

Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Xantin Oksidase Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit dari Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.)

Khiky Dwinatrana¹, Rustini², Lusya Eka Putri³, Bayu Afriadi⁴, Sara Surya⁵, Hendrizal Usman⁶

^{1,2,3,4,5,6} Farmasi, Universitas Dharma Andalas

e-mail: khiky@unidha.ac.id

Abstrak

Penyakit asam urat atau hiperurisemia sering kali dikaitkan dengan aktivitas enzim xantin oksidase (XO) yang berlebihan, sehingga penghambatan XO menjadi salah satu pendekatan terapi yang potensial. Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) merupakan buah tropis dari Asia Tenggara yang dikenal kaya akan metabolit sekunder seperti β -karoten, linoleat. Selain itu, jamur endofit, yang hidup dalam hubungan simbiosis dengan tanaman inangnya, memiliki kemampuan untuk menghasilkan penghambat enzim XO, yang berpotensi lebih kuat. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi penghambatan XO dari ekstrak jamur endofit yang ditemukan pada kulit rambutan. Metode yang digunakan adalah uji in-vitro dengan microplate assay dengan enzim xantin oksidase. Xantin digunakan sebagai substrat dan allopurinol digunakan sebagai kontrol positif, sementara ekstrak etil asetat dari jamur endofit kulit rambutan diuji pada berbagai konsentrasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dari jamur endofit kulit rambutan memiliki aktivitas penghambatan XO dengan nilai IC_{50} sebesar 116 $\mu\text{g/mL}$ dibandingkan dengan allopurinol sebesar 2,57 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: Rambutan (*Nephelium Lappaceum* L.), Hiperurisemia, Xantine Oksidase (XO), Jamur Endofit

Abstract

Gout or hyperuricemia is often associated with excessive xanthine oxidase (XO) enzyme activity, so inhibiting XO is a potential therapeutic approach. Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) is a tropical fruit from Southeast Asia which is known to be rich in secondary metabolites such as β -carotene, linoleate. Additionally, endophytic fungi, which live in a symbiotic relationship with their host plants, have the ability to produce XO enzyme inhibitors, which are potentially more potent. This study aims to evaluate the XO inhibitory potential of endophytic fungal extracts found in rambutan peel. The method used is an in-vitro test using a microplate assay with the xanthine oxidase enzyme. Xanthine was used as a substrate and allopurinol was used as a positive control, while ethyl acetate extract from the endophytic fungus rambutan skin was tested at various concentrations. The results showed that ethyl acetate extract from the endophytic fungus rambutan skin had XO inhibitory activity with an IC_{50} value of 116 $\mu\text{g/mL}$ compared to allopurinol of 2.57 $\mu\text{g/mL}$.

Keyword: Rambutan (*Nephelium Lappaceum* L.), Hyperuricemia, Xanthine Oxidase (XO), Endophytic Fungi

PENDAHULUAN

Arthritis radang akut dan gout merupakan penyakit rematik yang sering terjadi, yang disebabkan oleh aktivitas enzim xantin oksidase (XO) yang berlebihan. Enzim XO bertanggung jawab mengkatalisis konversi hipoksantin menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat (1). Kedua proses ini melibatkan reduksi molekul oksigen untuk menghasilkan anion superoksida dan hidrogen peroksida. Penghambatan enzim XO dapat digunakan sebagai terapi untuk hiperurisemia

dan/atau gout karena pengobatan untuk kedua kondisi tersebut melibatkan peningkatan ekskresi asam urat atau penurunan produksi asam urat (2).

Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) adalah buah tropis yang umum dikonsumsi di Asia Tenggara. Buah rambutan ini telah menarik perhatian karena mengandung berbagai senyawa bioaktif yang beragam seperti vitamin C, vitamin E, karoten, xantofil, tanin, dan senyawa fenolik seperti geraniin, asam elagik, quercetin, corilagin, dan rutin. Selain itu, rambutan memiliki berbagai aktivitas biologis yang luas, termasuk sifat antioksidan, antikanker, antivirus, antidiabetes, dan antihiperkolesterolemia. Beberapa senyawa antioksidan, seperti asam askorbat (vitamin C), asam elagik, dan quercetin diketahui memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim tirosinase. Mereka bekerja dengan mengurangi oksidasi tirosin menjadi melanin, sehingga dapat mengurangi atau mencegah hiperpigmentasi (3).

