Center for Biology) Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612 | |
| | | Cibinong, 27 Februari 2012 | |
| Nomor | : 247/IPH.1.02/If.8/II/2012 | | |
| Lampiran | : - | | |
| Perihal | : Hasil identifikasi/ determinasi Tumbuhan | | |
| Kepada Yth. Bpk./Ibu/Sdr(i). Trias Kusuma Dewi Mhs. Univ. Indonesia Jakarta | | | |
| Dengan hormat, Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut : | | | |
| No. | No. Kol. | Jenis | Suku |
| 1 | Akar Kucing | <i>Acalypha indica</i> L. | Euphorbiaceae |
| Demikian, semoga berguna bagi Saudara. | | | |
| | | Kepala Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI,  Dr. Joeni Setijoe Rahajoe NIP. 196706241993032004  | |
| D:\Ident 2012\Trias Kusuma Dewi.doc\Wardi DG | | | |
| Page 1 of 1 | | | |

Lampiran 3. Sertifikat Analisis Alopurinol

kimia farma

Plant Bandung

LAPORAN ANALISA BAHAN BAKU

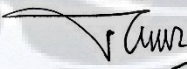
| | | |
|--|--|---|
| Nama Bahan Baku : ALLOPURINOLUM | No. Batch :20110304 Exp. Date :24-03-2015 | Kode Dok. : FQC-01-0022/00 Tgl. Berlaku : 26 Juli 2010 |
| Kode Bahan :3012010 Origin :Nanjing - China No. LA :B110626 No. SP :P113161 | Supplier :PT Parit Padang Tgl. Sampling :23-06-2011 Tgl. Selesai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

Penanggung Jawab :
MPM


(Dra. Titin Supiamah)

Bandung,, 13 Juli 2011

AMPM

(Dra. Endang Widiastuti)

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

Lampiran 4. Sertifikat Analisis Xantin Oksidase

SIGMA-ALDRICH® sigma-aldrich.com


3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: XANTHINE OXIDASE FROM BOVINE MILK

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

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



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

Lampiran 5. Sertifikat analisis xantin

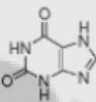
SIGMA-ALDRICH® sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: Xanthine - BioUltra, ≥99%

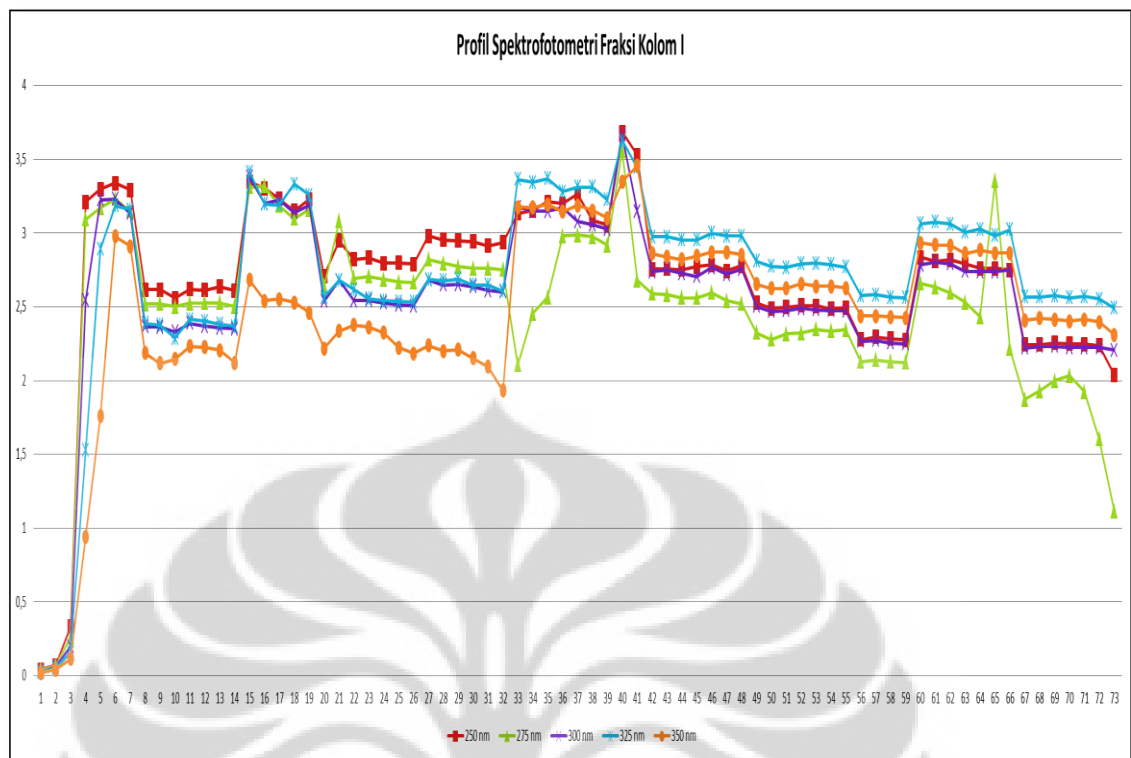
Product Number: X4002
 Lot Number: 077K53071V
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 69-89-6
 MDL Number: MFCD00078453
 Formula: C₅H₄N₄O₂
 Formula Weight: 152.11 g/mol
 Quality Release Date: 25 NOV 2008
 Date Retested: 01 JUN 2011
 Recommended Retest Date: JUN 2015



