

## **Aktivitas Penghambatan Migrasi Leukosit Ekstrak Diklorometana Daun Sendok (*Plantago major*) pada Mencit yang Diinduksi Tioglikolat**

### **Antiinflammatory Activity of Dichloromethane Extract of *Plantago major* on Thioglycollate-Induced Leukocyte Migration in Mice**

**Asih Triastuti<sup>a,\*</sup>, Fenny Alicia Andini<sup>a</sup>, Nanang Fakhrudin<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>*Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Islam Indonesia*

<sup>b</sup>*Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada*

\*Corresponding author: asih.triastuti@uii.ac.id

#### **Abstract**

*Plantago major* (Plantaginaceae) has been used empirically to treat various ailments and diseases. The plant have been reported to have antimicrobial, antidiabetic, antioxidant, and wound healing properties. To assess the anti-inflammatory activity of the dichloromethane extracts of *P. major*, the model of thioglycollate - induced leukocyte migration in mice was executed. Male balb/c mice were pretreated (i.p) with *P. major* extract followed by thioglycollate (i.p) to induce leukocyte migration. After 4,5 hours, the mice were sacrificed and the leukocytes were counted using hemocytometer under a light microscope. The statistical test Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney were used to analyse the results. Our study showed that *P. major* extract (dose 200, 400 and 600 mg/kg) significantly exhibited anti-inflammatory activity by inhibiting the migration of leukocytes induced by thioglycollate although the activity of the extracts was lower than the positive control, indomethacin. Thin layer chromatography analysis demonstrated that the extract contains ursolic acid that has been reported previously to inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2). This work strengthening the usage of *P. major* as an anti-inflammatory agent and its potential as a source of natural products..

**Keywords:** *Plantago major*, leukocyte migration, antiinflammation

#### **Abstrak**

*Plantago major* (daun sendok) telah dilaporkan memiliki beberapa aktivitas farmakologi seperti antibakteri, antidiabetes, antioksidan, dan membantu menyembuhkan luka. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi ekstrak diklorometana *P. major* pada model peritonitis yang diinduksi tioglikolat. Ekstrak diklorometana *P. major* diuji aktivitasnya sebagai antiinflamasi melalui penghambatan migrasi leukosit. Mencit jantan Swiss dibagi menjadi 7 kelompok yaitu kelompok normal (tanpa perlakuan), kontrol negatif (pemberian tioglikolat), kontrol positif (pemberian indometasin), kontrol pelarut (dimetilsulfoksida/DMSO 10%), dan kelompok perlakuan ekstrak *P. major* dengan dosis 200, 400, dan 600 mg/kgBB. Jumlah leukosit dihitung dengan hemositometer dan dianalisis dengan Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak dengan dosis 200, 400, dan 600 mg/kgBB mampu menghambat migrasi leukosit pada mencit yang telah diinduksi tioglikolat ditandai dengan penurunan jumlah leukosit secara signifikan ( $p < 0,05$ ) meskipun efektivitasnya lebih rendah dibandingkan dengan indometasin. Kemampuan ekstrak dalam menghambat migrasi leukosit semakin besar seiring dengan peningkatan dosis. Ekstrak diklorometana *P. major* mengandung asam ursolat yang sebelumnya telah dilaporkan aktif menghambat enzim siklooksigenase 2 (COX-2). Hal ini memperkuat dukungan *P. major* sebagai agen anti inflamasi dan sangat potensial untuk dikembangkan sebagai sediaan farmasi.

**Kata kunci:** *Plantago major*, anti inflamasi, migrasi leukosit

## Pendahuluan

Inflamasi memiliki peran yang cukup besar dalam memperantarai progresivitas beberapa penyakit (*immune-mediated inflammatory disease*) seperti aterosklerosis, rheumatid arthritis dan gout arthritis, termasuk penyakit sistem saraf pusat seperti Alzheimer. Migrasi leukosit dari darah ke jaringan merupakan tahapan penting dalam proses inflamasi yang dimediasi oleh beberapa kemokin dan sitokin sehingga memungkinkan masuknya sel efektor seperti neutrofil, monosit, dan sel T efektor ke tempat infeksi, cedera, dan stres (Nourshargh and Alon, 2014; Rossi *et al.*, 2011). Mekanisme molekuler yang mampu mengendalikan migrasi leukosit merupakan salah satu target terapi yang potensial dalam pengobatan inflamasi dan penyakit yang dimediasi inflamasi.

