

**EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) SEBAGAI ANTIOKSIDAN
PADA PENURUNAN KADAR ASAM URAT TIKUS WISTAR****Ni Putu Rahayu Artini, Sri Wahjuni, dan Wahyu Dwijani Sulihingtyas***Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana,
Bukit Jimbaran***ABSTRAK**

Telah dilakukan isolasi dan identifikasi isolat aktif antioksidan dari daun sirsak (*Annona muricata* L.). Ekstraksi metabolitnya dilakukan dengan cara maserasi menggunakan metanol sehingga dihasilkan 158 gram ekstrak kental metanol dari \pm 1.200 gram serbuk sampel. Ekstrak kental metanol ini memiliki persentase peredaman DPPH sebesar 77,22% pada menit ke-5 dan 85,42% pada menit ke-60. Partisi dilakukan menggunakan petroleum eter, kloroform, n-butanol, dan lapisan air hingga diperoleh ekstrak n-butanol yang memiliki persentase peredaman paling besar, yaitu 91,10% pada menit ke-5 dan 97,90% pada menit ke-60.

Pada penelitian ini dosis terbaik yang diperoleh untuk menurunkan kadar asam urat pada tikus penelitian adalah fraksi n-butanol dosis 200 mg/kg BB, dengan persentase penurunan sebesar 86,29% ($p=0,001$). Fraksi aktif antioksidan diidentifikasi menggunakan panduan kromatografi gas-spektroskopi massa. Senyawa aktif yang teridentifikasi adalah 2,3-dihidro-benzofuran; tetradekana; 1,4,4a,5,6,7,8,8a-oktahidroisokuinolin-3-etoksi; 4-hidroksi-3,5,6-trimetil-4-(3-oxo-1-butenil)-2-sikloheksena-1-on. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dapat menurunkan kadar asam urat tikus penelitian. Selanjutnya, penelitian ini dapat diaplikasikan pada manusia untuk mengurangi kadar asam urat darah.

Kata kunci : daun sirsak (*Annona muricata* L.), isolasi, identifikasi, antioksidan, asam urat, kromatografi gas-spektroskopi massa

ABSTRACT

Isolation and identification of anti-oxidant active isolate from soursop leave (*Annona muricata* L.) was carried out in this study. Methanol was used to macerate an 158 gram sample. This crude extract showed 77,22% of inhibition ability to reduce oxidation of DPPH (*difenil-picrylhydrazine*) at the fifth minute and 85,42% at the sixtieth minute inhibition time. Petroleum benzene, chloroform, n-buthanol, and water were applied to separate it. N-buthanol extract has the highest anti-oxidant reduction percentage which was 91,10% of inhibition ability to reduce oxidation at the fifth minute and 97,90% at the sixtieth minute inhibition time.

From this research, it was obtained that the best dose of n-buthanol fraction applied to decrease uric acid was 200 mg/Kg BW with a percentage decrease of 86,29% ($p=0,001$). n-buthanol fraction was identified by gas chromatography-mass spectrometer. The active compounds observed were: benzofuran, 2,3-dihidro; tetradecana; 3-ethoxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydroisoquinoline; 2-cyclohexen-1-one, 4-hydroxy-3,5,6-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl). In conclusion, soursop leave (*Annona muricata* L.) extract was active for decreasing uric acid of rat tested. For future research, this method could be applied to human in decreasing uric acid concentration in blood.

Keywords : soursop leave (*Annona muricata* L.), isolation, identification, anti-oxidant, uric acid, gas chromatography-mass spectrometer

PENDAHULUAN

Pesatnya perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi serta berubahnya pola hidup masyarakat berdampak munculnya berbagai penyakit degeneratif yang membahayakan. Asam urat merupakan salah satu dari beberapa penyakit yang sangat membahayakan, karena bukan hanya mengganggu kesehatan tetapi juga dapat mengakibatkan cacat pada fisik. Penyakit ini juga berkaitan erat dengan ginjal, karena ginjal merupakan suatu organ yang berfungsi sebagai tempat pembuangan asam urat yang berlebihan. Ketika ginjal tidak mempunyai kekuatan untuk membuang asam urat yang berlebihan, maka hal ini yang menjadi salah satu penyebab terbentuknya asam urat (Asaidi, 2010). Di dalam tubuh telah terdapat 85% senyawa purin untuk kebutuhan sehari-hari, ini berarti kebutuhan purin dari makanan hanya 15%. Kadar asam urat yang normal dalam tubuh adalah 3,5-7 mg/dL untuk laki-laki dan 2,6-6 mg/dL bagi wanita (Saraswati, 2009). Asam urat dihasilkan dari proses metabolisme utama nukleosida purin melalui basa purin *hipoxanthin*, *xanthin*, dan *guanin* (Saraswati, 2009). Apabila terjadi penyimpangan dalam proses ini, maka kadar asam urat akan meningkat, hal ini disebut sebagai kondisi hiperurisemia (Stryer, 2000).

