

Trad. Med. J., September 2013
Vol. 18(3), p 151-156
ISSN : 1410-5918

Submitted : 07-07-2013
Revised : 09-08-2013
Accepted : 12-09-2013

ANTIINFLAMATORY ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACT OF *Mangifera casturi* IN THIOGLYCOLLATE-INDUCED LEUKOCYTE MIGRATION ON MICE

AKTIVITAS ANTIINFLAMASI EKSTRAK METANOLIK BUAH MANGGA KASTURI (*Mangifera casturi*) MELALUI PENGHAMBATAN MIGRASI LEUKOSIT PADA MENCIT YANG DIINDUKSI THIOGLIKOLAT

Nanang Fakhrudin^{*1,3}, Peni Susilowati Putri², Sutomo², Subagus Wahyuono^{1,3}

¹Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

²Department of Pharmacy, Faculty of Mathematic and Science, Universitas Lambung Mangkurat, Kalimantan Selatan, Indonesia.

³Center for Natural Anti-infective Research, Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

Kasturi (Mangifera casturi) is a plant originally from Kalimantan, mainly in South Kalimantan. Although there is no report regarding the usage of the fruit in traditional healings, current research demonstrate that methanolic extract of Mangifera casturi fruit demonstrated high antioxidant activity. As oxidant plays crucial role in inflammatory related diseases, we investigate the antiinflammatory effect of Mangifera casturi fruit methanolic extract. To assess the antiinflammatory activity, we used thioglycollate-induced leukocyte migration in mice. Male balb/c mice were pretreated (i.p) with Mangifera casturi fruit methanolic extract followed by thioglikolat (i.p) to induce leukocyte migration. After 4,5 hours, the mice were sacrificed and the number of leukocytes were counted using hemocytometer under light microscope. Our experiment indicates that Mangifera casturi fruit methanolic extract significantly exhibited antiinflammatory activity by inhibiting the migration of leukocytes induced by thioglycollate. However, the activity of the extracts was lower than the positive control, indomethacin. Further purification was required to obtain the active compound with the activity comparable to indomethacin. Thin layer chromatography (TLC) analysis demonstrates that the methanolic extract of Mangifera casturi fruit contains terpenoid and phenolic compounds.

Key word: Mangifera casturi, leukocyte migration, antiinflammation

ABSTRAK

Mangga kasturi (Mangifera casturi) adalah mangga khas Kalimantan Selatan. Buah mangga kasturi dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan dan potensial untuk pengobatan berbagai penyakit termasuk penyakit yang berhubungan dengan inflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antiinflamasi dari ekstrak metanol buah mangga kasturi melalui uji migrasi leukosit pada mencit yang diinduksi thioglikolat. Secara singkat, mencit diinduksi dengan thioglikolat untuk menaikkan jumlah leukosit, dan dihitung penghambatan migrasi leukosit oleh ekstrak metanolik buah mangga kasturi. Thioglikolat diberikan selama 4,5 jam (i.p.) sedangkan ekstrak metanolik buah mangga kasturi (i.p.) diberikan 30 menit sebelum pemberian thioglikolat. Keduanya diberikan secara injeksi intra peritoneal (i.p.). Penghitungan jumlah leukosit dilakukan menggunakan haemositometer dengan bantuan mikroskop. Jumlah leukosit pada kelompok normal, indometasin, ekstrak dosis 625; 125; dan 2,5 g/Kg BB berturut-turut adalah 38,24%; 11,28%; 65,24%; 19,72%; dan 7,18%. Analisis statistik dengan menggunakan uji post hoc multiple comparison Games Howell dengan tingkat kepercayaan 95% menunjukkan bahwa ekstrak metanolik buah mangga kasturi dosis 1250 dan 2500 mg/Kg BB mempunyai potensi antiinflamasi melalui penghambatan migrasi leukosit pada mencit yang diinduksi thioglikolat.