*Plantago major* (daun sendok) secara empirik telah digunakan oleh masyarakat di Asia dan Eropa untuk mengobati berbagai penyakit (Samuelson, 2000). Berbagai aktivitas biologis yang telah dilaporkan dari ekstrak tumbuhan tersebut termasuk diantaranya sebagai anti bakteri (Jamilah *et al.*, 2012; Metİner *et al.*, 2012), analgesik, dan antioksidan (Kolak *et al.*, 2011; Matsuura *et al.*, 2014). Tanaman

ini mengandung senyawa flavonoid, glikosida iridoid, terpenoid, plantagin, aukubin, dan asam ursolat (Nazarizadeh *et al.*, 2013; Ringbom *et al.*, 1998).

Dalam pengembangan penelitian terkait inflamasi, *P. major* telah dilaporkan memiliki beberapa mekanisme penghambatan anti inflamasi yang meliputi penghambatan reaksi anafilaksis (Nugroho *et al.*, 2004), aktivasi komplemen melalui jalur klasik dan alternatif (Kainde *et al.*, 2016), dan menghambat infiltrasi leukosit pada model inflamasi topikal pada mencit yang diinduksi minyak kroton (Triastuti *et al.*, 2019). Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas penghambatan migrasi leukosit dari ekstrak diklorometana *P. major* dalam rangka pengembangan tanaman tersebut sebagai agen anti-inflamasi.

## Metode Penelitian

### Bahan

Tanaman *P. major* (diperoleh dari B2P2TOOT, Tawangmangu), n-hexana (Merck), kloroform, etil asetat (Merck), diklorometana (Merck), metanol, pereaksi semprot serium sulfat, lempeng KLT (Silica gel F<sub>254</sub>, Sigma). Mencit jantan galur Swiss umur 2-3 bulan (LPPT UGM), *dimethyl sulfoksida* (DMSO 10%, Sigma), tioglikolat

(Merck), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), NaCl 0,9%, indometasin (Sigma®), pewarna larutan turk 1:9 (0,01% kristal violet dalam 3% asam asetat).

### **Ekstraksi *P.major***

Ekstraksi *P.major* dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut diklorometana. Serbuk sebanyak 500 gram diekstraksi dengan 4,5 liter pelarut diklorometana selama 3 hari dengan 3x remaserasi. Sari yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

### **Pembuatan ekstrak 200, 400, dan 600 mg/kgBB**

Untuk ekstrak dosis 200 mg/kgBB, ditimbang 40 mg ekstrak kental, untuk dosis 400 mg/kg BB, ditimbang 80 mg ekstrak, dan untuk ekstrak diklorometana dosis 600 mg/kg BB, ditimbang 120 mg ekstrak. Masing-masing ekstrak yang telah ditimbang dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 1 ml lalu dilakukan ultrasonifikasi selama 1 jam. Setelah ekstrak larut, ditambahkan NaCl 0,9% sampai 10 ml.

### **Pemeriksaan kandungan senyawa kimia**

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase gerak yaitu n-heksana : etil asetat (3:1) dan fase diam silika gel F<sub>254</sub> digunakan untuk analisis kandungan

kimia secara kualitatif. Ekstrak *P.lanceolata* dan standar asam ursolat digunakan sebagai pembanding.

### **Penghambatan Migrasi Leukosit**

Mencit jantan galur Swiss dibagi menjadi 7 kelompok uji yaitu kelompok I (kelompok normal) dimana mencit tidak diberi perlakuan apapun sebelum dibedah; kelompok II (kontrol pelarut) dimana mencit diberikan pelarut DMSO 10% sebanyak 1 ml secara oral; Kelompok III (kontrol negatif) dimana mencit diberikan 1 ml tioglikolat 4% secara intraperitoneal; kelompok IV (kontrol positif) dimana mencit diberikan indometasin dosis 10 mg/kgBB sebanyak 1 ml secara oral, 2 jam kemudian diberikan 1 ml tioglikolat secara intraperitoneal; kelompok V (perlakuan I) dimana mencit diberikan ekstrak *P.major* dosis 200 mg/kgBB sebanyak 1 ml secara oral, 2 jam kemudian diberikan 1 ml tioglikolat secara intraperitoneal, kelompok VI (perlakuan II) dimana mencit diberikan ekstrak *P.major* dosis 400 mg/kgBB sebanyak 1 ml secara oral, 2 jam kemudian diberikan 1 ml tioglikolat secara intraperitoneal; dan kelompok VII (perlakuan III) dimana mencit diberikan ekstrak *P.major* dosis 600 mg/kgBB sebanyak 1 ml secara oral, 2 jam

kemudian diberikan 1 ml tioglikolat secara intraperitoneal.

