

INHIBITION ACTIVITY OF XANTHINE OXIDASE OF ETHANOL EXTRACT OF AVOCADO LEAVES WITH IN VITRO METHOD

Deden Winda Suwandi, Farid Perdana

Fakultas MIPA-Universitas Garut, Jl.Jati No. 42B, Tarogong, Garut

Korespondensi: Deden Winda Suwandi (deden@uniga.ac.id)

ARTICLE HISTORY

Received: 29 Mei 2017

Revised: 6 Juni 2017

Accepted: 19 Juni 2017

Abstract

Hyperuricemia is a condition characterized by excessive levels of uric acid in the blood because the production of uric acid in the body exceeds the normal level which can lead to gout in the form of deposition of monosodium urate crystals. One of the drugs used to treat gout was allopurinol with the mechanism of inhibiting the activity of xanthine oxidase. Avocado is one of the plants that contain flavonoids that people use for traditional medicine. From previous studies reported that flavonoids can potentially lower blood uric acid levels by inhibiting the activity of xanthine oxidase. Due to the flavonoids contained in avocado leaves then investigated if the ethanol extract of leaves of avocado can inhibit the activity of xanthine oxidase. The ethanol extract of avocado leaves made by maceration. Inhibition of xanthine oxidase activity by the ethanol extract of avocado leaves in vitro was determined by a decrease in the production of uric acid that is monitored by a spectrophotometer at (λ) 293 nm with xanthine as a substrate. Rated speed were then used to calculate the value of the activity. IC₅₀ is then determined. Allopurinol used as a comparison. The results showed the ethanol extract of leaves of avocado is able to inhibit xanthine oxidase activity with IC₅₀ 65.55 ppm is weaker compared with allopurinol IC₅₀ of 0.59 ppm.

Key words: *Hyperuricemia, avocado leaves, xanthine oxidase.*

AKTIVITAS PENGHAMBATAN XANTIN OKSIDASE EKSTRAK ETANOL DAUN ALPUKAT (*Persea americana MILL*) SECARA IN VITRO

Abstrak

Hiperurisemia merupakan keadaan berlebihnya kadar asam urat dalam darah disebabkan oleh ketidak seimbangan antara produksi dan ekskresi asam urat dalam tubuh. Kondisi ini dapat menimbulkan penyakit gout yang ditandai pengendapan kristal monosodium urat. Salah satu obat yang digunakan untuk menurunkan kadar asam urat adalah allopurinol dengan cara menghambat aktivitas xantine oksidase sebagai enzim pembentuk asam urat. Penggunaan obat tradisional seperti tumbuhan alpukat yang mengandung flavonoid diduga memiliki aktivitas antihiperurisemia karena dilaporkan bahwa senyawa flavonoid dapat menurunkan kadar asam urat darah dengan cara menghambat aktivitas xantin oksidase. Telah dilakukan penelitian terhadap ekstrak etanol daun alpukat dalam menghambat aktivitas xantin oksidase sehingga bisa digunakan sebagai obat

penyakit gout. Aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase oleh ekstrak etanol daun alpukat secara invitro ditentukan melalui penurunan produksi asam urat yang diukur dengan alat spektrofotometer pada (λ) 293 nm dengan xantin sebagai substrat. Ekstrak etanol daun alpukat dapat menghambat enzim xantin oksidase pada pada konsentrasi 40; 60; 80; 100 dan 120 ppm dengan persen penghambatan sebesar 27,97; 51,98; 64,07; 71,15 dan 77,54 %. Aktivitas penghambatan xantin oksidase ekstrak daun alpukat ditentukan dengan nilai IC50, dimana hasilnya menunjukkan ekstrak etanol daun alpukat mampu menghambat aktivitas xantin oksidase dengan IC50 65,55 ppm yang lebih lemah bila dibandingkan dengan IC50 allopurinol yaitu sebesar 0,59 ppm.

Kata kunci: Hiperurisemia, daun alpukat, penghambatan xantin oksidase.