Hiperurisemia dapat diatasi dengan menurunkan produksi asam urat. Allopurinol sebagai inhibitor spesifik dari enzim *xanthin oksidase* (XO) yang mengkatalisis oksidasi *hipoxanthin* menjadi *xanthin* dan asam urat, terbukti efektif dalam menurunkan kadar asam urat (Gaw *et al.*, 1998). Penyakit degeneratif ini dapat diredam, bila tubuh memiliki penangkap radikal bebas. Secara alami, tubuh mempunyai benteng yang dapat mencegah serangan radikal bebas yang disebut antiradikal bebas. Senyawa sintesis antiradikal bebas yang cukup terkenal adalah *butylatedhydroxytoluena* (BHT) dan *butylatedhydroxyanisole* (BHA) yang banyak dimanfaatkan dalam industri makanan dan minuman. Namun, beberapa hasil penelitian telah membuktikan bahwa antiradikal bebas tersebut mempunyai efek samping yang tidak diinginkan, yaitu berpotensi sebagai karsinogenik terhadap efek reproduksi dan

metabolisme. Oleh karena itu jenis antiradikal bebas alami yang baru harus terus dicari untuk meredam radikal bebas yang dapat merusak tubuh manusia. Untuk memenuhi hal tersebut, pencarian senyawa antiradikal bebas diarahkan pada daun sirsak (*Annona muricata L.*) (Hernani, 2005).

Daun sirsak (*Annona muricata L.*) adalah tanaman yang mengandung senyawa flavonoid, tanin, fitosterol, kalsium oksalat, dan alkaloid (Adjie, 2011). Antioksidan yang terkandung dalam buah sirsak antara lain adalah vitamin C. Hasil riset menyatakan, sirsak mengandung asetogenin yang mampu melawan 12 jenis sel kanker. Banyaknya manfaat sirsak membuat orang mulai beralih mengkonsumsi sirsak sebagai alternatif pencegahan dan pengobatan konvensional (Adji, 2011). Pada tahun 1999, dalam majalah "*The Journal of Natural Products*", melaporkan bahwa kandungan senyawa asetogenin pada daun sirsak (*Annona muricata L.*) berkhasiat sebagai antitumor. Para peneliti di Taiwan tahun 2003 juga melaporkan bahwa kandungan asetogenin daun sirsak (*Annona muricata L.*) memiliki sifat toksik yang tinggi terhadap sel kanker ovarium, serviks, dan sel kanker kilit pada dosis rendah.

Hasil penelitian [menyebutkan manfaat buah sirsak \(*Annona muricata L.*\), salah satunya sebagai antioksidan](#), oleh karena itu perlu dilakukan uji *screening* pada bagian daun untuk mengetahui pengaruh aktivitasnya sebagai antioksidan yang disadarkan pada pengaruh distribusi metabolit sekunder. Selain itu, adanya kecenderungan masyarakat mengkonsumsi daun maupun buah sirsak untuk mencegah dan mengobati asam urat adalah alasan mengangkat topik ini dan untuk mengetahui secara ilmiah dosis maupun kandungan senyawa dari daun sirsak dalam menurunkan kadar asam urat darah. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan isolasi dan identifikasi isolat yang bersifat antiradikal bebas dalam daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan dicoba aplikasinya melalui penurunan kadar asam urat darah pada tikus wistar yang diinduksi makanan tinggi purin, yaitu jus hati ayam dan melinjo.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari daun sirsak (*Annona muricata L.*) yang dikumpulkan dari bulan Oktober 2011 dan diperoleh di daerah Badung. Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan wistar berat rata-rata 70-75 g dan berumur sekitar 1,5 bulan sebanyak 24 ekor, normal dan sehat yang diperoleh dari UPT. Lab Analitik Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Badung, Bali. Bahan-bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah beberapa jenis pelarut yaitu CH₃OH (p.a), CH₃OH teknis, petroleum eter (p.a), CHCl₃(p.a), n-butanol (p.a), silica gel 60, plat KLT, silica gel 60 F₂₅₄, akuades, kristal DPPH (*difenil-picrylhydrazine*), pereaksi uji fitokimia allopurinol, melinjo, EDTA, pakan tikus, reagen asam urat (FS TBHBA), dan hati ayam mentah.

Peralatan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pisau, blender, ayakan, neraca analitik, aluminium foil, corong pisah, standar, statif, labu ukur, gelas beaker, gelas ukur, desikator, pipit volume, batang pengaduk, botol vial, ball filler, kertas saring, corong, vakum putar penguap, corong pisah, seperangkat alat KLT dan Kromatografi kolom, membrane 0,45 μ , seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis, seperangkat alat GC-MS, dan spuit injeksi volume 1,0 mL dan 3,0 mL, *blood tube*, *sentrifuge*, masker, dan sarung tangan.

Cara Kerja

Penyiapan Sampel dan Hewan Uji

Daun sirsak (*Annona muricata L.*) diuji determinasi, dibersihkan, dikeringkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung, dan dipotong kecil-kecil lalu diblender kemudian diayak sehingga menjadi serbuk berwarna hijau kecoklatan dan ditimbang dengan neraca teknis. Sebelum digunakan untuk percobaan hewan yang diuji diadaptasikan selama 1 minggu agar tikus jantan wistar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungannya, sambil dilakukan kontrol kesehatan, berat badan dan penyeragaman

makanan dengan pemberian pakan standar dan diberi air minum *ad libitum* sebelum penelitian.

