

EXTRACT ASHITABA (*Angelica keiskei*) IMPROVING THE IMMUNE RESPONSE IL-2 BALB/C MICE VACCINATED WITH RABIES VACCINE

^{1*}Merdana I Made, ¹Sudira I Wayan, ¹Ketut Budiasa, ¹Samsuri

¹Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University, Bali-Indonesia

ABSTRACT

Ashitaba plant (*Angelica keiskei*) is native to Japan that has been developed in Indonesia, has many benefits, as a vegetable and as an immunomodulator. This study aims to determine the ethanol extract effect of Ashitaba leaves (*Angelica keiskei*) to increase immune response IL-2. Balb/C mice were vaccinated with rabies vaccine. Treatment consisted of six points: without Ashitaba (control), giving a dose of 100, 200, 300, 400, and 500 mg/kg orally for 21 days. Each treatment was repeated four times, so there are 24 units for researching. On the 28th day, do the vaccination with rabies vaccine to all groups of mice. On 49th day, the spleen was taken for viewing cultured lymphocytes producing cells. Variables observed are the levels of IL-2 levels of the lymphocyte. The results showed that the extract of Ashitaba can increase levels of IL-2 significantly ($P < 0.05$). Respectively, the average levels of interleukin-2 after treatment Ashitaba extract dose 0; 100; 200; 300; 400, and 500 mg/kg are 1,700; 3,919; 5,218; 8,875; 15,563. The conclusion, Ashitaba ethanol extract can improve the immune response of IL-2 and IFN- γ mice vaccinated with rabies vaccine.

Keywords: Ashitaba; Interleukin-2; Immune; lymphocyte

*Correspondence: Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University, Bali-Indonesia, Email : imade_merdana@unud.ac.id

PENDAHULUAN

Ashitaba yang mempunyai nama ilmiah *Angelica keiskei koidzumi*, mempunyai multikhasiat, seperti antioksidan dan ampuh mengatasi kanker seperti yang dibuktikan oleh penelitian Okuyama, *et al.*, (2007), peneliti di Fakultas Farmasi di *Meiji University*, Jepang dengan memberikan ekstrak Ashitaba pada tikus pengidap kanker paru dan kanker kulit. Enam bulan berselang, pertumbuhan kanker paru dan kanker kulit berhenti. Hasil ini diperkuat oleh riset Kimura dan Baba (2003) di Fakultas Kedokteran, *Ehime University*, Jepang. Ia memberikan ekstrak akar Ashitaba 100 mg per kg berat badan tikus penderita tumor paru. Pertumbuhan tumor itu terhambat dan tidak terjadi metastasis ke jaringan lain. Senyawa aktif yang berperan menghambat tumor itu *xanthoangelol*, yang menghambat sintesis DNA pada sel-tumor. *Xanthoangelol* juga terbukti ampuh mengobati neuroblastoma atau kanker saraf dan leukemia.

Tabata, *et al.*, (2007) dari *Nihon University*, Jepang, membuktikan *xanthoangelol* bersifat apoptosis atau menyebabkan program kematian sel kanker. Setelah inkubasi selama empat jam terjadi apoptosis sel, yang mana larutan caspase-3 yaitu sejenis protein dalam sel leukemia dan neublastoma menjadi aktif setelah diberi *xanthoangelol*. Penelitian tentang manfaat Ashitaba sebagai imunomodulator terus dilakukan. Beberapa diantaranya telah membuktikan manfaat imunomodulator pada kasus-kasus infeksi virus yang tidak dapat diobati dengan antibiotika. Penelitian lain pada mencit *Balb/C* memberikan kesimpulan bahwa pemberian ekstrak Ashitaba juga baik untuk terapi kanker dengan menunjukkan aktivitas antikarsinogenik dan antimutagenik pada penelitian *invitro* (Kimura dan Baba, 2003). Terhadap respon imun spesifik pemberian ekstrak Ashitaba mempunyai efek meningkatkan proliferasi sel limfosit T, meningkatkan sekresi TNF- α , IFN- γ , IL-10 (Zimhizu *et al.*, 2005). Imunitas juga dapat ditingkatkan oleh beberapa senyawa yang berefek antioksidan seperti senyawa fenolik atau polifenol. Senyawa ini diketahui berefek pada peningkatan kemampuan fagositosis (Wahyuniari, 2006)

