



## **EVALUASI AKTIVITAS INHIBISI XANTIN OKSIDASE DAN KANDUNGAN SENYAWA POLIFENOL DARI EKSTRAK SAPPAN**

### **Evaluation of xanthine oxidase inhibitory activity and polyphenolic content of sappan extract**

**Sri Ningsih\*, Churiyah**

Pusat Teknologi Farmasi dan Medika – Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi  
Laptiab Gedung 610-611 Kawasan Puspiptek, Setu, Tangerang Selatan, Banten

\*Email: [sri.ningsih@bppt.go.id](mailto:sri.ningsih@bppt.go.id)

#### **ABSTRACT**

*Hyperuricemia is a disease that is characterized by a high uric acid level, in which the number of patients tends to increase every year. This research was intended to evaluate the xanthine oxidase (XO) inhibitory activity and determinate the total polyphenol content of heartwood sappan (*Caesalpinia sappan* L.) extract. The extract was prepared by macerating the dry powder wood using 70% ethanol at room temperature. The quality of ethanolic extract obtained was evaluated based on BPOM guideline. XO inhibitory power was determined by measuring uric acid produced in the xanthine/XO system *in vitro*. The polyphenol content of the extract was measured using Folin-Ciocalteu reagent spectrophotometrically. The results showed that the quality of sappan semisolid extract fulfilled the required standard. Sappan extract inhibited XO activity by 98% relative to the positive control, allopurinol, at the final extract concentration of 100 µg/mL. The total polyphenol content was 26% of the crude extract. It could be concluded that sappan ethanolic extract has the potential to be developed as an ingredient for hyperuricemia treatment.*

**Keywords:** *hyperuricemia, sappan, total polyphenol, xanthine, xanthine oxidase*

#### **ABSTRAK**

Hiperurisemia adalah penyakit yang dicirikan dengan kadar asam urat tinggi dimana prevalensi penderita cenderung meningkat. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aktivitas ekstrak kayu sappan (*Caesalpinia sappan* L.) dalam menghambat enzim XO (*xantin oksidase*) secara *in vitro* dan penentuan kadar senyawa polifenol total yang terkandung di dalamnya. Ekstrak dibuat dengan cara maserasi serbuk kayu menggunakan pelarut etanol 70% pada suhu kamar. Kualitas ekstrak dievaluasi mengacu pada parameter karakteristik ekstrak yang ditetapkan oleh BPOM. Aktivitas inhibisi XO ditetapkan dengan mengukur kadar asam urat yang terbentuk pada sistem xantin/XO *in vitro*. Kadar polifenol ekstrak diukur menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu secara spektrofotometri. Hasil analisis menyatakan bahwa kualitas ekstrak kental sappan memenuhi persyaratan yang ada. Pengujian inhibisi XO dengan pembandingan positif allopurinol pada konsentrasi akhir ekstrak sebesar 100 µg/mL menunjukkan bahwa ekstrak mempunyai kekuatan menghambat XO sebesar 98% relatif terhadap pembandingan positif allopurinol. Kadar senyawa polifenol total dalam ekstrak sappan sebesar 26% dari ekstrak kasar. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak sappan mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai bahan untuk mengatasi hiperurisemia.

**Kata Kunci:** hiperurisemia, polifenol total, sappan, xantin, xantin oksidase

## PENDAHULUAN

Hiperurisemia adalah suatu kondisi dimana kadar asam urat dalam darah tinggi. Hiperurisemia kronis akan mengakibatkan penimbunan kristal monosodium urat pada persendian. Kondisi ini dapat memunculkan kelainan *arthritis gout* (AG), yaitu berupa serangan rasa nyeri mendadak dan berulang pada persendian. Kristal ini juga dapat mengendap dan membentuk batu di dalam ginjal sehingga menyebabkan penurunan fungsi ginjal (Maiuolo et al. 2016).

Prevalensi penderita hiperurisemia dan AG cukup tinggi dan menunjukkan adanya kecenderungan meningkat sepanjang tahun. Survei kesehatan nasional melaporkan jumlah penderita AG pada tahun 1992 sebesar 2 juta kasus dan pada tahun 1996 pada pria meningkat lebih dari 4,6%, sedangkan pada wanita meningkat 2%. Data nasional menunjukkan bahwa hampir 32% serangan AG terjadi pada usia dibawah 34 tahun (Maupé dkk. 2010).

Kadar asam urat dalam tubuh tergantung dari 3 proses yaitu konsumsi makanan tinggi purin, produksi asam urat dan pengeluaran asam urat. Kondisi tinggi asam urat dalam darah disebabkan dari produksi asam urat berlebih atau penurunan ekskresi atau kombinasi keduanya. Diantara beberapa mekanisme menurunkan kadar urat dalam tubuh, mekanisme yang paling potensial adalah dengan menekan produksi asam urat khususnya untuk kondisi hiperurisemia kronik (Ling dan Bonchu 2014). Metabolisme asam urat dalam tubuh dilakukan oleh enzim xantin oksidase (XO). Selama proses metabolisme tersebut, dihasilkan senyawa radikal reaktif  $\text{OH}^-$  dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang bersifat toksik bagi sel. XO terlibat dalam berbagai bentuk iskemia, gangguan vaskular, penyakit inflamasi dan gangguan jantung kronik (Gliozzi et al. 2016).

Tatalaksana pengobatan penderita AG dilakukan melalui kombinasi antara mengatur gaya hidup dengan mengurangi konsumsi makanan tinggi purin dan disertai penggunaan obat bahan kimia seperti allopurinol, kortikotropin, kortikosteroid, kolkisin, dan antiinflamasi nonsteroid pada serangan akut atau tujuan pencegahan. Namun demikian, penggunaan obat kimia tidak menutup kemungkinan memberikan efek samping (Ling dan Bonchu 2014).

