BAB 4
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Batang Kayu Kuning

Sebanyak 750 mg simplisia batang kayu kuning dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Filtrat ekstrak etanol batang kayu kuning tersebut setelah dikering uapkan menggunakan oven didapatkan 23,54 gram ekstrak pekat etanol batang kayu kuning kering.

4.2 Fraksinasi Ekstrak Etanol Batang Kayu Kuning

Sebanyak 23 gram ekstrak pekat etanol batang kayu kuning dilakukan fraksinasi bertingkat. Fraksinasi dilakukan dengan melarutkan ekstrak etanol kayu kuning yang kental dengan menggunakan 5 ml aquades agar ekstrak berbentuk fase cair untuk dilakukan fraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Fraksinasi dengan ekstraksi cair-cair dimulai dengan menggunakan pelarut n-heksan yang bersifat nonpolar, kemudian corong pisah dikocok-kocok dan didiamkan sebentar hingga terjadi pemisahan 2 fase. Kedua fase larutan tersebut dikeluarkan secara terpisah sehingga didapatkan fraksi sisa dan fraksi n-heksan. Fraksinasi dilakukan berulang kali hingga didapatkan fraksi n-heksan yang jernih. Fraksi sisa yang tidak larut dengan n-heksan kemudian difraksinasi kembali dengan pelarut semipolar berupa etil asetat, sehingga didapatkan fraksi sisa dan fraksi etil asetat. Fraksinasi dengan menggunakan etil asetat juga dilakukan berulang kali hingga mendapatkan fraksi yang jernih, kemudian dikeringuapkan dengan oven pada suhu 40^0C dan didapatkan fraksi etil asetat kering sebanyak 1,52 gram.

Tabel 0.1 Hasil rendeman ekstrak etanol batang kayu kuning

Berat Simplisia	Berat Ekstrak Etanol	%Rendeman
750 gram	23,54 gram	3,14 %

Tabel 0.2 Hasil rendeman fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning

Berat Ekstrak Etanol	Berat Fraksi Etil Asetat	%Rendeman
23 gram	1,52 gram	6,62%

4.3 Uji Fitokimia

Uji fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini yaitu uji flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid, steroid, dan saponononin. Hasil uji fitokimia fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 0.3 Hasil uji fitokimia

No.	Jenis Uji	Kejadian	Hasil
1.	Flavonoid	Terbentuk warna merah	+
2.	Alkaloid : Dragendroff	Terbentuk endapan merah	+
	Alkaloid : Mayer	Terbentuk endapan putih kekuningan	+
	Alkaloid : Wagner	Terbentuk endapan cokelat	+
3.	Tanin	Tidak terbentuk warna biru kehitaman	-
4.	Terpenoid	Terbentuk cincin violet	+
5.	Steroid	Tidak terbentuk warna hijau kebiruan	-
6.	Saponin	Tidak terbentuk buih	-
7.	Kuinon	Terbentuk warna merah	+

Keterangan : (+) teridentifikasi, (-) tidak teridentifikasi

Uji fitokimia yang dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder pada fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning dilakukan secara

kualitatif. Hasil uji fitokimia fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang larut dalam pelarut semi polar adalah flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan kuinon. Tanin, steroid, dan saponin tidak teridentifikasi pada fraksi ini.

Berdasarkan studi literatur sebelumnya, beberapa metabolit sekunder yang telah diteliti dapat menghambat enzim xantin oksidase antara lain flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, dan terpenoid.[43–45] Berdasarkan hasil uji fitokimia penelitian ini, metabolit sekunder fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning yang berpotensi untuk menghambat enzim xantin oksidase yaitu flavonoid, alkaloid, dan terpenoid.

