

## Pengaruh Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap Limfosit dan Makrofag Mencit Balb/c

### Effect of Leaf *Syzygium aromaticum* on Lymphocytes and Macrophages Mice Balb/c

Syahran Wael<sup>1\*</sup>, Ferymon Mahulette<sup>1</sup>, Theopilus Wilhelmus Watuguly<sup>1</sup>, Didik Wahyudi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pendidikan Biologi. Universitas Pattimura. Jalan Ir. M. Putuhena, Poka, Ambon. 97233. Indonesia

<sup>2</sup>Akademi Analisis Kesehatan Nasional Surakarta. Jalan Yos Sudarso No. 338 Serengan. 57155

#### ABSTRAK

*Syzygium aromaticum* sebagai imunomodulator mengandung senyawa aktif utama yakni eugenol yang dapat memacu fungsi proliferasi limfosit dan produksi makrofag. Limfosit memiliki peran yang sangat penting untuk memberikan perlindungan bagi tubuh terhadap infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh ekstrak *Syzygium aromaticum* terhadap peningkatan proliferasi limfosit, limfoblas dan produksi makrofag mencit Balb/c yang diinduksi *Salmonella typhimurium*. Metode yang dipakai dalam penelitian ini adalah eksperimental dengan rancangan post test only control group. Hewan coba mencit Balb/c dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diinduksi *Salmonella typhimurium*. Kelompok perlakuan pertama diberi ekstrak 15mg, kedua 75mg, ketiga 150mg/kgBB selama 12hari. Hasil uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada proliferasi limfosit sedangkan limfoblas dan makrofag tidak signifikan.

**Kata kunci:** cengkeh, limfosit, limfoblas, makrofag

#### ABSTRACT

*Syzygium aromaticum* as an immunomodulator contains main active compound eugenol which is able to stimulate lymphocyte proliferation and the production of macrophages. Lymphocytes have a very important role to provide protection in the body against infection. This study aims to prove the effects of extract *Syzygium aromaticum* leaf against increased proliferation of lymphocytes, lymphoblast and macrophages of mice Balb/c of induced *Salmonella typhimurium*. The method used in this study was experimental with post test only control group. Mice Balb/c were divided into 4 groups as a control group and treatment induced of *Salmonella typhimurium*. The first treatment group were administrated extracts of 15mg /kgbw, the second treatment 75mg/kgbw, the third treatment of 150mg/kgbw for 12days. ANOVA test showed a significant difference in lymphocyte proliferation but not lymphoblast and macrophages.

**Key words:** cloves, lymphocytes, lymphoblast, macrophage

#### PENDAHULUAN

Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) merupakan tanaman asli Maluku (Indonesia) yang tergolong ke dalam keluarga tanaman Myrtaceae pada ordo Myrtales (Razafimamonjison, *et al.*, 2015) yang merupakan tanaman herbal telah lama digunakan di negara-negara Timur Tengah dan Asia (Dehghani *et al.*, 2012). Cengkeh digunakan sebagai obat tradisional dalam penyembuhan berbagai macam penyakit, dan juga penyedap masakan. Aroma cengkeh yang khas dihasilkan oleh senyawa eugenol, yang merupakan senyawa utama (72-90%).

Eugenol juga memiliki sifat antiseptik dan anestetik. (Razafimamonjison, *et al.*, 2015). Analisis senyawa daun cengkeh asal Bangladesh dengan metode GC-MS didapatkan senyawa eugenol 74,28%, eucalyptol 5,78%, kariofilen 3,85%,  $\alpha$ -cardinol 2,43%, limonen 2,08% (Bhuiyan *et al.*, 2010).

Minyak atsiri dari cengkeh mempunyai sifat kimiawi dan efek farmakologis yang berfungsi sebagai anestetik, antimikrobia, antiseptik (Nurhidayati, 2013), antioksidan, dan imunomodulator (Dehgani *et al.*, 2012). Senyawa fenolik daun cengkeh juga bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidan dan senyawa flavonoid yang bertindak sebagai penangkal radikal bebas (Dibazar *et al.*, 2014).

