

## UJI INHIBISI ENZIM XANTIN OKSIDASE EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn.)

Slamet<sup>1)</sup>, Partomuan simanjuntak<sup>2)</sup>, Siswa setyahadi<sup>2)</sup>.

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila

<sup>1</sup>Stikes Muhammadiyah Pekajangan Pekalongan.

email: [slamet93ffua@gmail.com](mailto:slamet93ffua@gmail.com)

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi Pancasila, Universitas Pancasila

<sup>2</sup>Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Cibinong

<sup>3</sup>Badan Peneliti dan Penerapan Teknologi serpong

### ABSTRAK

*Soursop plants used by the public for traditional medicine for various diseases such as cancer, diabetes and many others. Efficacy of soursop, which has been studied is as an antioxidant, anti-gout, anti-bacterial, anti-malaria, antimolusca, analgesic and anti-inflammatory, intestinal worms or parasites, hypertension, depression or stress, and normalize the nervous depressed .. chemical constituents in leaves of Annona muricata L which are alkaloids , essential oils . , and acetogenins. It is expected from the content of existing substances for the treatment of gout. Uric acid is a degenerative disease that is very disturbing sufferers. The prevalence of gout tends to increase in the future and attack age. The prevalence of gout in Indonesia occurred at ages under 34 years by 32% and the highest incidence in the population Minahasa at 29.2% . The objective of this study was to determine the power of inhibition of soursop extract obtained from hexane, ethyl acetate, ethanol 96%, aqua, and decog*

**Keywords:** *Annona muricata, xantin oksidase, xantin, inhibisi asam urat, hexana*

### 1. PENDAHULUAN

Tanaman sirsak banyak digunakan oleh masyarakat untuk obat tradisional untuk berbagai penyakit seperti penyakit kanker, diabetes melitus dan banyak lagi lainnya. Khasiat sirsak, yang sudah diteliti yaitu sebagai antioksidan, anti gout ,anti bakteri, anti malaria, antimolusca, analgesik serta anti inflamasi, cacingan atau parasit, hipertensi, depresi atau stres, dan menormalkan syaraf yang tertekan..

Kandungan kimia yang ditemukan dalam daun *Annona muricata* L adalah alkaloid minyak esensial. dan acetogenins. Kandungan annonaceous acetogenins dalam daun sirsak merupakan senyawa antitumor dan kanker yang berkeja baik sekali tanpa merusak sel yang sehat.

Perkembangan ilmu pengetahuan dan

teknologi serta pola hidup masyarakat berdampak munculnya berbagai penyakit degeneratif yang membahayakan. Penyakit degeneratif salah satunya asam urat. Asam urat merupakan salah satu dari yang sangat membahayakan, karena bukan hanya mengganggu kesehatan tetapi juga dapat mengakibatkan cacat pada fisik. Penyakit ini juga berkaitan erat dengan ginjal, karena ginjal berfungsi sebagai tempat pembuangan asam urat yang berlebihan. Ketika ginjal tidak punya kemampuan untuk membuang asam urat yang berlebihan, maka terbentuk asam urat hal tersebut menunjukkan ginjal rusak yang berpengaruh pada fungsi tubuh (1).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya inhibisi dari ekstrak sirsak yang dilakukan secara bertingkat yang dimulai dari hexana, etil acetat, etanol 96%, ekstrak air serta decog.

## 2. BAHAN DAN METODA

### BAHAN

Daun sirsak diambil dari perkebunan disekitar Yogyakarta dan telah dideterminasi oleh Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Indonesia. Bahan kimia yang digunakan akuades, etanol 96%, hexana, etil asetat, enzim xantin oksidase, substrat xantin

**ALAT** : Spectrum uv, inkubator, mikropipet merk Socorex dan alat gelas laboratorium lainnya

### Metoda :

*Pembuatan simplisia dan Ekstraksi dan uji fitokimia*

#### **Pembuatan simplisia**

Daun sirsak yang digunakan adalah dimulai dari daun yang terletak lembar keempat dari pucuk ke arah daun yang lebih tua. Serbuk daun sirsak kering disiapkan dengan mengeringkan daun sirsak menggunakan oven pada suhu 50°C hingga kadar air kurang dari 10%. Daun sirsak kemudian dihaluskan hingga diperoleh serbuk daun sirsak kering berukuran 80 mesh.

#### **Ekstraksi**

Ekstraksi dengan metode maserasi bertingkat mulai dari n-heksan; etil asetat; etanol; air dan dekok dengan air dengan perbandingan 1:10. Hasil dari maserasi dan dekok disaring dan filtratnya dikumpulkan. Filtrat kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak daun sirsak.