Ekstraksi dan Pemisahan

Sebanyak 1.200 gram serbuk daun sirsak (*Annona muricata L.*) diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan metanol teknis sampai semua serbuk terendam dalam pelarut selama ± 24 jam secara berulang-ulang sampai diperoleh filtrat bening yang diperkirakan senyawa aktif dalam serbuk daun sirsak (*Annona muricata L.*) telah habis, kemudian disaring. Ekstrak metanol dipisahkan dari pelarutnya dengan *rotary vacum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental metanol. Ekstrak kental metanol yang diperoleh kemudian dilarutkan dalam 100 mL air-metanol (7:3), kemudian metanolnya diuapkan dan dipartisi dengan petroleum eter (5 x 50 mL). Ekstrak petroleum eter dikumpulkan dan residunya (ekstrak air) dipartisi kembali dengan CHCl₃ (5 x 50 mL). Ekstrak CHCl₃ dikumpulkan dan residunya (ekstrak air) dipartisi dengan n-butanol (5 x 50 mL). Keempat ekstrak yang diperoleh (EP, EK, EB, dan EA) kemudian diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* dan diuji aktivitas antioksidannya secara spektrofotometer Ultra violet – sinar tampak. Ekstrak yang memperlihatkan aktivitas antioksidan yang paling baik kemudian dilakukan uji fitokimia dan dilanjutkan aplikasinya ke hewan uji tikus wistar serta dipisahkan dengan kromatografi kolom.

Uji Aktivitas Antioksidan

Keempat ekstrak, yaitu ekstrak PE, CHCl₃, n-butanol, dan air yang diperoleh diuji aktivitas antioksidannya dengan tahap-tahap sebagai berikut: sebanyak 0,0800 gram ekstrak diencerkan dengan metanol pada labu ukur 10 mL sehingga kadarnya menjadi 8000 ppm. Kristal DPPH ditimbang seberat 0,0004 gram lalu dilarutkan dalam metanol dengan menggunakan labu ukur 10 mL sehingga kadarnya 0,004% (b/v). Pencatatan dilakukan terhadap absorbansi pada panjang gelombang 497 nm, 517 nm, dan 537 nm. Sejumlah 1 mL sampel dan 2 mL larutan DPPH 0,004% dicampurkan dan dikocok sampai homogen, lalu dituangkan dalam kuvet. Pada menit ke-5 dan ke-60 setelah reaksi berlangsung, dilakukan

pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 497 nm, 517 nm, dan 537 nm. Ekstrak yang menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi kemudian difraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Fase gerak yang digunakan adalah eluen yang sesuai berdasarkan hasil KLT. Pengembangan ini dilakukan dalam ruangan tertutup dan dihentikan setelah fase gerak mencapai garis batas yang telah ditentukan. Plat KLT diambil dari bejana kromatografi dan dikeringkan di udara terbuka. Sebagai penampak noda dapat digunakan radiasi ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm atau 366 nm. Noda yang terbentuk diamati dan dihitung harga Rf-nya. Fase gerak yang memberikan jumlah noda paling banyak dan pemisahan yang bagus, selanjutnya dipilih sebagai eluen dalam analisis kromatografi kolom.

Pemisahan dengan teknik kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel 60 dan fase geraknya menggunakan eluen terbaik dari hasil KLT. Pemisahan diawali dengan pembuatan kolom, dimana silika gel 60 ditambah sedikit eluen sehingga menjadi bubuk. Eluen dimasukkan ke dalam kolom dengan kran kolom, lalu bubuk sedikit demi sedikit dimasukkan ke dalam kolom, eluen tetap dialirkan kira-kira 4 jam. Kemudian kran ditutup dan dibiarkan selama 24 jam untuk menyempurnakan pemampatan. Setelah 24 jam, ekstrak dilarutkan dalam eluen, kemudian dimasukkan ke dalam kolom dengan hati-hati sambil kran dibuka dengan kecepatan alir 1 mL/ menit. Setiap 3 mL eluat ditampung dalam satu botol penampung fraksi. Elusi dihentikan setelah diperkirakan semua komponen keluar dari kolom. Setiap botol dilihat pola nodanya pada plat KLT. Eluat yang memiliki pola pemisahan noda yang sama digabungkan sehingga diperoleh beberapa fraksi. Fraksi-fraksi yang diperoleh diuji aktivitas antioksidannya. Fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi akan diuji kemurniannya dan diidentifikasi dengan GC-MS.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *true experimental* dengan rancangan *posttest only control group design* (Zainuddin, 1999). Langkah awal adalah membuat seragam kondisi

ke-24 ekor tikus dengan pemberian pakan standar pelet dan air minum selama satu minggu. Selanjutnya untuk mencapai kondisi hiperurisemia, diberi melinjo 4 mg/Kg BB dan jus hati ayam 50 mL/ kg BB selama sembilan hari. Langkah selanjutnya, tikus tersebut diberikan perlakuan fraksi aktif antioksidan daun sirsak selama sembilan hari dengan dosis 100, 200 dan 400 mg/Kg BB.