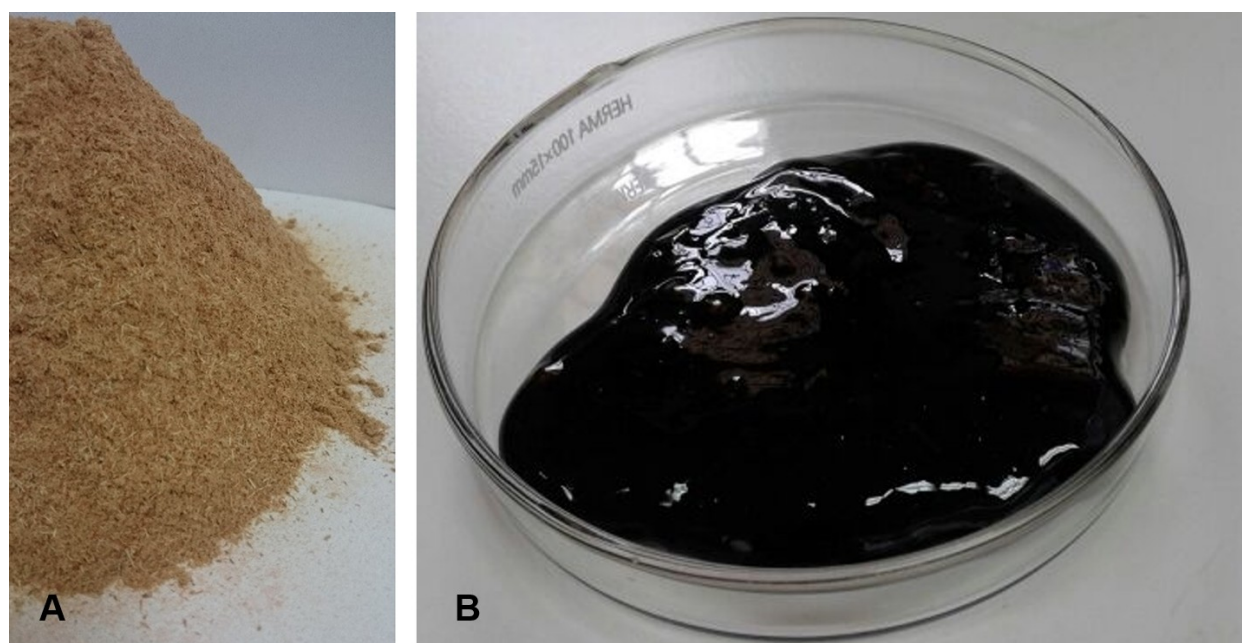
Telah dibuktikan bahwa bahan alam dengan kandungan flavonoid tinggi yang mempunyai efek sebagai antioksidan berkhasiat sebagai penurun asam urat (Spanou et al. 2012). Indonesia mempunyai kekayaan alam yang melimpah baik dari sumber tanaman, hewan dan mineral. Beberapa tanaman sudah terbukti bermanfaat dalam bidang pengobatan dan digunakan secara turun temurun. Sehingga hal ini merupakan salah satu peluang yang sangat strategis dalam upaya pencarian sumber tanaman khususnya yang bermanfaat sebagai bahan obat dalam mengatasi permasalahan hiperurisemia.

Tanaman sappan (*Caesalpinia sappan*) telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat dalam mengatasi penyakit (Zanin et al. 2012). Kandungan senyawa kimia yang ada di dalamnya membuat tanaman ini mempunyai berbagai aktivitas farmakologi. Sappan secara tradisional digunakan dalam bentuk ramuan untuk mengatasi kondisi hiperurisemia (Aditama 2015), selain sebagai pewarna dalam makanan (Ohama dan Tumpat 2014). Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa kulit kayu sappan mempunyai aktivitas inhibisi XO (Pertamawati dan Hardhiyuna 2015). Ekstrak metanol kayu sappan juga telah dibuktikan mampu menekan aktivitas enzim XO (Nguyen et al. 2004b).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengelaborasi aktivitas ekstrak kayu sappan dalam menghambat XO. Ekstrak dibuat dengan menggunakan simplisia kayu sappan yang diperoleh secara lokal dan menggunakan pelarut campur etanol-air dengan konsentrasi etanol 70%. Pemilihan jenis pelarut dengan memperhatikan kemudahan jika akan dilakukan aplikasi pada skala industri lebih lanjut. Diharapkan dari penelitian ini akan diperoleh informasi tentang spesifikasi dan kekuatan ekstrak etanol 70% kayu sappan dalam menghambat enzim XO secara *in vitro* dibandingkan dengan obat kimia allopurinol yang umum digunakan dalam mengatasi kondisi kadar asam urat tinggi. Dengan demikian akan diperoleh informasi potensi tanaman sappan sebagai antihiperurisemia.



Gambar 1. Pohon (A) dan kayu sappan (B)



Gambar 2. Serbuk kayu (A) dan ekstrak kental kayu (B) sappan

## BAHAN DAN METODE

### Bahan penelitian

Simplisia kayu sappan, etanol *food grade*, asam galat standar (Merck), Folin Ciocalteu (Sigma), natrium karbonat *p.a.* (Merck), dimetil sulfoksida (DMSO) (Sigma), *potassium phosphate monobasic* (Sigma P 0662), *sodium hydroxide* (Sigma, 221465), *hydrochloride acid* (Merck), *xanthine* (Sigma X0626), *xanthine oxidase* (Sigma X4375), akuades, akua demineral, *hydranal composite 5* (Merck), *hydranal methanol dry* (Merck), allopurinol (tablet generik).