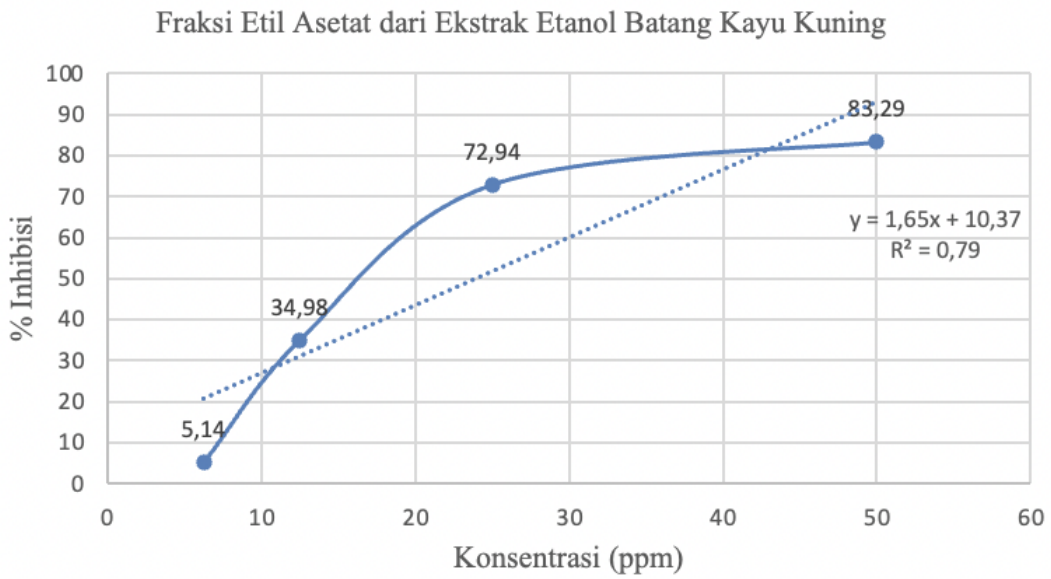
4.4 Uji Inhibisi Enzim Xantin Oksidase

Prosedur pengujian enzim xantin oksidase terhadap fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning dilakukan dengan pengukuran nilai absorbansi pada blanko, allopurinol, dan sampel menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 293 nm. Pengujian dengan spektrofometri dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Nilai absorbansi yang didapat, digunakan untuk menghitung persen inhibisi enzim xantin oksidase. Hasil persen inhibisi enzim xantin oksidase dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 0.4 Hasil persen inhibisi

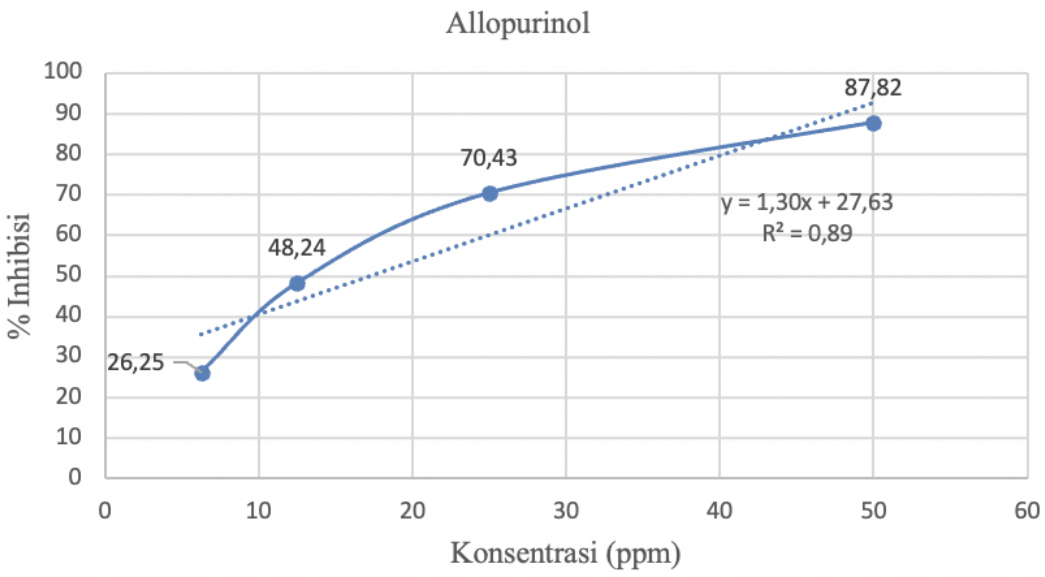
Kategori	Konsentrasi (ppm)	Persen Inhibisi (%)
Fraksi etil asetat dari ekstak etanol batang kayu kuning	50	83,29
	25	72,94
	12,5	34,98
	6,25	5,14
Allopurinol	50	87,82
	25	70,43
	12,5	48,24
	6,25	26,25

Hasil persen inhibisi yang didapatkan kemudian digunakan untuk mendapatkan persamaan regresi linier dengan sumbu x direpresentasikan sebagai konsentrasi fraksi etil asetat batang kayu kuning dan sumbu y sebagai persen inhibisi terhadap enzim xantin oksidase. Persamaan regresi linier yang didapatkan yaitu **y = 1,65x + 10,37**. Hasil persamaan yang didapatkan tersebut kemudian digunakan untuk menghitung IC_{50} yang menunjukkan konsentrasi sampel yang dapat menginhibisi 50% aktivitas enzim xantin oksidase. Perhitungan IC_{50} dilakukan dengan mengganti nilai y menjadi 50 sehingga didapatkan nilai IC_{50} sebesar **23,99 ppm**. Grafik persamaan regresi linier dari sampel dan persen inhibisi dapat dilihat pada gambar 4.1.