Pengambilan Darah dan Penetapan Kadar Asam Urat

Hewan uji diambil darahnya dari aorta jantung sebanyak ± 1 mL, ditampung pada *blood tube* yang sebelumnya telah diisi EDTA untuk menghindari adanya penggumpalan darah. Kemudian darah dan serum dipisahkan dengan cara disentrifuse selama 15 menit pada kecepatan 3.000-3.500 rpm. Plasma yang terpisah diambil dan ditentukan kadar asam uratnya. Untuk pengukuran serapan dengan spektrofotometer terlebih dahulu disiapkan tiga buah tabung. Tabung pertama berisi akuades, tabung kedua berisi standar asam urat, dan tabung ketiga berisi serum uji, pada masing-masing tabung ditambahkan masing-masing pereaksi *urea uric acid* FS TBHBA. Kadar asam urat ditetapkan berdasarkan reaksi enzimatis menggunakan reagen *uric acid* FS TBHBA. Plasma, blanko dan standar *uric acid* yang telah dicampur homogen dengan pereaksi *uric acid* FS TBHBA diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya larutan blanko, standart, dan sampel dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm.

Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan uji ANOVA menggunakan program SPSS pada tingkat kepercayaan 95%. Perhitungan dosis efektif tengah (ED₅₀) aktivitas anti asam urat fraksi daun sirsak (*Annona muricata L.*) dilakukan dengan analisis probit. ED₅₀ fraksi daun sirsak (*Annona muricata L.*) adalah dosis yang dapat memberikan aktivitas antigout (penurun kadar asam urat) sebesar 50% terhadap hewan uji.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Penentuan Aktivitas Antioksidan

Hasil maserasi 1.200 gram serbuk daun kering sirsak (*Annona muricata* L.) menggunakan pelarut metanol diperoleh ekstrak kental metanol yang berwarna hijau kehitaman sebanyak 158 gram. Ekstrak kental metanol yang telah disuspensi ke dalam metanol-air (7:3), kemudian dipartisi dengan berbagai pelarut, sehingga diperoleh ekstrak kental petroleum eter sebanyak 0,1863 gram yang berwarna hijau kehitaman, ekstrak kental kloroform sebanyak 73,186 gram yang berwarna hijau kehitaman, ekstrak *n*-butanol sebanyak 10,7486 gram yang berwarna coklat kemerahan dan ekstrak kental air sebanyak 15,3411 gram yang berwarna merah kecoklatan. Keempat ekstrak kental kemudian diuji aktivitas antioksidannya secara spektrofotometer ultra violet – sinar tampak dengan menggunakan senyawa DPPH, hasil uji aktivitas antioksidan dan uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Berdasarkan uji aktivitas antioksidan pada Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak

petroleum eter, kloroform, *n*-butanol dan air bersifat aktif sebagai antioksidan. Ekstrak *n*-butanol memiliki persentase peredaman paling tinggi pada menit ke-5 sebesar 91,10% dan menit ke-60 sebesar 97,9 %. Ekstrak *n*-butanol kemudian diuji fitokimia.

Penentuan Kadar Asam Urat

Untuk penelitian asam urat, tikus penelitian yang digunakan disiapkan sesuai dengan kaidah-kaidah pemeliharaan hewan untuk percobaan. Berat badan tikus ditimbang tiga kali yaitu: pada awal percobaan (umur tikus enam minggu), setelah adaptasi selama satu minggu di laboratorium, dan sesudah pemberian pakan tinggi purin berlangsung selama sembilan hari (tikus telah menjadi hiperurisemia). Tikus penelitian menunjukkan perilaku yang normal dan berat badan tikus rata-rata $69,63 \pm 13,9827$ gram dan dalam seminggu terjadi peningkatan berat badan tikus secara keseluruhan adalah sebesar $110,375 \pm 9,1807$ gram, sehingga layak digunakan untuk penelitian. Hasil perubahan berat badan tikus penelitian sebelum dan sesudah adaptasi, serta sesudah asam urat dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antioksidan pada ekstrak kental hasil partisi

Sampel	Waktu (menit)	Uji	Absorbansi			A hitung 517 nm	% peredaman
			497 nm	517 nm	537 nm		
Ekstrak PE	5	DPPH	0,612	0,624	0,576	0,0300	45 %
		Sampel	0,607	0,564	0,488	0,0165	
	60	DPPH	0,673	0,659	0,587	0,0290	57 %
		Sampel	0,487	0,457	0,402	0,0125	
Ekstrak CHCl ₃	5	DPPH	0,625	0,689	0,603	0,0750	27 %
		Sampel	0,422	0,398	0,264	0,0550	
	60	DPPH	0,615	0,638	0,591	0,0350	74,30 %
		Sampel	0,408	0,337	0,248	0,0090	
Ekstrak <i>n</i> -butanol	5	DPPH	0,617	0,647	0,520	0,0785	91,10 %
		Sampel	0,164	0,156	0,134	0,0070	
	60	DPPH	0,537	0,576	0,520	0,0475	97,90 %
		Sampel	0,136	0,110	0,082	0,0010	
Ekstrak air	5	DPPH	0,614	0,589	0,464	0,0500	30 %
		Sampel	0,235	0,237	0,169	0,0350	
	60	DPPH	0,422	0,420	0,369	0,0245	77,55 %
		Sampel	0,201	0,183	0,154	0,0055	

