AKTIVITAS INHIBISI XANTIN OKSIDASE DAN KANDUNGAN SENYAWA POLIFENOL EKSTRAK SECANG (CAESALPINIA SAPPAN L.)

Sri Ningsih

Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi Tangerang

E-mail: sri.ningsih@bppt.go.id

Abstrak
Secang (*Caesalpinia sappan* L.) termasuk ke dalam suku Caesalpiniaceae adalah salah satu tanaman yang banyak terbukti mempunyai banyak khasiat farmakologi. Hiperuresemia adalah salah satu kelainan fisiologis yang disebabkan dengan kadar asama urat tinggi dimana prevalensi penderita cenderung meningkat. Asam urat merupakan produk akhir dari kerja enzim xantin oksidase (XO). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aktivitas esktrak secang dalam menginhibisi XO dan penentuan kadar senyawa polifenol. Ekstrak dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol pada suhu kamar. Hasil pengujian inhibisi XO dengan pembanding positif allopurinol pada konsentrasi akhir 100 ug/ml menunjukkan bahwa ekstrak secang mampu menginhibisi XO sebesar 98% relative terhadap pembanding positif. Hasil penentuan kadar polifenol menunjukkan bahwa ekstrak secang mempunyai kadar sebesar 99%. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak secang mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai bahan untuk pengobatan hiperuresemia.

Kata kunci: secang (*Caesalpinia sappan* L.), xantin oksidase, polifenol, hiperuresemia

Abstract
Secang (Caesalpinia sappan L.) belonging to Caesalpiniaceae family is one of the medicinal plant that had been claimed exhibiting pharmacological properties. Hyperuricemia is a disease that is characterized by high uric acid levels, in which the number of victim increase year by year in the worldwide. Uric acid is the end product of the enzyme xanthine oxidase (XO) metabolism. These researches were intended to evaluate the XO inhibitory activity of secang extract and determinate of polyphenol content. The extract was prepared by maceration using ethanol at room temperature. The results showed that secang extract was potential to inhibit XO by 98% relative to positive control, allopurinol, at the final concentration of 100 ug/ml. The polyphenol content of extract was 99%. It could be concluded that secang extract has potency to be developed as an ingredient for hyperuricemia treatment.

PENDAHULUAN

Hiperuresemia adalah suatu kondisi dimana kadar asam urat dalam darah meninggi. Prevalensi penderita hiperuresemian cukup tinggi yang menunjukan trend peningkatan sepanjang tahun. Survei kesehatan nasional melaporkan jumlah penderita AG Indonesia pada 1992 sebesar 2 juta kasus dan pada 1996 pada pria meningkat lebih dari 4,6% sedangkan pada wanita 2%. Hampir 32% serangan AG terjadi pada usia dibawah 34 tahun (Kodin, 2010). Hiperuresemia bisa menimbulkan komplikasi berupa Arthritis Gout (AG) (penimbunan kristal asam urat pada persendian dan jaringan ikat) dan terbentuknya batu ginjal (Halliwell, 1996).

Kadar asam urat dalam tubuh tergantung dari 3 proses yaitu konsumsi makanan tinggi purin, produksi asam urat dan pengeluaran asam urat. Kondisi tinggi urat dalam darah disebabkan dari produksi asam urat berlebih atau penurunan ekresi atau kobinasi keduanya. Diantara mekanisme menekan kadar urat dalam tubuh, mekanisme yang paling potensial adalah dengan menekan produksi asam

urat khususnya untuk kondisi hiperuresemia kronik (Ling, 2014). Metabolisme asam urat dalam tubuh dikerjakan oleh enzim xantin oksidase (XO). Selama proses metabolism tersebut, dihasilkan senyawa reaktif OH^- dan H_2O_2 yang bersifat toksik bagi sel dengan berinteraksi dengan fosfolipid membran mitokontria, mikrosom dan lisosom (Dew, 2005).

Secara klasik, penanganan AG dilakukan secara kombinasi mengatur gaya hidup dengan mengurangi konsumsi makanan tinggi purin dengan disertai penggunaan obat bahan kimia seperti allopurinol, obat korkitotropin, kortikosteroid, kolkisin, dan antiinflamasi nonsteroid pada serangan akut atau tujuan pencegahan. Diperkirakan, biaya tahunan di Amerika akibat munculnya kasus AG baru mencapai US$27 juta (Kim, 2003). Sementara itu, umumnya penggunaan obat kimia memberikan efek samping (Ling, 2014).