#### **Uji Aktivitas enzim Xantin Oksidase (XO)**

Uji ini melalui rangkaian tahap :

##### **a.Pembuatan Kurva Standar untuk Uji Daya Inhibisi Enzim Xantin Oksidase (34)**

Larutan substrat (xantin) dibuat pada berbagai konsentrasi (0,1; 0,2;0,3; 0,4; 0,5; 0,6; dan 0,7 mM), kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 293 nm. Kurva hubungan antara konsentrasi dan serapan dibuat. Persamaan kurva linear tersebut digunakan untuk menghitung aktivitas xantin oksidase.

##### **b.Uji Daya Inhibisi Ekstrak daun *Annona muricata* L Enzim Xantin Oksidase Secara In Vitro (35).**

Uji daya inhibisi ekstrak *Annona muricata* L terhadap xantin oksidase dilakukan pada kondisi optimumnya. Menurut Tamta *et al.* (2005), yaitu pada waktu inkubasi 45 menit, suhu 20°C, pH 7,5, konsentrasi xantin oksidase 0,1 unit/ml, dan konsentrasi substrat (xantin) 0,7 mM. Ekstrak kering dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan variasi konsentrasi. Selanjutnya kedalamnya ditambahkan larutan larutan penyangga kalium fosfat 50 mM pH 7,5 sampai volumenya menjadi 1,9 ml. Campuran kemudian ditambahkan 1 ml xantin 2,1 mM dan xantin oksidase 0,1 unit/ml sebanyak 0,1 ml lalu diinkubasi pada suhu 20°C selama 45 menit. Setelah diinkubasi, ke dalam campuran dengan segera ditambahkan HCl 0,58 M sebanyak 1 ml untuk menghentikan reaksi. Campuran diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 294 nm untuk melihat seberapa besar sisa xantin yang tidak bereaksi dalam sampel uji. Daya inhibisi yang diperoleh dibandingkan dengan produk komersil yang ada dipasaran, yaitu allopurinol.

Selain itu dibuat blanko dengan perlakuan sama yang berbeda tanpa ekstrak. Dan pengukuran serapan dilakukan untuk mendapatkan data serapan blanko,

##### **c.Penentuan IC50**

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi yang terbaik Ekstrak Daun Sirsak. Pengujian inhibisi xantin oksidase dilakukan terhadap sampel dengan berbagai konsentrasi yaitu, 20 mg/mL, 40 mg/mL, 60 mg/mL dan 80 mg/mL. Setelah itu dilakukan penentuan nilai IC<sub>50</sub>. Inhibition concentration 50 atau IC<sub>50</sub> merupakan nilai konsentrasi minimal ekstrak yang dapat menginhibisi enzim sampai 50%. Nilai IC diperoleh dari persamaan  $y = a + bx$  yang dihasilkan dari plot hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan nilai persentase inhibisi dengan a adalah nilai konsentrasi ekstrak dan b adalah persentase inhibisi xantin oksidase.

**Uji Fitokimia (Harborne 1987)**

Uji fitokimia dilakukan pada ekstrak yang mempunyai aktivitas inhibisi Xantin Oksidase meliputi :

**Identifikasi Alkaloid.**

0.05 gram ekstrak daun sirsak diberi 10 mL kloroform dan beberapa tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> M. Fraksi asam diambil dan dibagi menjadi 3 bagian, kemudian ditambahkan pereaksi Dragendorf, Meyer, dan Wagner. Alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan merah pada pereaksi Dragendorf, dan endapan coklat pada endapan pereaksi Wagner.

**Identifikasi Flavonoid.**

0.05 gram ekstrak daun sirsak ditambah 10 mL air. Campuran kemudian dipanaskan selama 5 menit, disaring, dan diambil filtratnya. Filtrat diberi serbuk Mg, 1 mL HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol. Campuran dikocok kuat-kuat. Uji positif flavonoid ditandai dengan munculnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol.

**Identifikasi Saponin.**

0.05 gram ekstrak daun sirsak ditambah air kemudian dididihkan selama beberapa menit. Larutan disaring dan filtratnya dikocok kuatkuat. Timbulnya buih yang stabil selama 10 menit setelah pengocokkan menunjukkan terdapatnya saponin.

**Identifikasi Tanin.**

0.05 gram ekstrak daun sirsak ditambah air kemudian dididihkan selama beberapa menit. Larutan ini disaring dan filtratnya ditambah FeCl<sub>3</sub> 1% (b/v). Warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan terdapatnya tanin.

