

## ARTIKEL PENELITIAN

## Pengaruh Ekstrak Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Pada Mencit Yang Diinfeksi *Escherichia coli*

Rury Trisa Utami<sup>1</sup>, Efrida<sup>2</sup>, Elizabeth Bahar<sup>3</sup>

1. Program Studi Ilmu Biomedis Program Magister Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Indonesia; 2. Departemen Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas/RSUP Dr.M.Djamil, Padang, Indonesia; 3. Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Indonesia

**Korespondensi:** Efrida; email: [efrida@med.unand.ac.id](mailto:efrida@med.unand.ac.id); HP: 081266582970

### Abstrak

**Tujuan:** untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bunga *S. aromaticum* dengan dosis 15mg/kgbb, 75 mg/kgbb, 150 mg/kgbb terhadap aktivitas fagositosis makrofag mencit yang diinfeksi *E. coli*. **Metode:** eksperimental dengan desain *The Post Test-Only Control Group* yang dibagi menjadi 5 kelompok, K1 tidak diberi perlakuan, K2, P1, P2, dan P3 diberi perlakuan infeksi *E.coli* sebanyak 0,2 mL pada hari pertama, sebelum pemberian ekstrak bunga cengkeh. Kelompok P1, P2 dan P3 diberi ekstrak bunga cengkeh masing-masing 15mg/kgBB, 75mg/kgBB, 150mg/kgBB. Ekstrak diberikan pada hari ke-2 hingga hari ke-13. Aktivitas fagositosis makrofag dihitung berdasarkan jumlah sel fagosit yang aktif melakukan fagositosis dalam 100 sel makrofag. Data yang didapatkan diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro Wilk* dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Hasil penelitian bermakna secara statistik jika ( $p < 0,05$ ) **Hasil:** adanya perbedaan yang signifikan aktivitas fagositosis makrofag antara kelompok kontrol dengan perlakuan ( $p < 0,05$ ). **Kesimpulan:** Ekstrak bunga *S. aromaticum* dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag yang di infeksi *E. coli* secara signifikan.

**Kata kunci:** Cengkeh; Makrofag; Fagositosis

### Abstract

**Objective:** to determine the effect of giving *S. aromaticum* flower extract at a dose of 15 mg/kg, 75 mg/kg, 150 mg/kg on the phagocytic activity of mice infected with *E. coli*. **Methods:** experimental with *The Post Test-Only Control Group* design which was divided into 5 groups, K1 was not treated, K2, P1, P2, and P3 were treated with 0.2 mL of *E.coli* infection on the first day, before administration of flower extract. clove. Groups P1, P2 and P3 were given clove flower extract 15mg/kgBW, 75mg/kgBW, 150mg/kgBW, respectively. The extract was given on day 2 to day 13. The phagocytic activity of macrophages was calculated based on the number of active phagocytic cells in 100 macrophage cells. The data obtained were tested for normality using the *Shapiro Wilk* test followed by the *One Way Anova* test. The results of the study were statistically significant if ( $p < 0.05$ ) **Results:** there was a significant difference in macrophage phagocytic activity between the control and treatment groups ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** *S. aromaticum* flower extract can significantly increase the phagocytic activity of macrophages infected with *E. coli*.

**Keywords:** Cloves; Macrophages; Phagocytosis

## PENDAHULUAN

Obat herbal banyak digunakan di masyarakat untuk mengobati berbagai penyakit. Komponen aktif obat herbal dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh<sup>1</sup>. Respons imun *innate* di perantarai oleh makrofag yang memainkan peran penting dalam pertahanan melalui proses fagositosis<sup>2</sup>. Peningkatan aktivitas makrofag juga dapat diperantarai melalui peran imunomodulator. Imunomodulator dapat meningkatkan daya tahan tubuh dengan mengonsumsi obat herbal. Penelitian Meyer *et al.*, (2008) melaporkan bahwa masyarakat mulai memilih obat herbal untuk meningkatkan sistem imun agar tidak mudah terserang berbagai macam penyakit<sup>3</sup>. Obat herbal mengandung senyawa imunostimulan berupa senyawa fenolik, polifenol, alkaloid<sup>4</sup>. Senyawa imunostimulan merupakan senyawa yang digunakan untuk mempotensi sel-sel imun<sup>5</sup>. Salah satu diantaranya adalah bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*)<sup>6</sup>.

