

PENENTUAN PARAMETER KINETIK ENZIM XANTIN OKSIDASE TERINHIBISI EKSTRAK SELEDRI BERDASARKAN METODE GRAFIK LINEWEAVER-BURK DAN LANGMUIR

DETERMINATION OF KINETIC PARAMETERS OF XANTHINE OXIDASE ENZYME INHIBITED CELERY EXTRACT BASED ON LINEWEAVER-BURK AND LANGMUIR GRAPH METHODS

Atiqoh Zummah⁽¹⁾, Rahma Diyan Martha⁽²⁾

⁽¹⁾ Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya, ⁽²⁾ STIKES Karya Putra Bangsa

Info Artikel

Sejarah Artikel :

Submitted: 25

November 2018

Accepted: 6 Juni

2020

Publish Online: 8

Juni 2020

Kata Kunci:

Asam urat, seledri,
inhibitor, ekstrak
hidroetanol

Keywords:

Uric acid, celery,
inhibitors,
hydroethanol
extract

Abstrak

Latar belakang: Seledri merupakan tanaman obat yang diketahui mampu menghambat aktivitas enzim xantin oksidase yang berperan dalam pembentukan asam urat. Prevalensi penyakit asam urat (gout) yang tinggi di Indonesia, yaitu 1,6-13,6% per seribu penduduk membuat penelitian tentang sifat penghambatan terbentuknya produk asam urat dalam tubuh sangat diperlukan. **Tujuan:** mengetahui nilai parameter kinetik enzim xantin oksidase dengan adanya penambahan ekstrak seledri. **Metode:** Ekstrak seledri dari daun dan batang diperoleh menggunakan metode soxhletasi dan pelarut hidroetanol. Penentuan parameter kinetik enzim dilakukan dengan metode grafik linear Lineweaver-Burk dan Langmuir. **Hasil:** Ekstrak hidroetanol daun seledri menunjukkan inhibisi terbaik sebesar 86,86% (konsentrasi 30%) dan ekstrak hidroetanol batang seledri menunjukkan inhibisi terbaik sebesar 87,71% (konsentrasi 40%). Penambahan ekstrak daun seledri pada enzim memberikan nilai K_m sebesar 27,74 ppm dan V_{maks} sebesar 3,55 U/mL pada metode grafik Lineweaver-Burk, sedangkan pada metode grafik Langmuir nilai K_m mencapai 327,66 ppm dan V_{max} sebesar 6,45 U/mL. Penambahan ekstrak batang seledri menghasilkan nilai K_m sebesar 145,24 ppm dan V_{max} sebesar 4,55 U/mL pada metode grafik Lineweaver-Burk, sementara pada metode grafik Langmuir nilai K_m sebesar 321,09 ppm dan V_{maks} sebesar 5,21 U/mL. **Kesimpulan:** Metode grafik Langmuir lebih sesuai digunakan untuk penentuan parameter kinetik dalam inhibisi enzim xantin oksidase oleh ekstrak seledri.

Abstract

Background: Celery is a medicinal plant that is known to inhibit xanthine oxidase enzyme activity in uric acid formation. The high prevalence of gout in Indonesia, about 1.6-13.6% per thousand population makes the study of the inhibiting properties of the formation of uric acid products in the body is very necessary. **Objective:** determine the kinetic parameters value of xanthine oxidase enzyme in the presence of celery extract. Celery extract from leaves and stem in this research was obtained using the Soxhletation method and hydroethanol solvent. Determination of enzyme kinetic parameters was carried out using Lineweaver-Burk and Langmuir linear graph method. **Results:** hydroethanol extract of celery leaves showed the best inhibition of 86.86% (concentration 30%) and the hydroethanol extract of celery stems showed the best inhibition of 87.71% (concentration 40%). Enzyme with the addition of celery leaves extract resulted in K_m value of 27.74 ppm and V_{max} value of 3.55 U / mL in the Lineweaver-Burk graph method, while according to Langmuir graph method the K_m value reached 327.66 ppm and V_{max} value of 6.45 U/mL. Addition of celery stems extract resulted in K_m value of 145.24 ppm and V_{max} value of 4.55 U/mL in the Lineweaver-Burk graph method, while this extract resulted in K_m value of 321.09 ppm and V_{max} value of 5.21 U/mL in the Langmuir graph method. **Conclusion:** Langmuir graphic method was more suitable to determine kinetic parameters in the inhibition reaction of xanthine oxidase enzyme by celery extract.