Pendahuluan

Pirai atau gout merupakan penyakit metabolik yang ditandai oleh episode artritis akut berulang karena adanya endapan kristal monosodium urat pada sendi-sendi dan jaringan sekitarnya.¹ Penyakit ini terjadi biasanya karena adanya peningkatan kadar asam urat dalam darah hingga di atas normal (hiperurisemia). Hiperurisemia merupakan suatu keadaan yang ditandai oleh berlebihnya kadar asam urat dalam darah karena produksi asam urat dalam tubuh melebihi kadar normal atau disebabkan oleh asupan makanan yang kaya akan asam nukleat seperti usus, biji-bijian, seafood, dan makanan berasal dari yeast yang merupakan sumber purin tinggi. Purin sendiri merupakan prekursor bagi biosintesis asam urat dengan katalis enzim xantin oksidase.²

Pengobatan penyakit gout salah satunya adalah dengan menurunkan kadar asam urat darah dengan cara mengurangi produksi asam urat. Alopurinol adalah contoh obat yang bekerja menghambat pembentukan asam urat melalui penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase.³ Selain allopurinol, penelitian sudah banyak melaporkan dari bahan alam yang memiliki aktivitas antihiperurisemia yang selain secara empiris terbukti berkhasiat menurunkan kadar asam urat dalam darah, terbukti juga secara ilmiah dapat mengobati hewan yang hiperurisemia.⁴

Penggunaan obat dari bahan alam lebih aman karena memiliki efek samping yang relatif lebih kecil jika digunakan secara tepat.⁵ Salah satu tumbuhan obat yang banyak digunakan secara empiris terutama untuk mengobati penyakit reumatik adalah tumbuhan alpukat terutama bagian daunnya.

Berdasarkan latar belakang diatas masalah yang dapat diidentifikasi adalah apakah daun alpukat memiliki aktivitas antihiperurisemia melalui penghambatan enzim xantin oksidase dalam memproduksi asam urat.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas daun alpukat sebagai antihiperurisemia melalui penghambatan enzim xantin oksidase dalam memproduksi asam urat secara in vitro serta menentukan nilai IC50 sebagai konsentrasi efektif sebagai antihiperurisemia.

Metode

Determinasi tumbuhan

Tumbuhan alpukat dideterminasi di Laboratorium Taksonomi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran.

Pembuatan ekstrak

Simplisia kering diekstraksi dengan etanol 70% (3 x 24 jam) secara maserasi pada suhu kamar. Pelarut kemudian diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental.

Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap ekstrak kental untuk mengetahui adanya kandungan senyawa metabolit sekunder seperti golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon dan steroid/triterpenoid.

Pengujian hambatan xantin oksidase secara In vitro

Metode penentuan hambatan xantin oksidase berdasarkan metode penelitian yang ditulis oleh Xu fan et al., 2014. Pertama-tama menyiapkan zat uji, Pembanding (kontrol positif) dan kontrol negatif. Disini dilakukan dengan membandingkan absorbansi asam urat yang terbentuk antara larutan uji (xantin + sampel uji + xantin oksidase) dengan absorbansi kontrol negatif (xantin + xantin oksidase) serta absorbansi kontrol positif (xantin + allopurinol + xantin oksidase). Disini diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 293 nm. Allopurinol (100 µg/mL) dipakai sebagai pembanding untuk uji penghambatan xantin oksidase. Larutan pengujian terdiri dari 300 µL dari 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5), 100 µL dari larutan uji dalam DMSO, 100 µL larutan enzim (0.2 units/mL xantin oksidase dalam buffer phosphate) dan 100 µL aquadest. Larutan pengujian di atas diinkubasi pada 37°C selama 15 menit dalam inkubator. Selanjutnya, larutan substrat 200 µL (0.15 mM xantin) ditambahkan pada larutan uji dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan 200 µL 0.5 M HCl. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV/VIS dengan memakai blanko larutan enzim dalam buffer fosfat. Sebagai kontrol digunakan 100 µL DMSO yang mengandung asam urat.⁶

Hasil dan Pembahasan

Determinasi simplisia

Tumbuhan segar dideterminasi di Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tumbuhan yang digunakan adalah tumbuhan Alpukat (*Persea americana* Mill).

Ekstrak etanol daun alpukat (1 kg) dimaserasi dengan etanol 70% (3 x 24 jam) menghasilkan ekstrak kental sebanyak 112 gram atau rendemen ekstrak adalah 11,2 %. Ekstrak kental yang diperoleh berwarna hijau kecoklatan, berbau khas gula dan berasa pahit.

