

PENGUJIAN FITOKIMIA DAN PENENTUAN PARAMETER KINETIK ENZIM DENGAN PENAMBAHAN EKSTRAK INFUSA AIR SELEDRI

PHYTOCHEMICAL TESTING AND DETERMINATION OF KINETIC PARAMETERS ENZYME WITH WATER INFUSION OF CELERY EXTRACTS

¹Rahma Diyan Martha*, ¹Atiqoh Zummah

[#]Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri

Info Artikel

Sejarah Artikel :

Submitted: 28 Des 2017

Accepted: 27 Feb 2018

Publish Online: 16 Des 2018

Kata Kunci:

Seledri, Fitokimia, Xantin Oksidase, Infusa Air

Keywords:

Celery, Phytochemicals, Xanthine oxidase, Water Infuse

Abstrak

Latar belakang: Hiperurisemia merupakan kelainan metabolisme karena produksi asam urat yang berlebih. Prevalensi hiperurisemia di Indonesia diperkirakan antara 2,3-17,6%, sehingga penelitian mengenai obat antihiperurisemia sangat dibutuhkan saat ini. **Tujuan:** untuk mengetahui aktivitas infusa batang seledri terhadap parameter kinetik enzim xantin oksidase. **Metode:** spektrofotometri UV untuk mengukur kadar asam urat. **Hasil:** pengujian kandungan senyawa bahan aktif menunjukkan hasil positif pada pengujian flavonoid. Parameter kinetik enzim K_m dan V_{maks} menunjukkan perubahan nilai dengan adanya penambahan infusa batang seledri. Nilai K_m enzim adalah sebesar 90,00 ppm, dan nilai V_{maks} enzim sebesar 3,51 U/mL sebelum adanya penambahan ekstrak air batang seledri dan nilai K_m dan V_{maks} berubah menjadi 125,42 ppm dan 2,97 U/mL dengan adanya penambahan ekstrak infusa air batang seledri. **Simpulan dan saran:** pengujian kandungan senyawa bahan aktif menunjukkan hasil positif pada pengujian flavonoid, sedangkan uji parameter kinetik enzim menunjukkan kenaikan K_m dan V_{maks} menunjukkan penurunan dengan adanya penambahan ekstrak infusa air batang seledri.

Abstract

Background: Hyperuricemia is a metabolic disorder because of excessive production of uric acid. The prevalence of hyperuricemia in Indonesia is estimated to be between 2.3-17.6%, so makes the research of antihyperuricemia drugs very needed today. **Objective:** determine the infusion activity of celery stems on kinetic parameters of xanthine oxidase enzyme. **Method:** UV spectrophotometry to measure uric acid levels. **Results:** testing the content of the active ingredient showed positive results on flavonoid testing. Kinetic parameters of K_m and V_{max} enzymes showed changes in values by the addition of infusion of celery stem. The enzyme K_m value was 90.00 ppm, and the enzyme V_{max} value was 3.51 U / mL before the addition of celery stem water extract and K_m and V_{max} values changed to 125.42 ppm and 2.97 U / mL with the addition of extract infusion of celery stem water. **Conclusions and suggestions:** testing the content of active ingredient showed positive results on flavonoid testing, while the kinetic parameter test showed that the increase of K_m and V_{max} showed a decrease with the addition of infusion extract of celery stem water.

PENDAHULUAN

Hiperuresemia merupakan kelainan metabolisme yang diakibatkan mekanis dari produksi urat yang berlebihan atau gangguan absolut atau relatif ekskresi asam urat ginjal (Wyngaarden, 1976). Menurut Wolf *et al.*, 1999 dan Kang *et al.*, 2005 menyatakan bahwa hiperuresemia dapat menginduksi kerusakan ginjal secara langsung, tidak hanya menyebabkan insufisiensi ginjal, tetapi juga terkait penyakit ginjal stadium akhir. Prevalensi hiperurisemia di Indonesia diperkirakan antara 2,3-17,6% sedangkan prevalensi gout bervariasi antara 1,6-13,6 per seribu penduduk (Sudoyo *et al.*, 2006). Gout merupakan penyakit metabolik yang ditandai oleh episode artritis akut berulang karena adanya endapan kristal monosodium urat pada sendi-sendi dan jaringan sekitarnya akibat adanya peningkatan kadar asam urat (Katzung *et al.*, 2012; Abdullahi *et al.*, 2012).