Jamur endofit hidup pada tanaman secara internal tanpa merusak tanaman inangnya, bersimbiosis dan berbagi kesamaan secara genetik. Jamur endofit memiliki kemampuan untuk menghasilkan metabolit sekunder yang sama bahkan berbeda dari tanaman inangnya yang seringkali memberikan aktivitas biologi yang menarik. Eksplorasi jamur endofit untuk inhibisi xantin oksidase (XO) adalah area yang masih baru dengan data awal yang sangat terbatas. Banyaknya laporan yang menyebutkan potensi dari jamur endofit sebagai XO inhibitor membuatnya menjadi sumber produk alami yang relatif andal yang dapat menghambat XO sebagai obat antihiperurisemik (4)

Fusaraside adalah cerebroside baru secara kimiawi yang berasal dari *Fusarium* sp. IFB-121, dapat menghambat XO dengan nilai IC₅₀ sebesar 43,8±3,6 µm. Selain Fusaraside, cerebroside yang sudah dikenal dan diisolasi dari *Fusarium* sp. juga telah menunjukkan aktivitas inhibisi XO dengan nilai IC₅₀ sebesar 55,5±1,8 µm. Selain itu, senyawa fenolik yang diisolasi dari *Chaetornium* sp. endofit yang berada di *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) telah menunjukkan aktivitas inhibisi XO dengan nilai IC₅₀ sebesar 109,8 µg/ml. Pada penelitian lainnya, dua senyawa baru, lasdiplakton menunjukkan inhibisi XO yang tinggi dengan IC₅₀ sebesar 0,35 ± 0,13µg/ml dan lasdiplakton asam IC₅₀ sebesar 0,41 ± 0,1µg/ml (5).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi jamur endofit dari kulit Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) diikuti dengan evaluasi potensi inhibisi terhadap enzim XO secara in vitro dengan metode microplate assay.

METODE

Pengambilan dan Identifikasi Sampel

Sampel kulit buah rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) diambil secara acak dari desa Buluh Rampai, kecamatan Seberida, kabupaten Indragiri Hulu, Provinsi Riau. Plastik zipper yang digunakan untuk tempat penyimpanan kulit buah rambutan disterilkan terlebih dahulu dengan lampu UV selama 15 menit, lalu cool box disterilkan dan bagian dalam cool box dilapisi dengan aluminium foil untuk tempat penyimpanan plastik zipper yang sudah berisi kulit buah rambutan. Selanjutnya sampel kulit buah rambutan dikumpulkan sebanyak 100 g, kemudian kulit buah rambutan dimasukkan ke dalam plastik zipper yang sudah disterilkan, lalu dimasukkan ke dalam cool box (6).

Sterilisasi Permukaan/Surface – Sterillization

Sterilisasi permukaan jaringan dilakukan seperti yang dijelaskan oleh Silva-Hughes dkk, (2015). Sampel dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan debu, kotoran, serta jamur epifit yang terdapat pada kulit buah rambutan, lalu dicuci dengan air suling steril, setelah itu direndam dengan etanol 70% selama 1 menit, lalu di cuci dengan air suling steril, dilanjutkan perendaman dengan NaOCl 2,5% selama 3 menit, terakhir dicuci dengan air suling steril sebanyak 3 kali. Air bilasan terakhir dipindahkan ke cawan Petri yang berisi media PDA sebagai kontrol negative (7).

Penyiapan Media PDA (Potato Dextrosa Agar)

Serbuk PDA (Potato Dextrosa Agar) (Merck Millipore) ditimbang sebanyak 39 g dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 1000 ml, kemudian ditambahkan 1 liter aquades. Media dipanaskan hingga mendidih pada hotplate dan diaduk menggunakan stirrer. Media PDA yang sudah mendidih kemudian disterilisasi dengan autoklaf suhu 121 °C selama 15 menit. Selanjutnya

penambahan antibiotik menggunakan kloramfenikol sebanyak 0,0035 mg agar bakteri tidak tumbuh pada media PDA (8).