Bunga *S. aromaticum* mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Senyawa fenolik yang ditemukan di dalam bunga cengkeh yaitu *Eugenol*, *Carvacrol* dan *Thymol*<sup>7</sup>. Bunga *S. aromaticum* kaya dengan kandungan *eugenol* (78%-90%) yang bersifat antioksidan kuat dalam mengatasi radikal bebas<sup>8</sup>. *Eugenol* dan *isoeugenol* (analog *eugenol*) dapat mengaktivasi sel makrofag dan meningkatkan produksi *Nitrit Oxide* (NO) pada mencit yang distimulasi LPS<sup>9</sup>. Hal ini membuktikan bahwa *eugenol* memiliki

efek antiinflamasi dan *eugenol* memiliki nilai toksisitas rendah pada makrofag. Penelitian Sharma *et al.*, (2014) melaporkan aktivitas antioksidan, sitotoksik, dan anti-leishmanial *eugenol*, dalam mengurangi radikal NO cukup besar (63%), menunjukkan perlindungan lebih baik terhadap peroksidasi lipid pada otak tikus dan homogenat ginjal (hingga 40%)<sup>10</sup>. Penelitian Baitiha (2020) melaporkan ekstrak bunga *S. aromaticum* juga memiliki kandungan analgesik, antikanker, antiseptik, anti-inflamasi, antivirus, antijamur, dan antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen<sup>11</sup>. Penelitian Aparecido *et al.*, (2009) melaporkan bunga *S. Aromaticum* yang mengandung senyawa *eugenol* tinggi 78%-90% dapat digunakan sebagai antiseptik pada obat kumur serta analgesik pada sakit gigi<sup>12</sup>. Penelitian Pandey (2011), tentang uji aktivitas bunga cengkeh terhadap patogen pada makanan yang terinfeksi *E.coli*, melaporkan bahwa ekstrak metanol bunga cengkeh dapat diandalkan sebagai obat yang digunakan untuk antibakteri, karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dengan zona hambat 20 mm<sup>7</sup>. Penelitian Dibazar (2015) melaporkan bunga cengkeh juga dilaporkan dapat meningkatkan imunitas tubuh terhadap infeksi<sup>4</sup>.

Penelitian Wael (2018) memberikan dosis ekstrak daun cengkeh bertingkat masing-masing 15 mg/kgbb, 75 mg/kgbb, dan 150 mg/kgbb ke hewan coba, membuktikan bahwa ketiga dosis tersebut dapat meningkatkan jumlah limfosit pada hewan coba secara signifikan, namun tidak dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag ( $p > 0,05$ )<sup>13</sup>. Oleh karena itu peneliti tertarik melakukan penelitian

terhadap komponen lain cengkeh yaitu ekstrak bunga cengkeh dengan dosis yang sama. Peneliti telah melakukan pengujian kadar eugenol pada ekstrak bunga cengkeh dengan metode *Gas Chromatography and Mass Spectroscopy* (GCMS), didapatkan hasil kadar eugenol 86.18%. Kadar eugenol bunga cengkeh lebih tinggi dari pada daun cengkeh (0,76%-10%). Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti tertarik melakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap aktivitas fagositosis makrofag dan jumlah limfosit pada mencit yang diinfeksi *Escherichia coli*.

## METODE

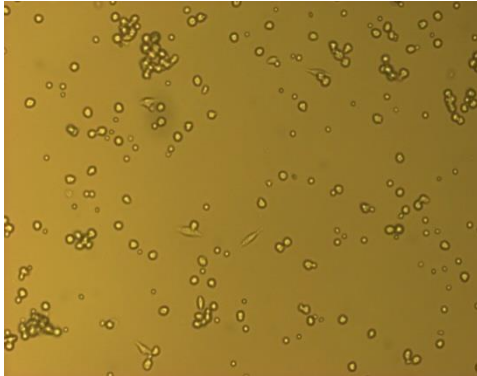
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *The Post Test-Only Control Group* yang menggunakan hewan coba mencit sebagai objek penelitian. Kriteria inklusi adalah mencit Balb/c jantan, usia 8-12 minggu, berat 30-40 gram, dan tidak terdapat kelainan anatomis. Jumlah sampel pada penelitian ini adalah 30 ekor mencit. Kelompok penelitian akan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu Kontrol satu (K1), Kontrol dua (K2), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), dan Perlakuan 3 (P3). Kontrol satu tidak diberi perlakuan, Kontrol dua hanya diinfeksi dengan *E. coli* 0,2 mL pada hari ke-1 melalui injeksi intraperitoneal. Perlakuan 1, Perlakuan 2, dan Perlakuan 3 diberikan ekstrak bunga cengkeh dengan dosis masing masing masing 15mg/kgBB, 75mg/kgbb dan 150mg/kgBB selama 12 hari setelah diinfeksi *E. coli*.

