

Uji Aktivitas Penangkapan Radikal 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Ekstrak Kering Meniran (*Phyllanthus niruri* L)

2-2 Diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) Radical Scavenger Activity of Meniran (*Phyllanthus niruri* L) Dried Extract

Andayana Puspitasari Gani^{1*}, Retno Murwanti², Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri², Miftahus Sa'adah³

¹ Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

² Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

³ Departemen Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

Corresponding author: Andayana Puspitasari Gani; Email: andayana@ugm.ac.id

Submitted: 14-06-2021

Revised: 02-02-2022

Accepted: 03-02-2022

ABSTRAK

Meniran (*Phyllanthus niruri* L), adalah salah satu tanaman obat yang telah banyak digunakan dalam sediaan obat tradisional dengan indikasi meningkatkan daya tahan tubuh. Diduga terdapat hubungan yang kuat antara aktivitas antioksidan dan respon imun, terutama respon imun humoral yang diperantarai oleh aktivitas makrofag. Pembuatan ekstrak kering sebagai bahan baku sediaan obat tradisional berpotensi menimbulkan adanya perubahan aktivitas ekstrak dikarenakan adanya pemanasan pada prosesnya. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak kering meniran dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh proses pengeringan ekstrak terhadap kadar senyawa aktif dan aktivitas farmakologis, khususnya antioksidan. Kadar senyawa aktif dinyatakan dengan parameter kadar flavonoid total, sedangkan uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH, Hasil menunjukkan bahwa ekstrak kering meniran dengan kadar flavonoid total sebesar $0,79 \pm 0,06$ % EK, memiliki aktivitas penangkapan radikal DPPH dengan IC_{50} sebesar $74,28 \mu\text{g/mL}$. Proses pengeringan dan penambahan bahan pengisi pada ekstrak dapat berpengaruh pada aktivitas penangkapan radikal DPPH.

Kata kunci: Ekstrak, Meniran, Penangkapan radikal, DPPH

ABSTRACT

Meniran (*Phyllanthus niruri* L) has been widely used in traditional medicine with immunostimulant indications. It is suspected that there is correlation between antioxidant activity and immune response, especially the humoral immune response mediated by macrophage activity. The manufacture of dry extracts as raw materials for traditional medicine dosage forms has potency to cause changes in extract activity due to heating in the process. Therefore, the aim of this study is to measure the ability of meniran dried extract to scavenge DPPH radical. The results showed that the dry extract of meniran with total flavonoid content of $0.79 \pm 0.06\%$ EQ, had DPPH radical scavenging activity with IC_{50} of $74.28 \mu\text{g/mL}$. The drying process and the addition of fillers to the extract can affect the DPPH radical scavenging activity.

Keywords: Dried extract, Meniran, Radical Scavenge, DPPH

PENDAHULUAN

Penggunaan obat tradisional untuk menjaga kesehatan kembali meningkat di masa pandemi virus SARS COVID-19. Hal ini disebabkan karena salah satu upaya pencegahan yang dilakukan adalah dengan meningkatkan sistem imun tubuh dengan mengkonsumsi suplemen yang diantaranya berupa obat tradisional. Salah satu jenis tanaman yang banyak terkandung di dalam obat

tradisional dengan indikasi membantu meningkatkan daya tahan tubuh adalah herba meniran (*Phyllanthus niruri* L).

Herba meniran dapat berfungsi sebagai imunstimulan melalui mekanisme peningkatan respon imun seluler, terutama dengan mengaktifkan neutrophil, makrofag atau monosit, dan sel B dan T limfosit (Tjandrawinata *et al.*, 2017). Pada penelitian lain dilaporkan bahwa pemberian ekstrak herba meniran pada

mencit dapat meningkatkan respon imun baik spesifik maupun non-spesifik. Peningkatan respon imun non-spesifik dapat disebabkan karena adanya peningkatan fagositosis dan kemotaksis makrofag, kemotaksis neutrophil, sitotoksitas sel NK, serta aktivitas hemolisis komplemen sehingga terjadi peningkatan pada indeks fagositosis makrofag (Maat, 1986).

