



9 772686 250000

e-ISSN : 2686-2506



Aktivitas Penghambatan Denaturasi Albumin dan Efek Anti-Inflamasi Campuran Ekstrak Herba Meniran, Daun Kelor, Daun Salam

Dian Ratih Laksmitawati*, Claudia Tiffani

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jl. Srengseng Sawah Jagakarsa, Jakarta

*Email korespondensi : dian.ratih@univpancasila.ac.id

(Submit 15/03/2019, Revisi 05/09/2019, Diterima 20/12/2019)

Abstrak

Kombinasi herbal dalam satu formula memiliki keuntungan antara lain sinergisitas efek. Daun salam, daun kelor dan herba meniran dilaporkan memiliki aktivitas anti-inflamasi, namun dalam bentuk kombinasinya belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan aktivitas anti-inflamasi dari meniran (*Phyllanthus niruri* L.), daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) dan daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp) dalam bentuk tunggal dan kombinasinya secara *in vitro* dan *in vivo*. Metode : Metode pengujian aktivitas antiinflamasi *in vitro* menggunakan metode penghambatan denaturasi albumin sedangkan uji *in vivo* menggunakan metode edema pada telapak kaki tikus putih jantan. Ketiga daun dari tanaman tersebut masing-masing dibuat ekstrak dengan maserasi etanol 70%. Sebagai sampel uji *in vitro*, dibuat 7 macam yaitu : ekstrak meniran (M) tunggal, ekstrak kelor (K), tunggal ekstrak salam (S) tunggal dan ekstrak kombinasi M:K:S dengan perbandingan = 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1, 1:1:2. Ekstrak dengan aktivitas antiinflamasi *in vitro* tertinggi akan diujikan secara *in vivo*. Hasil dari pengujian *in vitro* menunjukkan persen inhibisi denaturasi albumin tertinggi pada kombinasi meniran : kelor : salam (1:2:1) sebesar 60,04% ± 0,32 dan secara *in vivo* diperoleh persen penghambatan edema kaki tikus yang diinduksi karagenan sebesar 9,06%. Aktivitas penghambatan denaturasi albumin Na diklofenak sebagai kontrol adalah 84,06% dan secara *in vivo* sebesar 41,21%. Aktivitas anti-inflamasi *in vivo* ekstrak tunggal meniran sebesar 19,59%. Kombinasi ekstrak daun meniran, kelor dan salam dengan perbandingan 1:2:1 mempunyai aktivitas antiinflamasi melalui metode penghambatan denaturasi albumin yang cukup besar (60,04%), namun aktivitas penghambatan radang kaki tikus tidak sebaik *in vitro*nya (9,06%).

Kata kunci: anti-inflamasi, *Phyllanthus niruri*, *Moringa oleifera*, *Syzygium polyanthum*, denaturasi albumin

Outline

- Pendahuluan
- Metode
- Hasil dan Pembahasan
- Kesimpulan
- Daftar Pustaka

Pendahuluan

Inflamasi adalah respon protektif normal terhadap jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, zat kimia yang merusak atau zat-zat mikroorganisme. Inflamasi dicetuskan oleh pelepasan mediator kimiawi dari jaringan yang rusak dan migrasi sel yang kemudian akan menyebabkan serangkaian proses yang dimulai dari timbulnya *rubor* (kemerahan), panas (kalor), *dolor* (nyeri), pembengkakan (tumor), dan sampai terjadinya gangguan fungsi organ yang mengalami cedera (*functio laesa*). Beberapa penyakit didasari oleh inflamasi mulai dari penyakit yang tergolong ringan hingga penyakit yang tergolong berat. Obat-obatan anti-inflamasi terdiri dari dua golongan yaitu golongan steroid dan golongan Non-steroid. Penggunaan kedua golongan ini apabila dikonsumsi dalam jangka panjang dapat menyebabkan efek samping yang tidak diinginkan seperti gangguan pada lambung. Untuk mengatasi efek samping tersebut maka diperlukan pengobatan alternatif lain yang dapat mencegah terjadinya inflamasi sistemik. Salah satu pengobatan alternatif inflamasi yaitu dengan memanfaatkan tanaman herbal.