Tabel 2. Hasil uji fitokimia ekstrak *n*-butanol

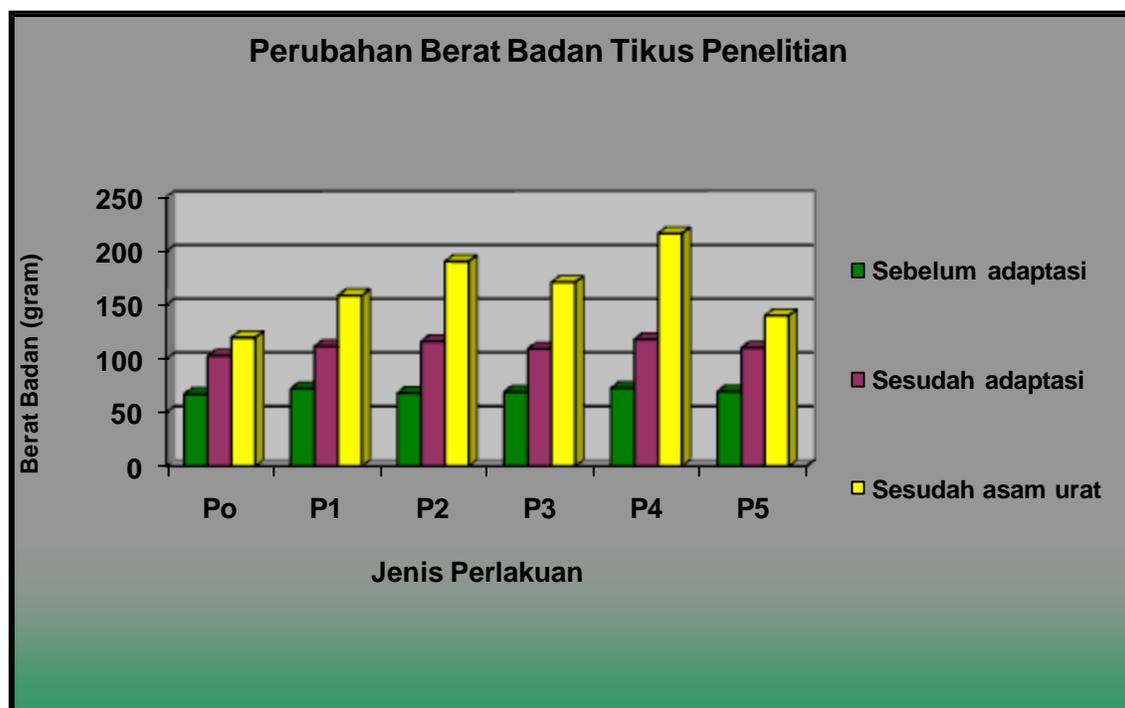
No.	Uji fitokimia untuk senyawa	Pereaksi	Perubahan	Simpulan
1.	Alkaloid	Meyer Wagner	Kuning - oranye (tanpa end.putih) Kuning - coklat (tanpa end.coklat)	- -
2.	Flavonoid	Wilstatte NaOH 10 % H ₂ SO ₄ pekat Bate Smith-Metacalf	Kuning - merah tua Kuning - coklat Kuning - merah tua Kuning - merah	+ + + +
3.	Triterpenoid	Lieberman-Burchard H ₂ SO ₄ 10 %	Kuning – coklat Kuning – coklat	+ +
4.	Saponin	Air panas + HCl	Tidak terbentuk busa	-
5.	Fenolat (tannin)	Air panas + FeCl ₃	Kuning - hitam kehijauan	+
6.	Steroid	Lieberman-Burchard H ₂ SO ₄ 10 %	Kuning – coklat Kuning – coklat	- -

Keterangan:

(+) = Mengandung senyawa yang dimaksud

(-) = Tidak mengandung senyawa yang dimaksud

Uji fitokimia, fraksi *n*-butanol positif mengandung senyawa golongan flavonoid, triterpenoid, dan fenolat.

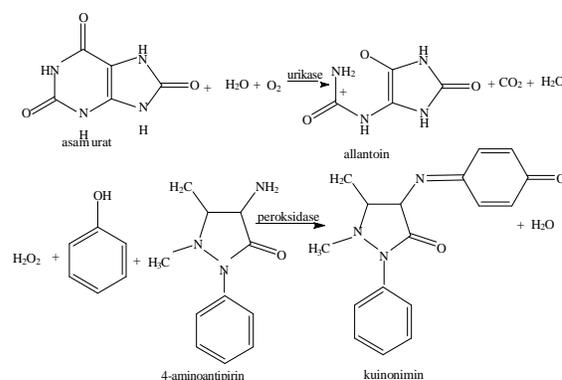


Gambar 1. Diagram pertambahan berat badan tikus sebelum adaptasi, setelah adaptasi, dan setelah asam urat

Pada hari ke-6 dan hari ke-9 diambil darahnya untuk mengetahui persentase kenaikan kadar asam urat darahnya. Setelah dianalisis dan dibuat asam urat sampai hari ke-9, masing-masing tikus pada setiap perlakuan ditimbang berat-badannya untuk mengetahui secara pasti dosis pemberian allopurinol dan fraksi n-butanol. Pada hari ke-10 s/d hari ke-18, tikus diberi perlakuan berupa pengobatan dengan allopurinol dosis 10 mg/kg BB pada kontrol positif (kelompok P₂) dan fraksi n-butanol dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 400 mg/kg BB pada perlakuan kelompok P₃ – P₅ secara peroral dengan sonde. Hari ke-14 dan hari ke-18 kembali diambil darahnya untuk mengetahui persentase penurunan kadar asam urat darah setelah diberi fraksi n-butanol dengan berbagai dosis dan sebagai pembandingan dengan pemberian allopurinol.