Salah satu tanaman obat yang berkhasiat sebagai pengobatan yaitu tanaman seledri untuk menghambat aktivitas enzim xantin oksidase. Menurut Wang *et al.*, 2008, xantin oksidase merupakan enzim yang berperan dalam mengkatalisis oksidase hipoxantin menjadi xantin dan menjadi asam urat yang dapat menghalangi biosintesis asam urat. Menurut Wibraham & Michael (1992) konsentrasi enzim dan keadaan reaksi seperti pH dan suhu mempengaruhi aktivitas enzim. Faktor lain yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim adalah substrat, inhibitor dan activator (Lehninger, 1982).

Dalam penelitian sebelumnya, ditemukan senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai inhibitor enzim xantin oksidase antara lain tanin, polifenol dan flavonoid (Azmi *et al.*, 2012). Menurut Cos *et al* 1998, yang berpotensi sebagai inhibitor xantin oksidase adalah flavonoid. Diduga di dalam seledri terdapat kandungan flavonoid yang dapat menghambat aktivitas enzim xantin oksidase. Aktivitas penghambatan oleh seledri ini diduga karena adanya kandungan flavonoid dalam seledri. Daun seledri memang diketahui mengandung banyak senyawa metabolit sekunder diantaranya senyawa golongan flavonoid (Nadinah, 2008).

Tahap pendahuluan dalam suatu penelitian yang perlu dilakukan yaitu skrining fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman. Dalam uji fitokimia dapat dilakukan pemeriksaan pendahuluan terhadap senyawa aktif metabolit sekunder tersebut, sehingga potensi relatif dari masing-masing tanaman dapat diukur (Tomohayu, 2014). Iswantini (2012) telah melakukan penelitian tentang pengujian penghambatan enzim xantin oksidase ekstrak seledri secara *in vitro* dan hasil penelitiannya dengan parameter kinetik enzim berupa Km dan Vmaks yang ditentukan dengan grafik Lineweaver-Burk menunjukkan ekstrak seledri mampu menghambat aktivitas enzim xantin oksidase. Untuk itu, dalam penelitian ini akan dilakukan penentuan parameter kinetik enzim dengan grafik Langmuir yang sebelumnya belum pernah dilakukan.

METODE PENELITIAN

Bahan dan peralatan:

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang seledri yang sudah dipisahkan dari daun nya dan dibersihkan, dikeringkan serta dibuat serbuk. Dalam tahap pembuatan ekstrak batang seledri dalam penelitian ini digunakan pelarut air. Sedangkan, untuk pengujian aktivitas digunakan enzim xantin oksidase, substrat xantin, buffer fosfat pH 7,5 dan larutan HCl 0,5 M.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas laboratorium, timbangan analitik (Libror EB330 Shimadzu), pipet mikro, dan spektrofotometer UV-Visibel (Shimadzu 1800-Series).

Prosedur kerja:

Metode Pembuatan Ekstrak

Seberat 20 gram serbuk kering batang seledri dimasukkan ke dalam kertas saring dan diikat rapat. Kemudian dimasukkan ke dalam panci infusa yang berisi 100 ml air selama 1 jam

pada suhu 105 °C. Hasil rebusan kemudian disaring dengan kertas saring dan disimpan didalam lemari es.