Isolasi Jamur Endofit

Isolasi jamur endofit dilakukan dengan metode tanam, cara pengerjaannya kulit buah rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) yang sudah disterilkan, kemudian dipotong kecil-kecil (1 x 1 cm), setelah itu ditempatkan dalam cawan Petri yang sudah berisi media PDA (Potato Dextrosa Agar). Diinokulasi sampel di atas cawan Petri dan dilakukan triplo, tiap cawan berisi 4 potongan sampel. Selama pekerjaan dilakukan di dalam laminar air flow (LAF), kemudian diinkubasi selama 2-14 hari pada suhu 22°C. Isolat jamur endofit yang diperoleh dipindahkan ke media PDA (Potato Dextrosa Agar) yang baru (7).

Permurnian Isolat Jamur Endofit

Jamur yang telah tumbuh pada media PDA, kemudian secara bertahap dimurnikan satu per satu. Masing-masing isolat jamur yang sudah tumbuh diambil koloni yang terdapat pada permukaan media dengan jarum ose dan dipindahkan ke media PDA yang baru untuk ditumbuhkan kembali. Pemurnian ini bertujuan untuk mendapatkan satu jenis jamur yang murni, bila masih ditemukan pertumbuhan koloni yang berbeda pada pengamatan secara makroskopis maka harus dipisahkan kembali hingga diperoleh isolat murni. Jamur diinkubasi pada suhu kamar selama 3-5 hari (7).

Kultivasi Isolat Jamur Endofit

Isolat jamur yang telah murni dikultivasi dalam media PDA pada cawan Petri. Jamur dipotong dengan ukuran (1x1 cm), lalu diletakkan/dikultivasi di tengah-tengah cawan Petri sebanyak 20 buah dan diinkubasi selama 15-30 hari pada suhu 25-27 °C, diamati pertumbuhannya (9).

Ekstraksi

Isolat jamur yang telah dikultivasi dipotong ukuran kecil dipindahkan ke dalam Erlenmeyer 500 mL, lalu diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1, direndam selama 3 hari pada suhu ruangan, kemudian hasil maserasi disaring, setelah itu pelarut diuapkan menggunakan alat rotary evaporator sampai didapatkan ekstrak kental (9).

Uji Aktivitas Inhibitor Enzim Xantin Oksidase

a. Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak etil asetat jamur endofit dari kulit buah rambutan ditimbang 20 mg, lalu dilarutkan dengan 1 mL DMSO sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak 20.000 µg/mL. Serbuk allopurinol ditimbang sebanyak 10 mg, lalu dilarutkan dengan 1 mL DMSO sehingga didapatkan konsentrasi allopurinol 10.000 µg/mL. Buffer Fosfat (pH 7,5) ditimbang 2,7598 g NaH₂PO₄ (A) dan 7,12 g NaH₂PO₄ (B). Larutkan NaH₂PO₄ (A) dalam 100 mL aquadest dan larutkan NaH₂PO₄ (B) dalam 100 mL Aquadest. Pipet 13 mL dari larutan A dan 174 mL dari larutan B dicukupkan dengan aquades sampai 200 mL. Substrat xantin ditimbang 6,0844 mg (Sigma Aldrich), larutan substrat segar yang mengandung 0,4 mM xantin. Dicukupkan 100 mL dengan buffer fosfat (pH 7,5) (10). Untuk mendapatkan 0,1 unit/mL enzim xantin oksidase (Bovine Milk), ditimbang 0,90875 (11).

b. Metode Mikroplat Spektrofotometri

Pengujian aktivitas xantin oksidase dilakukan pada sampel uji ekstrak etil asetat jamur endofit kulit buah rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) dengan perbandingan allopurinol. Pengujian dilakukan menggunakan microplate 96-well dan absorban diukur dengan microplate reader (BioRad Xmark). Ekstrak disiapkan dengan konsentrasi akhir 125; 62,5; 31,25; 15,62; dan 7,81 ppm. Untuk perbandingan digunakan Allopurinol dengan konsentrasi akhir 3; 2; 1; 0,5; dan 0,25 ppm. Sampel dipipet 20 µL ke dalam microplate 96 well dibuat triplo dan ditambah 1 lubang untuk kontrol 1 masing-masing sampel tanpa penambahan enzim. Kemudian ditambahkan buffer fosfat 90 µl dan dilanjutkan dengan penambahan larutan enzim 30 µl (0,1 U/ml dalam buffer fosfat). Kemudian dibuat juga kontrol 2 tanpa penambahan sampel untuk mengetahui absorban dari enzim. Setelah penambahan enzim, plate diinkubasi selama 15 menit pada suhu 25°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 60 µl substrat xantin diinkubasi selama 30 menit.

