

# EKSTRAK ETANOL BIJI JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) MENINGKATKAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG MENCIT...

*By Akrom*

2

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/287199567>

1

# EKSTRAK ETANOL BIJI JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) MENINGKATKAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG MENCIT...

Article · October 2015

CITATIONS

0

READS

842

3 authors, including:



Akrom Akrom

Ahmad Dahlan University

29 PUBLICATIONS 7 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Development of *Nigella sativa* oil as immunomodulator and antioxidant for metabolic syndroms patients [View project](#)



*Nigella sativa* as chemopreventive and immunomodulator [View project](#)

**1**  
**EKSTRAK ETANOL BIJI JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) MENINGKATKAN  
AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG MENCIT SWISS YANG  
DIINFEKSI *Lysteria monocytogenes***

***Ethanollic Extract of Black Cumin (*Nigella sativa*) Seed Increases Macrophage Phagocytic  
Activity of Swiss Mice Infected with *Lysteria monocytogenes****

**1** Akrom<sup>1</sup>, Andi Widjaya<sup>1</sup>, dan T. Armansyah<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bagian Farmakologi dan Farmasi klinik Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta

<sup>2</sup>Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: abdullah\_akrom@yahoo.com

**1**  
**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh ekstrak etanol biji jintan hitam (EEBJH) terhadap aktivitas fagositosis dan sekresi *reactive oxygen intermediates* (ROI) makrofag peritoneal mencit Swiss yang diinfeksi *Lysteria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Dalam penelitian ini digunakan 72 ekor mencit jantan galur Swiss dengan berat antara 20-30 g. Mencit dibagi ke dalam enam kelompok, masing-masing terdiri atas 12 ekor. Kelompok I (kelompok kontrol negatif), diberi akuades secara per oral. Kelompok II (kelompok kontrol positif), hewan uji diberi *imboost* per oral. Kelompok III, IV, V, dan VI sebagai kelompok perlakuan, masing-masing diberi EEBJH dengan dosis 1, 5, 25, dan 125 mg/kg bobot badan/hari per oral selama 14 hari. Pada hari ke-15, semua mencit diinfeksi *L. monocytogenes*. Aktivitas fagositosis makrofag peritoneal diamati dengan metode lateks sedangkan aktivitas sekresi ROI diamati dengan metode *nitro blue tetrazolium* (NBT) *reduction assay*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian EEBJH meningkatkan aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag peritoneal yang diinfeksi *L. monocytogenes*. Angka kematian hewan uji pada kelompok perlakuan lebih rendah dari kelompok negatif. Aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag tertinggi terdapat pada hari ke-14. Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa EEBJH memiliki efek meningkatkan aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag mencit Swiss yang diinfeksi *L. monocytogenes*. Kelompok perlakuan dengan dosis 5 mg/kg bobot badan EEBJH memiliki aktivitas fagositosis dan sekresi ROI tertinggi.

Kata kunci: biji jintan hitam, fagositosis makrofag, *L. monocytogenes*

**ABSTRACT**

*This study aims to determine the effect of ethanol extract of black cumin seeds (EEBJH) of the phagocytic activity and the secretion of reactive oxygen intermediates (ROI) murine peritoneal macrophages infected L.monocytogenes Switzerland. The design of the study was experimental design with a control group. Seventy two male mice of Swiss strain weighing between 20-30 grams were used. Mice were divided into 6 groups, each of 12 heads. Group I (negative control group), was given distilled water orally. Group II (positive control group), the tested animals were given orally imboost. Group III, IV, V, and VI, as the treatment groups, respectively - each given EEBJH with a dose of 1, 5, 25, and 125 mg / kg body weight / day orally for 14 days. On day 15, all mice infected L.monocytogenes. Peritoneal macrophage phagocytic activity was observed by the method of latex while ROI secretion activity was observed by the method of nitro blue tetrazolium (NBT) reduction assay. Do different test average phagocytic activity and the secretion of ROI between groups by ANOVA followed by LSD test with a 95% confidence level. The results showed that administration of EEBJH increase ROI phagocytic activity and the secretion of peritoneal macrophages infected by L. monocytogenes. The mortality rate of tested animals in the treatment group was lower compared to those of the negative group. Phagocytic activity of macrophages and secretion of ROI was highest on day 14. Phagocytic activity of macrophages and secretion ROI was highest in the group MBJH receiving dose 5mg/kg/day. Based on research results, it can be concluded that EEBJH has the effect of increasing the activity of macrophage phagocytosis and ROI secretion of Swiss mice infected with L. monocytogenes.*

Key words: black cumin seed, phagocytosis of macrophage, *Lysteria monocytogenes*

**PENDAHULUAN**

*Lysteria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) merupakan salah satu bakteri penyebab infeksi intraseluler (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Respons imun seluler lebih efektif dalam eliminasi patogen intraseluler (Baratawidjaya, 2006). Makrofag merupakan efektor utama pada respons imun seluler. Sebagai fagosit profesional, makrofag bertanggung jawab dalam memusnahkan sel yang terinfeksi patogen intraseluler, termasuk *L. monocytogenes* (Baratawidjaya, 2006). Fagositosis dan sekresi *reactive oxygen intermediates* (ROI) merupakan mekanisme utama makrofag dalam memusnahkan sel yang terinfeksi patogen intraseluler (Akrom, 2004; Wahyuniari, 2006). Aktivitas fagositosis makrofag dapat ditingkatkan dengan zat-zat imunostimulator, termasuk imunostimulator berasal dari tanaman (Wahyuniari, 2006; Akrom *et al.*, 2013).