Setelah 2 jam pemberian senyawa uji atau larutan pembawa, disuntikkan tioglikolat 4% secara intraperitoneal sebanyak 1 ml. Kemudian setelah 6 jam, mencit diberikan anestesi eter dosis tinggi (*over dosis*) sampai mencit mati. Bagian rongga peritoneal mencit dibuka melalui irisan pada kulit secara perlahan-lahan kemudian disuntikkan 10 ml PBS dingin dan dipijat dengan lembut. Setelah itu diambil kembali 5 ml PBS pada rongga peritoneal mencit dan disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pellet diencerkan dengan PBS lalu ditambah pewarna larutan Turk 1:9 dengan cara 100 µl cairan yang mengandung leukosit dicampur dengan 900 µl larutan turk sambil divortex. Diambil 10 µl cairan untuk dihitung jumlah leukosit dengan hemositometer dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Total leukosit dihitung dengan rumus sebagai berikut:

Jumlah sel leukosit total (sel/ml) =

$$\frac{A}{4} \times 10^4 \times B \times \frac{C}{D}$$

Keterangan:

A = jumlah sel yang dihitung menggunakan hemositometer

B = faktor pengenceran

C = volume PBS yang disuntikkan (ml)

D = volume PBS yang diambil kembali setelah disuntikkan (ml)

### **Analisis Hasil**

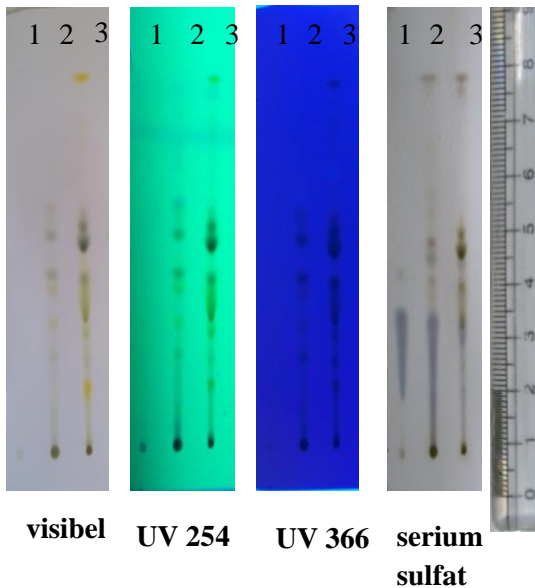
Setelah dilakukan perhitungan leukosit total kemudian dilakukan uji statistik menggunakan uji Kolmogorov Smirnov dan *One Way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* menggunakan uji *LSD*. Variabel yang dibandingkan yaitu jumlah total leukosit antar kelompok.

### **Hasil dan Pembahasan**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas anti inflamasi ekstrak diklorometan *P. major* dengan menggunakan model peritonitis pada mencit.

### **Analisis kandungan kimia dengan KLT**

Serbuk *P. major* diekstraksi dengan pelarut diklorometana dengan metode remaserasi sehingga diperoleh rendemen ekstrak kental 5%. Selanjutnya kandungan kimia *P. major* dianalisis dengan KLT dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (3:1). Hasil pemisahan senyawa dengan KLT dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Hasil analisis KLT dari ekstrak diklorometan *P. major* dengan fase diam silika gel F<sub>254</sub> fase gerak n-heksana : etil asetat (3:1), dan pereaksi semprot serium sulfat. (1) Standar asam ursolat, (2) ekstrak *P.lanceolata*, (3) ekstrak *P.major*

*P. lanceolata* digunakan sebagai pembanding karena *P. lanceolata* merupakan tanaman dari Plantaginaceae (genus *Plantago*) yang juga dilaporkan memiliki aktivitas anti inflamasi (Fakhrudin *et al.*, 2017; Jarić *et al.*, 2018). *P. lanceolata* banyak terdapat di Asia barat dan Eropa namun jarang di Indonesia sementara *P. major* lebih banyak terdapat di Asia tenggara termasuk Indonesia.

Bercak *P. major* dan *P.lanceolata* mengandung asam ursolat (hRf 44) yang berwarna ungu setelah disemprot dengan pereaksi semprot serium sulfat. Asam ursolat telah dilaporkan terdapat pada *P.*

*major* dan *P. lanceolata*, dan beberapa tanaman lain seperti *Salvia officinalis*. Asam ursolat dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim siklooksigenase-2 (COX-2) (Ringbom *et al.*, 1998).