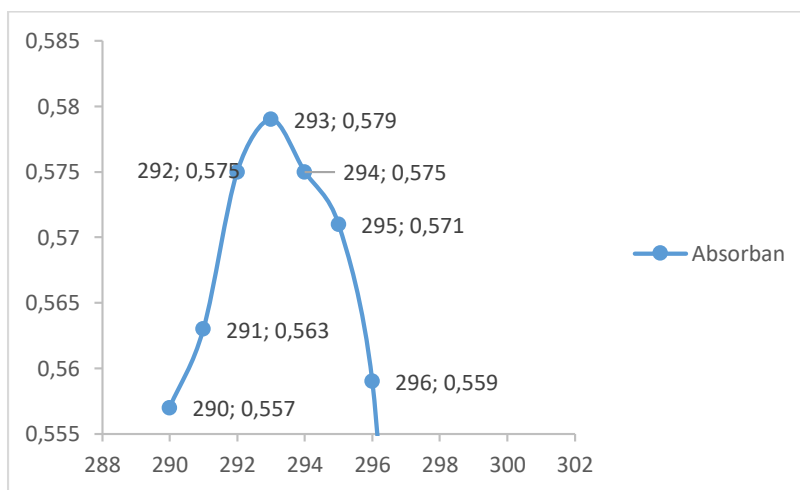
Tabel 1. Hasil Penapisan Simplisia, Ekstrak Etanol Daun Alpukat (*Persea americana* Mill)

Metabolit Sekunder	Hasil Penapisan	
	Simplisia	Ekstrak Etanol
Alkaloid	+	+
Flavonoid	+	+
Tanin	+	+
Kuinon	+	+
Saponin	+	+
Steroid/Triterpenoid	+	+

Keterangan: (+) = Terdeteksi; (-) = Tidak terdeteksi

Hasil penapisan fitokimia di atas menunjukkan bahwa pada simplisia, ekstrak etanol daun alpukat terdeteksi adanya senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin, dan steroid/triterpenoid.

Pada pengujian aktivitas penghambatan xantin oksidase dilakukan untuk melihat mekanisme kerja sediaan uji terhadap penurunan kadar asam urat darah yang dilakukan secara *in vitro*. Pengujian aktivitas penghambatan xantin oksidase, pertama-tama dilakukan penetapan panjang gelombang maksimum dengan mengukur absorbansi pada larutan kontrol positif yang mengandung substrat xantin 0,15 mM, larutan buffer fosfat pH 7,5 konsentrasi 0,05 M yang diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit, selanjutnya ditambahkan enzim xantin oksidase, dan diinkubasi kembali pada suhu 25°C selama 30 menit, setelah itu reaksi dihentikan dengan penambahan HCl 1 N. Campuran larutan tersebut kemudian diukur absorbansinya pada variasi panjang gelombang 290-300 nm. Hasilnya diperoleh absorbansi yang paling optimal adalah pada panjang gelombang maksimum 293 nm dengan nilai absorbansi (A) 0,579. Hasil pengukuran absorbansi dan penetapan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva penetapan panjang gelombang maksimum

Selanjutnya, dilakukan pengujian terhadap penurunan kadar asam urat dengan mengukur absorbansi larutan uji dan larutan perbandingan allopurinol pada panjang gelombang 293 nm. Efek penghambatan allopurinol terhadap penghambatan enzim xantin oksidase ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai Absorbansi dan Persen Inhibisi Allopurinol terhadap Xantin Oksidase pada 293 nm.

Konsentrasi (ppm)	Serapan (A)	Inhibisi (%)
2,5	0,288	50,26
5	0,233	59,76
10	0,117	79,79
20	0,048	91,71

Selanjutnya untuk melihat efek penghambatan sediaan uji ekstrak etanol daun alpukat terhadap penghambatan enzim xantin oksidase, maka dilakukan pengujian terhadap penghambatan enzim xantin oksidase secara *in vitro*, dimana hasilnya ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai Absorbansi dan Persen Inhibisi Xantin Oksidase Ekstrak Etanol Daun Alpukat

Konsentrasi (ppm)	Serapan (A)	Inhibisi (%)
40	0,417	27,97
60	0,278	51,98
80	0,208	64,07
100	0,167	71,15
120	0,13	77,54

Pada table 2 dan 3 diatas, menunjukkan pengujian aktivitas penghambatan xantin oksidase, dimana, allopurinol dengan konsentrasi 20 ppm menunjukkan hasil persen inhibisi paling tinggi, dengan nilai penghambatan sebesar 91,71 %. Hal ini menunjukkan bahwa allopurinol yang biasa digunakan secara klinik untuk mengobati/menurunkan asam urat dalam darah, efektif menghambat pembentukan asam urat dengan mekanisme kerja penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase. Allopurinol memiliki struktur yang mirip dengan xantin yang merupakan substrat xantin oksidase dalam sintesis asam urat. Dalam tubuh, Allopurinol akan bersaing dengan xantin untuk mengikat sisi aktif enzim xantin oksidase dan bereaksi menjadi oksipurinol yang juga bekerja sebagai penghambat enzim xantin oksidase. Dimana, xantin oksidase merupakan salah satu enzim yang ada dalam tubuh manusia yang bertanggung jawab dalam sintesis asam urat dari substrat purin.⁷

Demikian juga dengan ekstrak etanol daun alpukat, secara *in vitro* diuji aktivitasnya sebagai penghambatan xantin oksidase. Dimana, persen inhibisi yang paling tinggi ditunjukkan pada konsentrasi 120 ppm dengan nilai 77,54 %. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun alpukat juga memiliki aktivitas menurunkan kadar asam urat melalui mekanisme kerja penghambatan enzim xantin oksidase.