PENDAHULUAN

Seledri merupakan tanaman obat yang diketahui mempunyai banyak manfaat. Salah satu manfaat seledri adalah untuk menghambat aktivitas enzim xantin oksidase. Enzim xantin oksidase merupakan enzim yang berperan dalam reaksi katalisis hipoxantin menjadi xantin dan selanjutnya menjadi asam urat (Patcher *et al.*, 2006). Asam urat disebut juga arthritis gout yang merupakan penyakit degeneratif. Prevalensi penyakit gout di Indonesia sendiri sudah mencapai 1,6-13,6% per seribu penduduk. tingginya prevalensi penyakit gout di Indonesia membuat penelitian tentang sifat penghambatan terbentuknya produk asam urat dalam tubuh sangat diperlukan. Iswantini (2012) melakukan penelitian tentang pengujian penghambatan enzim xantin oksidase dengan ekstrak seledri secara *in vitro* dan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak seledri mampu menghambat aktivitas dari enzim xantin oksidase, sehingga penghambatan aktivitas enzim xantin oksidase ini mampu menghambat reaksi terbentuknya asam urat. Deviantra (2013) juga melakukan penelitian pemberian seduhan seledri pada tikus putih jantan strain wistar dan hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian seduhan tersebut mampu menurunkan kadar asam urat serum pada tikus putih jantan.

Aktivitas seledri yang mampu menurunkan kadar asam urat ini diduga karena adanya kandungan flavonoid dalam seledri. Daun seledri memang diketahui mengandung banyak senyawa metabolit sekunder diantaranya senyawa golongan flavonoid (Nadinah, 2008). Dengan adanya aktivitas senyawa flavonoid diduga akan mempengaruhi kinetika dari enzim xantin oksidase. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas dari enzim selain konsentrasi enzim, suhu, pH substrat, dan activator adalah inhibitor (Lehninger, 1997). Karena kemampuan penghambatan terhadap aktivitas enzim xantin oksidase inilah flavonoid dapat disebut sebagai inhibitor enzim xantin oksidase (Iswantini, 2012).

Penelitian tentang kinetika penghambatan ekstrak seledri terhadap enzim xantin oksidase pernah diteliti oleh Iswantini (2012), dalam penelitiannya parameter kinetik enzim berupa K_m dan V_{maks} ditentukan berdasarkan grafik Lineweaver-Burk dan pengujian dilakukan dengan menentukan parameter kinetik enzim tanpa penambahan ekstrak etanol seledri serta dengan penambahan ekstrak etanol seledri. Selain dengan menggunakan grafik Lineweaver-Burk, penentuan parameter kinetik enzim juga dapat ditentukan dengan metode grafik Langmuir (Emmanuel, 2006). Penentuan parameter kinetik enzim xantin oksidase terinhibisi ekstrak seledri sudah pernah dilakukan dengan dengan metode grafik Lineweaver-Burk, namun menggunakan metode grafik Langmuir belum pernah dilakukan (Zummah, 2018), sehingga dalam penelitian ini akan dilakukan penentuan parameter kinetik enzim berdasarkan grafik Lineweaver-Burk dan Langmuir.

METODE PENELITIAN

Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman seledri bagian daun dan batang. Sebelum tanaman seledri dibuat simplisia, tanaman seledri dipisahkan dari bagian daun dan batang selanjutnya dicuci bersih, dikeringkan, dan dibuat serbuk.