### Aktivitas Penghambatan Migrasi Leukosit

Uji aktivitas antiinflamasi dilakukan menggunakan metode migrasi leukosit pada mencit yang diinduksi tioglikolat. Tioglikolat merupakan reduktor oksigen yang mampu merekrut netrofil menuju rongga peritoneal. Proses ini diperantarai oleh beberapa kemokin seperti CXCL1, CXCL2, and CXCL8 (Call *et al.*, 2001; Hermida *et al.*, 2017). Hasil uji penghambatan migrasi leukosit ditampilkan pada tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil Perhitungan Leukosit

Kelompok	Jumlah leukosit (X±SD)
Kontrol normal	2.090.000±119.373,4 <sup>f</sup>
Kontrol pelarut (DMSO 10%)	2.140.000±119.373,4 <sup>f</sup>
Kontrol negatif (Tioglikolat 4%)	19.090.000±2.007922 <sup>a</sup>
Kontrol positif (Indometasin 10 mg/kgBB)	3.110.000±230.217,3 <sup>e</sup>
Ekstrak 200 mg/kgBB	9.690.000±207.364,4 <sup>b</sup>
Ekstrak 400 mg/kgBB	5.710.000±258.360,2 <sup>c</sup>
Ekstrak 600 mg/kgBB	3.560.000±258.360,2 <sup>d</sup>

Keterangan:

Superskript yang berbeda, artinya memiliki perbedaan yang signifikan

Jumlah sel leukosit pada kelompok pelarut tidak berbeda signifikan dengan kelompok normal, sehingga pelarut yang digunakan tidak menyebabkan adanya migrasi leukosit pada hewan uji. Sementara itu, injeksi tioglikolat mampu menginduksi jumlah sel leukosit menjadi 9 kali lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok normal yang menunjukkan adanya migrasi besar-besaran leukosit ke daerah peritoneal. Pemberian obat anti inflamasi (indometasin) mampu menurunkan secara signifikan jumlah migrasi leukosit meskipun jumlahnya tidak sama seperti pada kelompok normal.

Ekstrak diklorometana *P. major* mampu menghambat migrasi leukosit secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif meskipun efektivitasnya masih di bawah indometasin. Selain itu, makin tinggi kadar ekstrak menunjukkan adanya kenaikan potensi penghambatan aktivitas migrasi leukosit. Aktivitas penghambatan migrasi leukosit dari *P. major* kemungkinan diperantarai oleh asam ursolat yang terdeteksi pada analisis kandungan kimia dengan KLT. Asam ursolat memiliki aktivitas penghambatan enzim COX-2 (Baricevic *et al.*, 2001; Chiang *et al.*, 2003;

Ringbom *et al.*, 1998). Inhibitor COX-2 telah dilaporkan memperlancar proses migrasi leukosit dengan cara menghambat mediator inflamasi sehingga menghambat reseptor pada leukosit sehingga akan menghambat ekstrasvasasi ke jaringan. (Díaz-González and Sánchez-Madrid, 1998; Díaz-Muñoz *et al.*, 2013). Hasil penelitian ini merupakan dukungan ilmiah untuk pengembangan *P. major* sebagai agen anti inflamasi. Penelitian lanjutan untuk mengisolasi senyawa aktif dari *P. major* yang bertanggungjawab terhadap aktivitas anti-inflamasi dan penelusuran mekanisme aksinya perlu dilakukan untuk pengembangan lebih lanjut tanaman ini sebagai anti-inflamasi.

### **Kesimpulan**

Ekstrak diklorometana *P. major* memiliki aktivitas penghambatan migrasi leukosit pada dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 600 mg/kgBB setelah diinduksi tioglikolat dan menunjukkan efektivitas yang meningkat seiring dengan peningkatan dosis.