Secara empiris biji jintan hitam (BJH) telah lama digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional pemacu respons imun dan penguat stamina (Akrom *et al.*, 2007). Kandungan zat aktif BJH antara lain minyak atsiri yang terdiri atas 18,4 -24% timokuinon, dan 46% monoterpen seperti p-simene, dan a-pinene. Dalam minyak BJH juga banyak mengandung minyak aromatik, asam lemak jenuh dan tak jenuh, termasuk omega 3 dan omega 6, vitamin serta mineral (Gali-Muhtasib *et al.*, 2006; Nickavar *et al.*, 2003). Secara *in vitro* timokuinon terbukti memiliki efek antibakteri mikobakterium (Randhawa, 2011), antijamur *Aspergillus* (Al-Qurashi *et al.*, 2007), antibakteri *Staphylococcus* dan antikanker (Hossain *et al.*, 2012). Secara *in vitro* timokuinon juga terbukti memengaruhi aktivitas makrofag melalui reseptor *toll like receptor* (TLR) (Finlay, 2009). Biji jintan hitam telah dibuktikan mengandung zat aktif yang bersifat kemopreventif

(Akrom *et al.*, 2013), sitotoksik terhadap sel kanker (Akrom *et al.*, 2008), anti-oksidan hepatoprotektif (Kanthar *et al.*, 2004), antivirus (Salem *et al.*, 2000) maupun imunomodulator (Salem, 2005). Timokuinon merupakan ligan neu-1 sialidase pada reseptor TLR (Finlay *et al.*, 2010b) yang terlibat dalam proses sinyal transduksi pada aktivasi makrofag (Finlay, 2009; Finlay *et al.*, 2010). Aktivasi neu-1 sialidase telah dibuktikan menyebabkan aktivasi *nuclear factor*  $\kappa$ B (NF  $\kappa$ B) yang berujung pada peningkatan aktivitas fagositosis dan produksi sitokin pro-inflamasi oleh makrofag (Finlay, 2009; Amith *et al.*, 2010). Secara *in vivo* kandungan aktif BJH telah dibuktikan meningkatkan jumlah dan aktivitas sel-sel T (Majdalawieh, 2010; Mohany *et al.*, 2012; Akrom *et al.*, 2013).

*Listeria monocytogenes*, merupakan bakteri intraseluler, mempunyai kemampuan untuk bertahan dan bereplikasi dalam sel termasuk dalam fagosit karena mampu bertahan dari lisosim (Burke *et al.*, 2014). Melalui berbagai mekanisme penghindaran sistem imun, *L. monocytogenes* dapat merusak membran fagosom dan bertahan hidup dalam sitoplasma sehingga dapat terhindar dari aktivitas fagositosis langsung makrofag (Wahyuniari, 2006).

Namun bagaimana pengaruh ekstrak etanol biji jintan hitam (EEBJH) terhadap aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag peritoneal mencit Swiss yang diinfeksi *L. monocytogenes* belum diketahui. Penelitian ini dirancang untuk mengetahui efek EEBJH terhadap aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag peritonium mencit yang diinfeksi *L. monocytogenes*.

## MATERI DAN METODE

### Ekstraksi Biji Jintan Hitam dan Pembuatan Sediaan Uji

Pembuatan ekstrak dilakukan sesuai dengan pedoman pelaksanaan pedoman uji klinik obat tradisional. Pembuatan ekstrak etanol dilakukan dengan memakai metode Sokhletasi menggunakan etanol 95%. Biji jintan hitam dibeli dari toko penyedia bahan obat tradisional. Sebelum BJH dibuat ekstrak dilakukan identifikasi oleh tenaga ahli untuk penetapan keaslian bahan uji di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada (UGM). Identifikasi dilakukan dengan menggunakan buku pedoman Backer dan Van der Brink (1965) dan dibuktikan dengan dikeluarkannya sertifikat identitas bahan uji. Biji jintan hitam dipilih yang masak dan tidak kering kemudian dibuat serbuk. Tiap 50 g serbuk kering BJH dibungkus dengan kertas saring kemudian dimasukkan dalam alat soklet lalu ditambahkan 300 ml etanol 95% dan dihubungkan dengan pendingin balik. Proses ekstraksi dilakukan sampai sari BJH habis yang ditandai dengan cairan pengestrak yang telah berwarna bening. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan evaporator sampai etanol menguap, ekstrak disimpan dalam botol steril (Depkes, 2001).

### Persiapan Hewan Uji dan Infeksi *L. monocytogenes*

Penelitian ini menggunakan 72 ekor mencit jantan galur Swiss berumur 2-3 bulan dengan bobot badan 20-30 g diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (UPHP) UGM Yogyakarta. Mencit dipelihara dalam kandang besi berukuran 50 x 30 x 20 cm, tiap kandang berisi 8 ekor mencit. Mencit diberi makan pelet 529 dan diberi minum secukupnya. Kondisi kandang diusahakan tetap bersih dan bebas kuman dengan pencahayaan, kelembaban, dan suhu ruangan sesuai standar.

Mencit dipilih secara acak dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing kelompok terdiri atas 12 ekor. Kelompok I diberi akuades sebagai kelompok kontrol negatif. Kelompok II diberi sirup imunomodulator paten dari Soho (Imboost) sebagai pembanding (kontrol positif), kelompok III, IV, V, dan VI diberi EEBJH dengan dosis 1, 5, 25, dan 125 mg/kg bobot badan/hari. Pemberian EEBJH dilakukan secara per oral dengan volume 0,5 ml selama 14 hari sebelum mencit diinfeksi *L. monocytogenes*. Infeksi *L. monocytogenes* dilakukan pada hari ke-15 dengan menyuntikkan inokulum bakteri dosis  $1 \times 10^4$  cfu secara intraperitoneal (Wahyuniari, 2006).

Pada hari ke-14, 16, dan 17, dari masing-masing kelompok dikorbankan tiga mencit untuk diambil makrofag peritoneal dan dilakukan uji aktivitas fagositosis dan sekresi ROI. Hari ke-15 sampai hari ke-21 diamati kondisi klinik dan umum serta kemampuan hidup hewan uji.

### Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag

Keenam kelompok mencit dibunuh dengan narkose menggunakan kloroform. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%, kemudian disuntikkan 10 ml medium RPMI-1640 (GIBCO) dingin ke dalam rongga peritoneum, ditunggu selama tiga menit sambil digoyang-goyang secara perlahan. Cairan peritoneum dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan cara menekan rongga dalam dengan dua jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat disentrifus pada 1200 rpm selama 10 menit. Supernatant dibuang, pelet diresuspensi dengan RPMI-1640 (GIBCO) yang mengandung 10% fetal bovine serum (FBS), 1 mM natrium bikarbonat, 2 mM L-glutamin, 100  $\mu$  penisilin dan 0,5 mg streptomisin. Jumlah sel dihitung dengan hemositometer dan ditentukan viabilitasnya dengan larutan *trypan blue*, kemudian ditambahkan dengan medium komplit sehingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan  $2,5 \times 10^6$  / ml. Suspensi sel ditumbuhkan dalam mikrokultur 24 sumuran yang telah diberi *coverlips* bulat. Setiap semuran diisi 200 mikroliter ( $5 \times 10^5$  sel). Sel diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 30 menit, kemudian ditambahkan medium komplit sebanyak 1 ml tiap sumuran dan diinkubasikan 2 jam. Sel dicuci dua kali dengan RPMI 1 ml tiap sumuran

dan inkubasi dalam medium komplit dilanjutkan sampai 24 jam (Akrom, 2004).

Uji fagositosis dilakukan *in vitro* menggunakan lateks *bead* diameter 3 mikroliter (Efendi, 2003). Partikel lateks disuspensikan dalam *phosphate-buffered saline* (PBS) sehingga didapatkan konsentrasi  $2,5 \times 10^7$ /ml. Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci 2x dengan medium RPMI, kemudian ditambahkan suspensi lateks 200 µl/sumuran, diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37° C selama 60 menit. Sel kemudian dicuci dengan PBS 3x, dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik. Setelah kering dipulas dengan Giemsa 20%. Giemsa digunakan untuk pewarnaan yang bahannya terdiri atas 8 bagian *sorenson's buffer* (0,67 mM) pH 7,2 dan 2 bagian *Giemsa's stain* (BDH chemicals ltd). *Sorenson's buffer* (0,67 mM) dibuat dari campuran 7,2 ml larutan A dan 2,8 ml larutan B ditambah 90 ml akuades. Larutan A diperoleh dari 9,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ditambah akuades hingga 1 l. Larutan B diperoleh dari 9,07 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ditambah akuades hingga 1 l. Persentase sel makrofag yang memfagositosis partikel lateks dan banyaknya partikel lateks yang difagositosis dihitung dari sekitar 100 sel yang diperiksa dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x (Akrom *et al.*, 2008; Wahyuniari, 2006).

#### Uji Aktivitas Sekresi ROI Makrofag

Menggunakan makrofag sebagaimana pada uji fagositosis, kemampuan makrofag peritoneum untuk menyekresi ROI diamati dengan metode *nitro blue tetrazolium* (NBT) *reduction assay* (Akrom *et al.*, 2008; Wijayanti, 2000). Senyawa NBT akan teroksidasi dengan adanya O<sub>2</sub> membentuk preipitat *formazan* yang tidak larut. Untuk menginduksi sekresi anion suproksida, kultur makrofag distimulasi dengan *Phorbol 12-Myristate 13 Acetat* (PMA) dengan konsentrasi akhir 125 µg/ml. makrofag yang telah dikultur selama 24 jam dicuci 2x dengan medium RPMI, kemudian ditambahkan 500 µl larutan NBT, 1 mg/ml PBS yang mengandung 125 µg/ml PMA dan diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37° C selama 60 menit. Sel kemudian dicuci dengan PBS 3x, dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik. Setelah kering dipulas dengan *neutral red solution* 2%. Persentase sel makrofag yang menunjukkan reduksi NBT dihitung dari sekitar 100 sel yang diperiksa dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 x. Perhitungan persentase sel makrofag yang menunjukkan reduksi NBT direplikasi sebanyak 3x (Wijayanti, 2000).

#### Analisis Data

Analisis data statistik aktivitas fagositosis makrofag yang pertama adalah dengan menguji normalitas data dan homogenitas varian dengan taraf kepercayaan 95%. Pada tes normalitas menggunakan uji *Kolmogorof-Smirnov* dan pada tes homogenitas varian menggunakan uji Levene. Kemudian dilakukan analisis varian satu jalan (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji LSD, dengan taraf kepercayaan 95 % (Santosa, 2010).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Keadaan Hewan Uji

Keadaan klinis hewan uji yang diamati adalah kondisi umum dan kemampuan hidup. Pada kelompok kontrol positif ada satu hewan uji yang mati sebelum diinfeksi yaitu pada hari ke-10 perlakuan. Pada infeksi hari pertama belum tampak adanya perubahan kondisi klinis hewan uji. Hewan uji kelompok I, II dan V, pada hari ke-2 infeksi tampak mulai menurun nafsu makan dan kelincahan gerakan. Pada hari ke-3 infeksi (hari ke-17) mulai terjadi kematian hewan uji. Hasil pengamatan kemampuan hidup hewan uji mulai hari ke-15 sampai hari ke-21 penelitian disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Jumlah mencit hidup berdasarkan hari pengamatan hari ke-15 sampai ke -21

Kelompok	Jumlah (%) mencit hidup hasil pengamatan hari ke						
	15	16	17	18	19	20	21
Kontrol negatif	12	12	10	4	1	1	0
Kontrol positif	11	11	11	8	8	8	8
EEBJH 1 mg/kg bobot badan	12	12	12	9	8	8	8
EEBJH 5 mg/kg bobot badan	12	12	12	9	9	9	9
EEBJH 25 mg/kg bobot badan	12	12	12	9	9	9	9
EEBJH 125 mg/kg bobot badan	12	12	12	10	9	8	8

EEBJH= Ekstrak etanol biji jintan hitam

Kelompok perlakuan dosis 1 dan 125 mg/kg bobot badan memiliki angka kematian lebih tinggi (4 ekor) dari pada kelompok dosis 5 dan 25 mg/kg bobot badan EEBJH. Hewan uji yang tersisa tampak tetap sehat, gerakannya lincah dan nafsu makan baik. Hewan uji yang selamat diamati sampai hari ke-7 infeksi (hari ke-21).