Penghitungan jumlah limfosit dilakukan dengan menggunakan alat hematology analyzer dengan metode Flowsitometry. Pemeriksaan makrofag dilakukan dengan metode reduksi NBT. Makrofag distimulasi dengan PMA sehingga mensekresi anion super oksid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) yang akan mengoksidasi NBT. Suspensi makrofag (PEC) pada microplate 24 well yang telah diberi coverslip bulat, diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 300 menit, ditambahkan medium komplet 1 ml/sumuran, diinkubasi selama 2 jam. Sel dicuci dengan RPMI 2 kali, kemudian ditambah medium komplet 1ml/sumuran diinkubasi 24 jam. Setelah itu ditambah 500 µL larutan NBT yang mengandung 125 ng/ml PMA. Sel dicuci dengan PBS 3 kali, dikeringkan pada suhu kamar. Fiksasi dengan metanol absolut selama 2-3 menit, setelah kering diwarnai dengan Giemsa<sup>14</sup>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

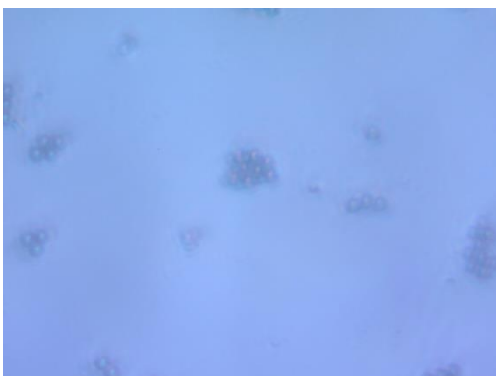
Makrofag ini diambil dari cairan peritoneal mengingat jumlahnya lebih banyak (70%-95%) dibanding dengan organ limfa<sup>15</sup>. Makrofag berasal dari makrofag yang tersebar bebas di sepanjang cairan peritoneum yang memiliki diameter 21 µm. Makrofag berada disepanjang kapiler memungkinkan untuk menangkap patogen dan antigen yang masuk ke dalam tubuh dengan mudah<sup>16</sup>. Sel makrofag didapat dengan menyuntikan medium RPMI dingin ke rongga peritoneal tikus. Medium RPMI mengandung nutrisi yang dibutuhkan

untuk pertumbuhan sel seperti asam amino, vitamin, dan garam-garam organik. Medium RPMI dingin digunakan agar sel makrofag tidak rusak. Kemampuan sel makrofag untuk menempel pada *coverslip* membedakan sel makrofag dengan sel yang lain.



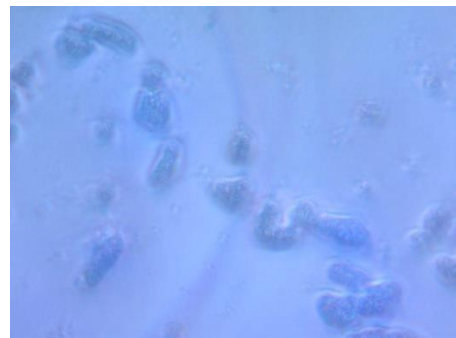
Gambar 1. Sel makrofag yang dikultur

Perbedaan aktivitas fagositosis makrofag antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol dapat dilihat dari kemampuan sel makrofag memfagositosis partikel lateks secara *in vitro*. Lateks merupakan makromolekul yang dianggap benda asing yang sangat direspons baik oleh sistem imun tubuh. Oleh karena itu, dengan adanya lateks diharapkan dapat memacu aktivitas makrofag dalam memfagositosis lateks.