Bahan pembuatan Ekstrak dan Uji Aktivitas

Pelarut yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah pelarut hidroetanol. Pelarut hidroetanol dibuat dengan perbandingan etanol dan air 7:3. Untuk pengujian aktivitas digunakan enzim xantin oksidase, substrat xantin, buffer fosfat pH 7,5, dan larutan HCl 0,5 M.

Metode Pembuatan Ekstrak

Serbuk kering daun dan batang seledri masing-masing ditimbang seberat 10 gram dan dimasukkan kertas saring dan diikat rapat. Masing-masing kertas saring yang sudah berisi serbuk kering daun dan batang seledri dimasukkan kedalam rangkaian alat soxhlet untuk dilakukan soxhletasi. Proses soxhletasi dilakukan sampai sekitar 7 siklus. Ekstrak hasil soxhletasi dimasukkan dalam botol gelap dan disimpan dalam lemari es.

Metode Pengujian Aktivitas

Aktivitas enzim xantin oksidase diuji tanpa dan dengan adanya penambahan ekstrak hidroetanol daun dan batang seledri. Metode pengujian yang digunakan dengan menggunakan prosedur dari sigma yang telah dimodifikasi. Ekstrak hidroetanol daun dan batang seledri yang digunakan masing-masing sebesar 10, 20, 30, 40, dan 50%. Masing-masing ekstrak sebanyak 0,4 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dicampur 1,5 mL larutan buffer fosfat PH 7,5. Campuran ditambah larutan subtract xantin oksidase 0,15 mM sebanyak 1 mL dan larutan enzim xantin oksidase sebanyak 0,1 mL. Campuran larutan diinkubasi pada suhu 25 °C selama kurang lebih 45 menit. Untuk menghentikan reaksi campuran larutan ditambah 1 mL HCl 0,5 M. Campuran larutan diukur dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 290 nm.

Persamaan yang digunakan untuk menentukan persen inhibisi dari ekstrak hidroetanol daun dan batang seledri adalah:

$$\text{Persen penghambat} = \frac{(A_{\text{larutan kontrol}} - A_{\text{larutan blanko}}) - (A_{\text{larutan sampel dan enzim}} - A_{\text{larutan sampel}})}{(A_{\text{larutan kontrol}} - A_{\text{larutan blanko}})} \times 100\%$$

Larutan kontrol merupakan larutan tanpa adanya penambahan ekstrak, larutan blanko merupakan larutan tanpa adanya penambahan ekstrak dan enzim, larutan sampel dan enzim merupakan larutan dengan adanya penambahan sampel dan enzim, dan larutan sampel merupakan larutan dengan adanya penambahan ekstrak tanpa adanya enzim.

Untuk perhitungan aktivitas enzim digunakan persamaan berikut:

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

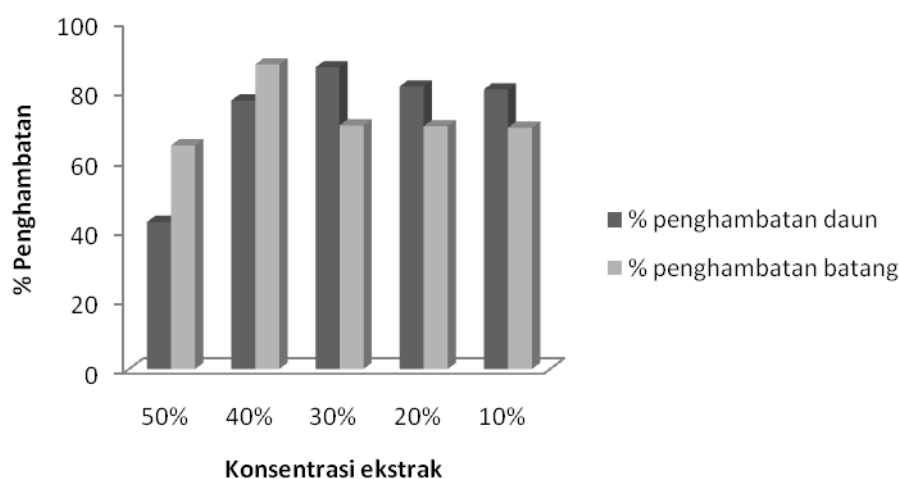
Pada persamaan tersebut angka 3 merupakan volume campuran reaksi dan symbol df merupakan faktor pengenceran. Angka 12,2 merupakan koefisien estingsi milimolar asam urat pada serapan 290 nm dan 0,1 merupakan volume enzim yang dipakai.