| 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% | | |

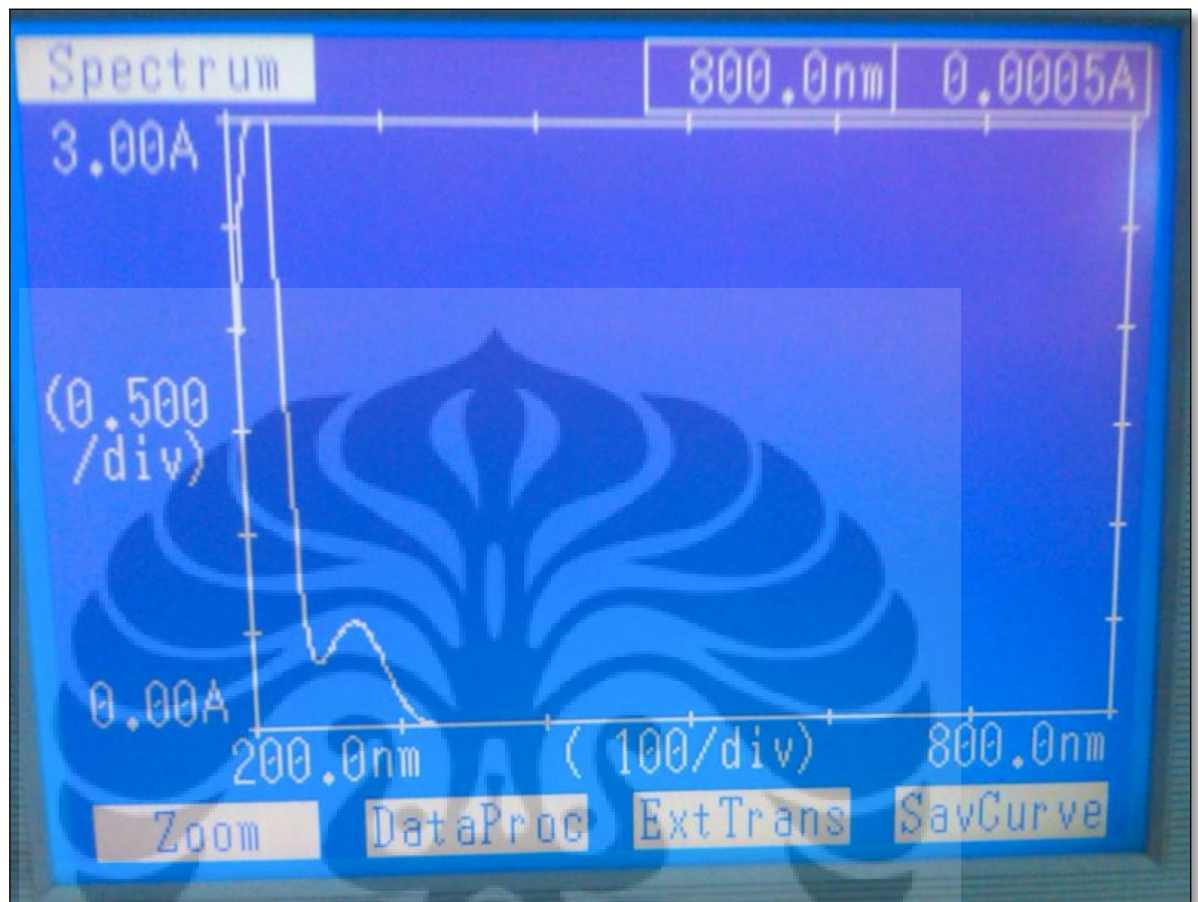
Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser 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.