Gambar 2. Partikel *Latex*

Kemampuan sel makrofag pada tahap yang paling awal untuk memfagositosis zat asing dimulai dengan membentuk kaki semu (*pseudopodia*), dilanjutkan dengan pembentukan vesikula membran yang dihasilkan pada proses endositosis atau penelanan partikel. Vesikula membran ini disebut fagosom, kemudian fagosom fusi dengan lisosom membentuk fagolisosom, dilanjutkan dengan pembunuhan dan penghancuran antigen<sup>18</sup>.



Gambar 3. Makrofag memfagositosis partikel *Latex*.

Rerata aktivitas fagositosis makrofag pada mencit yang diberiekstrak cengkeh cenderung mengalami peningkatan dibandingkan mencit yang tidak diberi ekstrak bunga cengkeh. Rerata aktivitas fagositosis makrofag mencit mencit Balb/c pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 berbanding lurus dengan dosis ekstrak cengkeh yang diberikan. Semakin besar dosis yang diberikan, semakin besar aktivitas fagositosisnya Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas Fagositosis Makrofag

Kelompok	N	Rerata± SD
K1	5	43±5,43
K2	5	61± 7,38
P1	5	72 ± 3,53
P2	5	77±2,23
P3	5	84±5,47

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa distribusi data aktivitas fagositosis makrofag adalah normal ( $P>0,05$ ). Pengaruh ekstrak bunga cengkeh terhadap aktivitas fagositosis makrofag pada kelompok kontrol dengan semua kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang signifikan ( $P>0,05$ ). Hal ini disebabkan karena kandungan antioksidan dalam cengkeh merupakan immunomodulator yang dapat menstimulasi sistem imun<sup>19</sup>. Eugenol dapat meningkatkan produksi sitokin makrofag pada saat terinfeksi bakteri *E.coli*<sup>4</sup>. Sitokin tersebut adalah IL-12. IL-12 bertugas mengaktifkan sel NK sehingga meningkatkan produksi IFN- $\gamma$ . Interleukin-12 memiliki tugas tambahan yaitu bersinergi dengan IL-2 yang bertindak sebagai *growth factor* untuk memicu diferensiasi sel Th0 menjadi Th1 dan Th2. Selanjutnya eugenol akan mempengaruhi Th1 untuk meningkatkan produksi IL-2 dan IFN- $\gamma$ <sup>20</sup>. Seiring dengan penelitian Bachiega *et al* (2009) tentang produksi Th1/Th2 sitokin pada mencit yang di beri perlakuan ekstrak bunga cengkeh melaporkan bahwa penambahan ekstrak bunga cengkeh dapat

meningkatkan IFN dan IL-12, Kemudian eugenol juga akan menginduksi sel NK untuk meningkatkan produksi IFN- $\gamma$ <sup>6</sup>. Interferon- $\gamma$  yang dihasilkan kemudian digunakan untuk mengaktifkan makrofag sehingga terstimulasi untuk menghasilkan TNF- $\alpha$ . (*Tumor Nekrosis Factor- $\alpha$* ) yang dapat merangsang produksi sitokin pada sel T dan sel NK sehingga dapat mengaktifkan makrofag yang lain<sup>16</sup>. Hal ini berbeda dengan penelitian Wael (2018) tentang ekstrak daun cengkeh dosis 15 mg/kgbb, 75 mg/kgbb, 150 mg/kgbb tidak dapat meningkatkan aktivitas fagositosis secara signifikan ( $p>0,05$ ), hal ini disebabkan kandungan eugenol pada ekstrak daun cengkeh (0,76%-10%) lebih rendah dibandingkan ekstrak bunga cengkeh (78%-90%)<sup>13</sup>.

## SIMPULAN

Dalam penelitian ini dapat disimpulkan ekstrak bunga cengkeh (*S.aromaticum*) dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag yang di infeksi *E. coli*.

## DUKUNGAN FINANSIAL

Tidak Ada.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Tidak Ada.

## KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak Ada.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Artini, K.S., Veranita,W. 2021. Tanaman Herbal Untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Duta Bangsa. Vol 10, No 1: 5-20
2. Abbas, A.K., Lichtman, A. and Pillai, S., 2019. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 6e: Sae-E-Book*. Elsevier India.2013;10(1):57–9.
3. Meyer, S, L, F., Lakshman, D, K., Zasada, I, A., Vinyard, B, T., Chitwod, D, J. 2008. Dose response effects of clove oil from *Syzygium aromaticum* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Pest Manag Sci* 64: 223-229
4. Dibazar, S.P., Fateh, S. and Daneshmandi, S., 2015. Immunomodulatory effects of clove (*Syzygium aromaticum*) constituents on macrophages: in vitro evaluations of aqueous and ethanolic components. *Journal of immunotoxicology*, 12(2), pp.124-131.
5. Sethi, J. & Singh, J, 2015, Role of Medicinal Plants as Immunostimulants in Health and Disease. *Annals of Medicinal Chemistry and Research*, 1(2): 1009.
6. Bachiega, T. F., Orsatti, C. L., Pagliarone, A. C., Missima, F., Sousa, J. P. B., Bastos, J. K., & Sforcin, J. M. (2009). Th1/Th2 cytokine production by clove-treated mice. *Natural Product Research*, 23(16), 1552-1558.
7. Pandey, A., & Singh, P. (2011). Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. *Asian J Plant SciRes*, 1(2), 69-80. Pandey, A., & Singh, P. (2011). Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum*(clove) with metal ion effect against food bornepathogens. *Asian J Plant SciRes*, 1(2),69-80
8. Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., ... & Ajami, M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical reviews in microbiology*, 43(6),668-689.
9. Weihua, Tsubouchi R, Qiao S,Haneda M, Murakami K, YoshinoM. Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264 macrophages. 2006.*Biomed Res.*;27(2):69–74
10. Sharma, U. K., Sharma, A. K., Gupta1, A. Kumar, R. Pandey, A. Pandey, A. K. 2017. Pharmacological activities of cinnamaldehyde and eugenol: antioxidant, cytotoxic and anti-leishmanial studies. *Cellular and Molecular Biology*. 63 : 73-78.
11. Batiha, G. E. S., Alkazmi, L. M., Wasef, L. G., Beshbishy, A. M., Nadwa, E. H., & Rashwan, E. K. 2020. *Syzygium aromaticum* L.(Myrtaceae): Traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. *Biomolecules*, 10(2).

12. Aparecido,N.,Daniel.,Simone,M., Sartoretto.,Gustavo,S.,Silvana,M., Caparroz-Assef., Ciomar,A., Bersani Amado.,Roberto,Kenji,N.,Cuman. 2009. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Brazilian journal of pharmacognosy*19 (1B): 212-217.
13. Wael, S., Mahulette, F., Watuguly, T. W., & Wahyudi, D. 2018. Pengaruh ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap limfosit dan makrofag mencit balb/c. *Tradit Med J*, 23(2), 79-83.
14. Farizal J. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Miremia mammosa*) Terhadap Proliferasi Limfosit dan Produksi ROI Makrofag yang Diinfeksi *Sallmonela thipy*. Journal Dipnegoro University
15. Wang, H., Paton, A. W., McColl, S. R., & Paton, J. C. (2011). In vivo leukocyte changes induced by *Escherichia coli* subtilase cytotoxin. *Infection and immunity*, 79(4), 1671-1679.
16. Baratawidjaja, K.G. dan Rengganis, I.,. 2012. *Imunologi Dasar*,Edisi ke-10, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 29-32, 61-64, 69, 73, 583.
17. Nestri, H. 2018. Uji aktivitas fagositosis makrofag ekstrak etanol daun suji (*Dracaena angustifolia*) Secara in vitro. *Pharmacy Medical Journal:Universitas Sebelas Maret*.
18. Rich Robert. *Clinical Immunology Fourth Edition*. USA: Elsevier;2013. h.114-18.
19. Lisdiana, L & Nuraini. 2018. Potensi Eugenol Sebagai Agen Proteksi Kerusakan Struktur Paru Akibat Paparan Asap Rokok. *Indonesian Journal of Mathematics and Natural Sciens* 41(2), 87-95, 2018.
20. Lestarini IA. 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Phyllanthus niruri L* terhadap Respon Imunitas Seluler Mencit balb/c yang dinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* (Tesis). Semarang : Universitas Diponegoro.