Makrofag merupakan bentuk pertahanan sistem imun pertama kali menghadapi patogen yang menyerang melalui fungsi fagositosis, mikrobisidal, dan tumorisidal, yang dilanjutkan dengan dilepaskannya beberapa jenis mediator. Salah satu jenis mediator yang dilepaskan tersebut adalah *reactive oxygen species* (ROS). Peningkatan kadar ROS akan berakibat pada perubahan keseimbangan antara oksidasi dan sistem antioksidan tubuh, yang menyebabkan produksi lipid peroksidasi (LPO) karena terjadinya kerusakan protein dan *deoxy nucleid acid* (DNA) akibat oksidasi (Victor, Rocha and De la Fuente, 2004; Pamok, Aengwanich and Komutrin, 2009). Keseimbangan produksi pro-oksidan dan pertahanan antioksidan adalah penting untuk fungsi sel. Gangguan dalam keseimbangan ini menyebabkan timbulnya stres oksidatif. Untuk mengatasi peningkatan kadar ROS berlebih maka diperlukan senyawa antioksidan yang dapat mengurangi stress oksidatif sehingga terjadi peningkatan imunitas (Knight, 2000; Pamok, Aengwanich and Komutrin, 2009; Yuan *et al.*, 2009). Hal ini menunjukkan adanya kaitan antara aktivitas imunostimulan dan antioksidan. Peningkatan aktivitas fagositosis sel makrofag memiliki efek samping berupa terbentuknya senyawa radikal bebas di dalam tubuh, yang mana senyawa tersebut tidak dapat membedakan antara agen asing dengan sel normal tubuh (Abbas, Lichtman and Pillai, 2012)

Del Rio dkk. (1998), menyebutkan bahwa senyawa antioksidan dapat berpengaruh terhadap tahapan fagositosis oleh sel makrofag. Senyawa α -tokoferol dan asam askorbat meningkatkan pelekatan makrofag pada substrat, migrasi acak pada kemotaksis, ingesti, dan meningkatkan produksi anion superoksida yang menggambarkan peningkatan aktivitas fagositosis. Laporan lain juga menyebutkan bahwa terdapat korelasi positif antara kemampuan penangkapan radikal bebas berkorelasi dengan aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* (Gani, 2016).

Berdasarkan data yang didapatkan dari <https://cekbpom.pom.go.id/>, terdapat lebih dari 40 produk obat tradisional dengan berbagai penandaan (jamu, obat herbal terstandar dan fitofarmaka) yang mengandung meniran dalam komposisinya. Sebagian besar produk-produk tersebut berbentuk kapsul, serbuk dan pil, dimana bentuk sediaan tersebut menggunakan ekstrak kering sebagai bahan bakunya. Ekstrak kering adalah ekstrak berbentuk kering yang diperoleh dari proses penguapan penyari ekstrak cair, dengan atau tanpa bahan tambahan, hingga memenuhi persyaratan yang ditetapkan (Departemen Kesehatan RI, 1986). Pada proses penguapan ekstrak dan penambahan bahan pengering untuk mendapatkan ekstrak kering diperlukan pemanasan yang dapat berpengaruh terhadap kandungan metabolit sekunder pada ekstrak.

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas penangkapan radikal DPPH terhadap ekstrak kering meniran untuk mengetahui efektivitas ekstrak sebagai antioksidan yang nantinya juga akan berpengaruh terhadap aktivitas imunstimulan ekstrak.

METODOLOGI

Bahan

Bahan utama berupa ekstrak kering meniran diperoleh dari PT. Jamu Borobudur, Semarang dengan pelarut ekstraksi etanol 70%, bahan pengering yang digunakan adalah maltodekstrin dengan rasio *botanical extract* 10:1 dan kadar *native extract* 90%. Kadar cemar mikroba dan logam berat telah memenuhi syarat BPOM, sedangkan nilai susut pengeringan sebesar 3,8 %.

Bahan uji berupa pereaksi 2,2-difenil-1-pikril hidrazil, aluminium klorida, natrium asetat, (Sigma-Aldrich), metanol dan etanol absolut (Merck).

Alat

Spektrofotometer Hitachi UH300 double beam, mikropipet (transferpette), seperangkat alat uji waktu alir dan alat gelas lain yang lazim.

Jalannya Penelitian

Karakterisasi ekstrak

Pengamatan organoleptik

Serbuk ekstrak diletakkan pada cawan petri diatas alas berwarna putih. Dilakukan pengamatan organoleptik meliputi bentuk,

warna, rasa dan konsistensi ekstrak.

Uji sifat alir

Kecepatan Alir (Voight, 1994)

Massa ekstrak sebanyak 100 gram ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam corong dan diratakan. Flowmeter dinyalakan, waktu yang diperlukan agar seluruh massa mengalir melalui corong dicatat. Kecepatan alir dinyatakan sebagai banyaknya gram serbuk yang melewati celah alat per detik.