Corresponding author : Nanang Fakhrudin
E-mail : nanangf@ugm.ac.id

Aktivitas ekstrak metanolik buah mangga kasturi tersebut lebih lemah dibandingkan indometasin yang memberikan respon antiinflamasi yang sama pada dosis yang lebih kecil. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menunjukkan ekstrak metanolik buah mangga kasturi mengandung senyawa triterpenoid dan fenolik.

Kata kunci : Mangifera casturi, migrasi leukosit, antiinflamasi

PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan reaksi kompleks sistem imun nonspesifik yang melibatkan akumulasi dan aktivasi leukosit serta protein plasma di tempat infeksi. Inflamasi dapat disebabkan oleh pejanan zat pemicu inflamasi maupun kerusakan sel pada jaringan. Meskipun inflamasi bertujuan protektif dalam mengontrol infeksi dan memacu pertumbuhan jaringan, namun jika berlebihan dan tidak terkontrol dapat menimbulkan kerusakan dan mengakibatkan penyakit (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Reactive oxygen species (ROS), seperti anion superoksid (O_2^-), radikal hidroksil (OH), hidrogen peroksida (H_2O_2) memiliki peran penting dalam *oxidative stress* yang memicu banyak penyakit seperti kanker, anemia, inflamasi, kardiovaskuler, diabetes, penyakit degenerative, maupun iskemik. ROS dapat menginisiasi reaksi oksidatif yang berbahaya seperti, peroksidasi lipid, menghambat respirasi dari mitokondria, inaktivasi *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, menghambat potassium ATP-ase, dan inaktivasi kanal sodium pada membran. Menurut penelitian yang dilakukan Ravipati (2012), senyawa fenolik, flavonoid dan logam (Zn, Mg dan Se) memiliki fungsi sebagai antioksidan di dalam tubuh (Ravipati, 2012). Sejalan dengan penelitian tersebut, tingginya *oxidative stress* karena kurangnya antioksidan dalam tubuh memperparah status inflamasi pada paru-paru, termasuk asma (Morcillo, 2013).

Pada inflamasi yang disebabkan oleh cedera jaringan, membran sel yang cedera memicu pembentukan asam arakidonat yang selanjutnya diubah menjadi mediator inflamasi. Mediator inflamasi akan memicu terjadinya vasodilatasi pembuluh, sehingga volume darah meningkat di pembuluh tersebut dan rentan mengakibatkan perdarahan. Permeabilitas pembuluh yang meningkat, menyebabkan plasma darah mudah melewati dinding kapiler dan terjadilah edema. Beberapa jam kemudian, leukosit pada aliran darah menempel pada sel endotel dan bermigrasi menembus dinding pembuluh dan masuk ke rongga jaringan. Pada kondisi keadaan tubuh normal, hanya sebagian kecil molekul dapat melewati dinding pembuluh darah. Namun bila terjadi inflamasi, sel endotel teraktivasi sehingga semakin banyak molekul, termasuk leukosit yang dapat melewatinya.

Proses inflamasi diatur oleh mediator proinflamasi, maupun mediator antiinflamasi. Mediator proinflamasi menyebabkan inflamasi terus berlangsung, diantaranya IL- 1β , TNF- α , dan IFN- γ (Eming dkk., 2007), IL-6, IL-12, IL-18, TNF- β (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Sitokin ini menyebabkan meningkatnya ekspresi selektin E dan P pada permukaan sel endotel, yang nantinya akan berikatan dengan integrin pada permukaan neutrofil. Kemoatraktan juga mempengaruhi perekrutan leukosit ke jaringan inflamasi, seperti IL-8, *growth related oncogen- α* , dan *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1). (Eming dkk., 2007). NF- κ B mengontrol ekspresi gen yang mengkode sitokin pro-inflamasi, kemokin (IL-8, MIP-1 α , MCP-1, eotaxin), molekul adhesi (ICAM, VCAM, selektin E), menginduksi enzim (COX-2 dan iNOS), serta faktor pertumbuhan (Calixto dkk., 2003).