Metode Penentuan Nilai K_m dan V_{maks}

Nilai parameter kinetik K_m dan V_{maks} ditentukan dengan menggunakan metode grafik Lineweaver-Burk dan Langmuir. Pengujian ini dilakukan dengan variasi substrat xantin 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560, dan 5120 ppm. Grafik Lineweaver-Burk dihasilkan dari hubungan $1/[S]$ terhadap $1/V$. Grafik Langmuir dihasilkan dari hubungan $[S]$ terhadap $[S]/V$.

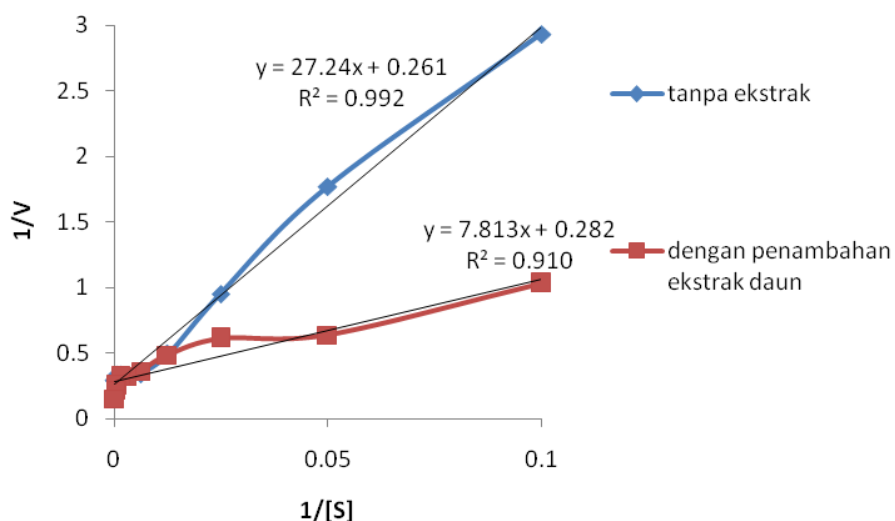
HASIL PENELITIAN

Hasil pengujian penghambatan ekstrak hidroetanol daun dan batang seledri pada beberapa konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 1.



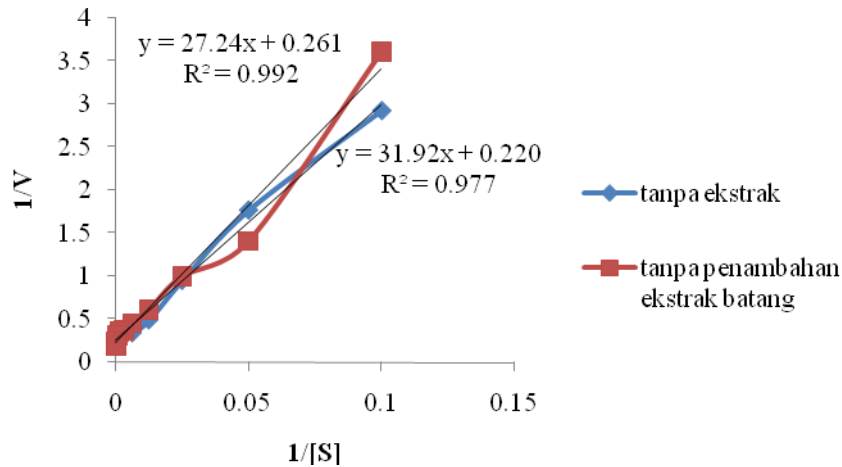
Gambar 1. Profil persentase penghambatan ekstrak hidroetanol daun dan batang seledri