Penetapan kadar asam urat ditentukan dengan metode enzimatik menggunakan reagen *uric acid* FS-TBHBA (2,4,6-tribromo-3-hydroxybenzoic acid) dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Mekanisme yang terjadi adalah asam urat dioksidasi oleh enzim urikase dengan bantuan H₂O dan O₂ menjadi

allantoin, CO₂ dan H₂O₂. H₂O₂ yang terbentuk akan bereaksi dengan 4-amino antipirin dan FS-TBHBA menjadi kuinonimin yang berwarna merah muda, reaksi tersebut dikatalisis oleh enzim peroksidase (POD). Reaksi enzimatik antara asam urat dan FS TBHBA dapat dilihat pada Gambar 2.



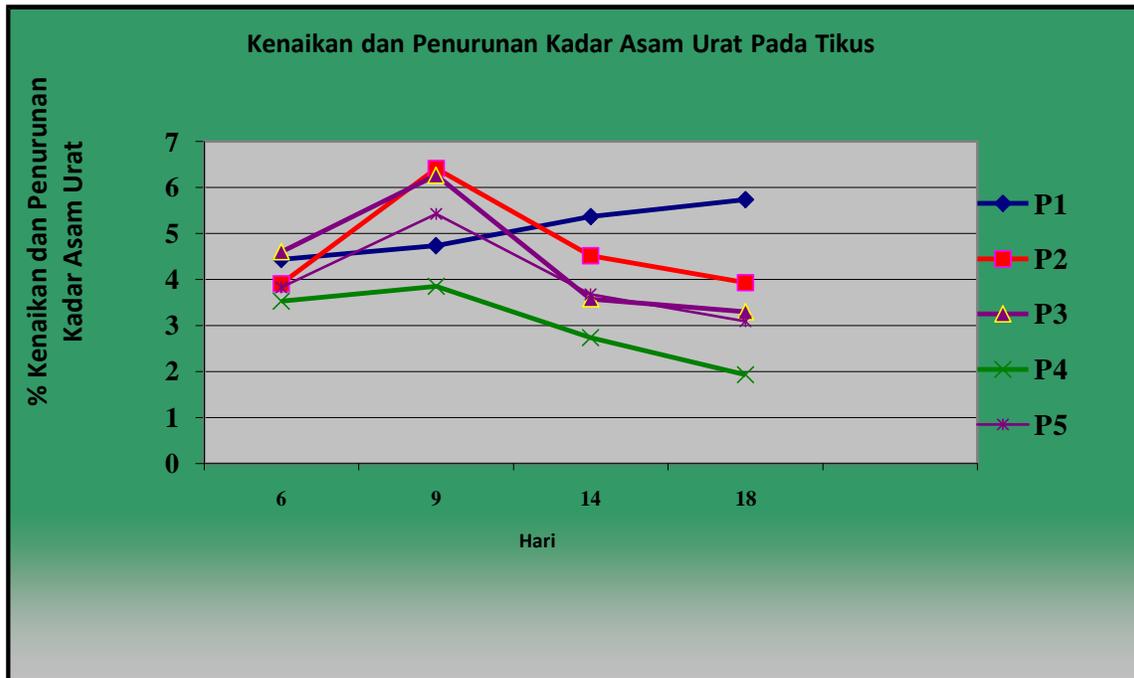
Gambar 2. Mekanisme reaksi pembentukan senyawa kuinonimin (Schunack *et al.*, 1990)

Tabel 3. Persentase kenaikan kadar asam urat darah tikus rata-rata hari ke-6 & 9, dan persentase penurunan rata-rata hari ke-14 & 18

Kelompok Perlakuan Tikus	Persentase Kenaikan Kadar As. Urat rata-rata (n=4) hari ke- (%)		14	18	dar ari
	6	9			
Normal	0,00	13,85	81,81	-27,27	
Hiperurisemia	173,23	191,69	*230,46	*253,23	
Allopurinol 10 mg/kg BB	140,62	295,08	39,62	51,93	
Fraksi n-butanol 100 mg/kg BB	183,38	285,85	57,91	63,98	
Fraksi n-butanol 200 mg/kg BB	117,23	136,92	49,89	86,29	
Fraksi n-butanol 400 mg/kg BB	135,69	234,15	46,18	61,50	

Keterangan:

*Peningkatan kadar asam urat



Keterangan:

1. P₁ adalah kontrol hiperurisemia (melinjo 4 g/kg BB + jus hati ayam mentah 50 mL/kg BB secara *ad libitum*),
2. P₂ adalah kontrol positif (allopurinol dosis 10 mg/kg BB peroral),
3. Perlakuan kelompok P₃ adalah pemberian ekstrak n-butanol dosis 100 mg/kg BB,
4. Perlakuan kelompok P₄ adalah pemberian ekstrak n-butanol dosis 200 mg/kg BB, dan
5. Perlakuan kelompok P₅ adalah pemberian ekstrak n-butanol 400 mg/kg BB.