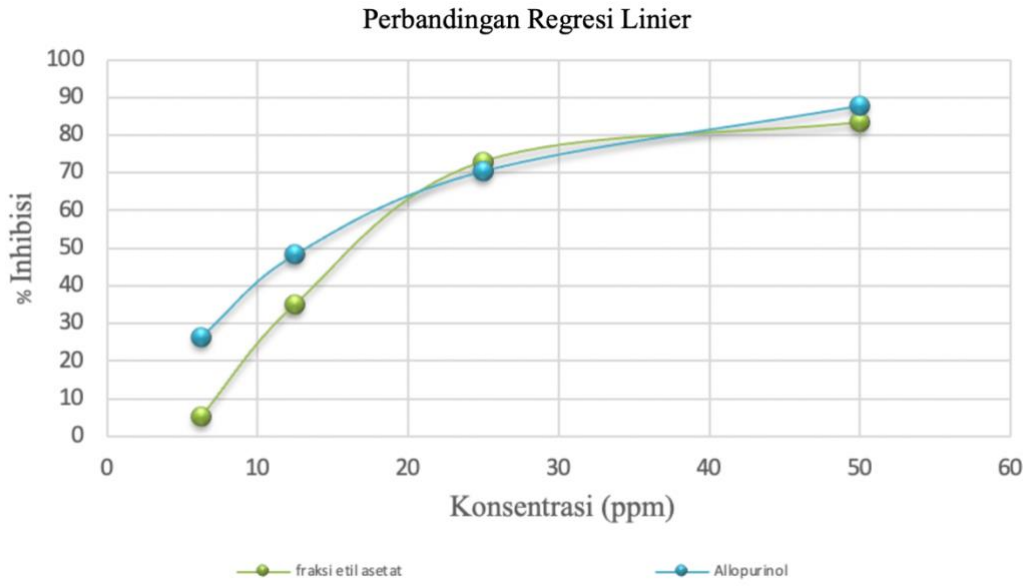
Gambar 0.1 Grafik regresi linier fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning

Persamaan regresi linier dan perhitungan IC_{50} pada allopurinol juga dilakukan dengan cara yang sama. Persamaan regresi linier allopurinol yang diperoleh yaitu **y = 1,30x + 27,63** dan nilai IC_{50} sebesar **17,16 ppm**. Grafik persamaan regresi linier dari allopurinol dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 0.2 Grafik persamaan regresi linier allopurinol

Adapun perbandingan grafik persamaan regresi linier allopurinol dan sampel dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 0.3 Grafik perbandingan regresi linier

Pada grafik perbandingan regresi linier tersebut didapatkan bahwa allopurinol memiliki daya inhibisi lebih kuat daripada fraksi etil asetat batang kayu kuning, Pada hasil penelitian didapatkan nilai IC_{50} fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning (*Arcangelisia flava*) adalah sebesar 23,99 ppm, sedangkan IC_{50} allopurinol adalah sebesar 17,16 ppm. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin baik kemampuan zat tersebut dalam menginhibisi enzim xantin oksidase. Apabila nilai IC_{50} <25 maka zat tersebut sangat kuat kemampuan inhibisinya, selanjutnya nilai IC_{50} 25-50 tergolong kuat, IC_{50} 50-100 tergolong kurang kuat, dan IC_{50} >100 tergolong tidak kuat (lemah).[57] Berdasarkan penggolongan tersebut, allopurinol dan fraksi etil asetat batang kayu kuning termasuk kategori sangat kuat dalam menginhibisi enzim xantin oksidase.