Metode Uji Fitokimia

Alkaloid

Ekstrak batang seledri dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 10% ammonia dan CHCl_3 10 ml yang kemudian dikocok. Diambil lapisan CHCl_3 dan ditambahkan H_2SO_4 yang kemudian dibagi menjadi tiga bagian. Masing-masing ditambah dengan pereaksi Dragendrof, pereaksi Meyer dan pereaksi Wegner. Hasil uji positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan.

Flavonoid

Ekstrak batang seledri ditambah dengan bubuk Mg dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl pekat. Hasil uji positif flavonoid jika terjadi perubahan warna larutan.

Saponin

Residu dari saringan batang seledri dimasukkan ke dalam beaker dan ditambahkan 5 ml akuades. Kemudian dipanaskan selama 5 menit sampai mendidih. Setelah itu, didinginkan dan dikocok dengan arah vertikal sampai membentuk busa, ditambahkan HCl 2N dan didiamkan selama 10 menit. Hasil uji positif mengandung saponin jika terbentuk busa atau buih pada larutan.

Metode Uji Aktivitas

Aktivitas inhibisi enzim xantin oksidase diuji menggunakan prosedur *Sigma quality control test procedure* (1994). Sebanyak 0,4 ml infusa batang seledri ditambah larutan buffer fosfat dengan konsentrasi 50 mM pH 7,5 sebanyak 1,5 ml ke dalam tabung reaksi. Kemudian campuran tersebut ditambahkan 1 ml substrat xantin 0,15 mM dan 1 ml larutan enzim xantin oksidase dan diinkubasi pada suhu 25 °C selama 45 menit. Ditambahkan 1 ml HCl 0,5 M yang bertujuan untuk menghentikan reaksi yang terjadi dan diukur pada gelombang 290 nm. Perhitungan aktivitas enzim menggunakan persamaan:

$$\text{Aktivitas enzim}(\text{unit / mL}) = \frac{\text{Absorbansi larutan uji}_{290} - \text{Absorbansi larutan blanko}_{290}}{(12,2)(0,1)} (3)(df)$$

Metode Penentuan Nilai K_m dan V_{maks}

Dalam penentuan nilai K_m dan V_{maks} digunakan konsentrasi larutan substrat yaitu 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560, dan 5120 ppm yang kemudian hasilnya dibuat grafik hubungan $[S]/V$ terhadap $[S]$ dengan persamaan kurva Langmuir.

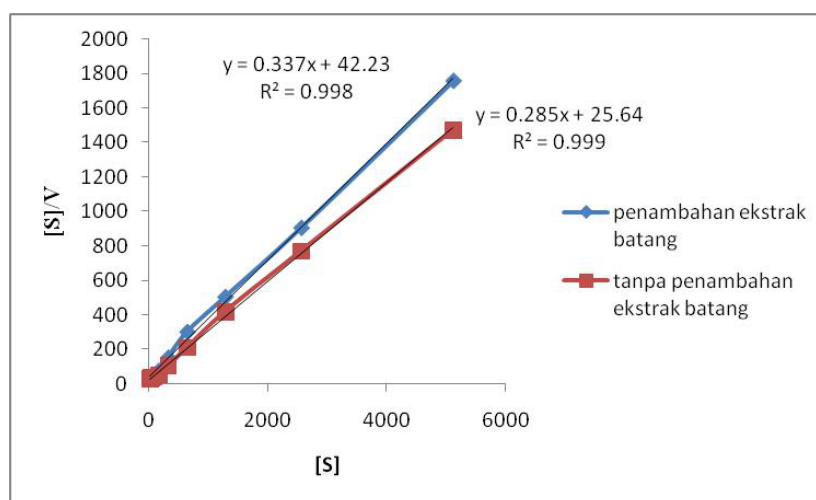
HASIL PENELITIAN

Pengujian fitokimia yang dilakukan meliputi pengujian adanya flavonoid, alkaloid, dan saponin. Pengujian untuk menentukan nilai parameter kinetik enzim berupa K_m dan V_{maks} dilakukan lebih lanjut dengan menggunakan metode grafik Langmuir (Gambar 1). Tabel 1 menunjukkan kandungan senyawa metabolit sekunder dari infusa batang seledri.