Beberapa penelitian telah dilakukan oleh beberapa peneliti untuk mengetahui aktivitas Daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.), daun kelor (*Moringa oleifera* L.) dan herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) baik secara *in vitro* maupun secara *in vivo*. Berdasarkan hasil penelitian terdahulu dari kombinasi ekstrak air daun salam dan daun sambiloto menunjukkan efek anti-inflamasi pada tikus edema dengan induksi karagenan¹. Ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) menunjukkan penghambatan volume edema kaki tikus yang diinduksi karagenan signifikan pada dosis 200 dan 500mg/kgBB². Sedangkan herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dilaporkan mempunyai aktivitas anti-inflamasi pada dosis 100,200,400 mg/kgbb signifikan dalam mengurangi inflamasi pada kaki tikus yang diinduksi karagenan 1%³. Pada paparan diatas diketahui bahwa ketiga tanaman yaitu herba meniran, daun kelor dan daun salam mempunyai khasiat inflamasi.

Dalam bentuk tunggal atau kombinasi dengan bahan lain kekuatan aktivitas anti-inflamasi dalam bentuk kombinasi dari ketiganya belum diketahui. Sediaan polih herbal yang berisi kombinasi herbal dalam satu bentuk sediaan memiliki beberapa keuntungan diantaranya menimbulkan efek saling sinergis mengurangi efek samping, dan memberi khasiat tambahan yang tidak dimiliki herbal lain. Untuk mengetahui kekuatan efek anti-inflamasi ketiga herbal tersebut maka pada penelitian ini akan dilakukan pengujian secara *in vitro* dengan metode penghambatan denaturasi albumin. Terhadap ekstrak tunggal dan kombinasi yang dibuat tiga kombinasi antara ekstrak herba meniran, daun kelor, dan daun salam sehingga aktivitas anti-inflamasi dapat diketahui. Ekstrak atau kombinasi ekstrak yang memiliki aktivitas anti-inflamasi terpilih selanjutnya akan diteruskan melalui uji *in vivo* dengan metode uji radang pada telapak kaki tikus yang diinduksi dengan menggunakan karagenan.

Metode

A. Bahan

Sampel : herba meniran (*Phyllanthus niruri*), daun kelor (*Moringa oleifera* L.), dan daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang diperoleh dari Balitro Pascapanen Bogor dan dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, LIPI Cibinong, Jawa Barat. Serbuk sampel diekstraksi menggunakan etanol 70%.

Bahan kimia untuk uji *in vitro*: Bovine Serum Albumin (BSA) Sigma Aldrich, Tris base, Tris buffer saline, Natrium diklofenak, dimetilsulfoksida (DMSO), aquadest

Bahan untuk uji *in vivo*: karagenan dan hewan coba yaitu tikus putih jantan (galur *Sprague Dawley*) yang diperoleh dari Laboratorium Ruminansia dan Satwa Harapan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor (IPB), berat 150-200 gram usia 2-3 bulan sebanyak 25 ekor diadaptasikan didalam lingkungan Laboratorium Farmakologi & Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Pancasila selama 1 minggu. Selama adaptasi, tikus diberi pakan dan minuman standar ad libitum.

B. Metode

1. Persiapan Sampel

2. Pembuatan Perbandingan Kombinasi Ekstrak Meniran:Kelor:Salam

Dibuat perbandingan ekstrak Meniran:Kelor:Salam (M:K:S) dengan konsentrasi akhir 300 bpj, sebagai berikut : sampel 1 M:K:S = 1:0:0 ; sampel 2 M:K:S = 0:1:0; Sampel 3 M:K:S = 0:0:1; sampel 4 M:K:S = 1:1:1; sampel 5 M:K:S = 2:1:1; sampel 6 M:K:S = 1:2:1; sampel 7 M:K:S = 1:1:2 .

3. Pengujian Aktivitas Anti-inflamasi *in vitro* ⁴

Sebanyak 500 µl dari larutan sampel 1-7/larutan kontrol positif Na diklofenak masing-masing dengan konsentrasi 300 bpj ditambahkan larutan BSA 0,15% dalam Tris *Buffer Saline* (TBS) ad 5 mL dan di inkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit. Campuran kemudian dipanaskan selama 5 menit pada suhu 70°C kemudian didinginkan dengan cara di rendam dalam wadah berisi air kurang lebih 10 menit. Setelah dingin larutan divortex dan dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan instrument spektrofotometer *UV-visible* pada panjang gelombang 660 nm. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Persentase penghambatan denaturasi protein diukur dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi larutan uji}}{\text{absorbansi kontrol negatif}} \times 100\%$$

4. Pengujian aktivitas anti-inflamasi *in vivo*

Sebanyak 25 ekor tikus diambil secara acak dan dibagi menjadi empat kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor.