Telah dibuktikan bahwa bahan alam dengan kandungan flavonoid tinggi yang mempunyai efek sebagai antioksidan berkhasiat sebagai penurun asam urat (Spanou, 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 hiperuresemia.

METODE PENELITIAN

Bahan penelitian

Simplisia secang, etanol food grade, asam galat standar, Folin Ciocalteu, sodium karbonat p.a, DMSO (sigma), potassium phosphate monobasic (Sigma P 0662), sodium hydroxide (sigma, 221465), hydrochloride acid (Merck), Xanthin (X0626), xanthin oxidase (Sigma X4375), aquadest bebas CO2, allopurinol (tablet generik).

Penyiapan ekstrak

Simplisia secang diperoleh dari BP2TOOT Tawangmangu Surakarta. Guna memastikan kebenaran tanaman yang akan digunakan dalam penelitian ini, maka dilakukan determinasi tanaman secang (*Caesalpinia sappan* L.) di Pusat Penelitian Biologi-LIPI Cibinong.

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi sebagai berikut. Sebanyak 250 g sebuk kayu secang dimaserasi menggunakan pelarut 1 L etanol pada suhu kamar dengan pengadukan selama 12-14 jam. Selanjutnya filtrate dipisahkan dengan cara penyaringan, ampas diekstraksi ulang sekali lagi. Filtrate disatukan dan diuapkan menggunakan mesin ratavapour hingga diperoleh ekstrak kental.

Kharakterisasi ekstrak

Ekstrak kental dilakukan kharakterisasi yang meliputi kadar abu, kadar abu tidak larut asam, kadar senyawa larut etanol, kadar senyawa larut air, susut pengeringan, cemaran logam berat, cemaran mikroba mengacu pada ketentuan Badan POM (Depkes, 2009) sebagai berikut.

a. Kadar air

   Kadar air ditentukan menggunakan alat KarlFisher.

b. Kadar abu total

   Ditimbang saksama 0,5 g ekstrak kental kental dan masukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara. Krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dan

timbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas, diaduk, disaring melalui kertas saring bebas abu, dan filtrate dipisahkan. Pijarkan kertas saring beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, diuapkan dan dipijarkan hingga bobot tetap. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b.

c. Kadar abu tidak larut asam

Didihkan abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dengan 25 mL *asam klorida encer* LP selama 5 menit. Kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan dalam krus hingga bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b.

d. Kadar senyawa larut etanol

Timbang saksama lebih kurang 0,5 g ekstrak kental dan dimasukkan ke dalam labu bersumbat. Ditambahkan 100 mL *etanol 95% P*, kocok berkali-kali selama 6 jam pertama, biarkan selama 18 jam, dan segera disaring untuk menghindarkan penguapan etanol. Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105°C dan ditara pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari yang larut dalam etanol.

e. Kadar senyawa larut air

Ditimbang saksama lebih kurang 0,5 g ekstrak kental dan dimasukkan ke dalam labu bersumbat tambahkan 100 mL air yang telah jenuh kloroform, kocok berkali-kali selama 6 jam pertama, biarkan selama 18 jam, segera saring. Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105°C dan ditara pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari yang larut dalam air.

f. Susut pengeringan

Ditimbang saksama 0,5 g ekstrak kental dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 150°C dan ditara. Ratakan bahan dalam botol timbang hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5-10 mm dan dikeringkan pada suhu 150°C hingga bobot tetap. Selanjutnya, simpan botol dalam keadaan tertutup dalam eksikator hingga suhu ruang. Ditentukan kadar susut pengeringan.

g. Cemaran logam berat

Penetapan kadar logam berat yaitu Cd, Pb, As, dan Hg dilakukan menggunakan alat *inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy* (ICP-OES) yang dikalibrasi setiap hari menggunakan larutan standar dengan prosedur sebagai berikut:

Persiapan sampel

1) Ditimbang tidak kurang dari 0,5 g sampel ke dalam *vessel*. Ditambahkan 5 ml aquadem *ultrapure* (disaring dengan filter 18 MΩcm-1) dan 5 ml NHO3 *p. Vessel* ditutup dan dilakukan destruksi dengan menggunakan *microwave degasser* suhu 180°C dengan tekanan 400–1600 w (tergantung jumlah vessel) selama 15 menit.
2) Setelah selesai, *vessel* dibiarkan hingga suhu kamar, ditambahkan 2-3 tetes hidrogen peroksida dan akuadem hingga 50,0 ml. Disaring.