METODE

Penelitian menggunakan 24 unit penelitian dan dibagi atas enam perlakuan yaitu tanpa Ashitaba (kontrol), pemberian Ashitaba 100, 200, 300, 400, dan 500 mg/kg bb. Cara pemberian dan konsentrasi Ashitaba seperti yang dilakukan oleh Jayatirtha dan Mirsha (2004) serta Parle dan Vasudevan (2007). Masing-masing perlakuan diulang empat kali. Setelah 21 hari pemberian ekstrak Ashitaba, mencit divaksinasi dengan vaksin *rabies*.

Ashitaba (*Angelica keiskei*) diperoleh dari Desa Sembalun, Kabupaten Lombok Timur, Propinsi Nusa Tenggara Barat, Indonesia. Ashitaba yang dipilih adalah daun berwarna hijau tua, utuh, dan segar. Selanjutnya dikumpulkan lalu dicuci dengan air, dikering anginkan. Setelah kering dihancurkan (dirajang) kemudian dihaluskan dengan blender, setelah itu ditimbang sebanyak 1000 gram. Bubuk Ashitaba kemudian direndam dalam 5000 ml pelarut etanol dan diaduk dengan *magnetic stirrer* selama satu jam, kemudian didiamkan selama satu hari pada suhu kamar. Selanjutnya, disaring dengan kertas Whatman no 42 sehingga diperoleh filtrat-1. Ampas yang diperoleh, dilakukan ekstraksi ulang sehingga diperoleh filtrat-2. Filtrat-1 dan filtrat-2 dicampur kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator*.

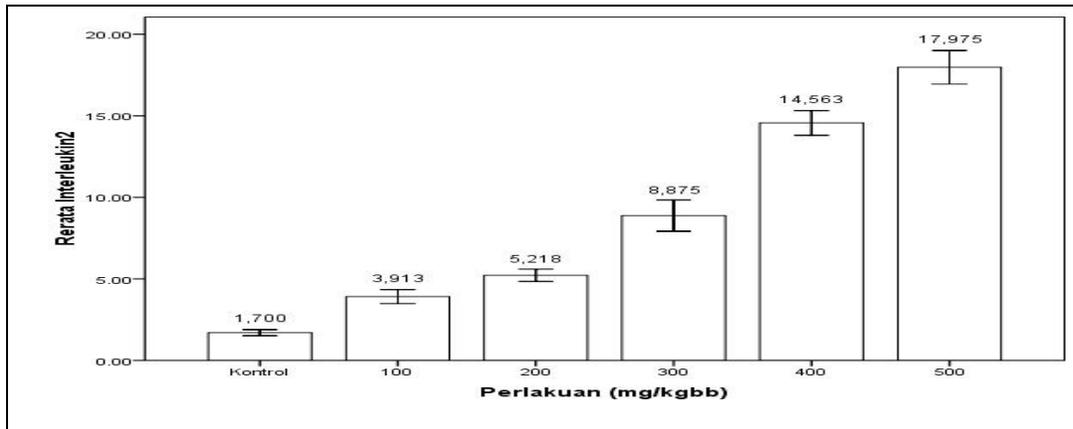
Jumlah IL-2 dalam plasma dan cairan supernatan kultur limfosit ditentukan dengan *Sandwich ELISA* menggunakan IL-2 ELISA *development kit* (R&D system, USA) sesuai dengan prosedur yang dijabarkan oleh pembuat kit. Konsentrasi IL-2 pada setiap sampel kemudian ditentukan dengan regresi logistik dengan 4 parameter logistik dengan mengacu pada grafik protein standar.