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian EEBJH mampu menghambat kejadian kematian pada hewan uji yang diinfeksi *L. monocytogenes*. Penghambatan kematian ini dimungkinkan akibat aktivitas antibakteri dan imunostimulan dari zat aktif EEBJH. Kandungan aktif BJH adalah minyak atsiri terdiri atas 18,4-24% timokuinon, dan 46% monoterpen seperti *p-cymene*, dan *a-pinene* (Nickafar *et al.*, 2003; Kanther *et al.*, 2004). Minyak BJH disamping mengandung minyak atsiri juga banyak mengandung minyak aromatik, trace elemen, enzim, asam lemak, vitamin dan mineral, termasuk juga omega 3 dan omega 6. Biji jintan hitam juga terbukti banyak mengandung karoten (sumber vitamin A), kalsium, zat besi, dan sebagainya, oleh karena itu minyak BJH memiliki efek sebagai antikanker, antijamur dan antibakteri. Secara *in vivo* kandungan BJH juga telah terbukti sebagai antifeksi (Mashadian dan Rakhshandeh, 2005), antibakteri (Abu-Al-Basal, 2009) dan antikanker (El Gazzar *et al.*, 2007). Ekstrak kloroform, dietil eter dan petroleum eter BJH mengandung zat aktif yang telah dibuktikan memiliki efek sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Candida albicans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, dan *Klebsiella albicans* secara *in vitro* dan *in vivo* (Abu-Al-Basal, 2009). Timokuinon telah dibuktikan secara *in vitro* memiliki aktivitas antibakteri *Streptococcus*

*aureus* dan *Bacillus anthracis* (Hossain, *et al.*, 2012) dan anti-TBC (Randhawa, 2011).

#### Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag

Hasil pemeriksaan aktivitas makrofag disajikan pada Gambar 1. Gambar 1 menyajikan aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit Swiss setelah diinfeksi *L.monocytogenes* dan pemberian EEBJH selama 14 hari. Makrofag kelompok kontrol negatif tampak kurang aktif jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Pada makrofag yang aktif tampak ada 1 atau lebih partikel lateks menempel atau terdapat di dalam vakuola dalam sitoplasma.

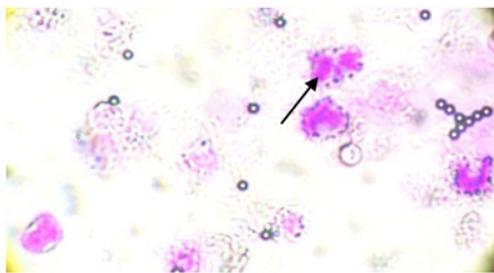
Hasil pengamatan aktivitas fagositosis makrofag (persentase fagositosis makrofag) disajikan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Hasil perhitungan pengaruh pemberian EEBJH terhadap rerata persentase makrofag yang makan lateks setiap kelompok perlakuan hari ke-14, hari ke-16, dan hari ke-17

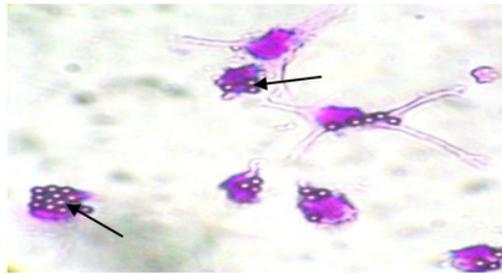
Kelompok	Aktivitas fagositosis (%) makrofag pada hari		
	ke -14	ke - 16	ke - 17
Kontrol negatif	45±3*	35±2*	45±2*
Kontrol positif	83±4	55±4	64±1
EEBJH 1 mg/kg bobot badan	73±4*	73±4**	63±2
EEBJH 5 mg/kg bobot badan	82±3	77±5**	64±2
EEBJH 25 mg/kg bobot badan	78±3	73±3**	63±4
EEBJH 125 mg/kg bobot badan	72±3*	69±2**	63±3

EEBJH= Ekstrak etanol biji jintan hitam. \*\*= Lebih tinggi dari kontrol positif dengan  $P<0,05$ , \*= Lebih rendah dari kontrol positif dengan  $P<0,05$

Pada hari ke-14 penelitian persentase fagositosis kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan lebih tinggi dari pada persentase fagositosis pada kelompok kontrol negatif ( $P<0,05$ ). Data hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan persentase makrofag yang aktif pada kelompok yang diberi kontrol positif maupun EEBJH selama 14 hari jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ( $P<0,05\%$ ). Persentase jumlah makrofag yang makan lateks dari yang paling tinggi kerendah berturut- turut adalah kelompok kontrol positif (83%), kelompok IV (82%), kelompok V (78%), kelompok III (73%), kelompok VI (72%) dan paling rendah pada kelompok I (kontrol negatif) (45%).



A



B

**Gambar 1.** Gambar makrofag peritoneal mencit Swiss jantan diinfeksi *L. monocytogenes* dengan pengecatan Giemsa dengan pembesaran 40x. Gambar A menunjukkan makrofag yang tidak aktif makan lateks. Tanda panah pada Gambar A menunjukkan makrofag yang tidak aktif dicirikan tidak tampak adanya lateks yang difagositosis. Gambar B menunjukkan makrofag yang aktif melakukan fagositosis. Tanda panah pada Gambar B menunjukkan makrofag yang aktif melakukan fagositosis dimana di dalam makrofag tampak terdapat partikel lateks.

Pada hari ke-16 semua kelompok terjadi penurunan aktivitas fagositosis makrofag jika dibandingkan dengan aktivitas fagositosis pada hari ke-14. Persentase makrofag yang makan lateks tetap lebih tinggi pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan (kelompok II, III, IV, V, dan VI) dibandingkan dengan kelompok I (kontrol negatif) ( $P<0,05$ ). Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa pemberian EEBJH selama 14 hari dapat meningkatkan onset dan intensitas respons imun pada makrofag peritoneal hewan uji yang diinfeksi *L. monocytogenes*.