Gambar 3. Grafik kadar asam urat tikus penelitian pada hari ke-6, 9, 14, dan 18

Tikus normal (P₀) memiliki kadar asam urat normal sekitar 1,6 mg/dl – 1,8 mg/dl, sedangkan kelompok P₁-P₅ yang diberikan makanan tinggi purin selama sembilan hari, telah mengalami peningkatan asam urat diatas 3,00 mg/dl yang terlihat sejak hari ke-6 dengan persentase diatas 100%. Kadar asam urat rata-rata untuk semua perlakuan hewan uji tikus yang dibuat dalam keadaan hiperurisemia sampai hari ke-9 adalah $4,74 \pm 0,665$ mg/dl. Grafik perkembangan kadar asam urat darah tikus penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.

Pada kontrol positif (P₂) dengan pemberian allopurinol dosis 10 mg/kg BB terjadi penurunan kadar asam urat selama 9 hari pada hari ke-18 sebesar 51,93% dan kadar asam urat

darah menjadi $3,93 \pm 0,995$ mg/dl, sedangkan untuk kelompok pemberian 100 mg/kg BB fraksi n-butanol terjadi penurunan kadar asam urat sebesar 63,98% dan kadar asam urat darah menjadi $3,30 \pm 0,562$ mg/dl, fraksi n-butanol dosis 200 mg/kg BB memperlihatkan penurunan asam urat yang lebih signifikan sebesar 86,29% selama 9 hari pemberian dengan kadar asam urat darah menjadi $1,93 \pm 0,535$ mg/dl, sedangkan fraksi n-butanol dosis 400 mg/kg BB juga memberikan efek penurunan kadar asam urat sebesar 61,50 % dengan kadar asam urat darah menjadi $3,09 \pm 0,679$ mg/dl, hasil ini cenderung lebih rendah dari pemberian fraksi n-butanol dosis 200 mg/kg BB.

Tabel 4. Hasil uji aktivitas antioksidan pada fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom

Fraksi	Waktu (menit)	Uji	Absorbansi			A hitung 517 nm	Persentase Peredaman (%)
			497 nm	517 nm	537 nm		
A	5	DPPH	0,607	0,637	0,566	0,05050	123,76
		Sampel	0,529	0,469	0,433	-0,0120	
A	60	DPPH	0,603	0,615	0,571	0,0280	142,86
		Sampel	0,479	0,403	0,351	-0,012	
B	5	DPPH	0,628	0,692	0,606	0,0740	35,81
		Sampel	0,420	0,394	0,273	0,0475	
B	60	DPPH	0,621	0,630	0,598	0,0205	80,49
		Sampel	0,408	0,337	0,258	0,0040	
C	5	DPPH	0,610	0,585	0,460	0,0500	30,00
		Sampel	0,231	0,233	0,165	0,0350	
C	60	DPPH	0,587	0,565	0,460	0,0050	65,06
		Sampel	0,217	0,200	0,154	0,0145	
D	5	DPPH	0,633	0,647	0,600	0,0305	37,70
		Sampel	0,534	0,486	0,400	0,0190	
D	60	DPPH	0,556	0,544	0,498	0,0170	79,42
		Sampel	0,501	0,450	0,392	0,0035	

Hasil kadar asam urat yang diperoleh, kemudian dilakukan uji statistik dengan SPSS 16. Data diketahui terdistribusi normal dan homogen dengan $p > 0,05$ dan taraf kepercayaan 95%. Data hasil uji kolmogorov-smirnov ditampilkan pada lampiran 13. Hasil uji ANOVA menunjukkan nilai $p < 0,05$ sehingga H_1 diterima, artinya terdapat perbedaan bermakna antara penurunan kadar asam urat pada hari ke-14 dan hari ke-18 antara kelompok hiperurisemia dengan kontrol positif dan kelompok perlakuan 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 400 mg/kg BB. Hasil uji Tukey/HSD menunjukkan bahwa perbedaan persentase penurunan kadar asam urat yang bermakna pada hari ke-14 dan hari ke-18, terjadi pada kontrol positif dan kelompok perlakuan 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 400 mg/kg BB, dengan nilai perbedaan paling signifikan adalah 400 mg/kg BB. Dosis 400 mg/kg BB memiliki aktivitas dalam menurunkan kadar asam urat pada hewan uji paling signifikan dibandingkan dengan fraksi *n*-butanol dosis 100 dan 200 mg/kg BB ($p < 0,05$). Penetapan dosis fraksi *n*-butanol yang dapat memberikan penurunan asam urat sebesar 50% (ED_{50})

dilakukan dengan uji probit. Data hasil uji probit diperoleh nilai ED_{50} fraksi *n*-butanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) sebesar 92 mg/Kg BB.

Pemisahan, Pemurnian, dan Identifikasi dengan GC-MS

Pemisahan ekstrak *n*-butanol menggunakan kromatografi kolom diperoleh empat fraksi dengan pola pemisahan yang berbeda serta diuji aktivitas antioksidannya yang dipaparkan pada Tabel 4 dan kandungan senyawa metabolit sekundernya.