Kelompok 1 : tikus normal tanpa perlakuan

Kelompok 2 : tikus kontrol (-) tanpa pengobatan namun diberi perlakuan induksi edema

Kelompok 3 : tikus kontrol (+)natrium diklofenak dosis 9mg/kgBB dan diinduksi edema

Kelompok 4 : tikus yang diberi sampel ekstrak kombinasi terpilih (yang mempunyai persentase inhibisi denaturasi albumin tertinggi) dosis 200mg/kgBB kemudian diinduksi edema

Semua kelompok diberikan perlakuan sediaan uji per oral natrium diklofenak dosis 9mg/kgBB atau sampel ekstrak terpilih dosis 200mg/kgBB atau CMC Na 0,05%. Tiga puluh menit setelah pemberian sediaan uji, telapak kaki tikus masing-masing kelompok kecuali pada kelompok normal, disuntikkan karagenan 1% secara subplantar. Kemudian volume pembengkakan telapak kaki tikus diukur menggunakan alat pletismometer pada jam ke-1, 2, 3, 4 dan 5 terhitung setelah penginduksian karagenan

1%. Persentase penghambatan edema ditetapkan melalui perhitungan Daerah di bawah Kurva (DDK) dan dengan rumus :

$$DDK_{0-5} = \frac{(v_n - 1 + v_n)(t_n - t_{n-1})}{2} \quad (1)$$

Keterangan :

DDK_{0-5} = DDK dari jam ke-0 sampai jam ke-5 (mL.jam)

V_n = volume kaki tikus pada jam ke-n (mL)

V_{n-1} = volume kaki tikus pada jam ke-(n-1) (mL)

t_n = jam ke-n

t_{n-1} = jam ke-(n-1) (jam)

Persentase penghambatan edema = $\frac{(k^-) - (k^+)}{k} \times 100\%$

Hasil dan Pembahasan

A. Hasil

1. Penghambatan Denaturasi Albumin

Berdasarkan hasil uji aktivitas anti-inflamasi secara *in vitro* menggunakan metode denaturasi albumin pada kondisi optimum pH 5,8 dengan waktu inkubasi 5 menit didapatkan hasil ekstrak tunggal herba meniran, daun kelor, daun salam memiliki rata-rata persen penghambatan denaturasi albumin sebesar berturut-turut 34.13%, 43.44% dan 40.70%. Ekstrak kombinasi M:K:S 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1, 1:1:2 memberikan hambatan denaturasi albumin sebesar berturut-turut 47.19%, 43.02%, 60.04%, 59.73%, sedangkan hambatan denaturasi oleh natrium diklofenak adalah 84,06%. Berdasarkan hasil persen penghambatan dari ketujuh perbandingan didapatkan hasil M:K:S ke-6 memiliki aktivitas anti-inflamasi secara denaturasi albumin tertinggi maka M:K:S ke-6 merupakan kombinasi terpilih yang akan dilanjutkan uji *in vivo*. Hasil Uji penghambatan denaturasi albumin dapat dilihat pada Tabel 1.

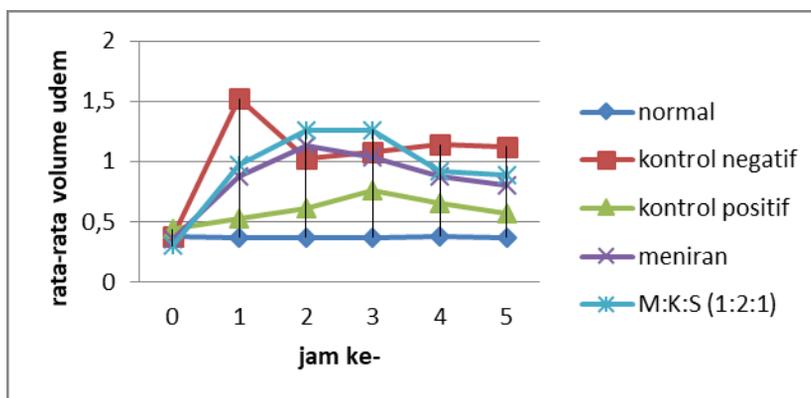
Tabel 1. Persentase Penghambatan Denaturasi Albumin