Tabel 1. Uji Fitokimia Infusa Batang Seledri

Infusa Batang Seledri	Senyawa metabolit sekunder		
	Flavonoid	Alkaloid	Saponin
	++	-	-

Keterangan: ++ = ada kandungan zat yang dianalisis
- = tidak ada kandungan zat yang dianalisis

Gambar 1. Grafik Langmuir hubungan $[S]/V$ terhadap $[S]$

PEMBAHASAN

Pengujian fitokimia dilakukan untuk memeriksa kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam infusa batang seledri. Uji fitokimia meliputi uji flavonoid, uji alkaloid dan uji saponin. Berdasarkan hasil yang ditunjukkan Tabel 1 diperoleh hasil positif adanya flavonoid pada infusa batang seledri, dan diperoleh hasil negatif untuk uji alkaloid dan saponin. Pada uji alkaloid, sampel yang telah ditambahkan reagen meyer dan didiamkan tidak menunjukkan adanya endapan. Hal ini menunjukkan hasil negatif untuk uji alkaloid. Pengujian saponin dilakukan dengan cara mengocok ekstrak batang seledri kemudian didiamkan, jika terdapat busa menunjukkan uji positif saponin. Jumlah kadar busa menunjukkan kadar saponin yang ada pada ekstrak tersebut. Sukandar (2006) juga pernah melakukan pengujian fitokimia terhadap ekstrak daun seledri menggunakan pelarut etanol dan metode refluks. Hasil yang diperoleh Sukandar (2006) juga menunjukkan positif adanya flavonoid dan negatif untuk uji adanya alkaloid dan saponin.

Tujuan selanjutnya pada penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas infusa batang seledri terhadap parameter kinetik enzim xantin oksidase. Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim xantin oksidase adalah metode Spektroskopi UV-VIS. Hasil pengukuran dari UV-VIS kemudian dianalisis lebih lanjut berdasarkan rumus empiris dari persamaan Langmuir. Pengujian untuk menentukan nilai parameter kinetik enzim berupa K_m dan V_{maks} dilakukan lebih lanjut dengan menggunakan metode grafik Langmuir. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan beberapa variasi konsentrasi substrat. Nilai parameter kinetik K_m dan V_{maks} pada metode Langmuir diperoleh dari grafik hubungan $[S]$ terhadap $[S]/V$.

Berdasarkan grafik Langmuir (Gambar 1) diperoleh persamaan $y = 0,28x + 25,64$ dari hubungan $[S]/V$ terhadap $[S]$ dan hasil parameter kinetik enzim K_m dan V_{maks} menunjukkan perubahan nilai dengan adanya penambahan ekstrak infusa air batang seledri. Nilai K_m enzim adalah sebesar 90,00 ppm, dan nilai V_{maks} enzim sebesar 3,51 U/mL sebelum adanya penambahan ekstrak air batang seledri dan nilai K_m dan V_{maks} berubah menjadi 125,42 ppm dan

2,97 U/mL dengan adanya penambahan infusa batang seledri. Hal ini menunjukkan penambahan infusa batang seledri berpengaruh terhadap parameter kinetik enzim. Menurut Lai (2014) metode grafik langmuir lebih akurat digunakan untuk menentukan parameter kinetik enzim berupa K_m dan V_{maks} . Pernyataan tersebut juga sesuai dengan yang dikemukakan oleh Wilkinson (1961) dan Ranaldi (1999) yaitu metode grafik Langmuir hanya mempengaruhi kemiringan (*slope*) dalam derajat yang sangat kecil sehingga lebih akurat untuk digunakan dalam menentukan nilai parameter enzim berupa K_m dan V_{maks} .