Lampiran 6. Hasil pengumpulan fraksi kolom secara spektrofotometri

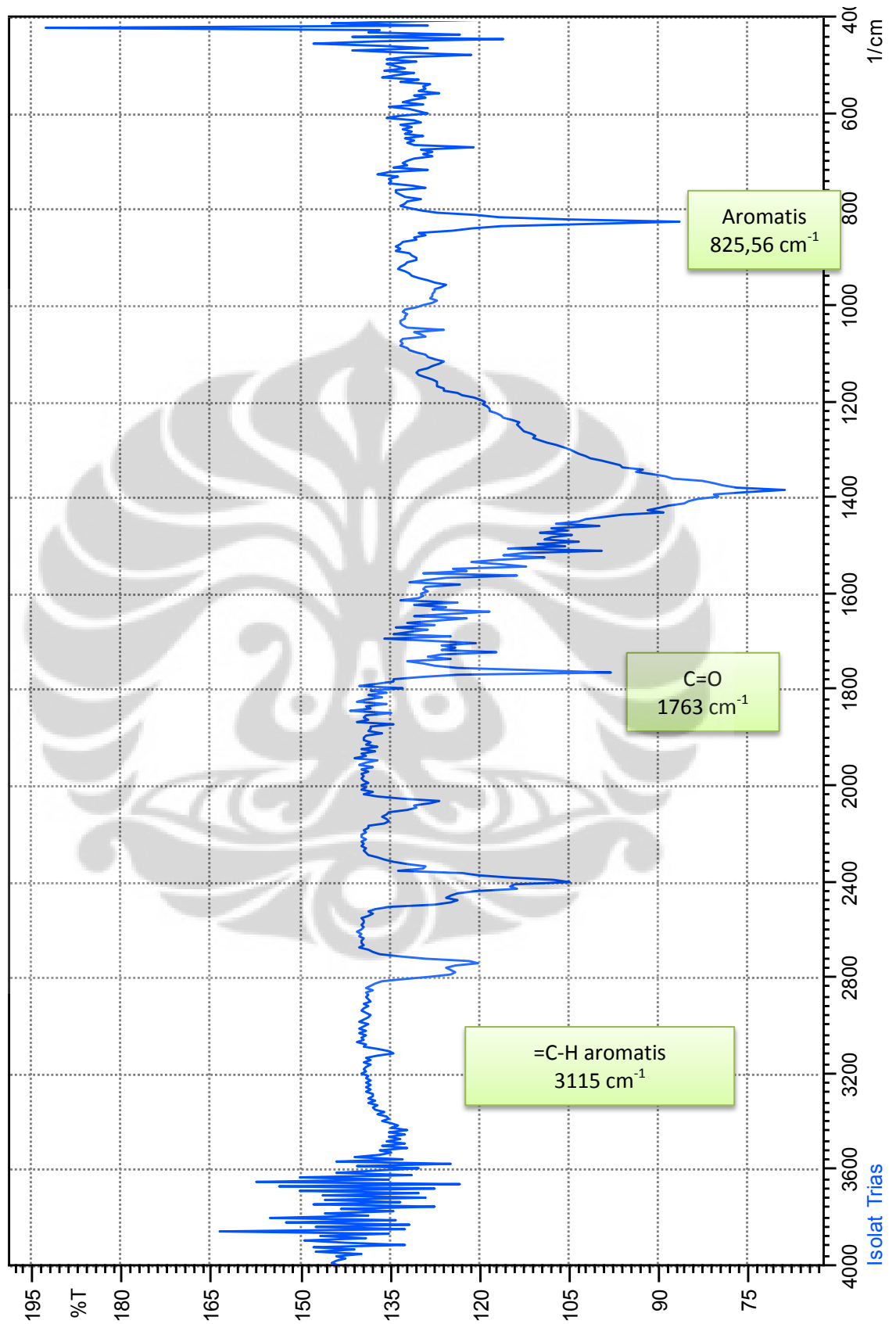


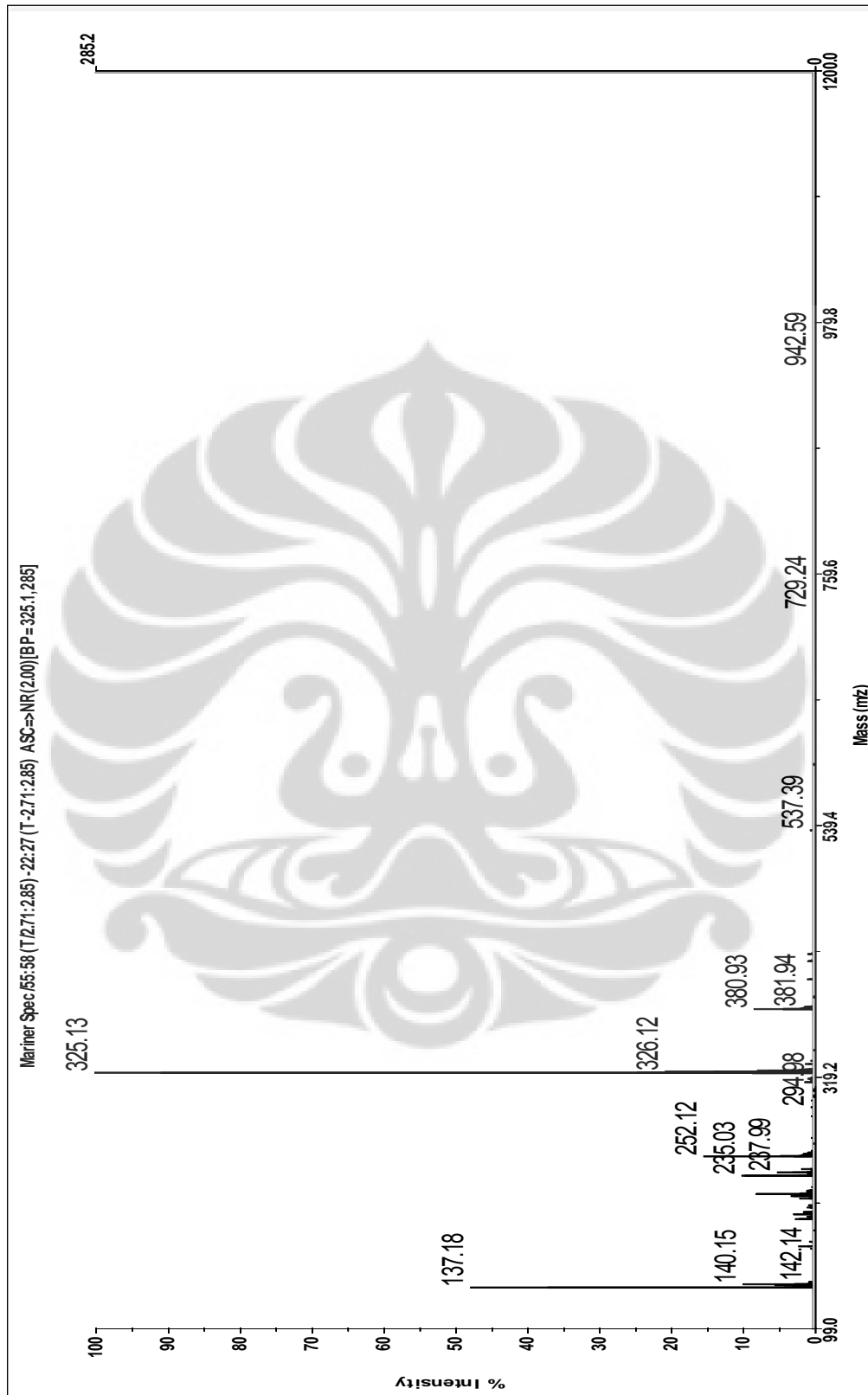
Keterangan:

- | | |
|-------------------------|---------------------|
| a. Subfraksi gabungan A | : subfraksi 1 – 7 |
| b. Subfraksi gabungan B | : subfraksi 8 – 13 |
| c. Subfraksi gabungan C | : subfraksi 14 - 20 |
| d. Subfraksi gabungan D | : subfraksi 20- 31 |
| e. Subfraksi gabungan E | : subfraksi 32- 40 |
| f. Subfraksi gabungan F | : subfraksi 41 - 57 |
| g. Subfraksi gabungan G | : subfraksi 58 – 66 |
| h. Subfraksi gabungan H | : subfraksi 67-97 |