Larutan sampel siap untuk diinjeksikan pada mesin ICP-EOS.

Persiapan pembanding

Pembanding digunakan logam yang telah terstandar (ICP-MS *Standard, Matrix*: 5% HNO3, *Perkin Elmer Life and Analytical Sciences*). Dibuat standar *mix* dengan konsentrasi 0.05, 0.25, 0.5, 1, dan 2 ppm. Ditambahkan pelarut 10% NHO3 10% sebanyak 10% volume. Khusus standar Merkuri (Hg), dibuat konsentrasi 1, 5, 10, 15, 20 ppb. Ditambahkan pelarut HCl:air = 1:1 sebanyak 10% volume.

Pengukuran

Kondisi pengukuran berikut ini: *Nebulizer Gas flow rates*: 0,95 L/min; *Auxiliary Gas Flow*: 1,2 L/min; *Plasma Gas Flow*: 15 L/min; *Lens Voltage*: 7.25 V; ICP RF *Power*: 1100 W; CeO/Ce = 0,031; Ba++/Ba+ = 0,016. Analisis dilakukan jika nilai R2 kurva standar > 0,99 dan dan kurva kalibrasi di cek kembali setalah dilakukan analisa sebanyak 10 sampel. Sebagai blanko digunakan pelarut dan pengulangan pengukuran dilakukan sebanyak 2 kali. Kadar logam berat dalam sampel ditentukan dengan rumus:

$$Kadar(mg/kg) = \frac{Konsentrasi\ (mg/mL) \times Volume\ \ (mL)}{Bobot\ sampel\ (g)}$$

Persyaratan kandungan logam berat pada ekstrak adalah As ≤ 5 mg/kg atau mg/L atau ppm, Cd ≤ 0,3 mg/kg atau mg/L atau ppm, Pb ≤ 10 mg/kg atau mg/L atau ppm, dan Hg ≤ 0,5 mg/kg atau mg/L atau ppm (36).

h. Cemaran mikroba

Dibuat satu seri pengenceran sampel uji dengan menimbang sebanyak 1 g ekstrak kental, dilarutkan dalam 10 ml larutan pengencer yaitu media ASA (Air Suling Agar). Selanjutnya dibuat satu seri pengenceran hingga 10^{-4} menggunakan media ASA.

Pengujian cemaran kapang/khamir. Disiapkan media PDA steril, didinginkan pada temperatur 40°C, ditambahkan kloramfenikol sebesar 1 ml/L, dan dituang ke dalam cawan petri hingga membeku. Sebanyak 1 ml suspensi hasil pengenceran sampel dituang pada permukaan media PDA yang telah beku dalam cawan petri dan diratakan. Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada temperatur 20-25°C selama 3-5 hari. Perhitungan jumlah koloni kapang/khamir yang tumbuh pada media dilakukan sesuai cara perhitungan yang ditetapkan dalam prosedur operasional baku pengujian mikrobiologi oleh Badan POM. Persyaratan angka kapang khamir adalah < 10^4 koloni/gram.

Pengujian inhibisi xantin oksidase (Apaya, 2011)

Prinsip pengujian inhibisi XO dengan mengukur asam urat yang terbentuk setelah dilakukan reaksi antara enzim XO dengan substrat xantin dengan pemberian sampel uji. Sebagai media digunakan buffer fosfat pH 7,5 yang disiapkan dengan cara melarutkan 7,071 g K2HPO4 dan 1,279 g KH2PO4 dengan 900 mL akuades bebas CO2 hingga homogen. Selanjutnya pH larutan ditetapkan menjadi 7,5 dengan menambahkan larutan NaOH 1 M, kemudian larutan di add dengan akuades bebas CO2 hingga volume 1000 mL.

Substrat xantin dibuat secara segar sebelum digunakan dengan cara melarutkan sebanyak 22 mg xanthin dalam 100 uL NaOH encer hingga larut kemudian tambahkan aquadest hingga 1 L dalam labu takar. Tetapkan pH hingga pH 7,5 pada

suhu 25°C dengan menggunakan larutan HCl/NaOH encer.