Interpretasi grafik lineweaver-Burk enzim dengan penambahan ekstrak daun seledri dan tanpa penambahan ekstrak daun seledri dapat dilihat pada Gambar 2.



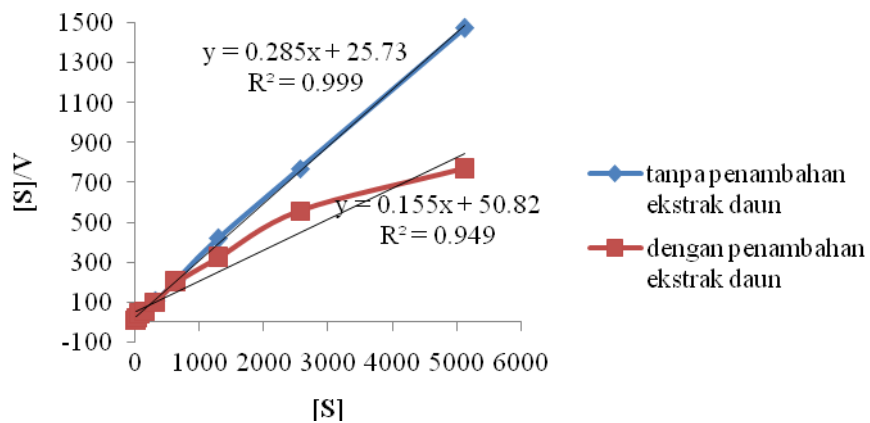
Gambar 2. Grafik Lineweaver-Burk tanpa dan dengan penambahan ekstrak daun

Interpretasi grafik lineweaver-Burk enzim dengan penambahan ekstrak batang seledri dan tanpa penambahan ekstrak batang seledri dapat dilihat pada Gambar 3.



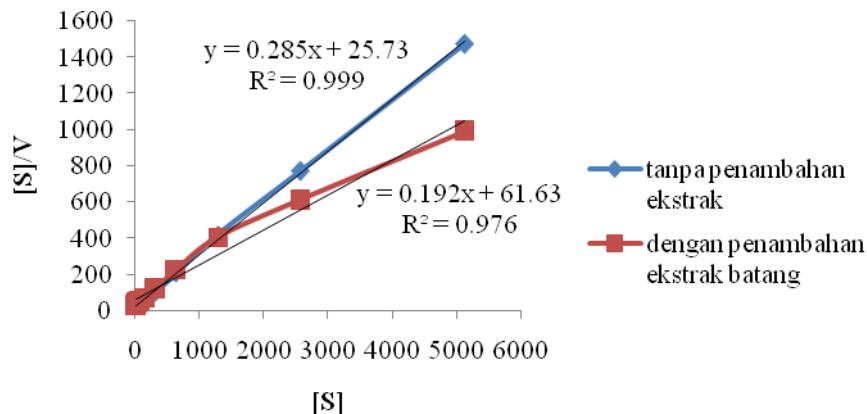
Gambar 3. Grafik Lineweaver-Burk tanpa dan dengan penambahan ekstrak batang

Interpretasi grafik Langmuir enzim dengan penambahan ekstrak daun seledri dan tanpa penambahan ekstrak daun seledri dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik Langmuir tanpa dan dengan penambahan ekstrak daun

Interpretasi grafik Langmuir enzim dengan penambahan ekstrak batang seledri dan tanpa penambahan ekstrak batang seledri dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Grafik Langmuir tanpa dan dengan penambahan ekstrak batang