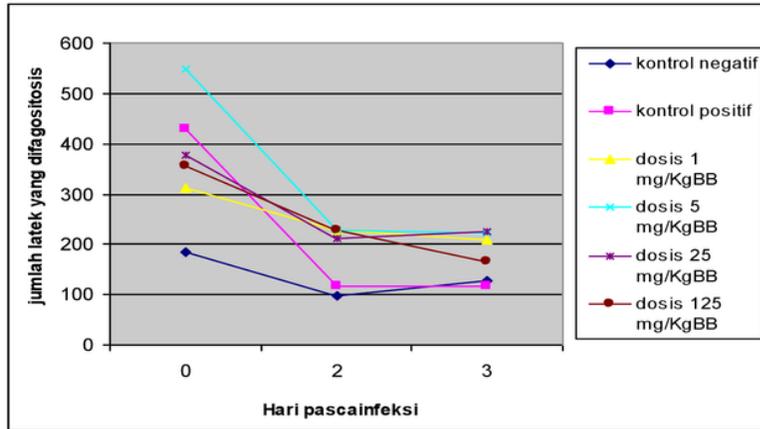
Aktivitas fagositosis pada hari ke-17 (ke-3 pasca infeksi) menunjukkan pola yang berbeda dengan hari ke-14 dan ke-16 (Gambar 2). Pada kelompok I dan II, terjadi peningkatan aktivitas fagositosis jika dibandingkan dengan hari ke-16. Aktivitas fagositosis makrofag pada hari ke-17 dari tinggi ke rendah berturut-turut adalah kelompok IV (64%), kelompok kontrol positif (64%), kelompok V (63%), kelompok III (62,67%), kelompok VI (63%), dan kelompok I (45%). Data persentase jumlah makrofag yang makan lateks pada kelompok perlakuan menunjukkan nilai yang relatif sama (stabil) yaitu pada rentang nilai antara 63% sampai dengan 64%. Aktivitas fagositosis antar kelompok uji menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ( $P>0,05$ ). Data ini berarti pada hari ketiga pasca-infeksi *L. monocytogenes*, pemberian EEBJH dengan dosis 1, 5, 25, dan 125 mg/kg bobot badan menunjukkan hasil yang sama dan peningkatan persentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks setelah infeksi *L. monocytogenes* berbanding lurus dengan jumlah partikel lateks yang difagositosis.

Tabel 3 dan Gambar 2 menyajikan jumlah lateks pada pemeriksaan hari ke-14, 16, dan 17. Rerata jumlah partikel lateks yang difagositosis makrofag paling tinggi pada hari ke-14, kemudian menurun pada hari ke-16 dan cenderung mengalami peningkatan pada hari ke-17. Pada hari ke-14, jumlah partikel lateks yang difagositosis makrofag dari yang paling tinggi sampai dengan yang terendah berturut-turut adalah pada kelompok IV, kelompok II, kelompok V, kelompok VI, kelompok III, dan kelompok I.

**Tabel 3.** Hasil perhitungan jumlah partikel lateks yang difagositosis makrofag setiap kelompok perlakuan hari ke-14, 16, dan 17 infeksi *Lysteria monocytogenes* pada mencit jantan galur Swiss setelah pemberian ekstrak etanol biji jintan hitam

Kelompok	Jumlah lateks yang difagositosis hari		
	ke - 14	ke - 16	ke - 17
Kontrol negatif	186±7*	97±3*	127±5
Kontrol positif	428±13	116±7	116±11
EEBJH dosis 1 mg/kg bobot badan	312±16*	227±18	208±9**
EEBJH dosis 5 mg/kg bobot badan	548±6**	229±13	223±7**
EEBJH dosis 25 mg/kg bobot badan	379±17*	211±6	227±10**
EEBJH dosis 125 mg/kg bobot badan	357±17*	229±10	166±6**

EEBJH= Ekstrak etanol biji jintan hitam, \*\*= Lebih tinggi dari kontrol positif dengan P<0,05; \*= Lebih rendah dari kontrol positif dengan P<0,05



**Gambar 2.** Grafik jumlah lateks yang difagositosis makrofag pada hari ke-14, 16, dan 17

Kelompok kontrol negatif jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P<0,05$ ). Hal ini berarti pemberian EEBJH dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag mencit jantan galur Swiss pada hari ke-17. Kelompok kontrol positif jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan atau berbeda bermakna, yang berarti bahwa pemberian EEBJH meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag yang lebih baik dari kontrol positif ( $P<0,05$ ).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa EEBJH terbukti meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Aktivitas fagositosis makrofag berperan penting pada proses eliminasi infeksi intraseluler. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya (Akrom *et al.*, 2007; Akrom *et al.*, 2008). *Listeria* mampu menghasilkan listeriolisin untuk meningkatkan menginisiasi fagositosis (Noor *et al.*, 2007) tetapi *Listeria* juga mampu bertahan terhadap lisosim (Burke *et al.*, 2014), sehingga *Listeria* dapat lama bertahan hidup dalam makrofag akibat tidak mengalami lisis oleh lisosim (Burke *et al.*, 2014; Vazquez-Boland, 2001). Namun hasil-hasil penelitian telah membuktikan bahwa pemberian agen imunomodulator mampu meningkatkan efektifitas fagositosis makrofag dalam mengeliminasi *Listeria* dan peningkatan respons imun seluler (Mellawati *et al.*, 2010; Salem, 2005). Telah dibuktikan bahwa timokuinon meningkatkan ekspresi TLR-4 (Finlay *et al.*, 2010). Finlay (2009) dan Mohany *et al.* (2012) membuktikan bahwa secara *in vitro* timokuinon dapat meningkatkan aktivitas fagositosis melalui aktivasi