Enzim XO disiapkan dengan cara melarutkan sejumlah 10 mg (~8 unit/10 mL) enzim dalam 10 mL dapar fosfat pH 7,5, suhu 25°C. Kocok hingga homogen dan dibagi dalam 10 microtube (0,8 unit/ml), simpan dalam frezzer.

Ditimbang sejumlah 10 mg (~8 unit/10 mL) enzim kemudian dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat pH 7,5, suhu 25°C. Larutan kerja enzim dibuat dengan mengencerkan 1 mL larutan induk dengan 4 mL dapar fosfat pH 7,5 hingga memberikan konsentrasi sekitar 0,2 /mL. Sebelum digunakan pastikan bahwa larutan kerja enzim memberikan absorbansi sekitar 0,9. Larutan induk dialiquot dalam tube plastik disposible 1 mL, disimpan dalam frezer. Larutan enzim tidak boleh di re-thawing.

Sampel uji dibuat dengan cara melarutkan 10 mg ekstrak secang dalam 200 uL DMSO hingga larut. Jika perlu dibantu dengan sonikasi atau vortek. Selanjutnya ditambah 300 mL dapar fosfat pH 7,5. Larutan kerja sampel uji dibuat dengan mengencerkan larutan induk menggunakan bufer fosfat pH 7,5 hingga konsentrasi 1000 ppm.

Pembanding allopurinol digunakan tablet generik yang dibeli di apotik. Penyiapan dengan cara mengerus 1 tablet allopurinol 100 mg hingga halus, dimasukan ke dalam labu ukur dan ditambah dengan buffer fosfat pH 7,5. Untuk membantu melarutkan allopurinol labu disonikasi atau divortek selama sekitar 10 menit. Selanjutnya filtrat dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm suhu kamar selama 5 menit. Filtrat digunakan untuk pengujian.

Pengukuran kadar urat dilakukan dengan cara spektrometri pada panjang gelombang 290 nm berdasarkan penelitian sebelumnya secara lebih jelasnya adalah sebagai berikut: Ke dalam kuvet kuarsa 3 mL dimasukkan secara berturut-turut sampel uji dan larutan kerja substrat kemudian diinkubasi pada 37C selama 5 menit. Selanjutnya reaksi dimulai dengan penambahan larutan kerja enzim dan dikocok hingga homogen. Segera dilakukan pengukuran kadar asam urat terbentuk setiap menit selama 4 menit. Selama pengukuran absorbansi, kuvet tetap dilakukan pada suhu 37C. Dibuat kurva yang menyatakan hubungan antara absorbansi terhadap waktu. Ditentukan nilai slope (kemiringan) dari persamaan regresi dengan menggunakan program *microsoft excell*. Dibuat kontrol enzim dimana sampel diganti dengan buffer fosfat. Blanko sampel dibuat dengan menambahkan larutan kerja sampel uji dan buffer fosfat tanpa larutan enzim dan larutan substrat. Blanko kontrol enzim digunakan buffer fosfat. Persen inhibisi xantine oksidase dihitung dengan persamaan berikut:

$$\%\ Inhibisi = \left(1 - \frac{slope\ sample}{slope\ kontrol\ enzim}\right) \times 100\%$$

Tabel 1. Komposisi Pereaksi Pada Pengukuran Inhibisi XO

	Kontrol enzim (uL)	**Blanko enzim (uL)**	**Sampel/ Allopu-rinol(uL)**	**Blanko sampel (uL)**
Sampel/ allopurinol	--		100	100
Buffer fosfat	800	840	700	740
xantin	160	160	160	160
-----Inkubasi pada 37C selama 5'				
XO	40	--	40	--
-----Inkubasi pada 37C dan ukur absorbansinya setiap menit selama 4 menit pada lamda-maksimum 290 nM				

Jumlah pereaksi yang dimasukkan kedalam kuvet dapat dilihat pada Tabel 1.

Pengujian kadar total polifenol (Waterhouse, nd)

Pengukuran kadar total polifenol dilakukan secara spektrofotometeri menggunakan reagen kit Follin Ciocalteu mengacu pada penelitian sebelumnya dengan modifikasi. Ditimbang 10 mg ekstrak secang dilarutkan dalam 200uL DMSO dengan bantuan sonikasi atau vortek hingga larut sempurna jika perlu disentrifugasi untuk memisahkan endapannya (= $5x10^4$ ppm). Larutan kerja sampel uji disiapkan dengan mengencerkan larutan induk di atas dengan DMSO secara bertahap (kelipatan 1/10x nya) hingga diperoleh konsentrasi 5000 ppm sehingga akan memberikan nilai absorbansi yang memenuhi syarat. Untuk konsentrasi larutan kerja tersebut akan diperoleh konsentrasi final 100 ppm.