Tabel 0.5 Interpretasi efek inhibisi enzim xantin oksidase

Sampel	Persamaan Regresi	Nilai IC_{50} (ppm)	Efek Inhibisi
Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning	y = 1,65x + 10,37	23,99	Sangat kuat
Allopurinol	y = 1,30x + 27,63	17,16	Sangat kuat

Enzim xantin oksidase berfungsi dalam produksi asam urat oleh penghancuran nukleotida purin.[27] Pengobatan lini pertama dari hiperurisemia adalah inhibitor xantin oksidase yaitu allopurinol.[26] Pada penelitian ini, didapatkan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning dan allopurinol memiliki efek inhibisi sangat kuat terhadap enzim xantin oksidase, sehingga dapat dikatakan bahwa fraksi semi polar dari batang kayu kuning ini berpotensi sangat kuat sebagai pengobatan alternatif dari hiperurisemia.

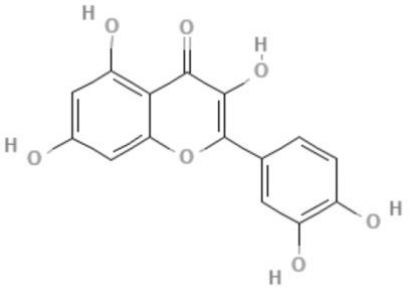
Berdasarkan hasil uji fitokimia, fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning memiliki kandungan metabolit sekunder berupa flavonoid, alkaloid, terpenoid,

dan kuinon. Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol batang kayu kuning berpotensi sangat kuat dalam menghambat enzim xantin oksidase karena memiliki kandungan flavonoid. Flavonoid menginhibisi kerja dari enzim xantin oksidase melalui mekanisme antioksidan intraselular dengan menghambat kerja dari enzim penghasil radikal bebas seperti xantin oksidase sehingga pembentukan asam urat menurun. Flavonoid memiliki struktur yang mirip dengan xantin. Kemiripan ini berdasarkan kandungan flavonoid yang memiliki dua cincin aromatik yang memilliki gugus hidroksil yaitu C5 dan C7 sebagai akseptor elektron dari enzim xantin oksidase. Gugus hidroksil dari C5 dan C7 beserta dengan gugus karbonil pada C4 flavonoid membentuk ikatan hidrogen dan berperan dalam interaksi sisi aktif enzim xantin oksidase dan inhibitor berupa flavonoid.[58]

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang berdasarkan oksidasinya dibagi menjadi enam subkelas yaitu flavonol, flavanon, flavon, isoflavon, katekin dan proantosianidin, serta antosianidin. Senyawa flavonoid yang umum dalam menghambat xantin oxidase yaitu apigenin, luteolin, kaempferol, kuersetin dan miresetin. Flavonoid terdiri dari dua cincin fenil (A dan B), gugus hidroksil (C5 dan C7) pada cincin A, cincin heterosiklik pada cincin C, dan senyawa ini telah banyak diteliti memiliki aktivitas penghambatan xantin oksidase yang kuat. Penghambatan enzim ini dipengaruhi oleh gaya ikatan, struktur planar, nilai pKa, momen dipol longitudinal, dan faktor ikatan hidrofobik. Selain itu, terjadinya reaksi hidroksilasi, glikosilasi, metilasi, dan hidrogenasi ikatan rangkap C2=C3 penting dalam proses inhibisi enzim XO.[59]

Pada penelitian yang dilakukan pada daun senggani (*Melastoma malabathricum* L.), didapatkan bahwa senyawa kuersetin yang merupakan salah satu dari jenis senyawa flavonol dapat larut pada pelarut etil asetat.[60] Kuersetin telah diteliti memiliki aktivitas penghambatan enzim XO yang kuat. Penelitian yang dilakukan oleh Cao *et al* menjelaskan bahwa struktur kristal kompleks XO-kuersetin terdiri dari posisi tunggal dengan bagian benzopyran disisipkan di antara residu asam amino (Phe 914, Phe 1009) dan cincin B. Selain itu, *tight junction* dari kuersetin ke XO disebabkan oleh

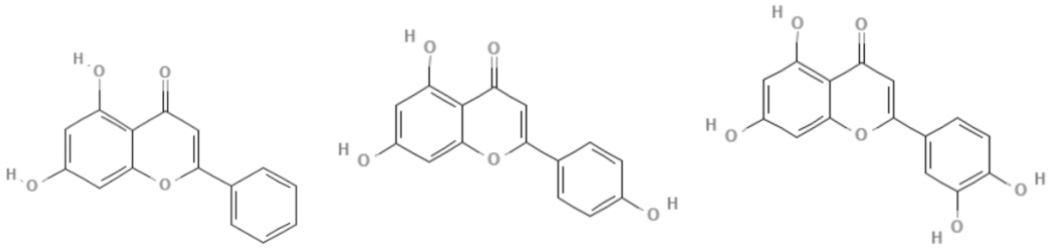
gaya van der Waals dan interaksi *steric complimentarity* diantara struktur trisiklik terkonjugasi (kuersetin) dan sisi aktif spesifik dari residu asam amino (XO). Pada penelitian yang dilakukan oleh Yoon et al. menunjukkan bahwa kuersetin yang diisolasi dari tanaman *Corylopsis coreana* dapat mengatasi penyakit hiperurisemia. Penelitian lain oleh Hadj Salem et al. yang menggunakan tanaman *Nitria retusa* menunjukkan aktivitas penghambatan XO yang kuat.[59]