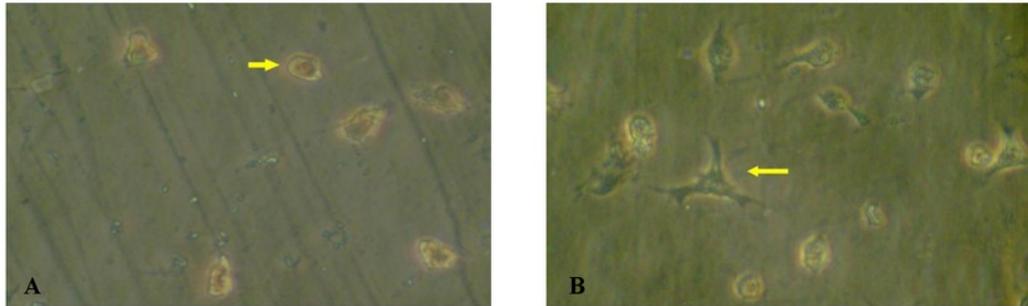
reseptor TLR-4 pada makrofag. Telah dibuktikan bahwa aktivitas fagositosis makrofag juga dapat ditingkatkan melalui pengeluaran sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IFN- $\gamma$  atau IL-12 akibat pemberian timokuinon (El-Gazzar *et al.*, 2007; Salem, 2005) atau aktivasi limfosit Th1/Th2 (Badr *et al.*, 2011; Majdalawieh *et al.*, 2010) dan sel T sitotoksik (Salem *et al.*, 2011).

**Uji Aktivitas ROI**

Hasil pengamatan aktivitas sekresi ROI pada makrofag mencit yang terinfeksi *Listeria* pada hari ke-14, ke-16, dan ke-17 disajikan pada Gambar 3.

Gambar 3 menunjukkan bentuk dan aktivitas makrofag dalam menyekresi ROI yang diamati dengan metode NBT *reduction assay*. Makrofag yang aktif memiliki bentuk yang lebih besar dengan warna yang lebih gelap. Hasil uji aktivitas makrofag dalam menyekresi ROI disajikan pada Tabel 4.

Pada Tabel 4 terlihat bahwa makrofag peritoneum mencit yang terinfeksi *L. monocytogenes* dari kelompok hewan uji baik kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol negatif mampu menyekresi ROI. Kelompok perlakuan memiliki aktivitas sekresi ROI lebih tinggi dari kelompok kontrol negatif. Dari Gambar 3 diketahui bahwa pada hari ke nol sekresi ROI paling tinggi kemudian menurun pada hari kedua pasca-infeksi dan kembali meningkat pada hari ketiga pasca-infeksi. Hasil uji ANAVA sekresi ROI pada hari ke nol infeksi *monocytogenes* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok ( $P<0,05$ )



**Gambar 3.** Pemeriksaan sekresi ROI dengan metode NBT pada kelompok kontrol negatif (A) dan kelompok eksperimen (B). Makrofag yang aktif ditunjukkan dengan ukuran yang lebih besar, bentuk sel dengan kaki-kaki yang memanjang dan dengan warna sel yang lebih gelap sedangkan sel yang tidak aktif tampak bulat dengan lebih kecil dan tampak lebih terang karena tidak menyekresi ROI. Sel yang menyekresi ROI dengan pewarnaan *Neutral red* terbentuk warna coklat kehijauan (ditunjukkan oleh panah). Diamati dengan pembesaran 400x

**Tabel 4.** Rerata persentase makrofag yang menyekresi ROI pada peritoneum mencit jantan yang diinfeksi *Lysteria monocytogenes* (dalam %) setiap kelompok perlakuan pada hari ke-14, 16, dan 17

Perlakuan	Rerata makrofag yang menyekresi ROI (%) ROI $\pm$ SD) pada hari		
	ke-14	ke-16	ke-17
Kontrol negatif	2,00 $\pm$ 0,58*	1,33 $\pm$ 0,58*	1,33 $\pm$ 0,58*
Kontrol positif	31,33 $\pm$ 4,93	8,33 $\pm$ 0,58	48,00 $\pm$ 4,00
EEBJH dosis 1 mg/kg bobot badan	24,33 $\pm$ 3,51*	7,33 $\pm$ 0,58	16,33 $\pm$ 1,53*
EEBJH dosis 5 mg/kg bobot badan	51,00 $\pm$ 2,00**	15,67 $\pm$ 4,16**	37,00 $\pm$ 9,00*
EEBJH dosis 25 mg/kg bobot badan	46,33 $\pm$ 1,53**	11,00 $\pm$ 2,00**	15,67 $\pm$ 3,06*
EEBJH dosis 125 mg/kg bobot badan	17,33 $\pm$ 2,08*	8,00 $\pm$ 2,00	14,33 $\pm$ 0,58*

EEBJH= Ekstrak etanol biji jintan hitam, ROI= *reactive oxygen intermediates*, \*\*= Lebih tinggi dari kontrol positif dengan  $P < 0,05$ ; \*= Lebih rendah dari kontrol positif dengan  $p < 0,05$

dengan nilai signifikansi 0,000. Aktivitas sekresi ROI kelompok perlakuan lebih tinggi dari pada aktivitas sekresi ROI kelompok kontrol negatif ( $P < 0,05$ ). Aktivitas sekresi ROI kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ( $P > 0,05$ ). Aktivitas sekresi ROI pada kelompok dosis 1 mg/kg bobot badan EEBJH menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan aktivitas sekresi ROI kelompok kontrol positif ( $P > 0,05$ ). Kelompok uji dosis 5 dan 25 mg/kg bobot badan EEBJH memiliki persentase sekresi ROI lebih besar dibandingkan kelompok kontrol positif. Kelompok 125 mg/kg bobot badan EEBJH memiliki persentase sekresi ROI lebih rendah dari kelompok kontrol positif ( $P < 0,05$ ). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok uji dosis 5 dan 25 mg/kg bobot badan memiliki daya imunostimulansia yang lebih besar dari pada kontrol positif. Kelompok uji dosis 1 mg/kg bobot badan EEBJH memiliki daya imunostimulansia sama dengan kontrol positif sedangkan kelompok uji dosis 125 mg/kg bobot badan EEBJH memiliki daya imunostimulansia lebih rendah dari kontrol positif.