**Identifikasi Triterpenoid dan Steroid.**

0.05 gram ekstrak daun sirsak ditambah 25 mL etanol 30% lalu dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Filtratnya diuapkan lalu ditambah eter. Lapisan eter ditambah pereaksi Lieberman Buchard. Warna merah atau ungu menunjukkan triterpenoid. Warna hijau atau biru menunjukkan steroid.

**2.13 Analisis Data**

Data kurva baku Larutan substrat (xantin) dari berbagai konsentrasi (0,1; 0,2;0,3; 0,4; 0,5; 0,6; dan 0,7 mM) didapat, dibuat kurva baku serta persamaan regresinya. Kurva baku untuk menghitung substrat xantin yang belum bereaksi.

Hasil data absorban blanko, ekstrak, pembanding alupurinol dimasukkan ke dalam persamaan regresi larutan substrat xantin, sehingga didapat substrat yang belum bereaksi.

Aktifitas xantin oksidase dihitung dengan rumus :

$$\text{Aktivitas X.O} = \frac{\text{xantin yang bereaksi (Mm)}}{\text{Vol Enzim (L) X Waktu inkubasi (menit)}}$$

Sedangkan xantin yang bereaksi dihitung dari rumus :

$$\text{Xantin yang bereaksi} = \text{Xantin total} - \text{xantin sisa}$$

Persen inhibisi dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Aktivitas XO blanko} - \text{aktivitas X.O sampel}}{\text{Aktivitas X.O blanko}} \times 100\%$$

Hasil dari persentasi inhibisi vs konsentrasi (ppm) diplot jadi persamaan regresi. Dari persamaan ini kemudian di dapat IC<sub>50</sub>.

**3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Ekstraksi**

Ekstraksi dari simplisia daun sirsak (*Annona muricata* Linn). dilakukan dengan cara maserasi bertingkat berturut-turut dengan menggunakan pelarut n-heksan; etilasetat; etanol 96%; air sebanyak 10 L selama 24 jam dan dilakukan pengulangan sebanyak 2x. Ekstrak hasil penyarian dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C. Didapatkan rendemen ekstrak kering seperti yang ditunjukkan ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 1., Hasil ekstrak daun sirsak

Sampel Bobot (g)	Rendermen	(%)*
Heksana	6,62	0,44
Etil Asetat	19,72	1,31
Butanol	9,98	0,66
Air	12,93	0,86

\* dihitung terhadap 1,5 kg simplisia kering.

Dari tabel 2 hasil ekstrak daun sirsak didapat rendermen masing-masing pembawa yang banyaknya berbeda. Paling banyak rendermen pada etil acetat. Hal ini menunjukkan zat aktif yang banyak yang terdapat pada ekstrak etilasetat mempunyai sifat kepolaran yang sama dengan etil asetat..

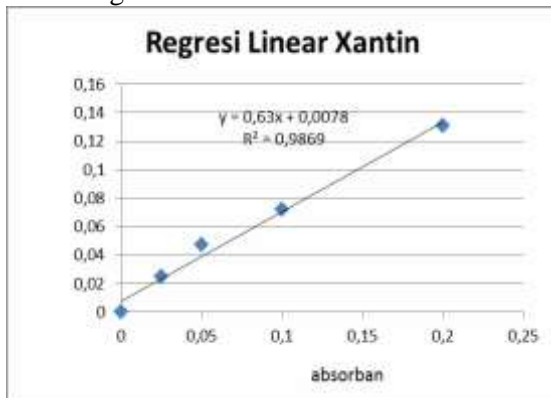
**Inhibisi enzim Xantin Oksidase**

Hasil yang didapat pada pengukuran absorban untuk pembuatan kurva baku substrat xantin:

Tabel.2. Substrat xantin konsentrasi vs absorbansi

Konsentrasi (nM)	Absorbansi
0	0
0,025	0,025
0,05	0,047
0,1	0,072
0,2	0,131

Kurva regresi linier konsentrasi vs absorban

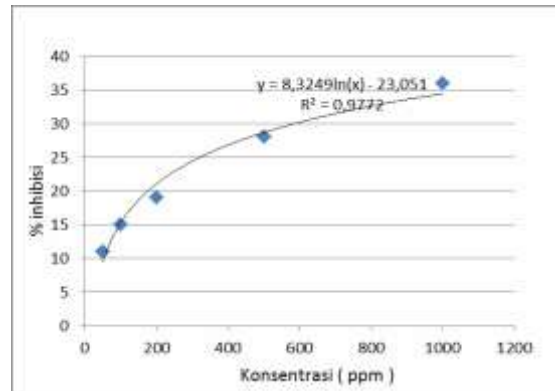


Dari konsentrasi, peneliti membuat konsentrasi 0,025 mM, 0,05mM, 0,1mM, 0,2 mM.