Sudut Diam (Voight, 1994)

Massa ekstrak sebanyak 100 gram ditimbang, dimasukkan ke dalam corong hingga penuh, lalu diratakan. Penutup corong dibuka, massa yang jatuh akan membentuk kerucut. Tinggi (h) dan jari-jari (r) kerucut dicatat, kemudian dihitung sudut diamnya (angle of repose, α) dengan persamaan (1).

$$\tan \alpha = h / r \dots\dots\dots (1)$$

Bulk density dan tapped density (Voight, 1994)

Massa dimasukkan ke dalam gelas ukur hingga 100 ml, kemudian dicatat sebagai volume awal (V_0). Gelas ukur yang berisi massa tersebut dipasang pada alat tapping device. Alat dipasang pada ketukan sebanyak 100 kali. Dicatat volume serbuk pada saat permukaan serbuk tidak mengalami penurunan kembali setelah pengetapan (V_k). Berat serbuk ditimbang, densitas serbuk (D_0) dan densitas serbuk setelah mencapai keseimbangan (D_f) dihitung. Densitas adalah perbandingan massa dengan volume, selanjutnya indeks pengetapan/ Carr's index dihitung dengan persamaan (2).

$$\text{Carr's index (\%)} = (D_0 - D_f) / D_f \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

Profil kromatogram

Ditimbang 100 mg ekstrak kering dan ditambahkan campuran kloroform dan metanol 1:1 sebanyak 5 mL. Campuran divorteks selama 30 detik dan dilakukan sonikasi kurang lebih 10 menit. Campuran didiamkan beberapa saat hingga bagian yang tak larut mengendap. Diambil 2 ml bagian yang jernih untuk diuapkan. Setelah kering, ditambahkan metanol p.a sebanyak 100 μ L. Larutan sampel ditotolkan pada plat silika gel 60 F254 dengan system Fase

gerak : Heksan-etil asetat (5:5); Standar : Kuersetin; Deteksi : sinar UV 254 nm, 365 nm, pereaksi AlCl_3 5% .

Penetapan kadar flavonoid total

Kadar flavonoid total dalam ekstrak ditentukan dengan metode spektrofotometri menggunakan pereaksi aluminium klorida seperti yang dilakukan (Chang *et al.*, 2002). Diambil 0,1 mL larutan perbandingan kuersetin atau ekstrak, ditambahkan dengan 1,9 mL etanol, 0,1 mL larutan aluminium klorida 10% dalam air suling, 0,1 mL larutan natrium asetat 1 M (dibuat dengan cara melarutkan 8,2 g natrium asetat dalam air suling hingga 100 mL) dan 2,8 mL air suling. Larutan uji di vortex selama 10 detik, didiamkan selama 30 menit dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 430 nm.

Uji aktivitas penangkapan radikal

Penetapan Panjang gelombang maksimum

penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH dilakukan dengan cara sebanyak 1,0 mL DPPH 0,4 mM ditambah dengan metanol hingga volume 5,0 mL kemudian digojog hingga homogen. Larutan discan absorbansinya pada panjang gelombang 400-700 nm

Penetapan waktu operasional

Sebanyak 100 μ L senyawa uji direaksikan dengan campuran 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM. Selanjutnya ditambahkan metanol hingga volume 5,0 mL. Larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum diperoleh dari tahap sebelumnya

Penentuan *Inhibition Concentration* (IC) 50

Sebanyak 1,0 mL DPPH 0,4 mM dimasukkan ke dalam labu takar 5,0 mL, ditambah 100 μ L bahan uji dengan 4-5 seri konsentrasi seperti yang dijelaskan pada tahap pembuatan sampel, lalu ditambahkan metanol hingga volume 5,0 mL. Larutan didiamkan hingga waktu operasi tercapai. Absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang 495 nm. Dilakukan pula pembacaan absorbansi larutan blangko dan larutan kontrol warna. Absorbansi sampel didapatkan dari pengurangan absorbansi larutan uji dengan larutan kontrol. Penangkapan radikal (*Radical Scavenging*) dihitung dengan rumus:

Tabel I. Hasil Pengujian Sifat Alir

Hasil Pengujian Ekstrak kering Meniran	
Kecepatan Alir (g/detik)	19,96 ± 0,15
Sudut Diam (°)	39,33 ± 1,89
Carr's Index (%)	6,00 ± 0,00

$$\% \text{ penangkapan radikal} = \frac{\text{Abs. blanko} - (\text{abs. sampel} - \text{abs. kontrol})}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

(3)

Perhitungan *Inhibition Concentration* (IC)50

Hasil persentase penangkapan radikal DPPH untuk masing-masing konsentrasi larutan uji digunakan untuk pembuatan kurva plot antara konsentrasi versus % penangkapan radikal. Ditentukan persamaan regresi linier masing-masing larutan uji. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier $Y = bX + a$.