Kemudian diukur absorban dengan Microplate Reader dengan panjang gelombang 295 nm (12).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi jamur endofit kulit buah rambutan diperoleh dari buah rambutan yang diambil secara acak dari desa Buluh Rampai, kecamatan Seberida, kabupaten Indragiri Hulu, provinsi Riau. Pada penelitian ini sampel yang digunakan sebelumnya sudah dilakukan identifikasi tanaman di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) dengan nomor surat 587/K-ID/ANDA/II/2023. Isolat jamur endofit (**Gambar 1**) dengan kode isolat (BA1) memiliki ciri-ciri makroskopis warna koloni mula-mula putih lama-kelamaan menjadi hijau muda, miselium menyebar teratur, pertumbuhan koloni datar, tebal, seperti serabut halus.



Gambar 1. Isolat (BA1) Jamur Endofit dari Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.)

Pada pengujian aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase ekstrak etil asetat jamur endofit dari kulit buah rambutan dilakukan dengan berbagai seri konsentrasi yaitu 125; 62,5; 31,2; 15,6; dan 7,8 µg/mL. Sedangkan, kontrol positif allupurinol dilakukan dengan seri konsentrasi yaitu 3; 2; 1; 0,5 dan 0,25 µg/mL. Variasi konsentrasi dimaksudkan untuk melihat pada konsentrasi berapa mulai terjadi penghambatan aktivitas enzim (**Tabel 1.**).

Tabel 1. Hasil Pengujian Aktivitas Penghambatan Enzim Xantin Oksidase Ekstrak Jamur Endofit dari Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.)

| Sampel | Konsentrasi (µg/ml) | Absorban Blanko | Absorban Sampel | % Inhibisi | IC ₅₀ |
|--------------------------|---------------------|-----------------|---|------------|------------------|
| Ekstrak Jamur Endofit | 125 | 0,792 | 0,375 ± 0,031 | 52,694% | 116 µg/ml |
| | 62,5 | | 0,533 ± 0,016 | 32,660% | |
| | 31,2 | | 0,735 ± 0,031 | 7,239% | |
| | 15,6 | | 0,763 ± 0,020 | 3,620% | |
| | 7,8 | | 0,769 ± 0,020 | 2,946% | |
| Persamaan regresi linear | | | Y= 0,0045x - 0,022 R ² = 0,963 | | |
| Allupurinol | 3 | 0,792 | 0,299 ± 0,032 | 62,25% | 2,57 µg/ml |
| | 2 | | 0,530 ± 0,011 | 33,12% | |
| | 1 | | 0,594 ± 0,012 | 25,00% | |
| | 0,5 | | 0,616 ± 0,036 | 22,18% | |
| | 0,25 | | 0,630 ± 0,023 | 20,41% | |
| Persamaan regresi linear | | | y = 0,1427x + 0,1333 R ² = 0,8862 | | |

Prinsip dari pengukuran aktivitas penghambat xantin oksidase adalah mengukur jumlah asam urat yang terbentuk pada reaksi yang dikatalis oleh xantin oksidase (13). Allopurinol

berperan sebagai inhibitor kompetitif yang memiliki struktur menyerupai substrat. Inhibitor kompetitif akan berkompetisi dengan substrat xantin untuk menempati sisi aktif enzim yang akan mengakibatkan aktivitas enzim menurun atau berhenti, sehingga produk berupa asam urat tidak terbentuk (14). Pemberian allopurinol sebagai inhibitor xantin oksidase akan menyebabkan kadar asam urat menurun (15). Pada inhibitor nonkompetitif tidak ada kemiripan struktur antara substrat dengan inhibitor, namun efek penghambatan terjadi karena inhibitor berikatan dengan sisi alosterik enzim, sehingga mengubah bentuk sisi aktif enzim (16).