### Penyiapan ekstrak

Kayu sappan (Gambar 1A) diperoleh dari daerah Tawangmangu Surakarta. Guna memastikan kebenaran tanaman yang akan digunakan dalam penelitian ini, maka dilakukan determinasi taksonomi tanaman yang dilakukan oleh Pusat Penelitian Biologi-LIPI Cibinong, secara morfologi. Sebelum diekstrak, kayu sappan dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara dioven, selanjutnya dihaluskan dengan mesin *grinding* (Gambar 1B). Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi sebagai berikut: sebanyak 250 g serbuk kayu

(Gambar 2A) dimaserasi menggunakan pelarut 1 L etanol 70% pada suhu kamar dengan pengadukan selama 12-14 jam. Selanjutnya filtrat dipisahkan dengan cara penyaringan, ampas diekstraksi ulang sekali lagi. Filtrat disatukan dan diuapkan menggunakan mesin vakum *rotavapour* hingga diperoleh ekstrak kental (Gambar 2B).

### Karakterisasi ekstrak

Pada ekstrak kental dilakukan karakterisasi yang meliputi parameter kadar abu, kadar abu tidak larut asam, kadar senyawa larut etanol, kadar senyawa larut air, susut pengeringan, cemaran logam berat, dan cemaran mikroba, dengan mengacu pada Pedoman Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat (Depkes RI 2000).

### Pengujian inhibisi xantin oksidase

Evaluasi aktivitas inhibisi XO secara *in vitro* mengacu pada penelitian sebelumnya (Apaya dan Hernandez 2011; Ningsih dan Fahrudin 2018) dengan modifikasi, secara jelasnya sebagai berikut: sebagai media digunakan buffer fosfat pH 7,5 yang disiapkan dengan cara melarutkan 7,071 g  $K_2HPO_4$  dan 1,279 g  $KH_2PO_4$  dengan 900 mL akuades bebas  $CO_2$  hingga homogen. Selanjutnya pH larutan ditetapkan menjadi 7,5 dengan menambahkan larutan NaOH 1 M, kemudian larutan ditambah dengan akuades bebas  $CO_2$  hingga volume 1000 mL.

Substrat xantin dibuat secara segar sebelum digunakan dengan cara melarutkan sebanyak 22 mg xantin dalam 100  $\mu$ L NaOH encer, kemudian ditambahkan aquades hingga 1 L dalam labu takar. Nilai pH ditetapkan hingga pH 7,5 pada suhu kamar dengan menggunakan larutan HCl/NaOH encer.

Larutan induk enzim XO disiapkan dengan cara melarutkan sejumlah 10 mg (~8 unit/10 mL) enzim dalam 10 mL dapar fosfat pH 7,5 pada suhu 25°C. Larutan induk di-*aliquot* dalam tabung plastik *disposable* 1 mL (0,8 unit/mL), disimpan pada suhu -20°C. Larutan induk tidak boleh di-*rethawing*.

Berdasarkan hasil optimasi sebelumnya bahwa konsentrasi larutan kerja enzim paling optimal adalah 0,2 UI/L yang dibuat dengan mengencerkan 1 mL larutan induk dengan 4 mL dapar fosfat pH 7,5

**Tabel 1.** Komposisi pereaksi pada pengukuran inhibisi XO

Pereaksi	Kontrol enzim ( $\mu$ L)	Blanko enzim ( $\mu$ L)	Sampel/ Allopurinol ( $\mu$ L)	Blanko sampel ( $\mu$ L)
Sampel/ Allopurinol <sup>1)</sup>	–	–	100	100
Buffer fosfat <sup>1)</sup>	800	840	700	740
Xantin <sup>1)</sup>	160	160	160	160
XO <sup>2)</sup>	40	–	40	–

Keterangan:

<sup>1)</sup> Diinkubasi pada 37°C selama 5'

<sup>2)</sup> Diinkubasi pada 37°C dan absorbansi diukur setiap menit selama 4 menit pada  $\lambda$ -maks. 290 nm menggunakan spektrofotometer UV-vis

hingga memberikan konsentrasi sekitar 0,2 unit/mL.

Larutan induk sampel uji dibuat dengan cara melarutkan 10 mg ekstrak kental dalam 200  $\mu$ L DMSO hingga larut, kemudian ditambah 300 mL dapar fosfat pH 7,5. Selanjutnya larutan induk ini diencerkan menggunakan buffer fosfat pH 7,5 hingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan ini digunakan untuk pengujian.

Sebagai pembandingan positif digunakan sediaan tablet allopurinol (generik) dengan penyiapan sebagai berikut: sebanyak 1 tablet allopurinol 100 mg digerus hingga halus, dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan ditambah dengan buffer fosfat pH 7,5 hingga tanda batas. Untuk membantu melarutkan allopurinol, labu disonikasi atau divorteks selama 10 menit. Selanjutnya filtrat dipisahkan dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm pada suhu kamar selama 5 menit. Filtrat digunakan untuk pengujian.

Pengukuran aktivitas inhibisi enzim XO dilakukan sebagai berikut: ke dalam kuvet kuarsa 3 mL dimasukkan secara berturut-turut larutan sampel uji dan larutan substrat, kemudian diinkubasi pada 37°C selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan penambahan larutan kerja enzim dan dikocok hingga homogen. Pengukuran kadar asam urat yang terbentuk dilakukan segera setiap menit selama 4 menit menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 290 nm. Selama pengukuran absorbansi, kuvet tetap diinkubasi pada suhu 37°C. Kurva yang menyatakan hubungan antara absorbansi terhadap waktu