\*Corresponding author : Syahran Wael  
Email : sharan\_wael@yahoo.com

Kandungan senyawa ekstrak daun yang dapat memicu imunitas spesifik dan non spesifik serta dapat mengaktifkan komponen seluler dari sistem imun, misalnya fungsi fagositosis tanpa berpengaruh pada imunitas humoral maupun seluler (Tursinawati, 2015). Masyarakat mulai memilih obat tradisional untuk meningkatkan sistem imun agar tidak mudah terserang berbagai macam penyakit (Meyer *et al.*, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pemberian ekstrak daun cengkeh terhadap aktivitas fagositosis makrofag dan pengukuran proliferasi limfosit mencit yang diinduksi *Salmonella typhimurium*. Induksi respon imun mencit pada penelitian ini dilakukan dengan *Salmonella typhimurium*. *Salmonella* telah banyak digunakan sebagai model untuk mempelajari respon imun bawaan dan adaptif, terutama aktivasi makrofag (Amanda *et al.*, 2009). *Salmonella* mampu mengaktifkan sistem imun seluler inang yang diperankan oleh makrofag dan sel NK sebagai eksekutor imun non spesifik dan sel T sebagai mediator imun spesifik (Tursinawati, 2015).

Eugenol merupakan bahan awal yang sangat berguna untuk sintesis senyawa lain yang lebih bermanfaat. Kandungan utama dari minyak cengkeh adalah eugenol (80-90%) yang digunakan sebagai antiseptik pada obat kumur dan analgesik pada sakit gigi (Apparecido *et al.*, 2009). Eugenol telah diketahui memiliki aktivitas farmakologis imunomodulator (Dehgani *et al.*, 2012).

Minyak cengkeh memiliki sifat anti bakteri sehingga dapat diterapkan untuk luka ringan dan bekas gigitan serangga (Prashar *et al.*, 2006). Senyawa utama yang terkandung dalam ekstrak daun cengkeh adalah eugenol yang merupakan komponen utama terhadap peran imunomodulator dan anti inflamasi (Apparecido *et al.*, 2009).

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Fasilitas Laboratorium Bersama (Falitma) Fakultas Biologi UGM sejak tanggal 15 Maret sampai pemeriksaan makrofag 30 Juni 2016. Daun cengkeh diperoleh dari perkebunan desa Negeri Lima Kecamatan Leihitu Maluku Tengah. Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi adalah metanol pro analisis. Dua puluh ekor mencit Balb/c jantan yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM dengan berat 20 gram dibagi menjadi 4 kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Kelompok kontrol diberi akuades dan kelompok perlakuan diberi ekstrak daun cengkeh selama 12 hari.

Perlakuan P1 dengan dosis 15 mg/kgBB, perlakuan P2 dosis 75 mg/kgBB, perlakuan P3 dengan dosis 150 mg/kgBB. Pada semua kelompok mencit diinjeksi *Salmonella typhimurium* sebanyak 0,2 ml sebelum diberi ekstrak daun cengkeh. *Salmonella typhimurium* diperoleh dari Laboratorium Akademi Analisis Kesehatan Nasional Surakarta sebanyak 1 isolat  $10^5$  CFU.

Penghitungan jumlah limfosit dilakukan dengan cara limpa di letakkan diatas cawan petri yang berisi 1,5 ml RPMI kemudian dilumatkan sampai halus. Selanjutnya dicuci dengan PBS 10 ml kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit, suhu  $40^{\circ}\text{C}$ , supernatan dibuang lalu ditambah PBS 2 ml. Jumlah limfosit dihitung dengan bilik hitung (*Neubauer Improve*) dengan cara meneteskan cairan limpa tersebut (Farizal, 2012; Ulfa, 2017).

Penghitungan jumlah limfoblas dengan cara setetes substrat limpa diambil dan dibuat preparat apusan di atas gelas sediaan, dilakukan fiksasi dengan metanol absolut dan dikeringkan, dicat dengan pewarna Giemsa. Limfoblas diidentifikasi sebagai sel besar dengan inti yang bernukleolus, kromatin belum padat (warna ungu muda) dan masih terlihat adanya sitoplasma, sedangkan limfosit ukuran selnya lebih kecil dengan inti bulat berkromatin padat (warna ungu tua) tidak ada nukleolus dan hampir tidak terlihat sitoplasma (Farizal, 2012; Ulfa, 2017).

Pemeriksaan makrofag dilakukan dengan metode reduksi NBT. Makrofag distimulasi dengan PMA sehingga mensekresi anion superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) yang akan mengoksidasi NBT. Suspensi makrofag (PEC) pada *microplate 24 well* yang telah diberi *coverslip* bulat, diinkubasi dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5%,  $37^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  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. (Farizal, 2012; Ulfa, 2017).