Berdasarkan uji aktivitas antioksidan, semua fraksi bersifat sebagai antioksidan dengan peredaman lebih dari 50%. Namun dari keempat fraksi tersebut, fraksi A memiliki persentase peredaman paling tinggi pada menit ke-5 dan menit ke-60, yaitu sebesar 123,76% dan 142,86%. Oleh karena itu, tahap kerja selanjutnya hanya dilakukan pada fraksi A yang paling aktif sebagai antioksidan. Secara KLT fraksi FA tetap memberikan satu noda dengan berbagai fase gerak *n*-butanol: air: *n*-heksana (2:0,5:3), *n*-butanol: air: $CHCl_3$ (3:0,5:1), dan *n*-butanol: CH_3COOH : *n*-heksana (2:1:1). Setelah

diuji dengan pendeteksi uji fitokimia, fraksi A mengandung flavonoid dan fenolat.

Senyawa aktif pada fraksi A yang teridentifikasi adalah 2,3-dihidro-benzofuran; tetradekana; 1,4,4a,5,6,7,8,8a-oktahidroisokuinolin-3-etoksi; 4-hidroksi-3,5,6-trimetil-4-(3-oxo-1-butenil)-2-sikloheksena-1-on. Se-nyawa ini diduga berkontribusi dalam menurunkan kadar asam urat pada tikus penelitian

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil uji secara *in vivo*, fraksi n-butanol dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 400 mg/kg BB mampu menurunkan kadar asam urat yang lebih besar dari allopurinol dosis 10 mg/kg BB, dengan dosis paling optimal adalah 200 mg/kg BB sebesar 86,29%.
2. Persentase peredaman radikal bebas dalam isolat yang bersifat sebagai antioksidan pada daun sirsak (*Annona muricata L.*), yaitu pada fraksi A dari fraksi n-butanol adalah sebesar 123,76% pada menit ke-5 dan 142,86% pada menit ke-60.
3. Isolat aktif bersifat antioksidan diduga mengandung empat senyawa dominan, yaitu: 2,3-dihidro-benzofuran; tetradekana; 1,4,4a,5,6,7,8,8a-oktahidroisokuinolin-3-etoksi; 4-hidroksi-3,5,6-trimetil-4-(3-oxo-1-butenil)-2-sikloheksena-1-on.

Saran

1. Perlu dilakukan pemisahan lebih lanjut agar menghasilkan senyawa tunggal yang aktif bersifat sebagai antioksidan.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan mengukur aktivitas dari enzim *xanthin oksidase* untuk mengetahui mekanisme dari penurunan asam urat dalam darah.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pula dengan pemeriksaan histopatologi pada organ ginjal tikus penelitian untuk kontrol normal, hiperurisemia, kontrol positif, dan kelompok perlakuan sehingga diketahui

perbedaan pengaruh asam urat terhadap fungsi ginjalnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Ida Bagus Putra Manuaba, M.Phil dan Ir. Ni G.A. Made Dwi Suastuti, M.Si. atas bimbingannya serta Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Nasional melalui proyek penelitian PKM atas pendanaannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Asaidi, M., 2010, Waspadai Asam Urat, Diva Press, Yogyakarta
- Adjie, S., 2011, Dahsyatnya Sirsak Tumpas Penyakit, Pustaka Bunda, Jakarta
- Gaw, et al., 1998, Allopurinol Sebagai Inhibitor Spesifik dari Enzim *Xanthine Oksidase* (XO) yang Mengkatalisis Oksidasi *Hypoxanthine* menjadi *Xanthine* dan Asam Urat, <<http://agungy.blogspot.com/2007/06/memahami-asam-urat-ginjal.html>> 20 September 2011
- Hernani, 2005, Tanaman Berkhasiat Antioksidan, Penebar Swadaya, Depok
- Harborne, J.B., 1987, Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terjemahan Padmawinata, K., dan Soediro, I., Penerbit ITB, Bandung
- Murray, R.K., et al., 1996, Biokimia Harper, Edisi 24, diterjemahkan oleh Hartono, A., Buku Kedokteran EGC, Jakarta
- Mutschler, E., 1991, Dinamila Obat, Edisi 5, 217-219, Alih Bahasa oleh Mathilda B. Widiyanto dan Ana S., Penerbit ITB, Bandung
- Price S. A., Wilson L. M., 1995, Patologi Konsep Klinis Proses Penyakit, Terjemahan Partawinarno, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta
- Saraswati, Sylvia, Diet Sehat Untuk penyakit Asam Urat, Diabetes, Hipertensi, dan Stroke, Yogyakarta, A+Plus Books

Schunack, W., Mayer, and K., Manfred, H., 1990, *Senyawa Obat Kimia Farmasi*, diterjemahkan oleh Joke, Witlmena dan Soebita, S., Gajah Mada University Press, Yogyakarta

Swantara, I M. D., 2005, Identifikasi Senyawa Bersifat Toksik Pada Ganggang Laut *Eucheuma spinosum*, *Prosiding : Seminar Nasional Kimia*, Universitas Negeri Surabaya

Zainuddin, M., 1999, *Metodelogi Penelitian*, Universitas Erlangga, Surabaya

Zhao, X., Zhu, X. dan Pan, Y., 2005, *Effects Of Cassia Oil On Serum and Hepatic Uric Acid Levels In Oksonate-Induced Mice and Xantine Dehydrogenase and Xantin Oksidase Activities In Mouse Liver*, *Journal Of Ethnopharmacology*, (<http://www.el-sevier.com/locate/jethpharm>, diakses 15 Agustus 2005