Proses penyembuhan inflamasi dapat dilakukan dengan menurunkan pelepasan molekul proinflamasi, meningkatkan pelepasan molekul antiinflamasi, penghentian kemoatraktan, apoptosis, dan *drainase lymphatic*. Respon inflamasi yang tidak berhenti, dapat disebabkan oleh tidak seimbangnnya aktivitas proteolitik. Pelepasan inhibitor protease leukosit memiliki aktivitas antiinflamasi. Pada inflamasi kronis, fungsi protease leukosit tidak terkontrol, sehingga inflamasi tidak dapat berhenti (Eming dkk., 2007).

Tujuan pemberian antiinflamasi adalah mencegah berkembangnya proses inflamasi menjadi inflamasi kronis dan agar proses inflamasi krosis tidak semakin parah yang mengakibatkan hilangnya fungsi jaringan. Inflamasi yang dibutuhkan oleh tubuh adalah yang cepat menghilangkan faktor pemicu, mencegah infeksi, cepat mengembalikan fungsi jaringan seperti semula, dan tidak berlebihan/dapat berhenti setelah rangsangan itu hilang (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Mangifera casturi yang juga berasal dari genus *Mangifera*, diduga memiliki efek antioksidan yang dimiliki *Mangifera indica* karena berasal dari satu genus. Uji pendahuluan dan fitokimia yang dilakukan Mustikasari dan Ariyani (2007) menyatakan bahwa batang pohon mangga kasturi mengandung senyawa terpenoid, steroid, dan saponin. Menurut Suhartono (2012), ekstrak air buah mangga kasturi mengandung total

flavonoid lebih banyak dari pada daun kelakai, batang gerunggang, maupun akar pasak bumi. Sutomo (2013^a) melaporkan bahwa ekstrak metanolik buah mangga kasturi, mengandung senyawa golongan terpenoid/streroid dan fenolik.

Pada proses inflamasi, makrofag melepaskan radikal bebas yang berfungsi merusak benda asing pemicu inflamasi agar bisa segera dibuang tetapi radikal bebas ini dapat juga berbahaya bagi jaringan tubuh, dan dapat menjadi faktor yang memperlama terjadinya inflamasi. Apabila radikal bebas yang terjadi pada proses inflamasi dapat dikurangi, maka bisa menjadi alternatif pengobatan antiinflamasi. Mangga kasturi yang telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, diduga mampu menekan proses inflamasi.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dapat dirumuskan beberapa rumusan permasalahan antara lain: 1) Apakah ekstrak metanolik buah mangga kasturi mempunyai aktivitas antiinflamasi melalui pendekatan penghambatan migrasi leukosit? 2) Senyawa apa yang ada di dalam ekstrak metanolik buah mangga kasturi?

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antiinflamasi ekstrak metanolik buah mangga kasturi dan mengidentifikasi kandungan senyawanya. Penelitian ini dapat menjadi landasan untuk penelitian-penelitian selanjutnya dalam rangka mencari obat bahan alam untuk antiinflamasi serta mendukung pengembangan potensi sumber daya alam Indonesia untuk pengobatan.

METODOLOGI

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: *Phosphat Buffer Saline (PBS)*, thioglikolat (E-Merck), indometasin (Sigma), NaCl (E-Merck), aquadest steril, tripan blue, DMSO (E-Merck), etanol teknis, kloroform (E-Merck), Aluminium foil, buah mangga kasturi, silica Gel F₂₅₄ (E-Merck), n-heksan (E-Merck), etil asetat (E-Meck), metanol (E-Merck), CeSO₄, anisaldehyd asam sulfat, dan FeCl₃. Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur Balb/C berumur 6-8 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi UGM.