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan ekstrak hidroetanol daun dan batang seledri yang diperoleh dari metode soxhletasi. Masing-masing ekstrak diuji persentase penghambatan terhadap enzim oksidase. Konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk pengujian penghambatan sebesar 10, 20, 30, 40, dan 50 %. Pengujian persentase penghambatan dilakukan pada serapan 290 nm. Hasil pengujian persen penghambatan menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan ekstrak daun seledri terbesar adalah 86.86% pada konsentrasi ekstrak 30% dan penghambatan ekstrak batang seledri terbesar adalah 87.71% pada konsentrasi ekstrak 40%. Keseluruhan hasil pengujian persen penghambatan dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil pada Gambar 1 juga menunjukkan bahwa dari konsentrasi ekstrak daun 10 sampai 30 % menunjukkan persen penghambatan yang semakin meningkat dan selanjutnya mengalami penurunan dari konsentrasi 30 sampai 50%. Hal ini menunjukkan aktivitas penghambatan ekstrak daun optimum adalah pada konsentrasi 30%. Pola yang sama juga ditunjukkan pada penghambatan oleh ekstrak batang seledri. Pada konsentrasi ekstrak seledri 10 sampai 40% menunjukkan persen penghambatan yang semakin meningkat dan selanjutnya menunjukkan penurunan dari konsentrasi 40 ke 50%, berdasarkan data ini aktivitas penghambatan ekstrak batang optimum adalah pada konsentrasi 40%.

Pengujian untuk menentukan nilai parameter kinetik enzim berupa K_m dan V_{maks} dilakukan lebih lanjut dengan menggunakan metode grafik Lineweaver-Burk dan Langmuir. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan beberapa variasi konsentrasi substrat. Nilai parameter kinetik K_m dan V_{maks} pada metode grafik Lineweaver-Burk diperoleh dari grafik hubungan $1/[S]$ terhadap $1/V$ dan nilai parameter kinetik K_m dan V_{maks} pada metode Langmuir diperoleh dari grafik hubungan $[S]$ terhadap $[S]/V$.

Grafik Lineweaver-Burk enzim tanpa dan dengan penambahan ekstrak hidroetanol daun seledri dapat dilihat pada Gambar 2 dan grafik Lineweaver-Burk enzim tanpa dan dengan penambahan ekstrak hidroetanol batang seledri dapat dilihat pada Gambar 3. Penambahan ekstrak daun seledri memberikan nilai K_m sebesar 27.74 ppm dan V_{maks} sebesar 3,55 U/mL pada metode grafik Lineweaver-Burk, sedangkan Penambahan ekstrak batang seledri memberikan nilai K_m sebesar 145.24 ppm dan V_{maks} sebesar 4,55 U/mL. Grafik Langmuir enzim tanpa dan dengan penambahan ekstrak hidroetanol daun seledri dapat dilihat pada Gambar 4 dan grafik Langmuir enzim tanpa dan dengan penambahan ekstrak hidroetanol batang seledri dapat dilihat pada Gambar 5. Penambahan ekstrak daun seledri memberikan nilai sebesar 327.66 ppm dan V_{maks} sebesar 6.45 U/mL pada metode grafik Langmuir, sedangkan Penambahan ekstrak batang seledri memberikan nilai K_m sebesar 321,09 ppm dan V_{maks} sebesar 5.21 U/mL. Berdasarkan data penelitian ini, metode penentuan parameter kinetik yang lebih dianggap sesuai dalam inhibisi enzim xantin oksidase oleh ekstrak seledri adalah metode Langmuir, hal ini dapat dilihat pada nilai regresi linear dari metode Langmuir lebih tinggi dibandingkan metode Lineweaver-Burk. Pada Grafik Lineweaver-Burk juga terlihat adanya distorsi v yang lebih terlihat pada konsentrasi $[S]$ kecil.