**Tabel 2.** Hasil uji karakterisasi ekstrak

No	Parameter	Hasil	Syarat*)
1.	Kadar air	7,50%	<10,0%
2.	Abu total	2,29 ± 0,032%	<2,2%
3.	Abu tidak larut asam	0,08 ± 0,051%	<0,6%
4.	Sari larut etanol	8,50 ± 0,25%	>1,0%
5.	Sari larut air	7,50 ± 0,46%	>2,0%
6.	Susut pengeringan	47,86 ± 0,22%	–
7.	Logam berat:		
	Pb	Negatif	≤ 10 mg/kg
	Cd	Negatif	≤ 0,3 mg/kg
	As	Negatif	≤ 5 mg/kg
	Hg	Negatif	≤ 0,5 mg/kg
8.	Angka kapang/ khamir	< 10 <sup>3</sup> CFU/g	< 10 <sup>4</sup> CFU/g

\*) Depkes RI (1989)

dibuat, dan nilai *slope* (kemiringan) dari persamaan regresi ditentukan dengan menggunakan program *Microsoft Excel*. Kontrol enzim dibuat dimana sampel diganti dengan buffer fosfat. Blanko sampel dibuat dengan menambahkan larutan kerja sampel uji dan buffer fosfat tanpa larutan enzim dan larutan substrat. Buffer fosfat digunakan sebagai blanko kontrol enzim. Komposisi pereaksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Persen inhibisi XO dihitung dengan persamaan berikut:

% *Inhibisi* =

$$\left[ 1 - \frac{(\text{slope ekstrak} - \text{slope blanko ekstrak})}{(\text{slope kontrol enzim} - \text{slope blanko enzim})} \right] \times 100\%$$

### Pengujian kadar polifenol total

Pengukuran kadar polifenol total dilakukan secara spektrofotometri menggunakan reagen kit Folin-Ciocalteu, mengacu pada penelitian sebelumnya (Waterhouse 2012) dengan modifikasi. Rinciannya adalah sebagai berikut: larutan sampel uji dibuat dengan melarutkan hingga homogen 10 mg ekstrak kental dalam 1 mL metanol *p.a.* Selanjutnya, larutan tersebut diencerkan kembali menggunakan metanol hingga diperoleh konsentrasi 1000 *ppm*.

Pengukuran kadar polifenol total dilakukan dengan memasukkan sebanyak

20 µL larutan ke dalam *multiwell* 96 dan ditambah 75 µL larutan Folin-Ciocalteu (disiapkan dengan mengencerkan reagen Folin-Ciocalteu 1:10 menggunakan akuades). Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 5 menit pada suhu 22°C pada suasana gelap sambil digoyang. Ke dalam *multiwell* 96 ditambahkan 75 µL larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 60 g/L dan kembali diinkubasi selama 90 menit pada kondisi yang sama sambil digoyang. Absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang maksimum 725 nm menggunakan *Elisa reader*. Sebagai blanko dengan mengganti sampel uji menggunakan metanol *p.a.* Setiap pengukuran dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

Sebagai pembandingan, digunakan asam galat yang disiapkan sebagai berikut: larutan induk dibuat dengan melarutkan 10 mg asam galat dalam 1 mL metanol *p.a.* Larutan induk diencerkan menggunakan metanol *p.a.* hingga diperoleh serangkaian konsentrasi 25, 50, 100, 150, dan 200 *ppm* atau konsentrasi akhir asam galat 2,94; 5,88; 11,76; 17,65 dan 23,53 *ppm*. Larutan standar diperlakukan sama seperti sampel. Kurva standar yang menyatakan hubungan antara absorbansi dibuat menggunakan program *Microsoft Excell* dan diturunkan persamaan regresi  $y=ax+b$ . Kadar polifenol total dalam sampel dihitung menggunakan



persamaan  $y=ax+b$  dan dinyatakan dengan satuan setara dengan asam galat (*gallic acid equivalent* atau GAE). Persen kadar polifenol total dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

% Polifenol total =

$$\frac{\text{kadar setara asam galat (ppm)}}{\text{konsentrasi akhir (ppm)}} \times 100\%$$

### Pengolahan data

Data disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$ SD. Data aktivitas inhibisi XO diolah secara statistik menggunakan metode *independent* T-Test untuk data yang terdistribusi normal, atau metode Mann Whitney untuk data yang tidak terdistribusi normal. Analisis statistik dilakukan pada pada tingkat kepercayaan 95% ( $p=0,05$ ).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Bagian dari tanaman sappan yang digunakan pada penelitian ini adalah kayu keras. Sebelum digunakan dalam penelitian dilakukan determinasi tanaman di Pusat Biologi LIPI guna menjamin bahwa simplisia yang digunakan benar. Hasil identifikasi menyatakan bahwa sampel tanaman adalah jenis *Caesalpinia sappan* L.

Menurut ketentuan BPOM, dalam memanfaatkan tanaman obat sebagai bahan baku dalam bidang pengobatan dapat dilakukan dalam berbagai bentuk, salah satunya dengan cara dibuat dalam bentuk sediaan galenika dengan diekstraksi menggunakan pelarut organik (dan/atau tanpa penguapan pelarut). Sediaan ekstrak termasuk ke dalam jenis sediaan galenika, yang disiapkan dengan cara mengekstrak simplisia nabati atau hewani menggunakan jenis pelarut yang sesuai (air atau organik) baik dengan cara panas atau dingin dan selanjutnya sebagian atau semua pelarut diuapkan dan masa yang diperoleh dapat berupa semisolid atau serbuk diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Kemenkes RI 2014). Sediaan bentuk ekstrak memiliki banyak keunggulan seperti zat berkhasiat berada dalam konsentrasi tinggi, zat berkhasiat lebih mudah diatur dosisnya, lebih mudah dilakukan standarisasi kandungan senyawa

markernya sehingga menjamin mutu, keamanan dan khasiat produk akhir dibanding simplisia asal. Selain itu, keunggulan penggunaan ekstrak adalah lebih sedikit dari segi jumlah penggunaannya, dari aspek produksi akan diperoleh sediaan dengan keseragaman mutu yang lebih baik, dan lebih terkendali dalam hal cemaran mikroba dibanding menggunakan simplisia aslinya (Sasidharan et al. 2011). Guna mendapatkan berbagai manfaat tersebut, ekstrak harus dilakukan karakterisasi sehingga jelas spesifikasinya dan hal ini akan menjadi parameter rujukan jika akan dilakukan pembuatan ekstrak yang berikutnya. Hasil uji karakterisasi terhadap ekstrak kental disajikan pada Tabel 2.