Berdasarkan persamaan (3) tersebut di atas, ditentukan nilai IC50 ekstrak yaitu konsentrasi dimana terjadi penghambatan radikal DPPH sebanyak 50 %.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi ekstrak

Pengamatan organoleptik

Ekstrak kering meniran berupa granul kasar berwarna hijau tua, dengan bau pahit.

Uji sifat alir

Pada awal pengujian, ekstrak meniran yang berbentuk campuran butiran kasar dan halus tidak dapat mengalir pada alat flowmeter. Untuk meningkatkan homogenitas dan kualitas sifat alir ekstrak meniran, dilakukan pengayakan dengan ayakan mesh 14. Data hasil pengujian sifat alir dapat dilihat pada Tabel I.

Berdasarkan hasil pengujian kecepatan alir dan sudut diam, ekstrak meniran tergolong memiliki sifat alir yang baik dengan kecepatan alir lebih dari 10 g/detik dan sudut diam kurang dari 40° (Tabel I). Dari nilai *Carr's index* ekstrak meniran tergolong dalam kategori *excellent*. Dalam hal ini ekstrak yang didapatkan setelah pengayakan telah memenuhi syarat untuk formulasi selanjutnya.

Profil kromatogram

Hasil pembuatan profil kromatogram ekstrak meniran gambar 1.

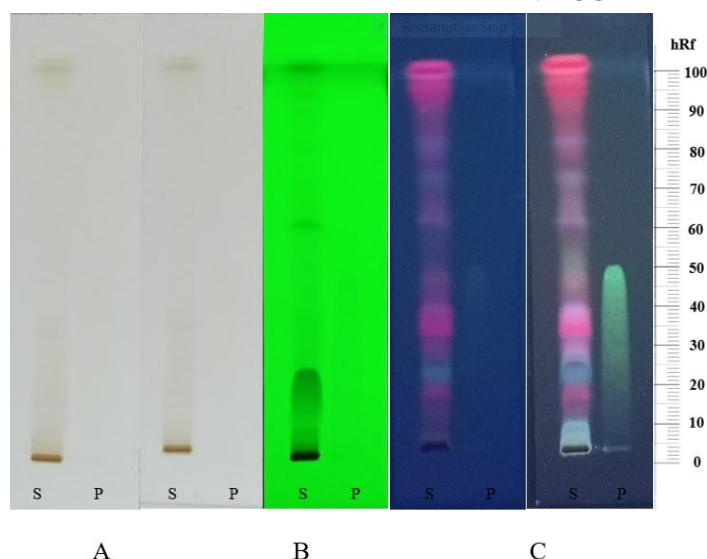
Dari Gambar 1 dan Tabel II, terlihat bahwa pada EMN tidak terdapat bercak yang memiliki Rf yang sama dengan kuersetin. Namun demikian, terdapat beberapa bercak yang memiliki karakteristik yang sama yaitu meredam pada sinar UV 254 dan berwarna kuning setelah disemprot dengan AlCl₃, dan berpendar dengan lebih intensif pada sinar UV 366 setelah disemprot. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam EMN terdapat senyawa golongan flavonoid meskipun bukan kuersetin. Oleh karena itu untuk karakterisasi secara kuantitatif, akan digunakan pengukuran kadar flavonoid total bukan penetapan kadar kuersetin.

Penetapan kadar flavonoid total

Dari pengukuran kadar flavonoid total didapatkan hasil persamaan kurva baku $Y = 0,0033x \pm 0,0169$.