Data dianalisis dengan program SPSS-20 menggunakan uji *Shapiro wilks* untuk menentukan kenormalan data sebagai syarat dalam penggunaan *One Way Anova* kemudian dilanjutkan dengan uji LSD. Sedangkan untuk data tidak normal menggunakan uji Kruskal Wallis.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Berat Limpa

Setelah perlakuan pemberian ekstrak daun cengkeh pada kelompok perlakuan maka mencit dibedah untuk mengetahui berat limpa sebagai indikator peningkatan proliferasi. Data hasil analisis berat limpa (Tabel I).

Tabel I. Berat limpa

Perlakuan	Rerata ± st deviasi
Kontrol	0.126±0.015
15mg	0.556±0.049
75mg	0.516±0.015
150mg	0.510±0.015

uji *One Way Anova* \*p (0.00) < 0.05

Tabel II. Uji LSD

Kelompok	Dosis	Sig.
Kontrol	15mg	0.000*
	75mg	0.000*
	150mg	0.000*

\*beda nyata

Uji statistik terdapat perbedaan yang signifikan ( $P = 0.00$ ) antara kelompok kontrol dan perlakuan ekstrak 15mg, 75mg dan 150mg/kgBB mencit. Pada penelitian ini terjadi penambahan berat limpa pada kelompok perlakuan yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. *Salmonella* akan menginisiasi respon inflamasi pada tempat penyebarannya dan akan mencapai limpa dan dapat menyebabkan pembesaran pada limpa. Ekstrak daun cengkeh dengan kandungan eugenol dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit. Eugenol merupakan senyawa utama pada cengkeh dapat memodulasi respon imun termasuk efek anti inflamatori (Bachiega *et al*, 2009).

Proliferasi limfosit akan mempengaruhi sel CD4+, kemudian menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (Spesifik Makrofag Activating Factor) yang dapat mengaktifkan makrofag (Rachel *et al*, 2017). Respon imun seluler akan teraktivasi untuk mengeliminasi infeksi oleh bakteri intra seluler seperti *Salmonella typhimurium*, diantaranya dengan adanya respon proliferasi limfosit. Respon proliferasi limfosit secara mikroskopis dilihat dengan adanya perbedaan penambahan ukuran besar dan berat limpa (Farizal, 2012).

### Limfosit

Penghitungan limfosit dihitung dari cairan limpa yang dilumatkan sampai halus kemudian

diamati dibawah mikroskop. Sel limfosit dihitung dengan menggunakan bilik hitung dengan ciri-ciri sel limfosit lebih kecil dan berwarna ungu tua, (Tabel III).

Tabel III. Jumlah limfosit.

Perlakuan	Rerata ± st deviasi
Kontrol	101.61±8.853
15 mg	109.67±9.292
75 mg	112.00±2.00
150 mg	142.33±20.404

uji *One Way Anova* \*p (0.038) < 0.05

Tabel IV. Uji LSD

Kelompok	Dosis	Sig.
Kontrol	15mg	0.833
	75mg	0.21
	150mg	0.022*

\*beda nyata)

Pada uji statistik terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan dosis 150 mg/kgBB sedangkan dosis 15 mg dan 75 mg tidak signifikan. Hal tersebut menjelaskan bahwa pada pemberian ekstrak daun cengkeh dosis 150 mg/kgBB terjadi peningkatan jumlah limfosit lebih baik dari pada dosis 15 mg dan 75 mg. Ekstrak daun cengkeh dosis 150 mg terbukti meningkatkan limfosit pada penelitian ini. Hal ini diakibatkan karena pada dosis 150 mg lebih banyak mengandung senyawa eugenol sebagai imunomodulator dalam meningkatkan proliferasi sel limfosit melalui produksi IL-2. IL-2 memiliki peran dalam mengaktivasi sel limfosit T untuk berproliferasi. Proliferasi limfosit T dirangsang oleh antigen yang diatur oleh ikatan antara IL-2 dengan reseptornya (Ulfa, 2017).

### Limfoblas

Penghitungan limfoblas dihitung dari cairan limpa yang dilumatkan kemudian diamati dibawah mikroskop dan limfoblas dihitung dengan menggunakan bilik hitung dengan ciri-ciri sel lebih besar dan berwarna ungu muda.

Uji statistik tidak terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan tetapi terdapat peningkatan jumlah limfoblas pada perlakuan pemberian dosis 75 mg dibandingkan dosis 15 mg dan 150 mg. Pemberian ekstrak daun cengkeh dosis 15 mg, 75 mg, dan 150 mg tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada penelitian ini. Konsentrasi optimal pada pemberian ekstrak daun cengkeh belum meningkatkan limfoblas.