Hasil pengujian karakter ekstrak kental sappan menunjukkan adanya kesesuaian dengan ketentuan yang ditetapkan oleh BPOM kecuali pada kadar abu total. Kadar abu suatu bahan menyatakan kandungan mineral di dalamnya. Mineral tersebut dapat berupa garam organik (misalnya garam dari asam malat, oksalat, pektat), garam anorganik (misalnya fosfat, karbonat, klorida, sulfat nitrat dan logam alkali), atau berupa mineral yang terbentuk menjadi senyawa kompleks bersifat organik. Kadar abu yang tinggi dapat berasal dari saat proses pengolahan yang kurang bersih misalnya pada tahap pencucian (masih tersisa tanah atau pasir) sehingga mineral terbawa saat ekstraksi (Azizah dan Salamah 2013).

Uji karakterisasi ekstrak kental penting dilakukan sebagai jaminan terhadap kualitas ekstrak dan sediaan akhir yang dihasilkan. Selain itu, parameter kualitas ekstrak menjadi patokan dalam produksi ekstrak pada skala *batch* sehingga diperoleh ekstrak dengan kualitas lebih seragam. Pengujian dilakukan dengan mengacu pedoman yang berasal dari BPOM. Hal ini penting dilakukan mengingat bahwa ekstrak dari suatu tanaman sangat dipengaruhi oleh sumber simplisia yang digunakan, dimana simplisia sangat dipengaruhi oleh banyak faktor seperti tempat tumbuh, metode panen dan penanganan pasca panen, usia panen, kondisi penanaman, iklim dan sebagainya.

Pengujian inhibisi XO dilakukan pada sistem xantin/XO *in vitro* dengan cara mengukur produksi asam urat yang terbentuk persatuan waktu selama kurun waktu tertentu menggunakan spektrofotometer

Tabel 3. Hasil uji inhibisi XO

Sampel	Ulangan	Absorbansi ( $\lambda$ -maks. 290 nm) pada menit				Nilai slope	% Inhibisi XO*)	Rata2 inhibisi XO
		ke-1	ke-2	ke-3	ke-4			
Kontrol enzim	1	0,330	0,567	0,766	0,896	0,190		0,1963
	2	0,352	0,598	0,811	0,948	0,200		
	3	0,353	0,587	0,802	0,945	0,199		
Ekstrak EtOH70% sappan	1	0,237	0,319	0,400	0,467	0,077	61%	59 $\pm$ 1%
	2	0,164	0,255	0,335	0,412	0,082	58%	
	3	0,258	0,346	0,420	0,502	0,081	59%	
Allopurinol	1	0,234	0,288	0,320	0,357	0,080	59%	60 $\pm$ 1%
	2	0,250	0,299	0,333	0,365	0,078	60%	
	3	0,233	0,281	0,313	0,343	0,075	62%	

\*) Dihitung dengan persamaan =  $[1 - (slope\ sampel / slope\ kontrol\ enzim)] \times 100\%$ . Pengujian dilakukan pada konsentrasi akhir (baik ekstrak dan allopurinol) 100  $\mu\text{g/mL}$ . Blanko enzim dan blanko ekstrak/allopurinol dengan komposisi seperti tertulis pada Tabel 1 tidak menunjukkan tingkat kemiringan *slope*. Hasil analisis statistik menunjukkan tidak berbeda bermakna ( $p=0,468$ ) aktivitas inhibisi XO ekstrak etanol 70% sappan dan allopurinol pada konsentrasi 100  $\mu\text{g/dL}$ .

UV-vis. Hasil pengukuran kekuatan inhibisi XO disajikan pada Tabel 3.

Dari Tabel 3 terlihat bahwa kekuatan inhibisi XO dari ekstrak hampir setara dengan pembanding allopurinol. Pada konsentrasi akhir 100  $\mu\text{g/mL}$ , aktivitas inhibisi XO ekstrak kental sekitar 59% sementara allopurinol sebesar 60%, dimana secara statistik tidak terdapat perbedaan yang bermakna ( $p=0,468$ ). Jika dibandingkan terhadap pembanding positif, aktivitas inhibisi XO ekstrak sappan sebesar 98% relatif terhadap kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak sappan mempunyai potensi dalam menekan kerja enzim XO. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa ekstrak metanol sappan yang dikoleksi dari Vietnam mempunyai aktivitas menekan enzim XO dengan nilai  $IC_{50} < 20\ \mu\text{g/mL}$  (Nguyen et al. 2004b). Sementara pada penelitian ini dimana pengujian inhibisi hanya dilakukan pada satu titik konsentrasi, yaitu 100  $\text{mg/mL}$ , maka tidak bisa dibandingkan dengan pengujian yang dilakukan oleh Nguyen et al. (2004b).

Aktivitas inhibisi XO suatu ekstrak dipengaruhi oleh kandungan senyawa aktif di dalamnya. Penelitian lain telah berhasil mengisolasi jenis senyawa aktif yang berpotensi dalam menghambat XO yaitu

*sappanchalcone* yang berpotensi dalam menghambat XO dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 3,5  $\mu\text{M}$ , hampir setara dengan allopurinol sebesar 2,5  $\mu\text{M}$ . Senyawa lain yang menunjukkan aktivitas inhibisi XO dengan sifat *concentration-dependent manner* (aktivitas tergantung pada konsentrasi), seperti *neoprotosappanin*, *protosappanin A dimethyl acetal*, *protosappanin E-2*, *neosappanone A*, *protosappanin A*, *sappanol*, *sappanone B*, *3-deoxysappanone B*, dan *sappanchalcone*. (Nguyen et al. 2004a).