Menurut Lai (2014) metode grafik langmuir lebih akurat digunakan untuk menentukan parameter kinetik enzim berupa K_m dan V_{maks} , hal ini karena metode grafik Lineweaver-Burk diketahui dapat mendistorsi v dalam kesalahan eksperimen. Kesalahan juga semakin terlihat pada konsentrasi substrat yang kecil sehingga memberikan hasil yang tidak akurat. Pernyataan tersebut juga sesuai dengan yang dikemukakan oleh Wilkinson (1961) dan Moser (1985) 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} , selain itu Doran (1995) juga menyatakan bahwa metode grafik Langmuir lebih sesuai digunakan dalam penentuan nilai K_m dan V_{maks} enzim untuk metode linearisasi.

SIMPULAN

Berdasarkan data penelitian dapat disimpulkan persentase penghambatan ekstrak daun seledri terbesar adalah 86.86% pada konsentrasi ekstrak 30% dan penghambatan ekstrak batang seledri terbesar adalah 87.71% pada konsentrasi ekstrak 40%. Penambahan ekstrak daun seledri memberikan nilai K_m sebesar 27.74 ppm dan V_{maks} sebesar 3,55 U/mL pada metode grafik Lineweaver-Burk, sedangkan memberikan nilai K_m sebesar 327.66 ppm dan V_{maks} sebesar 6.45 U/mL pada metode grafik Langmuir. Penambahan ekstrak batang seledri memberikan nilai K_m sebesar 145.24 ppm dan V_{maks} sebesar 4,55 U/mL pada metode grafik Lineweaver-Burk, sedangkan memberikan nilai K_m sebesar 321,09 ppm dan V_{maks} sebesar 5.21 U/mL pada metode grafik Langmuir. Berdasarkan hasil, metode penentuan parameter kinetik yang lebih dianggap sesuai dalam inhibisi ekstrak adalah metode Langmuir, hal ini dapat dilihat pada nilai regresi linear dari metode Langmuir lebih tinggi dibandingkan metode Lineweaver-Burk. Pada Grafik Lineweaver-Burk juga terlihat adanya distorsi V yang lebih terlihat pada konsentrasi $[S]$ kecil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada semua pihak yang telah membantu dan berkontribusi dalam penelitian ini, sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

REFERENSI

- Deviandra, R., Safitri, F., & Handaja, D. 2013. Efek Pemberian Seduhan Seledri (*Apium graveolens* L.) Terhadap Kadar Asam Urat Pada Tikus Jantan Strain Wistar (*Rattus norvegicus*) Hiperurisemia. Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, 9(2):75-81
- Doran, P.M. 1995. *Bioprocess Engineering Principle*. London: Academic Press Ltd.
- Emmanuel, M. Papamichael, dan Leonidas, G.T. 2006. Enzyme Kinetics And Modeling Of Enzymatic System. In: Ashok, P. Colin, W. Carlos, R.S. dan Christian, L. (ed), *Enzyme technology*, India: Springer.
- 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.
- Iswantini, D. Nadinah, Darusman, L.K. dan Trivadila. 2012. Inhibition Kinetic of *Apium graveolens* L. Ethanol Extract and Its Fraction on the Activity of Xanthine Oxidase and Its Active Compound. *J. Biol. Sci.*
- 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, A. L. 1997. *Biochemistry*. New York: Worth Publisher Inc.
- Moser, A. 1985. Rate Equation of Enzyme Kinetics. In: 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.
- 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.
- Pacher, P. Nivorozhkin, A. dan Szabo, C. 2006. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half A Century After The Discovery of Allopurinol. *Pharmacological Reviews*. 58 (1) 87-111.
- Wilkinson, G.N. 1961. Statistical Estimations In Enzyme Kinetics. *Biochem. J.* 80:324-332.
- Zummah, A & Martha, R.D. 2018. Antihyperuricemic Activity of Aqueous Celery Infusion by Xanthine Oxidase Enzyme Inhibition. *Trad.Med.J.* 23(3)131-136.