Persentasi inhibisi dari fraksi n-hexana terdapat pada tabel 3 berikut :

N hexana (ppm)	% inhibisi
1000	36
500	28
200	19
100	15
50	11

Kurva fraksi n-hexana konsentrasi vs % inhibisi.

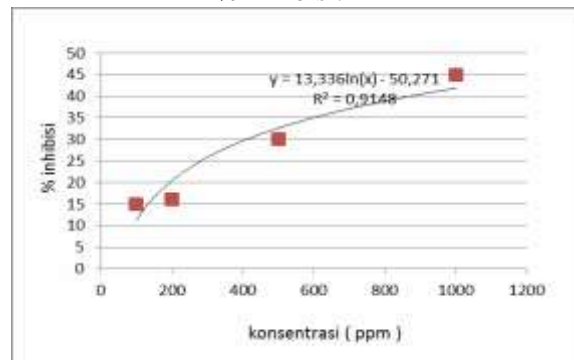


IC 50 fraksi n-hexana = 6469,66 ppm

Persentasi inhibisi dari fraksi Etil asetat terdapat tabel 4 :

etil acetat	inhibisi
1000	45
500	30
200	16
100	15
50	11
25	4

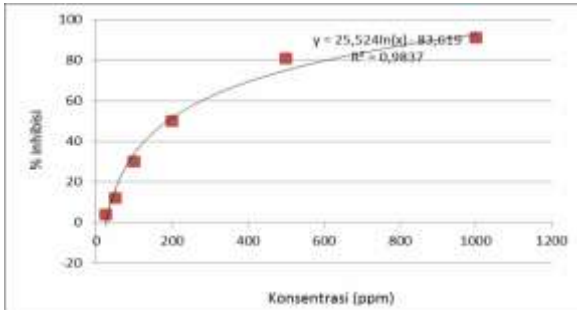
Kurva fraksi etil asetat konsentrsi (ppm) vs % inhibisi.



IC50 fraksi etil acetat = 3462,70 ppm

Persentase inhibisi dari fraksi etanol terdapat pada tabel 4 berikut :

Kurva fraksi etanol konsentrasi vs % inhibisi

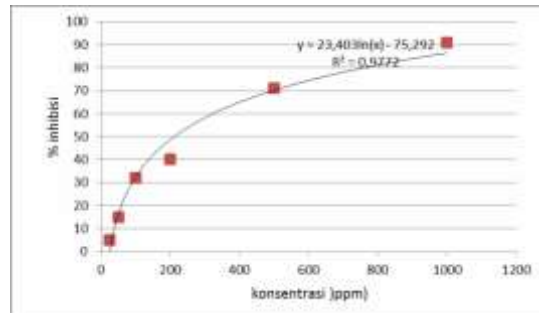


**IC 50 etanol 186.7928 ppm**

Persentase inhibisi dari fraksi air terdapat pada tabel 6 :

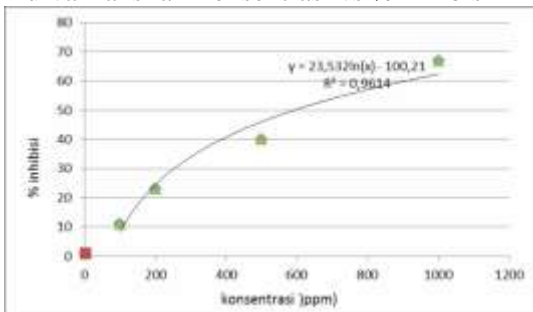
air ( ppm)	%inhibisi
1000	67
500	40
200	23
100	11

Etanol (ppm)	% inhibisi
1000	91
500	81
200	50
100	30
50	12
25	4



**IC50 fraksi decog air 591,7001 ppm**

Kurva fraksi air konsentrasi vs % inhibisi



**IC50 591,7001**

Persentase inhibisi dari fraksi decog air terdapat pada tabel 7:

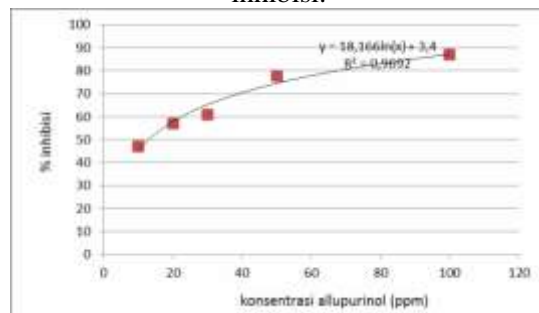
decog air (ppm)	%inhibisi
1000	91
500	71
200	40
100	32
50	15
25	5

Kurva fraksi decogair konsentrasi vs % inhibisi

Persentase inhibisi dari allopurinol decog air terdapat pada tabel 8 :

alupurinol (ppm)	%konsentrasi
100	87
50	77,76
30	61
20	57
10	47

Kurva fraksi allupurinol konsentrasi vs % inhibisi.