Kelompok @ konsentrasi 300 bpj	rata-rata % inhibisi
kontrol negatif	0,00
Natrium Diklofenak	84,06 ± 0,15
M:K:S = 1:0:0	34,13 ± 0,65 ^a
M:K:S = 0:1:0	43,44 ± 0,61 ^b
M:K:S = 0:0:1	40,70 ± 0,26 ^c
M:K:S = 1:1:1	47.19 ± 0,24 ^d
M:K:S = 2:1:1	43.02 ± 1,11 ^b
M:K:S = 1:2:1	60,04 ± 0,32 ^e
M:K:S = 1:1:2	59,73 ± 0,45 ^e

2. Penghambatan Edema Kaki Tikus

Gambar 1, memperlihatkan profil volume edema kaki tikus percobaan. Profil edema kaki tikus dengan zat penginduksi karagenan dapat dilihat pada kelompok kontrol negatif, yaitu kelompok tanpa pemberian zat uji. Dari Gambar 1 terlihat bahwa pada jam ke-1 setelah diinduksi karagenan 1% secara subplantar volume kaki tikus mengalami pembengkakan, kemudian pada jam ke-2 mengalami penurunan dan kembali meningkat pada jam ke-3 yang merupakan respon bengkak akibat induksi karagenan. Volume kaki tikus mulai mengalami penurunan pada jam ke-4.

Penetapan persentase penghambatan edema dilakukan melalui perhitungan nilai rata-rata Daerah Di bawah Kurva dari jam ke 0 sampai ke 5 (DDK_{0-5}) dan di dapatkan hasil seperti pada Tabel 2.



Gambar 1. Kurva hubungan antara rata-rata volume kaki tikus terhadap waktu

Tabel 2. Persen penghambatan edema

Kelompok	Rata-rata DDK_{0-5} (mL.jam)	% penghambatan edema
Normal	0.36±0,06	-
Kontrol negatif	5,63±0,57	0,00 ^a
Kontrol Positif (Na. Diklofenak) 100 mg/kgBB	3,31±1,15	41,21 ^b
Ekstrak Meniran 200 mg/kgBB	4,53±0,61	19,54 ^c
Ekstrak M:K:S (1:2:1) 200 mg/kgBB	5,12±0,5	9,06 ^{ac}

Keterangan : Huruf superskrip yang berbeda menandakan perbedaan bermakna (p 0,05%, Anova, LSD)

Berdasarkan hasil perhitungan persen penghambatan edema didapatkan hasil pada kelompok kontrol positif memiliki daya hambat sebesar 41,21%, pada ekstrak tunggal meniran memiliki daya hambat sebesar 19,54% lebih besar dibandingkan dengan ekstrak M:K:S dengan komposisi 1:2:1 sebesar 9,06%.

B. Pembahasan

Lebih dari 70% populasi dunia mengandalkan pengobatan herbal sebagai bagian dari perawatan kesehatan yang utama. Di berbagai wilayah dan budaya yang berbeda, produk herbal digunakan dalam bentuk tunggal, kombinasi herbal dengan herbal dan kombinasi herbal dengan obat (36) sehingga pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas anti-inflamasi antara herba meniran, daun kelor dan daun salam baik dalam bentuk tunggal maupun yang dikombinasi secara *in vitro* dan *in vivo*. Metode *in vitro* dimaksudkan untuk skrining kombinasi ekstrak yang memiliki aktivitas penghambatan denaturasi albumin paling tinggi. Ekstrak dengan nilai penghambatan denaturasi albumin tertinggi akan diujikan secara *in vivo* menggunakan metode induksi edema kaki tikus oleh karagenan.

Metode penghambatan denaturasi albumin dapat digunakan skrining aktivitas anti-inflamasi sebelum dilakukan uji anti-inflamasi menggunakan hewan coba seperti pada penelitian oleh LAD Williams (2008)⁴. Ketika BSA dipanaskan maka akan terdenaturasi.