Hasil dari tabel III menunjukkan bahwa kadar flavonoid total pada ekstran meniran adalah sebesar 0,79 ± 0,06 % EK (Ekuivalen Kuersetin). Hasil ini sepiantas terlihat tidak sesuai dengan yang dipersyaratkan oleh Farmakope Herbal Indonesia edisi II (Kementerian Kesehatan RI, 2017), dimana disebutkan bahwa ekstrak kental meniran mengandung flavonoid total tidak kurang dari 0,90% dihitung sebagai kuersetin. Hal ini disebabkan karena ekstrak kering yang digunakan pada penelitian ini mengandung bahan pengisi kurang lebih 10 %, sehingga apabila kemudian bahan pengering ini diperhitungkan, maka dalam *native extract* meniran yang digunakan pada penelitian ini mengandung flavonoid total sebesar 0,91 %, memenuhi persyaratan yang ditentukan.

memiliki Panjang gelombang maksimum di 516



Gambar 1. Profil kromatografi lapis tipis EMN sebelum dan sesudah disemprot AlCl₃ pada (A) sinar tampak, (B) sinar UV 254 nm, dan (C) sinar UV 366 nm

Keterangan : P = Pembanding (Kuersetin); S = Sampel ekstrak meniran; Fase gerak : Heksan-etil asetat (5:5) v/v

Tabel III. Perhitungan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Meniran

Sampel Ekstrak Meniran	Bobot sampel (mg)	Volume pelarut (mL)	Absorbansi	Kadar (% b/b)
1	262,5	10	0,434	0,72
2	303,5	10	0,585	0,83
3	303,4	10	0,572	0,82
Rerata =				0,79 ± 0,06

Tabel II. Nilai Rf Ekstrak Meniran

Senyawa	Rf	Sebelum disemprot AlCl ₃			Setelah disemprot AlCl ₃	
		Visible	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	Visible	UV ₃₆₆
Kuersetin	0,51	Kuning	Pemadaman	Hijau F.	Kuning	Kuning
	0,28			Hijau F.		
Ekstrak Meniran	0,51				Kuning	
	0,54			Merah muda F.		
	0,71	Hijau	Pemadaman	Merah muda F.	Hijau	Merah muda F.
	0,81	Hijau	Pemadaman	Merah muda F.	Hijau	Merah muda F.

Keterangan: F = Fluoresensi

Uji aktivitas penangkapan radikal

Penetapan Panjang gelombang maksimum Hasil penentuan Panjang gelombang maksimum DPPH ditunjukkan pada gambar 2.

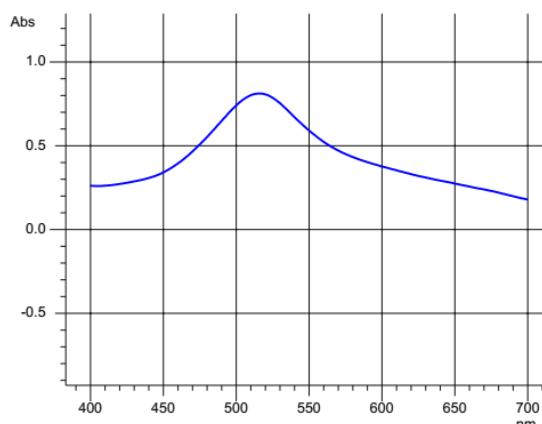
Berdasarkan gambar 2, terlihat bahwa DPPH yang digunakan pada penelitian ini

nm. Untuk selanjutnya pembacaan akan dilakukan pada Panjang gelombang ini.

Penetapan waktu operasional

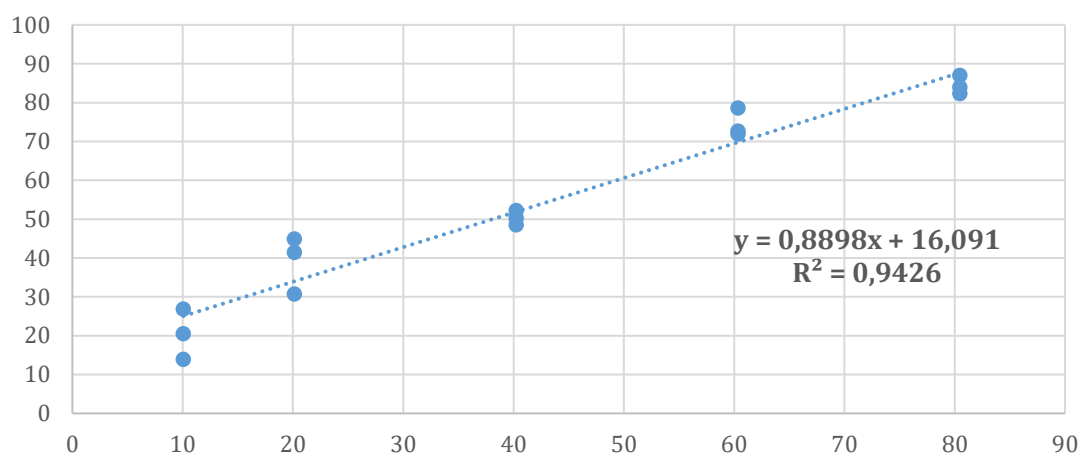
Hasil pembacaan absorbansi larutan sampel yang ditambahkan DPPH dari menit ke