Pada penelitian ini telah terbukti bahwa pemberian EEBJH dapat meningkatkan aktivitas makrofag dalam menyekresi ROI, yang kemungkinan dapat mengeliminasi infeksi bakteri intraseluler yaitu *L. monocytogenes*. Namun tidak menutup kemungkinan pemberian EEBJH dapat meningkatkan respons imun terhadap infeksi bakteri lainnya.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa EEBJH berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis makrofag yang diukur dari kemampuan makrofag memfagositosis partikel

lateks, disamping itu EEBJH juga meningkatkan aktivitas sekresi ROI makrofag. Efek imunostimulansia EEBJH dibuktikan dengan meningkatnya aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag pada kelompok perlakuan. Peningkatan aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag ini bisa disebabkan karena kandungan aktif dari BJI, terutama timokuinon, mampu meningkatkan aktivitas makrofag melalui TLR-4 (Badr *et al.*, 2011; Finlay *et al.*, 2010b). Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag dan dalam menyekresi ROI diduga melalui mekanisme langsung yaitu peningkatan aktivitas TLR-4. Mohany *et al.* (2012) melaporkan hasil penelitian pengaruh timokuinon terhadap respons imun pada tikus albino yang diinduksi agen imunotoksik imidakloprid. Melalui aktivasi reseptor TLR-4 timokuinon bersifat memacu inflamasi dengan meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi, interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-12 dan *tumor necrosis factor* (TNF)  $\alpha$  dan meningkatkan aktivitas fagositosis serta sekresi ROI sehingga respons imun anti-infeksi meningkat. Amith *et al.* (2010) menunjukkan aktivasi sialidase Neu1 dalam pengaturan aktivasi TLR-4 pada makrofag. Lebih jauh Finlay *et al.* (2010a) menunjukkan bahwa aktivasi sialidase Neu1 TLR-4 mengaktifkan NF $\kappa$ B dan menginduksi makrofag untuk menghasilkan sitokin pro-inflamasi.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa pemberian EEBJH (*Nigella sativa*, Lour) dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag mencit jantan galur Swiss setelah infeksi *L.*