Tabel V. Jumlah limfoblas

Perlakuan	Rerata ± st deviasi
Kontrol	102.11±10.012
15mg	117.33±11.015
75mg	123.33±10.408
150mg	120.00±13.229

uji *One Way Anova* \*p (0.023) < 0.05

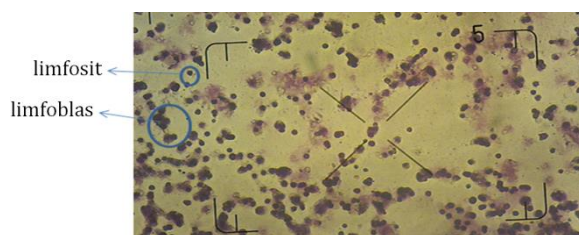
Tabel VI. Uji LSD

kelompok	Dosis	Sig.
Kontrol	15 mg	0.31
	75 mg	0.550
	150 mg	0.788

tidak beda nyata

Hasil pengamatan sel limfosit dan limfoblas dibawah mikroskop terlihat bentuk sel yang bulat dan tampak bergerombol dengan inti berukuran kecil. Sel limfosit dan limfoblas dihitung dengan menggunakan hemositometer perbesaran 400 x. Sel limfosit yang ada diperkirakan merupakan campuran sel T dan sel B. Secara visual antara sel T dan sel B sulit untuk dibedakan karena morfologi kedua sel tersebut sama dan terdapat dalam sirkulasi darah dan melewati jaringan tubuh. Limfosit selalu terlihat berwarna ungu tua dan kecil sedangkan limfoblas selnya lebih besar dan berwarna ungu muda.

Gambar 1. Sel limfosit dan limfoblas



Pemberian ekstrak daun cengkeh pada penelitian ini dapat meningkatkan jumlah limfosit pada dosis 150 mg sedangkan limfoblas belum terbukti secara signifikan. Hal ini disebabkan karena ada rangsangan senyawa ekstrak daun cengkeh seperti eugenol yang merupakan molekul efektor utama dalam modulator peningkatan limfosit (Bachiega *et al*, 2009). Selain itu eugenol sebagai senyawa utama yang terkandung dalam ekstrak daun cengkeh kemungkinan merupakan komponen utama terhadap peran imunomodulator dan anti inflamasi (Apparecido, *et al*, 2009).

### Makrofag

Pemeriksaan makrofag dilakukan dengan cara reduksi NBT. Makrofag distimulasi dengan PMA sehingga mensekresikan anion superoksida ( $O_2^-$ ) yang akan mengoksidasi NBT.

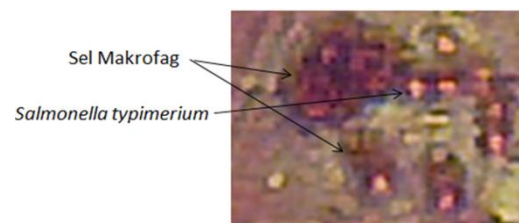
Tabel VII. Jumlah makrofag

Perlakuan	Rerata ± st deviasi
Kontrol	4.21±0.24
15mg/kg	5.20±0.44
75mg/kg	6.80±1.78
150mg/kg	7.00±3.00

uji *Kruskal Wallis* p (0.253) > 0.05

Berdasarkan uji statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan (P=0.253) pada pemberian ekstrak daun cengkeh dengan dosis 15mg, 75mg, dan 150mg/kgBB walaupun terjadi peningkatan aktifitas makrofag. Pada tabel menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis pemberian ekstrak daun cengkeh terjadi penambahan fagositosis *Salmonella typhimurium*. Hal tersebut menunjukkan bahwa bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak daun cengkeh berpotensi untuk meningkatkan aktifitas makrofag. Makrofag merupakan salah satu sel yang berperan penting dalam respon imun, baik dalam fagositosis maupun sebagai antigen presenting cell (APC). Makrofag sebagai sel fagosit memiliki 2 mekanisme dalam membunuh yaitu proses oksidatif dan non oksidatif (Rachel *et al*, 2017). Makrofag juga mampu mensekresikan IL-12 yang membantu diferensiasi sel T CD4+ menjadi Th1. Sel Th1 dan sel NK akan mensekresikan IFN  $\gamma$  sebagai faktor pengaktivasi makrofag sekaligus meningkatkan ekspresi MHC II pada permukaan APC. Th2 berperan dalam imunitas humoral melalui antibodi dalam proses opsonisasi (Tursinawati, 2015).