Uji Aktivitas Penangkapan Radikal 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)



Gambar 2. Penentuan Panjang gelombang maksimum DPPH

Penangkapan Radikal DPPH oleh Ekstrak Kering Meniran



Gambar 3. Kurva hasil Uji Penangkapan Radikal DPPH oleh Ekstrak Meniran

30 hingga menit ke 60 menunjukkan tidak adanya perubahan. Hal ini menunjukkan bahwa untuk selanjutnya pembacaan sampel dapat dilakukan pada kurun waktu 30-60 menit setelah pencampuran sampel dan reagen.

Penentuan *Inhibition Concentration* (IC)₅₀

Hasil pengujian aktivitas penangkapan radikal DPPH oleh ekstrak meniran tercantum pada Gambar 3.

Berdasarkan gambar 3, didapatkan nilai IC₅₀ penangkapan radikal DPPH ekstrak meniran adalah sebesar 74,28 µg/mL. Hasil kurang bersesuaian dengan penelitian yang

dilakukan oleh Harish and Shivanandappa (2006) yang melaporkan bahwa ekstrak metanol daun meniran memiliki kemampuan menangkap radikal DPPH dengan IC₅₀ 9,1 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan jenis dan konsentrasi pelarut serta keberadaan bahan pengisi pada ekstrak berpengaruh besar terhadap kemampuan penangkapan radikal DPPH oleh ekstrak.

KESIMPULAN

Ekstrak kering meniran dengan kadar flavonoid total sebesar $0,79 \pm 0,06$ % EK, memiliki aktivitas penangkapan radikal DPPH dengan IC₅₀ sebesar 74,28 µg/mL. Proses

pengeringan dan penambahan bahan pengisi pada ekstrak dapat berpengaruh pada aktivitas penangkapan radikal DPPH.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Program Prioritas Riset Nasional (PRN) 2020 Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. (2012) *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- Chang, C. C. *et al.* (2002) 'Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods', *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), pp. 178-182.
- Del Rio, M. *et al.* (1998) 'Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro', *Life Sciences*, 63(10), pp. 871-881.
- Departemen Kesehatan RI (1986) *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia Jakarta.
- Gani, A. P. (2016) *Optimasi Ekstraksi dan Penelusuran Fraksi Aktif Herba Sambilo (Andrographis paniculata Nees.) dan Patikan Kebo (Euphorbia hirta L.): Studi In Vitro Efek Fagositosis Makrofag*. Disertation. Universitas Gadjah Mada.
- Harish, R. and Shivanandappa, T. (2006) 'Antioxidant activity and hepatoprotective potential of Phyllanthus niruri', *Food Chemistry*, 95(2), pp. 180-185.
- Kementerian Kesehatan RI, D. J. K. dan A. K. (2017) *Farmakope Herbal Indonesia*. II. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Knight, J. A. (2000) 'Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system', *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 30(2), pp. 145-158.
- Maat, S. (1986) *Phyllanthus niruri Linn sebagai Immunostimulator pada Mencit*. Disertation. Airlangga.
- Pamok, S., Aengwanich, W. and Komutrin, T. (2009) 'Adaptation to oxidative stress and impact of chronic oxidative stress on immunity in heat-stressed broilers', *Journal of Thermal Biology*, 34(7), pp. 353-357.
- Tjandrawinata, R. R. *et al.* (2017) 'The use of Phyllanthus niruri L. as an immunomodulator for the treatment of infectious diseases in clinical settings', *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(3), pp. 132-140.
- Victor, V. M., Rocha, M. and De la Fuente, M. (2004) 'Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis', *International Immunopharmacology*, 4(3), pp. 327-347.
- Voight, R. (1994) *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. V. Universitas Gadjah Mada Press.
- Yuan, C. *et al.* (2009) 'Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice', *Food chemistry*, 115(2), pp. 581-584.