Tabel 2. Penyiapan Larutan Kerja Asam Galat

Konsentrasi Larutan Kerja yang Akan Dibuat	**Volume Larutan Induk**	**Volume Akuabi-des**	**Konsentra-si Akhir yang Akan Diperoleh**
(ppm)	(uL)	(uL)	(ppm)
100	12,50	487,50	1
200	25,00	475,00	2
250	31,25	468,75	3
500	62,50	437,50	5
750	93,75	406,25	8
1000	125,00	375,00	10

Keterangan: Volume akhir dibuat 500 uL. Penghitungan dilakukan menggunakan rumus n1xv1 = n2xv2

Sebagai pembanding digunakan asam galat yang disiapkan dengan cara menimbang sebanyak 20 mg asam galat dilarutkan dalam 400 uL etanol dan di add dengan akuabidest hingga 5 mL dalam labu takar (= $4x10^3$ ppm). Selanjutnya dibuat serangkaian larutan kerja 100, 200, 250, 500, 750, 1000 ppm dengan cara mengencerkan larutan induk menggunakan akuabides. Dari serangkaian larutan kerja tersebut akan diperoleh konsentrasi final (FC) sebesar 1, 2, 3, 5, 8, 10 ppm. Cara pengenceran disajikan pada Tabel 2. Standar asam galat dapat bertahan selama 2 minggu disimpan dalam lemari es 4C selama tidak terkontaminasi.

Pengukuran kadar total polifenol dilakukan dengan cara sebagai berikut ke dala mikrotube plastik 1,5 mL dimasukan berturut-turut 20 uL larutan sampel uji, 780 uL akuades, 50 uL regen Folin Ciocalteu dan diaduk hingga homogen. tube dibiarkan selama 30 detik hingga 8 menit. Selanjutnya, ditambah dengan 150 uL 20% NaCO3, dikocok dan diinkubasi pada suhu 20^0C selama 2 jam atau 40^0C selama 30 menit. Absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang 765 nm terhadap regen blanko. Sebagai regen blanko digunakan ereaksi seperti diatas, dimana sampel uji dihilangkan dan diganti dengan akuades. Pengukuran dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali

Senyawa standar asam galat diperlakukan sama dengan sampel uji. Dibuat kurva standar yang menyatakan hubungan antara absorbansi dan konsentrasi akhir asam galat dan dihitungan persamaan regresi Y=AX+B menggunakan progra *microsoft excell*. Pengukuran dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Kadar total polifenol dalam sampel uji setara dengan asam galat (*gallic acid equivalent*/GAE) ditetapkan menggunakan persamaan regresi di atas dan persen total polifenol dihitung persamaan sebagai berikut:

$$\%\,Total\ polifenol = \frac{Kadar\ (ppm)}{Konsentrasi\ akhir\ (ppm)} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Secang (C. *sappan* L.) merupakan tanaman yang dikenal luas oleh masyarakat dalam pengobatan. Kandungan senyawa kimia yang ada di dalamnya, membuat secang menunjukkan berbagai aktivitas farmakologi. Bagian dari pohon secang yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu keras. Sebelum digunakan dalam penelitian dilakukan determinasi tanaman di Pusat Biologi Lipi guna menjamin bahwa simplisia yang digunakan benar.

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 pengkisatan pelarut). Sediaan ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan masa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes, 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 ekstrak lebih simple dari segi jumlah penggunaannya, dari sisi industry obat tradisional akan diperoleh sediaan dengan keseragaman mutu yang lebih baik, lebih terkendali dalam hal cemaran mikroba disbanding menggunakan simplisia aslinya (Sasidharan, 2011). Hasil uji kharakterisasi terhadap ekstrak kental secang diperoleh hasil sebagai berikut

Uji kharakterisasi ekstrak kental penting dilakukan sebagai jaminan terhadap kualitas ekstrak dan sediaan akhir yang dihasilkan selain itu untuk menjadi patokan dalam produksi ekstrak pada bets supaya diperoleh ekstrak dengan kualitas lebih seragam (Hariyati, 2005), hal ini penting dilakukan mengingat bahwa ekstrak dari suatu tanaman sangat dipengaruhi oleh sumber simplisia yang digunakan dimana kualitas simplisia sangat dipengaruhi oleh banyak factor seperti tempat tumbuh, metode panen dan penanganan pasca panen, usia panen, kondisi penanaman.