Metode Penelitian

Preparasi simplisia buah mangga kasturi

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah kasturi (*Mangifera*

casturi Konsterm.) yang telah masak. Buah dipanen dari Kabupaten Martapura Provinsi Kalimantan Selatan. Buah kasturi diambil pada bulan November-Desember 2011. Buah yang akan diteliti dilakukan determinasi untuk memastikan kebenaran jenis tumbuhan tersebut. Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Daging buah kasturi bersama kulit buahnya diiris untuk dipisahkan dari bijinya selanjutnya dipotong-potong kecil dan dikeringkan pada suhu 50°C selama 3 hari di dalam oven. Simplisia kering lalu diserbukkan dengan menggunakan mesin penyerbuk untuk selanjutnya diekstraksi (Sutomo, 2013^a).

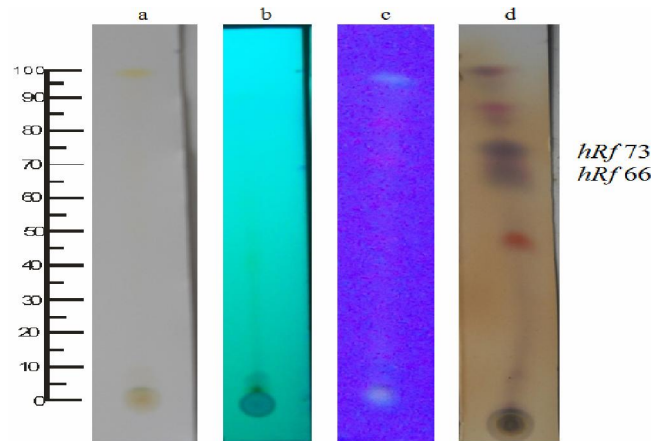
Ekstraksi buah mangga kasturi

Ekstrak metanolik dibuat dengan maserasi serbuk kering buah dan kulit *Mangifera casturi* menggunakan metanol sebanyak 3x masing-masing selama 24 jam. Ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental di pindahkan dalam cawan porselin dan sisa metanol diuapkan dengan suhu terkontrol hingga pelarut dinyatakan habis. Sebanyak 1 kg serbuk kering menghasilkan 379,5 gram ekstrak (rendemen ekstraksi sebesar 37,95%).

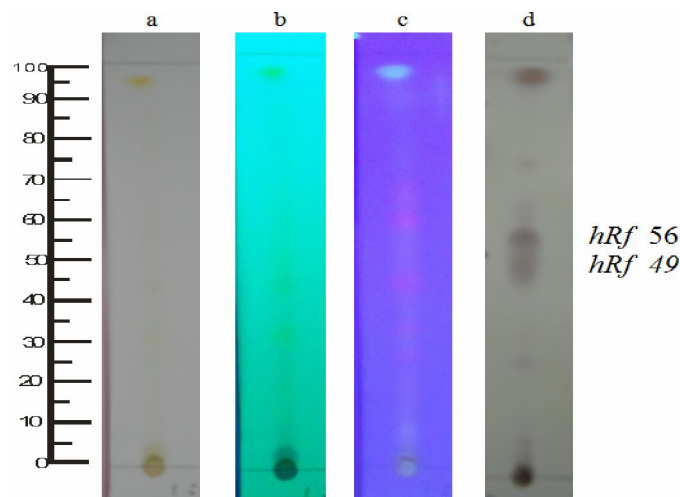
Sebanyak 35 mencit dibagi menjadi 7 kelompok perlakuan yang terdiri dari: kelompok normal (tanpa perlakuan), kelompok kontrol pelarut (DMSO 10%), kelompok thioglikolat, kelompok kontrol positif (indometasin), kelompok ekstrak dosis I, kelompok ekstrak dosis II dan kelompok ekstrak dosis III. Dosis yang digunakan berturut-turut adalah 0,625; 1,25; dan 2,5 gram/kg BB.