*monocytogenes*. Dosis 5 mg/kg bobot badan EEBJH memiliki efek tertinggi dalam peningkatan aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag mencit Swiss yang diinfeksi *L. monocytogenes*.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan UAD dan staf LPP yang telah memberikan bantuan dana penelitian. Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada Pimpinan LPPT UGM yang telah memberikan fasilitasi tempat dan alat untuk penelitian.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abu-Al-Basal, M.A. 2009. In vitro and in vivo anti-microbial effects of *Nigella sativa* Linn. Seed extracts against clinical isolates from skin wound infection, *Am. J. Applied Sci.* 6(8):1440-1447.
- Akrom, 2004. Efek ekstrak etanol Herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) terhadap Respon Imun Seluler Mencit Galur SWISS Jantan Selama Dinfeksi *Plasmodium berghei*: Studi Immunomodular Fitokimia. Tesis. Pasca Sarjana UGM. Yogyakarta.
- Akrom, L.N. Nurani, dan T. Hidayati. 2008. Kajian aktivitas imunomodulator agen kemopreventif isolate aktif ekstrak *N. sativa* pada kanker payudara akibat paparan DMBA pada tikus putih, *Laporan Penelitian*, LPP UAD, Yogyakarta
- Akrom, Mustofa, S. Mubarika, dan H.N.E. Setyanto. 2013. The Chemopreventive and immunomodulator effect of black cumin seed oil (BCSO) on Sprague dawley (SD) rat induced by dimethyl benzantracene (DMBA); *Proceeding Enhancing International Collaborative Research on Education, Sciences, and Humanities*; Naga City, Philippines.
- Akrom, N. Khoiri, Y. Suhana, dan Mustofa, 2007. Pengaruh pemberian ekstrak etanol biji Jintan hitam (*N. sativa* Lour) terhadap aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag mencit jantan galur Balb C secara *in vitro*. *Seminar Nasional Tanaman Obat dan Obat Tradisional*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Badan Litbang Kesehatan, Departemen Kesehatan RI, Solo:141-156.
- Al-Qurashi, A.R., N. Akhtar, S. Al-Jabre, O. AL-Akloby, and M.A. Randhawa. 2007. Anti-Fungal Activity of Thymoquinone and Amphotericin B Against *Aspergillus Niger*, *Scientific Journal of King Faisal University* (Basic and Applied Sciences). 8(1):143-148.
- Amith, S.R., P. Jayanth, T. Finlay, S. Franchuk, A. Gilmour, S. Abdulkhalek, and M.R. Szwczuk. 2010. Detection of Neu1 sialidase activity in regulating Toll-like receptor activation. *J. Vis. Exp.* 43:2142.
- Backer, C.A. and R.C.B. Van Den Brink. 1965. *Flora of Java*. Vol I. Noordoff Groninen, The Netherland.
- Badr, O.G., S. Alwasel, H. Ebaid, M. Mohany, and I. Alhazza. 2011. Perinatal supplementation with thymoquinone improves diabetic complications and T cell immune responses in rat offspring. *Cell Immunol.* 267(2):133-140.
- Baratawidjaya, K.G. 2006. *Imunologi Dasar*. Edisi ketiga. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Burke, T.P., A. Leukitcheva, J. Zemansky, and R. Wheeler. 2014. *Listeria monocytogenes* is resistant to lysozyme through the regulation, not the acquisition, of cell wall-modifying enzymes. *Journal Of Bacteriology.* 196(21):2756-67.
- Depkes RI. 2000. *Pedoman Pelaksanaan Pedoman Uji Klinik Obat Tradisional*. Departemen Kesehatan RI., Jakarta.
- Efendi, Z. 2003. Daya Fagositosis Makrofag pada Jaringan Longgar Tubuh. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara, USU. *Digital library*.
- El Gazzar, M.A., R. El Mezayen, M.R. Nicolls, and S.C. Dreskin. 2007. Thymoquinone attenuates proinflammatory responses in lipopolysaccharide-activated mast cells by modulating NF-kappaB nuclear transactivation. *Biochim Biophys Acta.* 1770(4):556-564.
- Finlay, T.M. 2009. Thymoquinone is A Novel Ligand which Activities Neu4 Sialidase to Promote A Pro-Inflammatory Response. *Thesis*. Queen's University, Kingston, Ontario, Canada.
- Finlay, T.M., P. Jayanth, S.R. Amith, A. Gilmour, C. Guzzo, K. Gee, R. Beyaert, and M.R. Szwczuk. 2010b. Thymoquinone from nutraceutical black cumin oil activates Neu4 sialidase in live macrophage, dendritic, and normal and type I sialidosis human fibroblast cells via GPCR Galphai proteins and matrix metalloproteinase-9. *Glycoconj J.* 27(3):329-348.
- Finlay, T.M., S. Abdulkhalek, A. Gilmour, C. Guzzo, P. Jayanth, S.R. Amith, K. Gee, R. Beyaert, and M.R. Szwczuk. 2010a. Thymoquinone-induced Neu4 sialidase activates NFkB in macrophage cells and pro-inflammatory cytokines in vivo. *Glycoconj J.* 27(6):583-600.
- Gali-Muhtasib, H., N. El-Najjar, and R. Schneider-Stock. 2006. The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components. In *Lead Molecules from Nature Products*. M.T.H. Khan and A. Athar (Eds.). Elsevier.
- Hossain, S., E. Sikes-Thurston, S.H. Leppla, and A.N. Wein. 2012. Thymoquinone as a novel antibiotic and chemotherapeutic agent: A natural therapeutic approach on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, and Four NCI-60 Cancer Cell Lines. *The Journal of Experimental Secondary Science.* 2(1):1-4.
- Kanther, M., O. Coskun, and M. Budancamanak. 2004. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzyme Systems and Liver Enzymes in Carbon Tetrachloride-Treated Rats. [www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com).
- Majdalawieh, A.F., R. Hmaidan, and R.I. Carr. 2010. *Nigella sativa* modulates splenocyte proliferation, Th1/Th2 cytokine profile, macrophage function and NK anti-tumor activity. *J. Ethnopharmacol.* 131(2):268-275.
- Mashhadian, N.V. and H. Rakhshandeh. 2005. Antibacterial and antifungal effects of *N. sativa* Extracts against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. *Pak. J. Med. Sci.* 21:147-152.
- Mellawati, D., Sudarsono, dan A.G. Yuswanto, 2010. Pengaruh pemberian ekstrak zat pedas rimpang jahe empirit terhadap fagositosis makrofag pada mencit jantan yang diinfeksi *Listeria monocytogenes*. *Majalah Obat Tradisional.* 15(5):112-120.
- Mohany, M., M. El-Feki, I. Refaat, and O.G. Badr. 2012. Thymoquinone ameliorates the immunological and histological changes induced by exposure to imidacloprid insecticide. *J. Toxicol. Sci.* 37(1):1-11.
- Nickavar, B., F. Mojab, K. Javidnia, and M.A. Amoli. 2003. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *J. Naturforsch.* 58(9-10):629-31.
- Noor, S., H. Goldfine, D.E. Tucker, and S. Suram. 2007. Activation of cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  in resident peritoneal macrophage, by *Listeria monocytogenes* involves Listeriolysin O and TLR-2. *J. Biological Chem.* 283(8):4744-4755.
- Randhawa, M.A. 2011. In vitro antituberculous activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*. *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad.* 23(2):78-81.
- Salem, M.L. 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int. Immunopharmacol.* 5:1749-1770.
- Salem, M.L. and M.S. Hossain. 2000. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *Int. J. Pharmacol.* 22(9):729-40.
- Salem, M.L., F.Q. Alenzi, and W.Y. Attia. 2011. Thymoquinone, the active ingredient of *Nigella sativa* seeds, enhances survival and activity of antigen-specific CD8-positive T cells in vitro. *Br. J. Biomed. Sci.* 68(3):131-7.
- Santosa, S. 2010. *Statistik Parametrik. Konsep dan Aplikasi dengan SPSS*. PT Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Vazquez-Boland, J.A., M. Kuhn, P. Berche, and T. Chakraborty. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiol. Review.* 14:584-640.
- Wahyuniari, I.A.I. 2006. Pengaruh Pemberian Minyak Buah Merah (*Pandanus conoides*, Lam) pada Respon Imun Selular Setelah infeksi *Listeria monocytogenes* (Kajian Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal dan Proliferasi Limfosit Limpa Mencit Balb/C). *Thesis*. Sekolah Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Wijayanti, M.A. 2000. Sekresi reactive oxygen intermediates oleh makrofag peritoneum mencit yang diimunisasi selama infeksi *Plasmodium berghei*. *BIK.* 32(2):77-82.

# EKSTRAK ETANOL BIJI JINTAN HITAM (Nigella sativa) MENINGKATKAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG MENCIT...

---

ORIGINALITY REPORT

---

6%

SIMILARITY INDEX

---

## PRIMARY SOURCES

---

1	<a href="http://jurnal.unsyiah.ac.id">jurnal.unsyiah.ac.id</a> Internet	269 words — 5%
2	<a href="http://halshs.archives-ouvertes.fr">halshs.archives-ouvertes.fr</a> Internet	32 words — 1%
3	<a href="http://hal.archives-ouvertes.fr">hal.archives-ouvertes.fr</a> Internet	21 words — < 1%

---

EXCLUDE QUOTES OFF

EXCLUDE MATCHES OFF

EXCLUDE BIBLIOGRAPHY ON