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pengujian kandungan senyawa bahan aktif menunjukkan hasil positif pada pengujian flavonoid, sedangkan uji parameter kinetik enzim K_m dan V_{maks} menunjukkan perubahan nilai dengan adanya penambahan infusa batang seledri. Nilai K_m enzim adalah sebesar 90,00 ppm, dan nilai V_{maks} enzim sebesar 3,51 U/mL sebelum adanya penambahan ekstrak air batang seledri dan nilai K_m dan V_{maks} berubah menjadi 125,42 ppm dan 2,97 U/mL dengan adanya penambahan infusa batang seledri.

SARAN

Saran-saran yang perlu ditindaklanjuti yaitu perlu diteliti lagi terkait ekstrak tanaman lain (bahan alam) yang berpotensi sebagai alternatif obat asam urat.

REFERENSI

- Azmi, S., Jamal, P., & Amid, A. (2012). Xantine Oxidase inhibitor activity from potential Malaysian medicinal plant as remedie for gout. *International Food Research Journal*, 19(1), 156-159.
- Cos, P., Callome, M., Hu, J., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., et al. (1998). Structure Activity Relationship and Classification of as Inhibitors of Xanthine Oxydase and Superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61-76.
- Iswantini, D. Ramdhani, T.H. dan Darusman, L.K. 2012. In Vitro Inhibition Of Celery (*Apium graveolens* L.) Extract on The Activity of Xanthine Oxidase And Determination of Its Active Compound, *Indo. J. Chem.*, 12(3), 247-254.
- Kang G., Kelly L., & Irris Y. Epidemiological Profile of Rotaviral Infection in India : Challenges for 21st Century. *The Journal of Infectious Diseases*; Sep 1, 2005;192.
- Katzung, B.G., Masters, S.B. & Trevor, A.J. 2012. *Basic & Clinical Pharmacology*, 12 Ed., New York: McGraw-Hill.
- Lai, L.W. Teo, C.L. Wahidin, S. dan Annuar, M.S.M. 2014. Determination of Enzyme Kinetic Parameters on Sago Starch Hydrolysis By Linearized Graphical Methods. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 18(3) 527-533.
- Lehninger, Albert. (1982). *Dasar-dasar Biokimia* (Ahli bahas: Dr. Ir. Maggy Thenawidjaja). Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Nadinah. 2008. Kinetika Inhibisi Ekstrak Etanol Seledri (*Apium graveolens* L.) dan fraksinya Terhadap Enzim Xantin oksidase Serta Penentuan Senyawa Aktifnya. Tesis. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Ranaldi, F. Vanni, P. dan Giachetti, E. 1999. What Students Must Know About The Determination of Enzyme Kinetic Parameters. *Biochem. Educ.* 27:87-91.
- Sudoyo, A., Satiyohadi, B., Alwi, I., K, M., & Setiati, S., 2006, *Ilmu Penyakit Dalam* (4 ed.), Jakarta: Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Tomohayu, R.T. 2014. Identifikasi Senyawa Aktif dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia Ten Steenis*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Thesis. Universitas Negeri Gorontalo.

- Wang, S., Liaob, J., Zhen, W., Chuc, F., & Chang, S. (2008). Essential oil from leaves *Cinnamomum osmophloem* acts as a xanthine oxidase inhibitor and reduces tes serum uric acid levels in oxonate induced mice. *Journal of Phytomedicine*, 15, 940-945.
- Wilkinson, G.N. 1961. Statistical Estimations In Enzyme Kinetics. *Biochem. J.* 80:324-332.
- Wolf, G., Hegewisch-Becker, S., Hossfeld, D.K., et al., 1999, Hyperuricemia and renal insufficiency associated with malignant disease: urate oxidase as an efficient therapy. *Am. J. Kidney Dis.* 34: E20.
- Wyngaarden, J.B., Kelley, W.N., 1976, Gout and Hyperuricemia, Grune and Stratton, New York.