Gambar 0.4 Struktur senyawa kuersetin.[61]

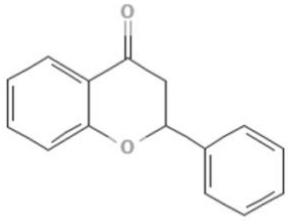
Lin et al menyebutkan bahwa beberapa flavon seperti apigenin, chrysin, baicalein dan luteolin menunjukkan aktivitas penghambatan XO yang kuat, dimana tingkat inhibisi dari chrysin dan apigenin memiliki tingkat inhibisi yang lebih tinggi daripada jenis flavon yang lain.[59] Pada pengisolasian senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat *Torreya grandis*, didapatkan 3 senyawa flavon yang larut pada pelarut etil asetat tersebut, yaitu flavon jenis apigenin, chrysin, dan luteolin.[62] Studi molekular menunjukkan ikatan hidrogen 5C=OH dan 4C=O pada residu grup asam amino (Lys771 dan Ser876) dengan chrysin, dan ikatan hidrogen antara epigenin (4C=O) dan rantai samping dari residu asam amino (Glu802 dan Lys771) menjadikannya sebagai inhibitor XO yang kuat. Studi lain oleh Lin et al. menyatakan bahwa chrysin berinteraksi dengan pusat aktif XO (Mo) sehingga melemahkan ikatan XO dengan substrat aslinya berupa xantin yang mengakibatkan perubahan struktur XO. XO juga

dihambat secara kompetitif oleh luteolin dengan hubungan hidrofobik pada sisi pengikatan.[59]



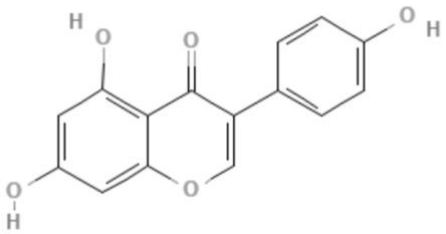
Gambar 0.5 Struktur senyawa chrysin, apigenin, dan luteolin.[63–65]

Penelitian yang dilakukan pada *Autocarpus communis* yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut etil asetat berhasil mengisolasi senyawa flavanon dengan menggunakan teknik kromatografi kolom, dimana flavanon dapat menginhibisi enzim xantin oksidase namun dengan tingkat inhibisi yang lemah.[59,66]



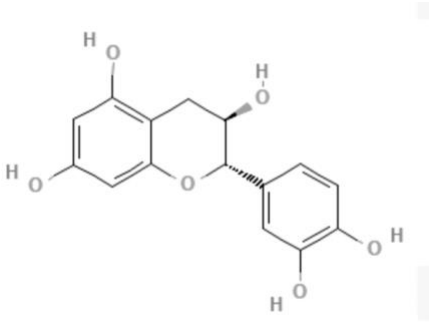
Gambar 0.6 Struktur senyawa flavanon.[67]

Pada penelitian fraksi etil asetat dari ampas tahu teridentifikasi senyawa isoflavon berupa genistein yang juga memiliki efek inhibisi dari enzim XO.[68] Genistein menginhibisi XO secara kompetitif, kompleks genistein-XO berhubungan secara hidrofobik, mengubah konformasi struktur sekunder XO dan menyebabkan penghambatan XO dengan menghambat hubungan dengan substratnya yaitu hipoxantin atau xantin. [59]



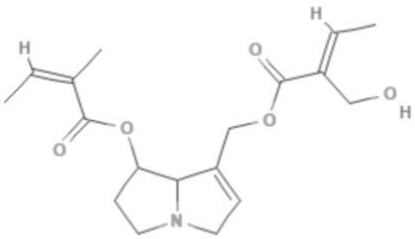
Gambar 0.7 Struktur senyawa genistein.[69]