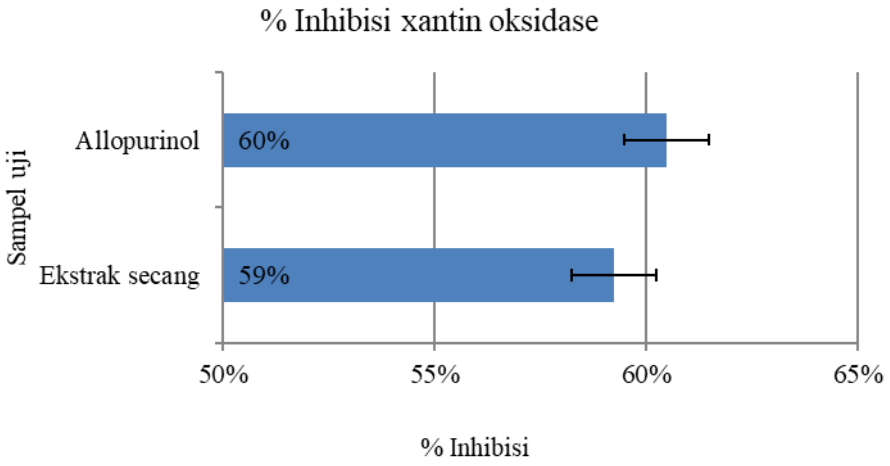
Tabel 3. Hasil Uji Kharakterisasi Ekstrak Kental

No	Parameter	Hasil	Persyaratan
1	Kadar air	7,50%	<10%
2	Kadar abu total	2,29±0,0321%	<10,2%
3	Kadar abu tidak larut asam	0,08±0,0513%	<0,9%
4	Kadar sari larut etanol	8,50±0,2524%	>11,5%
5	Kadar sari larut air	7,50±0,4565%	>11,4%
6	Susut pengeringan	47,86±0,2193%	<12%
7	Logam berat (Pb, Cd, As, Hg)	negatif	As ≤ 5 mg/kg, Cd ≤ 0,3 mg/kg, Pb ≤ 10 mg/kg, dan Hg ≤ 0,5 mg/kg.
7	Angka kapang khamir	$< 10^4$	$< 10^4$ koloni/gram

Tabel 4. Hasil Uji Inhibisi XO

Sampel	Ulangan	Absorbansi Pada Menit Ke-				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 secang EtOH70%	1	0,237	0,319	0,400	0,467	0,077	61%	59%±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%±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)] x 100%.
Pengujian dilakukan pada nilai konsentrasi akhir 100 ppm.



Gambar 1. Inhibisi XO Sampel Uji

Pengujian inhibisi XO sampel uji secara in vitro dengan mengukur kadar asam urat yang terbentuk persatuan waktu selama kurun waktu tertentu dengan menggunakan sistem xantin-xantin oksidase. Hasil pengukuran kekuatan inhibisi XO disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 1.

Dari Gambar ... terlihat bahwa kekuatan inhibisi XO dari ekstrak secang hampir setara dengan pembanding allopurinol. Pada konsentrasi akhir 100 ug/ml, aktivitas penghembatan XO secang sekitar 59% sementara allopurinol sebesar 60%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak secang mempunyai potensi dalam menekan kerja enzim XO. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa ekstrak metanol secang yang dikoleksi dari Vietnam mempunyai aktivitas menekan enzim XO dengan nilai IC_{50} < 20 ug/mL (Nguyen, 2004[1]). Penelitian lain yang mencoba mengisolasi jenis senyawa aktif yang berpotensi dalam menginhibisi XO menunjukkan bahwa senyawa kimia *sappanchalcone* menunjukkan aktivitas inhibisi XO yang paling poten yaitu nilai IC_{50} sebesar 3,5 uM hampir setara dengan allopurinol sebesar 2,5 uM. Senyawa lain

yang menunjukkan aktivitas inhibisi XO dengan sifat *concentration-dependent manner* seperti *neoprotosappanin, protosappanin A dimethyl acetal, protosappanin E-2, neosappanone A, protosappanin A, sappanol, sappanone B, 3-deoxysappanone B*, dan *appanchalcone*. (Nguyen 2005[2]).