Uji aktivitas antiinflamasi

Uji antiinflamasi yang digunakan yaitu migrasi leukosit pada mencit yang diinduksi thioglikolat yang dimodifikasi Segal (2002). Pertama kali, mencit diinjeksi dengan ekstrak, pelarut, maupun indometasin sebanyak 1 mL secara i.p., diikuti pemberian 1 mL thioglikolat 4% secara i.p yang diberikan 30 menit setelah pemberian ekstrak, pelarut, maupun indometasin. Mencit dikorbankan 4,5 jam kemudian dengan menggunakan kloroform. Kulit perut dibuka kemudian disuntikkan 10 mL larutan PBS dingin secara perlahan menggunakan spuit injeksi. Perut mencit digoyang-goyang dengan tangan selama 3-5 menit, dan PBS diambil kembali menggunakan spuit.



Gambar 1. Hasil analisis KLT dari ekstrak metanolik buah mangga kasturi dengan fase diam silika gel F₂₅₄ fase gerak etil asetat:n-heksan (1:2) dan pereaksi semprot anisaldehyd- asam sulfat. Pengamatan pada a) sinar tampak; b) UV 254 nm; c) UV 366 nm; d) sinar tampak setelah disemprot anisaldehyd- asam sulfat dan dipanaskan.



Gambar 2. Hasil analisis KLT dari ekstrak metanolik buah mangga kasturi dengan fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak etil asetat:n-heksan (1:4) dan pereaksi semprot serum sulfat. Pengamatan pada a) sinar tampak; b) UV 254 nm; c) UV 366 nm; d) sinar tampak setelah disemprot serum sulfat dan dipanaskan.

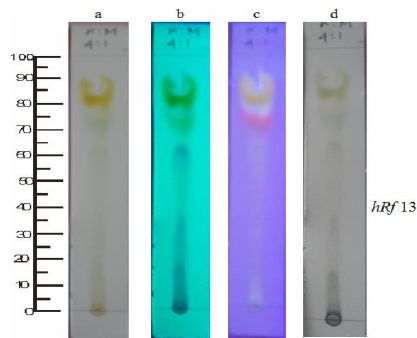
Suspensi sel dari rongga perut yang diperoleh diendapkan dengan alat sentrifuge (1200 rpm, 10 menit, 4°C) hingga terbentuk pelet sel. Supernatan dibuang dan peletnya diresuspensikan kembali dengan PBS 1 mL. Sel diwarnai dengan tripan *blue* dan jumlah sel leukosit dihitung menggunakan *haemositometer* dengan pengamatan di bawah mikroskop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

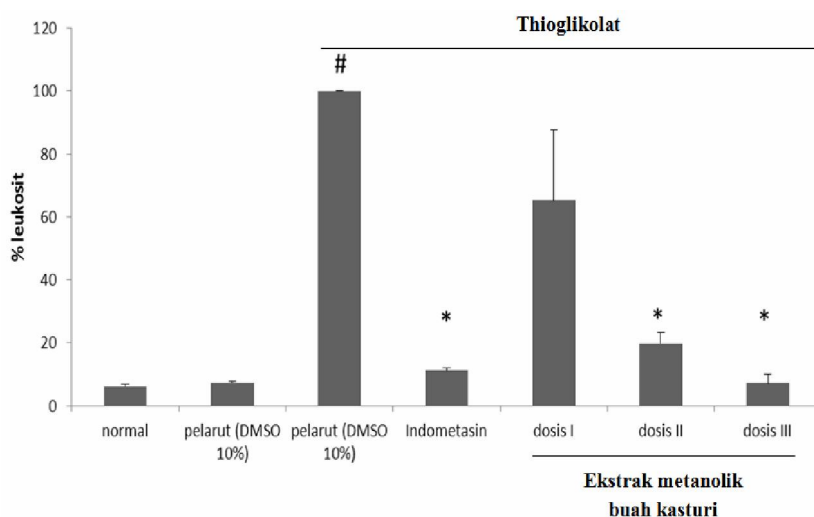
Analisis kandungan kimia ekstrak dengan teknik KLT