Etil asetat juga dikonfirmasi menjadi pelarut yang efektif dalam melarutkan flavonoid jenis katekin pada ekstrak teh hijau.[70] 4′-hidroksiasetofenon dan epicatechin-(4β,8)-epicatechin gallate ditunjukkan sangat kuat menghambat XO dengan mode kompetitif tipe campuran.[59]



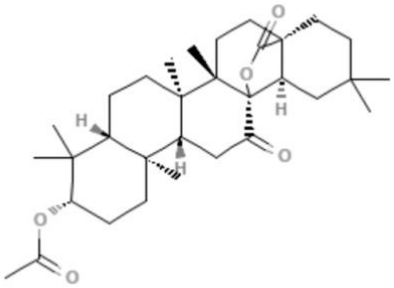
Gambar 0.8 Struktur senyawa katekin.[71]

Pada penelitian ini didapatkan kandungan metabolit sekunder berupa alkaloid dan terpenoid. Ahmad et al. menyebutkan bahwa oxindole alkaloid yang diekstraksi dari *Isatis costata* memiliki kemampuan yang baik untuk menurunkan kadar asam urat serum, namun belum dijelaskan lebih lanjut mengenai mekanisme spesifik mengenai efek tersebut. [59]



Gambar 0.9 Struktur senyawa alkaloid.[72]

Banyak yang telah meneliti bahwa terpenoid dari berbagai spesies tumbuhan efisien untuk mengobati hiperurisemia, namun belum banyak penelitian yang telah menunjukkan bagaimana mekanisme spesifiknya. Tiga glikosida monoterpen (1-O-β-D-glucopyranosyl-8-O-benzoylpaeonisuffrone, paeoniflorin dan albiflorin) dimurnikan dari *Paeonia lactiflora* dan diuji untuk aktivitas penghambatan XO. Dari senyawa murni albiflorin dan paeoniflorin memiliki aktivitas penghambatan XO masing-masing dengan IC_{50} 110,96 ± 0,06 dan 99,36 ± 0,08 μM.[59]



Gambar 0.10 Struktur senyawa terpenoid.[26]

Pada tanaman lain yang sudah diteliti dapat menjadi pengobatan alternatif lainnya dari hiperurisemia diantaranya adalah *Annona muricata* memiliki IC_{50} sebesar 66,82 ppm, *Ortosiphon stamineus* memiliki IC_{50} sebesar 92,14 ppm, dan *Syzygium polyanthum* memiliki IC_{50} sebesar 45,67 ppm.[73,74]

4.5 Kesetaraan IC_{50} dan Berat Simplisia Batang Kayu Kuning

Penelitian ini menggunakan 750 gram simplisia batang kayu kuning dan didapatkan fraksi etil asetat batang kayu kuning sebanyak 1,52 gram. Berdasarkan data yang diperoleh pada penelitian ini, didapatkan IC_{50} fraksi etil asetat batang kayu kuning adalah sebesar 23,99 ppm, sehingga dapat diperoleh nilai kesetaraan IC_{50} dengan berat simplisia batang kayu kuning yang dibutuhkan sebagai berikut:

Berat simplisia yang dibutuhkan = IC_{50} / berat fraksi etil asetat batang kayu kuning x berat simplisia, sehingga 0,02399 mg/mL / 1.520 mg x 750.000 mg = 11,84 mg/mL. Jika penyeduhan dilakukan dengan 200 mL air dan didapatkan berat simplisia efektif sebesar 2,37 gram.

Penelitian ini menggunakan 204,5 mg tablet allopurinol yang pada satu tabletnya mengandung 100 mg zat aktif allopurinol. Berdasarkan data yang diperoleh pada penelitian ini, didapatkan IC_{50} allopurinol sebesar 17,16 ppm, sehingga dapat diperoleh nilai kesetaraan IC_{50} dengan allopurinol yang dibutuhkan sebagai berikut.

Berat allopurinol yang dibutuhkan = IC_{50}/berat tablet allopurinol x berat zat aktif allopurinol dalam satu tablet = 0, 01716 mg/mL / 100 mg x 204,5 mg = 0,035 mg/mL. Jika penyeduhan dilakukan dengan 200 mL air dan didapatkan berat allopurinol yang efektif sebesar 7 mg.

Berdasarkan perhitungan di atas, didapatkan perbandingan bahwa 7 mg allopurinol setara dengan penggunaan fraksi etil asetat kayu kuning sebanyak 2,37 gram.