Berdasarkan hasil pengujian *in vitro* ini terbukti bahwa ekstrak etanol daun alpukat dapat menurunkan kadar asam urat darah melalui penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase, meskipun potensinya jauh dibawah allopurinol. Pada penelitian sebelumnya, senyawa kimia alami yang terkandung pada berbagai spesies tanaman dilaporkan mengandung senyawa kimia seperti flavonoid memiliki aktivitas antihiperurisemia dengan mekanisme kerja sebagai inhibitor beberapa enzim termasuk xantin oksidase, siklooksigenase dan lipooksigenase.⁷

Selanjutnya, untuk melihat potensi kerja penghambatan enzim xantin oksidase, maka ditentukan nilai IC_{50} sebagai nilai konsentrasi obat yang dapat menghambat 50% pembentukan asam urat. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Nilai konsentrasi inhibisi (IC_{50}) allopurinol dan ekstrak daun alpukat pada panjang gelombang maksimum 293 nm

No	Nama Zat Aktif	IC_{50}
1	Allopurinol	0,59 ppm
2	Esktrak Daun Alpukat	65,55 ppm

Pada penelitian ini, allopurinol memiliki daya inhibisi tertinggi dibandingkan dengan daun alpukat. Allopurinol memiliki nilai IC_{50} 0,59 ppm, artinya allopurinol memiliki daya hambat perubahan xantin menjadi asam urat oleh enzim xantin oksidase hingga 50 % aktivitasnya atau kadar asam uratnya, yaitu pada konsentrasi 0,59 ppm. Nilai tersebut lebih baik jika dibandingkan dengan daya inhibisi ekstrak daun alpukat yang memiliki IC_{50} 65,55 ppm. Ini berarti bahwa potensi daun alpukat dalam menurunkan kadar asam

urat atau menghambat enzim xantin oksidase lebih lemah dibandingkan dengan allopurinol.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian di atas, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun alpukat memiliki aktivitas penghambatan xantin oksidase, terutama pada konsentrasi 120 ppm sebesar 77,54 % serta memiliki nilai IC50 sebesar 65,55 ppm.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada pimpinan universitas garut khususnya dekan fakultas MIPA yang sudah sepenuhnya mendukung terlaksananya penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Katzung B.G., Masters, S.B. & Trevor, A.J. 2012. Basic & Clinical Pharmacology, 12 Ed., New York: McGraw-Hill.
2. Abdullahi, W., Hamzah, R.U., Jigam, A.A., Yahya, A., Kabiru, A.Y., Muhammad, A., Sakpe, S., Adefolalu, F.S., Isah, M.C. & Kolo, M.Z. 2012. Inhibitory activity of xanthine oxidase by fractions *Crateva adansonii*, J. of Acute Disease, 126-129.
3. Gilman, A.G., Rall, T.W. & Nies, A. S., Taylor, P. 2012. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 12th Ed., New York. McGraw-Hill.
4. Sumiwi, S.A., 2014. Antihyperuricemia Screening Of *Mimosa Pudica* L. Herb Extract Through Its Analgesics And Antiinflammatory Activity Assay. *New Bionatura*, 16(2)..
5. Kristiani, R.D., Rahayu, D. dan Subarnas, A. Aktivitas Antihiperurisemia Ekstrak Etanol Akar Pakis Tangkur (*Polypodium Feei*) Pada Mencit Jantan, 2013, *J. Bionatura*, Vol. 15, No. 3, Halaman 174 – 177.
6. Xu Fan, Zhao Xueqian, Yang Lingli, Wang Xiuhua, and Zhao Jing., 2014, A New Cycloartane-Type Triterpenoid Saponin Xanthine Oxidase Inhibitor from *Homonoia riparia* Lour, *journal molecules*, 19, 13422-13431.
7. Nguyen M.T., Awale S., Tezuka Y., Tran Q.L., Watanabe H. And Kadota S., 2004., Xanthin Oxidase Inhibitory Activity of Vietnamese Medicinal Plants, *Biol. Pharm. Bull.* 27 (9) 1414-1421.