Denaturasi albumin bertindak sebagai antigen yang terlibat pada reaksi imun seperti hypersensitive tipe III, serum sickness, glomerulonephritis, arthritis rematoid, lupus eritematosus yang merupakan penyakit autoimun berbasis inflamasi. Suatu agen yang dapat menghambat denaturasi albumin atau menstabilkan albumin > 20% maka dapat dipertimbangkan mempunyai sifat anti-inflamasi dan dapat dilanjutkan pada pengujian anti-inflamasi lanjutan⁴⁻⁶. Dari ke 7 kombinasi ekstrak yang terdiri dari 3 varian ekstrak tunggal dan 4 varian kombinasi kesemuanya menunjukkan penghambatan denaturasi albumin berkisar antara $34,13 \pm 0,65$ % sampai dengan $60,04 \pm 0,32$ % (ekstrak kombinasi M:K:S = 1:1:2), sementara penghambatan denaturasi albumin Na diklofenak adalah $84,06 \pm 0,15$ %.

Ekstrak yang terpilih yaitu ekstrak kombinasi M:K:S = 1:1:2, diuji secara *invivo* kepada tikus yang diinduksi edema pada telapak kaki belakangnya dengan karagenan. Hasil menunjukkan bahwa persentase penghambatan edema kombinasi ekstrak tersebut termasuk bernilai rendah yaitu hanya 9,06% dan tidak signifikan dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberikan terapi. Beberapa kemungkinan penyebab tidak liniernya hasil percobaan *in vitro* dan *in vivo* adalah adanya hambatan farmakokinetika ekstrak bila diberikan secara *in vivo* meliputi absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi yang tidak didapatkan ketika melakukan pengujian *in vitro*. Kemungkinan lain adalah karena tidak spesifiknya uji penghambatan denaturasi albumin. Williams menuliskan bahwa suatu senyawa yang mempunyai potensi penghambatan denaturasi albumin dapat dimasukkan ke dalam senyawa yang memiliki aktivitas biologi seperti antioksidan, antioksidan, anticancer, imunomodulasi dan lainnya⁴, tidak hanya sebagai anti-inflamasi.

Kesimpulan

Ekstrak herba meniran, daun kelor dan daun salam dalam bentuk tunggal dan kombinasinya mempunyai kemampuan menghambat denaturasi albumin lebih dari 20%. Ekstrak yang mempunyai kemampuan penghambatan denaturasi albumin tertinggi (60,04%) adalah ekstrak M:K:S = 1:1:2. Namun kombinasi ini hanya mampu menghambat edema kaki tikus sebesar 9,06%.

Daftar Pustaka

1. Mustafa RH, Hadisoewignyo L, Ervina M, Soegianto L. Optimizing Combination of Sambiloto Herbal Water Fraction and Salam Leaf Water Fraction As Anti-Inflammation.
2. Pal G, Singh GP, Garg R, Sharma SK. Anti-Inflammatory Evaluation of Leaf Extract of *Moringa Oleifera*. *J Pharm Sci Innov*. 2012;1(1):22–4.
3. Begum T, Hossain A, Tuhin RH, Sharma M, Sohanur Rahman M, Mostofa R, et al. Evaluation of anti-inflammatory and gastric anti-ulcer activity of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves in experimental rats. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1).
4. Williams LAD, O'Connar A, Latore L, Dennis O, Ringer S, Whittaker JA, et al. The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (Immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals. *West Indian Med J*. 2008;57(4):327–31.

5. Tatti PN, Anitha S, Shashidhara S, Deepak M, Bidari S. Evaluation of in-Vitro Anti-Denaturation Activity of Isolated Compound of Butea Monosperma Bark . *Pharma Sci Monit.* 2012;3(4):2314–20.
6. Bailey-shaw YA, Williams LAD, Green CE, Rodney S, Smith AM, Division D, et al. Research Article In-Vitro Evaluation of the Anti-Inflammatory Potential of Selected Jamaican Plant Extracts using the Bovine Serum Albumin Protein Denaturation Assay. 1. *Int J Pharm Sci.* 2017;47(27):145–53.