Selain bagian kayu, penelitian lain membuktikan bahwa kulit kayu pohon sappan mempunyai aktivitas menekan kerja enzim XO juga. Telah dilaporkan bahwa ekstrak etanol 96% kulit kayu sappan mampu menghambat enzim XO secara *in vitro* sebesar 54,47% pada konsentrasi 100  $\mu\text{g/dL}$ , sementara pembanding allopurinol sebesar 87,47% (Pertamawati dan Hardhiyuna 2015). Perbedaan nilai inhibisi antara hasil penelitian ini dengan sebelumnya, disebabkan karena terdapat perbedaan dalam preparasi sampel. Pada penelitian sebelumnya ekstraksi dilakukan secara perkolasi, sementara pada penelitian ini dilakukan dengan maserasi. Pada proses perkolasi, pelarut diputar secara kontinyu dengan menggunakan pompa peristaltik, sementara pada penelitian ini dilakukan

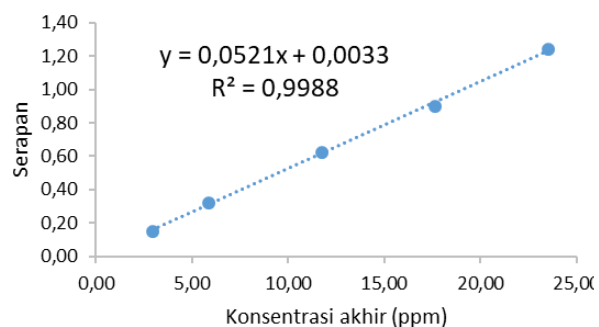
secara maserasi dengan pengadukan. Kemungkinan lainnya adalah jenis pelarut yang digunakan, dimana pada penelitian sebelumnya digunakan etanol 96%, sementara pada studi ini digunakan pelarut etanol 70%. Penggunaan pelarut campur etanol-air menyebabkan polaritas pelarut lebih tinggi, hal ini berpengaruh pada kemampuan pelarut dalam mengekstraksi senyawa kimia yang ada di dalam kayu sappan. Perbedaan yang lain adalah jenis sampel, pada penelitian sebelumnya sampel yang digunakan adalah kulit kayu, sementara pada tulisan ini digunakan bagian kayu kerasnya. Bagian tanaman yang berbeda juga mengandung senyawa metabolit yang berbeda juga. Selain itu tahapan pengujian yang digunakan pada penelitian sebelumnya agak berbeda dengan metode yang dilaporkan pada tulisan ini. Pada penelitian sebelumnya dilakukan terminasi enzim XO dengan menggunakan larutan HCl 0,5 M, kemudian baru dilakukan pengukuran kadar asam urat yang terbentuk selama kurun waktu 4 menit. HCl bersifat asam sehingga akan merusak sisi aktif enzim XO. Hal ini mengakibatkan enzim tidak mampu bekerja secara optimal dalam mengubah substrat xantin menjadi asam urat (Kostic et al. 2015; Sowndhararajan et al. 2012). Penghentian aktivitas XO ini menyebabkan produksi asam urat berkurang atau terhenti. Sementara pada tulisan ini tidak dilakukan penambahan larutan HCl, sehingga produksi asam urat berjalan terus selama pengukuran mengikuti reaksi enzimatik.

Prinsip mengukur kekuatan inhibisi XO dari sampel uji adalah dengan mengukur produk asam urat yang terbentuk dari kerja enzim XO pada sistem xantin/XO *in vitro*. Reaksi enzimatik berbeda dengan reaksi kimia biasa. Reaksi enzimatik mensyaratkan keberadaan suatu enzim yang berperan dalam mengatur reaksi sehingga tidak terjadi penyimpangan hasil akhir reaksinya. Reaksi enzimatik umumnya memerlukan persyaratan yang lebih kompleks dan ketat, seperti tingkat konsentrasi enzim, konsentrasi ligan (substrat, produk, inhibitor dan aktivator), pH larutan, kekuatan ion dan temperatur selama reaksi. Prosedur untuk mengukur aktivitas enzim dapat dilakukan dengan cara mengukur kehilangan substrat atau mengukur produk yang terbentuk pada

periode waktu tertentu (Milanowski et al. 2013) dimana pada penelitian ini yang dilakukan adalah dengan mengukur produk yang terbentuk pada kurun waktu tertentu.

Beberapa penelitian sebelumnya mengukur aktivitas inhibisi XO dengan mengukur kadar asam urat pada satu titik tertentu setelah dilakukan terminasi dengan penambahan HCl atau dengan menggunakan pemanasan (Kostic et al. 2015; Sowndhararajan et al. 2012). Sementara itu, pada penelitian ini, aktivitas dari sampel uji dalam menginhibisi XO ditetapkan dengan mengukur kadar asam urat yang terbentuk pada rentang waktu tertentu. Selanjutnya aktivitas inhibisi XO dari sampel uji dinyatakan dengan tingkat kemiringan kurva (*slope*) dari plot antara absorbansi terhadap waktu pengukuran (Apaya dan Hernandez 2011, Bustanji et al. 2011). Penggunaan prosedur pengukuran produk yang terbentuk dari suatu reaksi enzimatik dalam rentang waktu tertentu memiliki keunggulan dibandingkan hanya mengukur produk pada satu titik tertentu saja.