Deteksi kandungan metabolit sekunder pada ekstrak metanolik buah mangga kasturi dengan metode KLT menggunakan fase gerak etil asetat : n-heksan (1:2) setidaknya memberikan 5

bercak dengan warna masing-masing oranye, ungu, merah muda dan coklat pada deteksi dengan anisaldehyd asam sulfat (Gambar 1). Sebelum disemprot dengan anisaldehyd asam-sulfat, bercak tidak terdeteksi di pengamatan pada sinar tampak. Namun setelah disemprot dengan anisaldehyd asam sulfat muncul warna ungu yang menandakan adanya senyawa golongan triterpen. Deteksi pada KLT dengan fase gerak etil asetat:n-heksan (1:4) dan pereaksi semprot serum sulfat memberikan setidaknya 2 bercak warna coklat yang sebelum disemprot tidak terdeteksi pada pengamatan di sinar tampak (Gambar 3). Hal ini sekali lagi menunjukkan adanya senyawa golongan terpenoid. (Sutomo, 2013^a). Sebanyak 3 bercak disekitar *hRf* 13 yang bereaksi positif (warna biru



Gambar 4. Hasil uji aktivitas antiinflamasi dari ekstrak metanolik buah mangga kasturi pada mencit yang diinduksi thioglikolat. Indometasin 35,7 mg/kg BB, ekstrak metanolik buah mangga kasturi dosis I, II dan III berturut-turut 0,625; 1,25; dan 2,5 gram/kg BB. Tanda # menunjukkan signifikan dibandingkan dengan kelompok pelarut. Tanda * menunjukkan signifikan dibandingkan dengan kelompok thioglikolat.



Gambar 3. Hasil pengamatan KLT dari ekstrak metanolik buah mangga kasturi dengan fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak kloroform:metanol (4:1), dan pereaksi semprot FeCl₃. Pengamatan pada a) sinar tampak; b) UV 254 nm; c) UV 366 nm; d) sinar tampak setelah disemprot FeCl₃.

gelap) terhadap pereaksi FeCl₃, yang menunjukkan adanya senyawa fenolik ketika analisis KLT dilakukan dengan menggunakan fase gerak yang lebih non polar, yaitu kloroform : metanol (4:1) (Gambar 4). Walaupun bercak tersebut terlihat tailing, namun bisa terlihat bahwa bercak tersebut mengarah kepada kandungan senyawa fenolik.

Berdasarkan uji KLT yang dilakukan, ekstrak metanolik buah kasturi paling tidak mengandung senyawa triterpen dan fenolik. Berdasarkan identifikasi struktur pada penelitian lanjutan, senyawa triterpen yang terkandung adalah lupeol dan betasitosterol (Sutomo, 2013^b), sedangkan senyawa fenoliknya adalah metil galat (Sutomo, 2013^b).

Uji Aktivitas Antiinflamasi

Uji aktivitas antiinflamasi dilakukan menggunakan metode migrasi leukosit pada mencit yang diinduksi thioglikolat. Hasil uji ditampilkan dalam Gambar 4. Jumlah sel leukosit pada kelompok pelarut tidak berbeda signifikan dengan kelompok normal, sehingga pelarut yang digunakan tidak menyebabkan migrasi leukosit yang signifikan. Induksi migrasi sel leukosit dengan thioglikolat mampu menginduksi jumlah sel leukosit menjadi 16 kali lebih tinggi dibandingkan kelompok normal. Hal ini menunjukkan terjadinya inflamasi yang ditandai dengan migrasi leukosit akibat induksi thioglikolat. Pemberian indometasin (obat antiinflamasi) mampu menurunkan secara

signifikan jumlah sel leukosit menjadi setara dengan kelompok normal dan kelompok pelarut. Hasil ini menunjukkan bahwa model uji antiinflamasi ini berjalan dengan baik karena indometasin yang berfungsi sebagai kontrol positif mampu menurunkan migrasi leukosit secara signifikan.