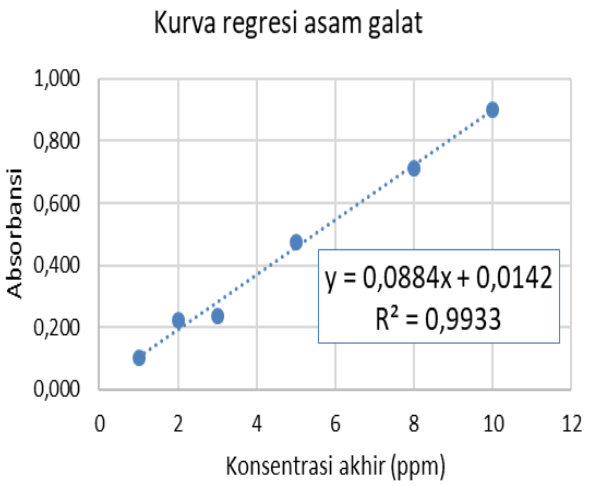
Prinsip mengukur kekuatan inhibisi XO dari sampel uji adalah dengan mengukur produk asam urat yang terbentuk dari kerja enzim XO pada system XO-Xantin. Prosedur untuk mengukur aktivitas enzim dapat dilakukan dengan cara mengukur kehilangan substrat atau mengukur produk yang terbentuk pada periode waktu tertentu (http://academic). Beberapa penelitian sebelumnya mengukur aktivitas inhibisi XO dengan mengukur kadar asam urat pada satu titik tertentu setelah dilakukan terminasi dengan penambahan HCl atau dengan teknis lainnya (Kostic, 2015). Sementara itu, pada penelitian ini, aktivitas dari sampel uji dalam menginhibisi XO ditetapkan dengan mengukura kadar asam urat yang terbentuk pada rentang waktu tertentu selanjutnya aktivitas inhibisi XO dari sampel uji dinyatakan dengan tingkat kemiringan (*slope*) dari plot antara konsentrasi dengan kadar asam urat terhadap waktu. Sehingga prosedur yang digunakan memiliki keunggulan dimana kadar asam urat yang terbentuk diukur dengan memperhatikan proses reaksi sehingga nilai yang diperoleh merupakan relatif dari nilai yang lain.

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

Pada pengukuran kadar total polifenol 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, *n.d.*). Karena senyawa fenol yang ada dalam sampel uji tidak semuanya adalah asam galat, maka kadar total polifenol 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 adalah sebagai berikut.

Tabel 5. Absorbansi Asam Galat

Konsentrasi Akhir	Abs-1	Abs-2	Abs-3	Rata2 Absorbansi
1	0,101	0,101	0,099	0,100
2	0,196	0,278	0,19	0,221
3	0,229	0,238	0,241	0,236
5	0,480	0,470	0,480	0,477
8	0,717	0,715	0,705	0,712
10	0,903	0,902	0,904	0,903



Gambar 2. Kurva Regresi Asam Galat

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa total polifenol dari ekstrak secang sekitar 1.030,47±39,86 mgGAE/g ekstrak atau 103,05±3,99%. Kandungan polifenol yang tinggi tersebut menyebabkan ekstrak secang memiliki aktivitas sebagai inhibisi XO yang potensial seperti ditunjukkan pada hasil di atas. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya, dimana senyawa golongan polifenol, termasuk didalamnya flavonoid, telah dilaporkan mempunyai potensi sebagai inhibitor XO (Abdullahi, 2012). Studi struktur aktivitas inhibisi XO dan senyawa flavonoid menunjukkan bahwa senyawa flavonoid yang mampu menginhibisi 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, 2014; Kostic, 2015).