Hasil uji aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase oleh ekstrak etil asetat jamur endofit dari kulit buah rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) dapat diketahui bahwa ekstrak tersebut mempunyai potensi dalam menghambat aktivitas enzim xantin oksidase. Dengan isolasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak tersebut bisa saja dapat memberikan aktivitas yang lebih kuat dari pada ekstraknya yang diketahui memiliki berbagai macam komponen senyawa metabolit sekunder didalamnya

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa Ekstrak etil asetat jamur endofit dari kulit buah rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) memiliki aktivitas dalam penghambatan enzim xantin oksidase dan nilai IC_{50} pengujian aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase ekstrak etil asetat jamur endofit dari kulit buah rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) yaitu sebesar 116 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian lanjutan diperlukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa aktif spesifik dalam ekstrak jamur endofit ini dan memahami mekanisme kerjanya

DAFTAR PUSTAKA

- Borges, F., Fernandes, E., & Roleira, F. (2002). Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 9(2), 195-217.
- Kumar, R., Darpan, Sharma, S., & Singh, R. (2011). Xanthine oxidase inhibitors: a patent survey. *Expert opinion on therapeutic patents*, 21(7), 1071-1108.
- Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2440-2475.
- Batchu, U. R., & Surapaneni, J. R. (2018). Exploration of microorganisms as a potential source of xanthine oxidase inhibitors: an updated review.
- Kumar, S., Pagar, A. D., Ahmad, F., Dwibedi, V., Wani, A., Bharatam, P. V., ... & Singh, I. P. (2019). Xanthine oxidase inhibitors from an endophytic fungus *Lasiodiopodia pseudotheobromae*. *Bioorganic Chemistry*, 87, 851-856.
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH. (2012). Defning the Core Arabidopsis Thaliana Root Microbiome. *Nature* 488:86–90.
- Silva-Hughes, A. F., Wedge, D. E., Cantrell, C. L., Carvalho, C. R., Pan, Z., Moraes, R. M., & Rosa, L. H. (2015). Diversity and Antifungal Activity of the Endophytic Fungi Associated With the Native Medicinal Cactus *Opuntia Humifusa* (Cactaceae) From the United States. *Microbiological research*, 175, 67-77.
- Yastanto, Anang Juni. (2020). Karakteristik Pertumbuhan Jamur pada Media PDA dengan Metode Pour Plate. *Indonesian Journal of Laboratory* 2.1: 33-39.
- Handayani, D., Dwinatrana, K., & Rustini, R. (2022). Antibacterial Compound from Marine Sponge Derived Fungus *Aspergillus sydowii* DC08. *Rasayan J. Chem*, 15, 2485-2492.
- Kong, L. D., Cai, Y., Huang, W. W., Cheng, C. H. K., Tan, R. X. (2000). Inhibition of Xanthine Oxidase by Some Chinese Medicinal Plants Used to Treat Gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 199– 207.
- Puspitasari, A. (2018). Karakterisasi dan Identifikasi Kandungan Kimia Daun Salam Serta Uji Efek Penghambatan Enzim. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Abdulhafiz, F., Mohammed, A., Kayat, F., Bhaskar, M., Hamzah, Z., Podapati, S. K., & Reddy, L. V. (2020). Xanthine oxidase inhibitory activity, chemical composition, antioxidant properties and GC-MS Analysis of Keladi Candik (*Alocasia longiloba* Miq). *Molecules*, 25(11), 2658.

- Rina Yanti Eff, A., Rahayu, S. T., & Syachfitri, R. D. (2016). Uji Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase Secara In-Vitro Oleh Isolat 6, 4'-dihidroksi-4-Metoksibenzofenon-2-O-B-D Glukopiranosida (C₂₀H₂₂O₁₀) yang Diisolasi dari Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl). *Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(1), 1.
- Ahmad AR, (2012). Isolasi dan Elusidasi Struktur Antioksidan dan Penghambatan Enzim Xantin Oksidase Ekstrak Daun Peletekan (*Ruelia tuberosa* T), Tesis. Depok: Universitas Indonesia.
- Stryer L, (2000). Biosintesis Nukleotida, Dalam: Soebianto SZ, Setiadi E. *Biokimia*. 4(2). Terjemahan: Soewoto H. EGC. Jakarta: 756.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. 2008. *Fundamentals of Biochemistry*. Edisi 4. John Wiley and Sons. New York.