Pemberian ekstrak metanolik buah mangga kasturi pada dosis I belum mampu menurunkan jumlah sel leukosit secara signifikan. Namun pada pemberian dosis II dan III mampu menurunkan jumlah sel leukosit. Pemberian ekstrak metanolik buah mangga kasturi pada dosis yang paling besar (dosis III) mampu menurunkan jumlah sel leukosit setara dengan indometasin, kelompok normal dan kelompok pelarut. Dengan demikian, ekstrak metanolik buah kasturi pada dosis II dan III mempunyai aktivitas antiinflamasi melalui penghambatan migrasi leukosit pada mencit yang diinduksi tioglikolat. Ekstrak ini potensial untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai sumber senyawa antiinflamasi yang potensial.

Ekstrak metanolik buah mangga kasturi (*Mangifera casturi*) pada dosis II (1,25 gram/kgBB) dan dosis III (2,5 gram/kgBB) memiliki aktivitas antiinflamasi melalui penghambatan migrasi leukosit pada mencit yang diinduksi tioglikolat.

Ekstrak metanolik buah mangga kasturi (*Mangifera casturi*) mengandung senyawa terpenoid dan fenolik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada DIKTI, yang telah membiayai penelitian ini melalui LPPM UGM dengan skema hibah kolaborasi dosen-mahasiswa dengan nomor kontrak LPPM-UGM/1261/LIT/2013, tanggal 20 Juni 2013.

DAFTAR PUSTAKA

Baratawidjaja, K. G., dan Rengganis, I., 2010, *Imunologi Dasar*, (Edisi ke-9), Jakarta: Balai Penerbit FKUI.

Calixto, J.B., Otuki, M.F., dan Santos, A.R.S., 2003, Anti-inflammatory Compound of Plant origin, *Planta Med.*, **69**: 973-983.

Eming, S. A., Krieg, Thomas, dan Davidson, J. M., 2007, Inflammation in Wound Repair:

Molecular and Cellular Mechanism, *Journal of Investigative Dermatology*, **27**.

- Morcillo, Esteban J., Estrela, J., dan Cortijo, J., 1990, Oxidative Stress And Pulmonary Inflammation: Pharmacological Intervention With Antioxidants, *Pharmacological Research*, **40** (5): 393-404.
- Mustikasari, K. dan Ariyani, D., 2007, Skrining Metabolit Sekunder Pada Akar Binjai (*Mangifera caesia*) dan kasturi (*Mangifera casturi*). *Laporan Penelitian Dosen*. Banjarbaru: FMIPA Universitas Lambung Mangkurat.
- Ravipati, A. S., Zhang, L., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Barlett, J., Smith, P. T., Shanmugam, K., Munch, G., Wu, M. J., dan Manavalan, 2012, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Selected Chinese Medical Plant and Their Relation with Antioxidant Content, *BioMed. central*.
- Segal, B.H., Kuhns, D.B., Ding Li, Gallin J. I., dan Holland S.M., 2002, Thioglycollate peritonitis in mice lacking C5, 5-lipoxygenase, or p47^{phox}: complement, leukotrienes, and reactive oxidants in acute inflammation, *Journal of Leukocyte Biology*, **71**.
- Suhartono, E., Viani, E., Ramadhan M. A., Syahuri, I. G., Rakhman M. F., dan Indrawardhana, D., 2012, Total Flavonoid and Antioxidant Activity of Some Selected Medicinal Plants in South Kalimantan of Indonesia. *ACPBEE Proced*. Singapore.
- Sutomo, Wahyuono, S., Rianto, S., dan Setyowati, E.P., (2013^a). Isolation and Identification of Active Compound of n-hexane Fraction from Kasturi (*Mangifera casturi* Konsterm.) against Antioxidant and Immunomodulatory Activity, *Journal of Biological Sciences*, **13**: 596-506.
- Sutomo, Wahyuono, S., Rianto, S., dan Setyowati, E. P., 2013^b, Antioxidant activity assay of extracts and active fraction of kasturi fruit (*Mangifera casturi* Kosterm.) using DPPH Methodh. *Laporan Penelitian*. Yogyakarta:Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.