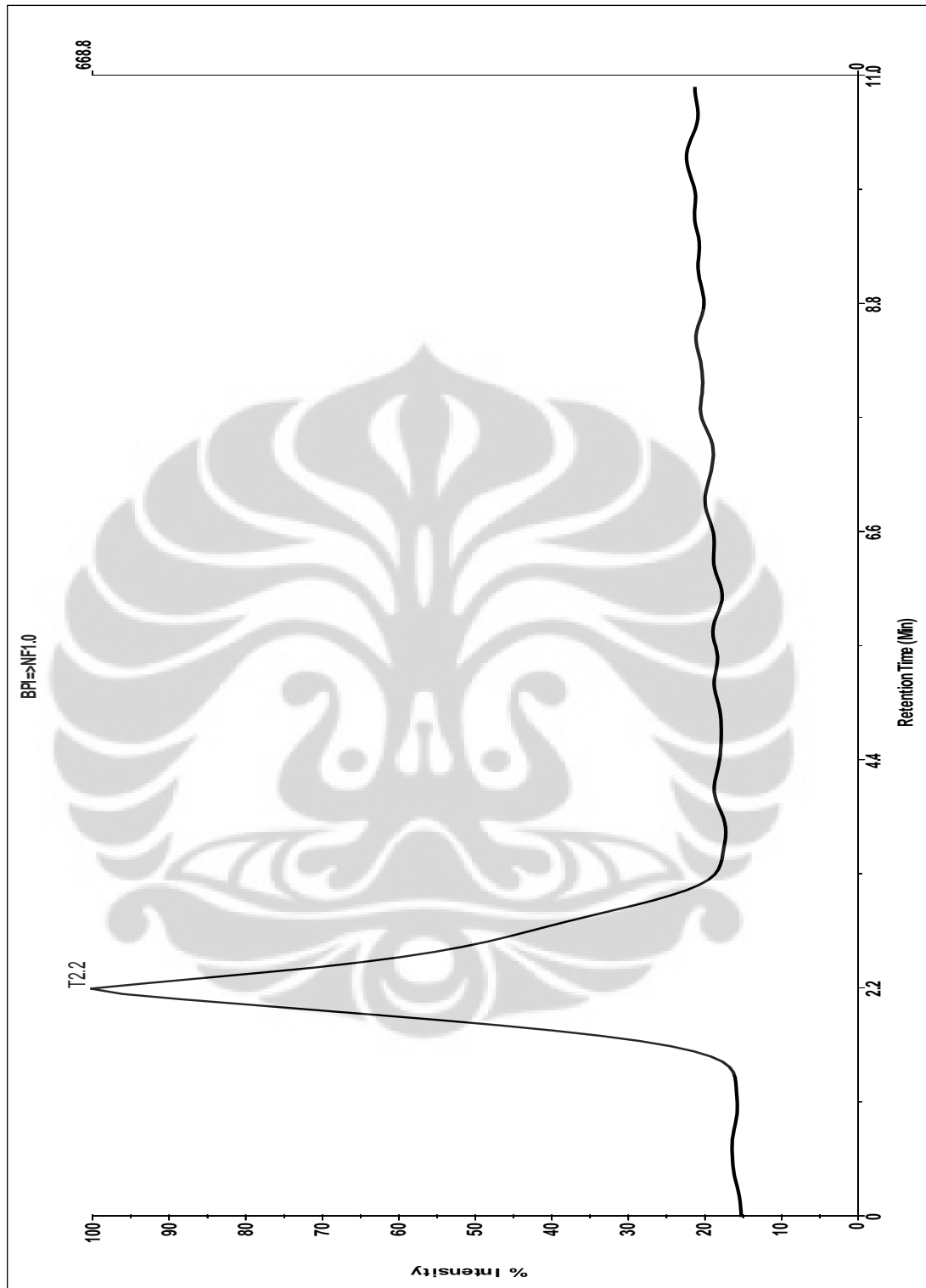
Lampiran 7. Hasil spektrum UV isolat

Keterangan : Panjang gelombang maksimum isolat pada 216 nm (3,1749 A) dan 270 nm (0,5490 A)

Lampiran 8. Hasil spektroskopi IR isolat

Lampiran 9. Hasil analisis isolat pada LC-MS

Lanjutan



Lampiran. 10 Perhitungan Nilai IC₅₀ Isolat

Perhitungan nilai IC₅₀ isolat :

| Kons. Akhir (x) | % Inhibisi (y) |
|--------------------|-------------------|
| 0,771 | 46,007 |
| 1,543 | 47,916 |
| 3,086 | 51,389 |
| 7,2 | 57,119 |
| 15,429 | 69,444 |

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

$$y = 45,630 + 1,563 x$$

Nilai y disubsitusi dengan 50, maka :

$$50 = 45,630 + 1,563 x$$

$$1,563 x = 50 - 45,630$$

$$1,563 x = 4,37$$

$$x = 2,79 \mu\text{g/mL}$$