Dalam sampel berupa ekstrak umumnya mengandung berbagai golongan senyawa kimia selain polifenol. Kemungkinan bahwa aktivitas inhibisi XO yang ditunjukkan oleh ekstrak secang juga disebabkan oleh keberadaan senyawa selain golongan polifenol. Hasil studi in vitro sebelumnya menunjukkan bahwa bahwa senyawa-senyawa berikut berpotensi sebagai penurun asam urat melalui mekanisme inhibisi XO seperti golongan alkaloid, minyak atsiri, tanin, glukosidas iridoid, kumarin. Selanjutnya, senyawa golongan lignan, triterpenoid dan xanthofil bermanfaat dalam penanganan gout melalui aktivitas antiinflamasi. (Ling, 2013). Dalam menginhisi enzim XO dapat melalui beberapa mekanisme seperti mengikat sisi aktif tempat pengikatan senyawa purin, sepeti ditunjukkan oleh allopurinol, atau pada kofaktor FAD, seperti benzimidazole, atau melalui membloking biosintesis asam urat dari senyawa purin. Sehingga mekanisme yang bersifat meningkatkan ekresi asam urat dari tubuh atau menekan produksi asam urat mampu menurunkan kadar asam urat. (Kostic, 2015)

DAFTAR PUSTAKA

1. [1]Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Tran QL, Watanabe H, Kadota S. Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. Biology Pharmaceutical Bulletin Sep 2004;27(9):1414-21.
2. [2]Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Tran QL, Kadota S. Neosappanone A, a xanthine oxidase (XO) inhibitory dimeric methanodibenzoxocinone with a new carbon skeleton from *Caesalpinia sappan*. Tetrahedron Letter 2004;45:8519–8522.
3. Abdullahi A, Hamzah RU, Jigam AA , Yahya A, Kabiru AY, Muhammad H, Sakpe S, Adefolalu FS, Isah MC, Kolo MZ. Inhibitory activity of xanthine

oxidase by fractions *Crateva adansonii*. Journal of Acute Disease 2012: 126-129.

4. Apaya KL, Christine L. Chichioco-Hernandez. Xanthine oxidase inhibition of selected Philippine medicinal plants. Journal of Medicinal Plants Research 2011;5(2):289-292.
5. Castellano DG, Tena J, Torrens F. Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of *Posidonia oceanica* (L.). Communications in Mathematical and in Computer Chemistry 2012;67:231-250.
6. Depkes RI. Farmakope Indonesia Edisi V. Menteri Kesehatan Republik Indonesia. 2014. Jakarta.
7. Depkes RI. Keputusan Mentri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 261/MENKES/SK/IV/2009 tentang Farmakope Herbal Indonesia. Menteri Kesehatan Republik Indonesia. 2009. Jakarta.
8. Dew TP, Day AJ, Morgan MRA, Xanthine oxidase activity in vitro: Effects of food extracts and components. Journal Agricultural Food Chemical 2005;53(16):6510-6515.
9. Halliwell B. Uric acid: An example of antioxidant evaluation. In: Cadenas E, Packer L, editors. Handbook of Antioxidants New York:1996. Marcel Dekker: Inc.
10. Hariyati S. Standarisasi ekstrak tumbuhan obat Indonesia, salah satu tahapan penting dalam pengembangan obat asli Indonesia. InfoPOM Juli 2005;6(4):1-5.
11. Kodim N. Faktor risiko kejadian arthritis gout pada pasien rawat jalan di Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo, Makassar. Medika-Jurnal Kedokteran Indonesia 2010;7(36). EDITORIAL dalam http://www.jurnalmedika.com/edisi-tahun-2010/edisi-no-07-vol-xxxvi-2010/205-editorial.
12. Ling X, Bochu W. A Review of phytotherapy of gout: Perspective of new pharmacological Treatments. Pharmazie 2014; 69: 243–256.
13. Quideau SP, Deffieux D, Douat-Casassus CL, Pouységu L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. Angewandte Chemie International Edition 2011;50(3):586–621.
14. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. Africa Journal Traditional Complement Alternative Medicine 2011;8(1):1-10
15. Spanou C, Veskoukis AS, Kerasioti T, Kontou M, Angelis A, Aligiannis N, et al. Flavonoid glycosides isolated from unique legume plant extracts as novel inhibitors of xanthine oxidase. PLoS ONE March 2012; 7(3):e32214.
16. Waterhouse A. Folin-ciocalteau micro method for total phenol in wine. Waterhouse Lab., University of California. Diunduh dari http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/davis-info pada 17 Oktober 2013.
17. Wong YP, Ching R, Chuah SP, Koh RY, and LingAPK. 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, 2014. Bali (Indonesia).
18. Kostic DA, Dimitrijevic DS, Stojanovic GS, Palic IR, Dordevic AS, Ickovski JD. Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition. Journal of Chemistry 2015; 2015:1-8. Article ID 294858.

19. http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/enz-rat.htm diakses pada tanggal 01-10-2017.