Menurut definisi, senyawa polifenol merupakan jenis senyawa yang mengandung gugus fenol lebih dari 12 gugus, umumnya larut dalam air, berat molekul 500-4000 Da dengan 5-7 cincin aromatik per 1000 Da (Quideau et al. 2011). Biosintesa polifenol dalam tanaman melalui jalur asam sinamat (C6-C3) dan asam benzoate (C6-C1). Gugus OH pada cincin aromatik mampu mendonasikan atom H sehingga kelompok ini memiliki sifat farmakologi yang lebih beragam seperti antioksidan, antimutagenisitas, antiviral, antibakteri, algasidal, antifungi, insektisida, estrogenik dan keratolitik bahkan proteksi diri dari lingkungannya (Castellano et al. 2012).



**Gambar 3.** Kurva regresi asam galat. Nilai adalah rata-rata dari 3 kali pengulangan



Pada pengukuran kadar polifenol total digunakan pembanding asam galat. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa penggunaan asam galat sebagai pembanding memiliki beberapa keunggulan seperti senyawa ini dalam keadaan murni cukup mudah diperoleh dengan harga yang relatif tidak terlampau mahal, hasil pengukuran kadar senyawa fenolik dari beberapa jenis sampel uji memberikan nilai yang ekuivalen dengan penggunaan standar asam galat, larutan asam galat relatif stabil dimana aktivitas akan menurun sekitar 5% setelah penyimpanan dalam lemari es selama 2 minggu dalam keadaan tertutup (Waterhouse 2012). Karena senyawa fenol yang ada dalam sampel uji tidak semuanya adalah asam galat, maka kadar polifenol total dalam sampel uji dinyatakan dengan satuan setara asam galat (*gallic acid equivalent/GAE*), yang dihitung dari persamaan kurva standar asam galat. Hasil pembuatan kurva standar asam galat dan penghitungan persamaan regresinya disajikan pada Gambar 3. Hasil pengukuran kadar polifenol total disajikan pada Tabel 4.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa polifenol total dari ekstrak sappan sebesar 26% ekstrak kasar. Kandungan senyawa polifenol menentukan sifat farmakologis yang diberikan oleh ekstrak. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya, dimana senyawa golongan polifenol, termasuk didalamnya senyawa golongan flavonoid, telah dilaporkan mempunyai potensi sebagai inhibitor XO (Abdullahi et al. 2012). Studi struktur aktivitas inhibisi XO dan senyawa flavonoid menunjukkan bahwa senyawa flavonoid yang mampu menghambat XO adalah yang mempunyai gugus OH pada posisi C5 dan C7 dan ikatan rangkap antara C2 dan C3 atau struktur berbentuk planar, sehingga golongan flavones agak lebih kuat sebagai inhibitor XO dibandingkan flavonol. Adanya substitusi gugus OH pada posisi C3 dan C7 dengan glikosida atau gugus metil akan melemahkan sifat inhibisi XO. Diduga bahwa keberadaan gugus gula akan menghalangi interaksi antara flavonoid dengan enzim XO sehingga melemahkan aktivitas (Wong et al. 2014; Kostic et al. 2015). Beberapa senyawa polifenol dalam sappan telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi, diantaranya adalah empat jenis

Tabel 4. Kadar polifenol ekstrak kental sappan

n	Absorbansi ( $\lambda$ -maks. 725 nm)	Kadar setara GAE (ppm)	Kadar polifenol (%)*	Rata2 Kadar polifenol (%)
1	1,57	30,15	25,77	26,00
2	1,61	30,76	26,29	
3	1,58	30,34	25,93	

\*) Dihitung dengan rumus =  $[\text{kadar(ppm)}/\text{konsentrasi akhir(ppm)}] \times 100\%$ . Kadar dihitung terhadap ekstrak kasar. n=ulangan.

*caesalpinaphenol A, B, C dan D* (Cuong et al. 2012). Selain senyawa polifenol, aktivitas inhibisi XO juga disebabkan oleh kandungan senyawa lain yang terkandung dalam ekstrak mengingat bahwa sampel uji adalah ekstrak kasar yang berisi beragam senyawa yang kompleks (Nguyen et al. 2014b).

Dalam sampel berupa ekstrak umumnya mengandung berbagai golongan senyawa kimia selain polifenol. Kemungkinan bahwa aktivitas inhibisi XO yang ditunjukkan oleh ekstrak etanol 70% sappan juga disebabkan oleh keberadaan senyawa selain golongan polifenol. Hasil studi *in vitro* sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa-senyawa berikut berpotensi sebagai penurun asam urat melalui mekanisme inhibisi XO, yaitu golongan alkaloid, minyak atsiri, tannin, glukosida iridoid, kumarin. Selanjutnya, senyawa golongan lignan, triterpenoid dan xantofil bermanfaat dalam penanganan gout melalui aktivitas antiinflamasi (Ling dan Bonchu 2014). Dalam menghambat enzim XO, suatu senyawa dapat melalui beberapa mekanisme seperti mengikat sisi aktif tempat pengikatan senyawa purin, seperti ditunjukkan oleh allopurinol, atau pada kofaktor FAD, seperti pada benzimidazole, atau melalui memblokir biosintesis asam urat dari senyawa purin. Sehingga mekanisme yang bersifat meningkatkan ekskresi asam urat dari tubuh atau menekan produksi asam urat mampu menurunkan kadar asam urat (Kostic et al. 2015).

## KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% kayu sappan yang dibuat memenuhi

persyaratan parameter mutu ekstrak. Ekstrak tersebut mampu menghambat enzim XO sebesar 98% relatif terhadap kontrol positif allopurinol pada konsentrasi uji 100 µg/mL. Ekstrak mengandung senyawa polifenol total dengan kadar mencapai 26% ekstrak kental. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol 70% kayu sappan mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai bahan baku obat untuk mengatasi kondisi hiperurisemia yang mana prevalensinya menunjukkan kecenderungan meningkat setiap tahun. Namun demikian masih diperlukan penelitian lebih lanjut terkait penggunaannya dalam bidang pengobatan.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia atas bantuan pendanaan terhadap kegiatan penelitian ini melalui Program Insentif Riset Terapan (RT) dengan nomor RT-2014-294 Tahun Anggaran 2014.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abdullahi A, Hamzah RU, Jigam AA, Yahya A, Kabiru AY, Muhammad H, Sakpe S, Adefolalu FS, Isah MC, Kolo MZ (2012) Inhibitory activity of xanthine oxidase by fractions *Crateva adansonii*. J Acute Dis 1:126-129. doi: 10.1016/S2221-6189(13)60072-4
- Aditama TY (2015) Jamu & Kesehatan Edisi II. Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta
- Apaya KL, Hernandez CLC (2011) Xanthine oxidase inhibition of selected Philippine medicinal plants. J Med Plant Res 5:289-292
- Azizah B, Salamah N (2013) Standarisasi parameter non spesifik dan perbandingan kadar kurkumin ekstrak etanol dan ekstrak terpurifikasi rimpang kunyit. J Ilmiah Kefarmasian 3:21-30
- Bustanji Y, Hudaib M, Tawaha K, Mohammad M, Almasri I, Hamed S, Oran S (2011) *In vitro* xanthine oxidase inhibition by selected Jordanian medicinal plants. Jordan J Pharm Sci 4:49-56
- Castellano G, Tena J, Torrens F (2012) Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Commun Math Comput Chem 67:231-250
- Cuong TD, Hung TM, Kim JC, Kim EH, Woo MH, Choi JS, Lee JH, Min BS (2012) Phenolic compounds from *Caesalpinia sappan* heartwood and their anti-inflammatory activity. J Nat Prod 75:2069-2075. doi: 10.1021/np3003673
- Depkes RI (1989) Materia Medika Indonesia Jilid V pp:137-139. Direktorat POM, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Depkes RI (2000) Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Gliozzi M, Malara N, Muscoli S, Mollace V (2016) Review: The treatment of hyperuricemia. Int J Cardiol 213:23-27. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.087
- Kemenkes RI (2014) Farmakope Indonesia Edisi V. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Kostic DA, Dimitrijevic DS, Stojanovic GS, Palic IR, Dordevic AS, Ickovski JD (2015) Xanthine oxidase: Isolation, assays of activity, and inhibition. J Chemistry 2015:1-8. doi: 10.1155/2015/294858
- Ling X, Bochu W (2014) A Review of phytotherapy of gout: Perspective of new pharmacological treatments. Pharmazie 69:243-256. doi: 10.1691/ph.2014.3642
- Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V (2016) Regulation of uric acid metabolism and excretion. Int J Cardiol 213:8-14. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.109
- Maupe, Nawi R, Hakim BA (2010) Faktor risiko kejadian arthritis gout pada pasien rawat jalan di Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar. J Media Kesehatan Masyarakat Indonesia 6:12-16
- Milanowski P, Carter TJ, Weber GF (2013) Enzyme catalysis and the outcome of biochemical reactions. J Proteomics

- Bioinform 6:132-141.  
doi:10.4172/jpb.1000271
- Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Tran QL, Kadota S (2004a) Neosappanone A, a xanthine oxidase (XO) inhibitory dimeric methanodibenzoxocinone with a new carbon skeleton from *Caesalpinia sappan*. *Tetrahedron Lett* 45:8519–8522. doi: 10.1016/j.tetlet.2004.09.107
- Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Tran QL, Watanabe H, Kadota S (2004b) Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biol Pharm Bull* 27:1414-1421. doi: 10.1248/bpb.27.1414
- Ningsih S, Fahrudin F (2018) Lowering uric acid efficacy test of the combined extract of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. and *Caesalpinia sappan* L. *in vivo* and *in vitro*. *Asian J Pharm Clin Res* 11:166-170. doi: 10.22159/ajpcr.2018.v11i8.26020
- Ohama P, Tumpat N (2014) Textile dyeing with natural dye from sappan tree (*Caesalpinia sappan* Linn.) extract. *Int J Mater Text Eng* 8:432-434.
- Pertamawati, Hardhiyuna M (2015) Uji penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase terhadap ekstrak kulit kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.). *Kartika J Ilm Far* 3:12-17
- Quideau SP, Deffieux D, Douat-Casassus CL, Pouységu L (2011) Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed* 50:586–621. doi: 10.1002/anie.201000044
- Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY (2011) Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 8:1-10. PMC3218439
- Sowndhararajan K, Joseph JM, Rajendrakumaran D (2012) *In vitro* xanthine oxidase inhibitory activity of methanol extracts of *Erythrina indica* Lam. leaves and stem bark. *Asian Pac J Trop Biomed* 2:S1415-S1417
- Spanou C, Veskoukis AS, Kerasioti T, Kontou M, Angelis A, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Kouretas D (2012) Flavonoid glycosides isolated from unique legume plant extracts as novel inhibitors of xanthine oxidase. *PLoS One* 7(3):e32214. doi: 10.1371/journal.pone.0032214
- Waterhouse A (2012) Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine. Waterhouse Lab, University of California, Davis, California.
- Wong YP, Ng RC, Chuah SP, Koh RY, Ling APK (2014) Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of *Swietenia macrophylla* and *Punica granatum*. International Conference on Biological, Environment and Food Engineering (BEFE-2014), August 4-5, Bali (Indonesia). doi: 10.15242/IICBE.C814014
- Zanin JLB, de Carvalho BA, Martineli PS, dos Santos MH, Lago JHG, Sartorelli P, Viegas C Jr, Soares MG (2012) The genus *Caesalpinia* L. (Caesalpiniaceae): Phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules* 17:7887-7902. doi:10.3390/molecules17077887