**IC 50 dari allupurinol 2,4108997064 ppm**

**Hasil Uji Fitokimia**

Uji fitokimia dilakukan pada fraksi yang mempunyai aktivitas inhibisi paling besar

terhadap kedua enzim. Hasil uji fitokimia fraksi air dan fraksi etanol ditunjukkan pada table 5.

Tabel 5. uji fitokimia ekstrak air dan ekstrak etanol daun sirsak

uji	ekstrak	
	Air	Etanol
Alkaloid	+	+
Meyer	+	+
Wagner	+	+
Dragenorf	+	+
Flavonoid	+	+
Tannin	+	+
Saponin	+	+
Triterpenoid	-	-
Saponin	+	++

Keterangan: - = tidak terdeteksi

+ = terdeteksi

++ = terdeteksi lebih kuat

#### 4. KESIMPULAN

Fraksi etanol mempunyai IC50 yang paling kecil yait sebesar 186,7928 dibandingkan dengan fraksi lain walaupun masih lebih besar dari Allupurinol yang sebesar 2,410 ppm.

#### 5. REFERENSI

- Leboeuf M, Cavé A, Bhaumik PK, Mukherjee B, Mukherjee R The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21: 1982., p.2783-813.
- Péllissler Y, Marion C, Kone D, Lamaty G, Menut C, Besslere JM Volatile components of *Annona muricata* L. *J Essen Oil Res* 6: 1994., p. 411-14.
- Pratiwi, V F., Gambaran Kejadian Asam Urat ( Gout ) Berdasarkan Kegemukan Dan Konsumsi Makanan (Studi Di Wilayah Kerja Puskesmas Kalisat Kecamatan Kalisat Kabupaten Jember).: Jember; 2013
- Kossouh C, Moudachirou M, Adjakidje V, Chalchat JC, Figuérédo G Essential oil chemical composition of *Annona muricata* L. leaves from Benin. *J Essen Oil Res* 19: 2007., p. 307-309.
- Zeng L, Wu FE, Oberlies NH, McLaughlin JL, Sastrodihadjo S. Five new onotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *J Nat Prod* 59: 1996, p.1035-042.
- Kim GS, Zeng L, Alali F, Rogers LL, Wu FE, McLaughlin JL, Sastrodihardjo S. Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, anomuricin E and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. *J Nat Prod* 61: 1998, 432 - 36.
- Chang FR, Liaw CC, Lin CY, Chou CJ, Chiu HF, Wu YC. New adjacent bis-tetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Med* 69: 2003, p. 241 - 46.
- Iswantini D, Darusman LK. Effect of Sidaguri Extract as an Uric Acid Lowering Agent On the Activity of Xanthine Oxidase Enzyme. Proceedings of International Symposium On Biomedicines Biopharmaca Research, Bogor Agricultural University. . 2003
- Tamta H, Kalra S, Mukhopadhyay AK 2005. Biochemical Characterization of Some Pyrazolopyrimidine\_Based Inhibitors of Xanthine Oxidase. *Biochemistry*: 49–54.
- Iswantini D. Bioprospeksi sidaguri (*Sida rhombifolia*) dan seledri (*Apium graveolens*): formulasi obat gout dan aktivitas inhibisinya terhadap xantin oksidase. Bogor: Biofarmaka.; 2003
- Co s P et al , Struktur Activity relationship and clasifikasi flavonoids as inhibitors of xanthin oxidase and superoxide scavengers J. Nat. Prod . 61:71-76.
- Santos AF, Sant'Ana AEG. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phytomedicine* 8: 2001, p. 115-20. .
- Roslida AH, Tay CE, Zuraini A, Chan PF 2010 Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. *J Nat Remedies* 10: 2001, p. 97-104.

- Leboeuf M, Legueut C, Cavé A, Desconclois JF, Forgacs P, Jacquemin H 1981. Alkaloids of Annonaceae. XXIX. Alkaloids of *Annona muricata*. *Planta Med* 42: p 37-44.
- Kim GS, Zeng L, Alali F, Rogers L, Wu F, Sastrodihardjo S, McLaughlin JL. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry* 49: 1998, p. 565 – 571..