**Daftar Pustaka**

- Baricevic, D., Sosa, S., Loggia, R. Della, Tubaro, A., Simonovska, B., 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L . leaves : the relevance of ursolic acid 75, 125–132.
- Call, D.R., Nemzek, J. a, Ebong, S.J., Bolgos, G.L., Newcomb, D.E., Remick, D.G., 2001. Ratio of local to systemic chemokine concentrations regulates neutrophil recruitment. *The American journal of pathology* 158, 715–721.
- Chiang, L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., Lin, C.C., 2003. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Medica* 69, 600–604.
- Díaz-González, F., Sánchez-Madrid, F., 1998. Inhibition of leukocyte adhesion: An alternative mechanism of action for anti-inflammatory drugs. *Immunology Today* 19, 169–172.
- Díaz-Muñoz, M.D., Osmá-García, I.C., Íñiguez, M.A., Fresno, M., 2013. Cyclooxygenase-2 Deficiency in Macrophages Leads to Defective p110 $\gamma$  PI3K Signaling and Impairs Cell Adhesion and Migration. *The Journal of Immunology* 191, 395–406.
- Fakhrudin, N., Astuti, E.D., Sulistyawati, R., Santosa, D., Susandarini, R., Nurrochmad, A., Wahyuono, S., 2017. N-hexane insoluble fraction of *Plantago lanceolata* exerts anti-inflammatory activity in mice by inhibiting cyclooxygenase-2 and reducing chemokines levels. *Scientia Pharmaceutica* 85.
- Hermida, M.D.R., Malta, R., De Santos, M.D.P.C., Dos-Santos, W.L.C., 2017. Selecting the right gate to identify relevant cells for your assay: A study of thioglycollate-elicited peritoneal exudate cells in mice. *BMC Research Notes* 10, 1–7.
- Jamilah, J., Sharifa, A., Sharifah, N., 2012. GC-MS Analysis of Various Extracts from Leaf of *Plantago major* Used as Traditional Medicine. *World Applied Sciences Journal* 17, 67–70.
- Jarić, S., Kostić, O., Mataruga, Z., Pavlović, D., Pavlović, M., Mitrović, M., Pavlović, P., 2018. Traditional wound-healing plants used in the Balkan region (Southeast Europe). *Journal of Ethnopharmacology* 211, 311–328.
- Kainde, A.R., Pangemanan, D.H.C., Hutagaling, B.S.P., 2016. Uji Efektivitas Ekstrak Daun Sendok (*Plantago major* L .) Terhadap Waktu Perdarahan pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*). *Journal e-Gigi* 4, 271–276.
- Kolak, U., Boğa, M., Uruşak, E.A., Ulubelen, A., 2011. Constituents of *Plantago major* subsp. *intermedia* with antioxidant and anticholinesterase capacities. *Turkish Journal of Chemistry* 35, 637–645.
- Matsuura, N., Aradate, T., Kurosaka, C., Ubukata, M., Kittaka, S., Nakaminami, Y., Gamo, K., Kojima, H., Ohara, M., 2014. Potent protein glycation inhibition of plantagoside in *Plantago major* seeds. *BioMed Research International* 2014, 1–5.
- Metiner, K., Ozkan, O., Seyyal, A., 2012. Antibacterial Effects of Ethanol and Acetone Extract of *Plantago major* L . on Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 18, 503–505.
- Nazarizadeh, A., Mikaili, P.,

- Moloudizargari, M., Aghajanshakeri, S., 2013. Therapeutic Uses and Pharmacological Properties of *Plantago major* L. and its Active Constituents Antisecretory Effect of Hydrogen Sulfide on Gastric Acid Secretion and the Involvement of Nitric Oxide View project. *J Basic Appl Sci Res* 3, 212–221.
- Nourshargh, S., Alon, R., 2014. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* 41, 694–707.
- Nugroho, A., Setyowati, E., Ikawati, Z., 2004. Uji aktivitas ekstrak daun sendok (*Plantago major* L) dalam menghambat reaksi anafilaksis yang diperantarai sel mast. *Majalah Farmasi* 15, 124–129.
- Ringbom, T., Segura, L., Noreen, Y., Perera, P., Bohlin, L., 1998. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *Journal of Natural Products* 61, 1212–1215.
- Rossi, B., Angiari, S., Zenaro, E., Budui, S.L., Constantin, G., 2011. Vascular inflammation in central nervous system diseases: adhesion receptors controlling leukocyte-endothelial interactions. *Journal of Leukocyte Biology* 89, 539–556.
- Samuelsen, A.B., 2000. A Review: The Traditional Uses, Chemical Constituents and Biological Activities of *Plantago major* L. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 1–21.
- Triastuti, A., Indrati, O., Hayati, F., 2019. Development of microemulsion containing *Plantago major* extracts: Formulation and evaluation of topical anti-inflammatory activities, in: Sekeroglu, N. (Ed.), *The 5th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (5MESMAP). Cappadocia*, pp. 211–215.