Gambar 2. Sel makrofag



Penelitian (Bachiega *et al*, 2009) tentang produksi Th1/Th2 sitokin pada mencit yang diberi perlakuan ekstrak cengkeh melaporkan bahwa penambahan ekstrak pada balb/c dapat

memproduksi sitokin Th1 (IFN $\gamma$  dan IL-2) dan Th2 (IL-4 dan IL-10). Pada penelitian pemberian ekstrak daun cengkeh dengan dosis pemberian 15 mg, 75mg, dan 150mg/kgBB tidak terdapat perbedaan yang signifikan dalam meningkatkan aktifitas makrofag.

## KESIMPULAN

Pemberian ekstrak daun cengkeh secara oral dengan dosis 15mg, 75mg dan 150mg/kgBB/hari selama 12 hari dapat meningkatkan limfosit, dan berat limpa pada mencit yang diinduksi *Salmonella typhimurium*. Sedangkan pada limfoblas dan makrofag tidak terjadi peningkatan yang signifikan pada dosis perlakuan.

## REFERENSI

- Amanda, L., Santos., Gilberto, O., Chierice, Kenneth, S., Alexander., Alan, R., Ellen, Matthewa. 2009. Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L. *J Therm Anal Calorim* **96**: 821-825.
- Apparecido, 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.
- Banerjee, S., Panda, C.K., Das, S. 2006. Clove (*Syzygium aromaticum* L.) potential chemopreventive agent for lung cancer. *Carcinogenesis* **27**: 1645-1654.
- Bachiega, T.F., Orsatti, C.L., Pagliarona, A.C., Missima, F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K. 2009. Th1/Th2 cytokine production by clove-treated mice. *Natural Product Research*. **23** (16): 1552-1558.
- Bhuiyan, Md, N.I., Bagum, J., Nandi, N.C. and Akter, F. 2010. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium aromaticum*). *African Journal of Plant Science*. **4** (11): 451-454.
- Dehghani, F., Heshmatpour, A., Panjehshahin, M.R. and Khozani, T.T. 2012. Toxic effects of water/ alcoholic extract of *Syzygium aromaticum* on sperm quality, sex hormones and reproductive tissues in male mouse. *IUFSJ Biol* **71** (2): 95 – 102.
- Dibazar S P, Fateh S, Daneshmandi S. 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*) ingredients affect lymphocyte subtypes expansion and cytokine profile responses: an in vitro evaluation. *Food and drug analysis*. **22**:448-454.
- Dibazar S P, Fateh S, 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) 124-131.
- Farizal, J. 2012. Effect of ethanol extract bidara upas tuber (*Merremia mammosa*) to lymphocytes proliferation And ROI macrophage production. *Tesis Magister Ilmu Biomedik UNDIP*.
- 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.
- Nurhidayati, L. dan Sulistiawati. 2013. Penetapan kadar eugenol dalam minyak atsiri dari tiga varietas bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*(L) Merr. & L.M. Perry) secara kromatografi gas. *Seminar Nasional dalam Rangka Lustrum X Fakultas Farmasi Universitas Pancasila*
- Prashar A, Locke I.C, Evans C.S. 2006. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cell. *Cell Prolif* **39**: 241-248.
- Rachel, N.T., Purnawati, R.D., Susilaningih, N. 2017. Pengaruh pemberian ekstrak daun sirih merah dosis bertingkat terhadap produksi peroksida makrofag: studi pada mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. *Jurnal kedokteran Diponegro* **6**(2): 912-920.
- Razafimamonjison G, Jahiel M, Duclos T, Ramanoelina P, Fawbush F, Danthu P. 2014. Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. *International Journal of Basic and Applied Sciences*. **3** (3) : 224-233.
- Tursinawati, Y., Dharmana, E. 2015. Efektivitas pemberian kombinasi produk herbal antibiotik terhadap infeksi *Salmonella typhimurium* pada mencit Balb/c. *University Research Coloquium* (**2**): 231-237.
- Ulfa, M., Cahyani, V.S.N., Kinasih, I. 2017. Pengaruh pemberian seduhan the daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag dan proliferasi sel limfosit mencit galur Balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis B. *Momentum*. **13** (2): 63-71