Data hasil penelitian diuji normalitasnya pada taraf kemaknaan 5%. Selanjutnya homogenitas data diuji dengan *Levene's test* pada taraf kemaknaan 5%. Jika datanya homogen maka *analisis variant* pada taraf kemaknaan 5% dan jika terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* yang dipakai adalah LSD. Apabila data tidak normal dan tidak homogen akan diuji dengan uji non parametrik uji *Dunnnett's C*.

Perbedaan perlakuan dianalisis dengan *Analisis of Varian* pada taraf kemaknaan 5%. Jika perlakuan menunjukkan perbedaan yang bermakna maka diuji lebih lanjut dengan LSD pada taraf kemaknaan 5%. Semua analisis data dibantu dengan program SPSS versi 17.00.

DISKUSI

Sekresi interleukin-2 yang dihasilkan oleh limfosit diamati dengan cara menghitung spot (limfosit) yang nampak menggunakan ELISPOT pada hari ke-42 (akhir pengamatan). Rerata kadar Interleukin-2 setelah perlakuan ekstrak Ashitaba disajikan pada Gambar 1



Gambar 1. Rerata Interleukin-2 Setelah Perlakuan Ekstrak Ashitaba

Terlihat bahwa rerata Interleukin-2 setelah perlakuan ekstrak Ashitaba dosis 100mg/kgbb, 200mg/kgbb, 300mg/kgbb, 400mg/kgbb dan 500mg/kgbb menunjukkan adanya peningkatan dengan meningkatnya dosis ekstrak Ashitaba yang diberikan. Hasil analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar dosis perlakuan seperti ditunjukkan pada Tabel 5.1.

Kadar interleukin-2 yang disekresikan oleh limfosit diamati dengan cara menghitung spot (limfosit) yang nampak menggunakan ELISPOT pada hari ke-42 (akhir pengamatan). Terlihat pada perlakuan dosis 500mg/kgbb kadar interleukin-2 tertinggi (17,975 pg). Analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian ekstrak Ashitaba mampu meningkatkan kadar IL-2 secara bermakna ($P < 0,05$), dengan kadar tertinggi terdapat pada dosis 500mg/kgbb, yang lebih tinggi secara bermakna ($p < 0,05$) dari dosis 400mg/kgbb (15,563pg), 300mg/kgbb (8,875pg), 200mg/kgbb (5,218pg), 100mg/kgbb (3,913pg) dan dengan kontrol (1,700pg). Hal ini disebabkan karena tanaman Ashitaba merupakan tanaman kaya akan vitamin, mineral, asam amino maupun zat aktif penciri sehingga dapat disebut sebagai tanaman multi fungsi. Menurut Hidaet *al* (2007). Ashitaba mengandung klorofil yang cukup tinggi sehingga dapat meningkatkan produksi darah serta keseimbangan fungsi tubuh. Zat aktif yang terdapat dalam chalcone bermanfaat untuk meningkatkan produksi sel darah merah, meningkatkan pertahanan tubuh untuk melawan penyakit infeksi. IL-2 yang disekresikan oleh limfosit meningkat seiring dengan peningkatan dosis ekstrak Ashitaba yang diberikan. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak Ashitaba mampu menginduksi kekebalan seluler pada hewan coba. Interleukin-2 dihasilkan oleh Limfosit T-penolong tipe-1 (*T-helper/Th-1*). Ketika tubuh terpapar antigen virus rabies yang terdapat dalam vaksin, tubuh akan memproses antigen tersebut. Antigen yang diproses diangkut ke permukaan

sel dan melalui molekul MHC-1 disajikan ke Th-1 yang selanjutnya menghasilkan IL-2 yang memicu perbanyakan sel T termasuk sel T sitotoksik (CD8+) (Abbas, 2003)..

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan bermakna diantara kelompok-kelompok perlakuan, Dapat dilihat bahwa dosis yang memberikan pengaruh pada kadar interleukin-2 mencit (*Mus musculus*) adalah pada semua tingkatan dosis. Pada penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak Ashitaba mampu meningkatkan kadar IL-2 di dalam tubuh. Meningkatnya kadar IL-2 ini akibat adanya rangsangan yang ditimbulkan oleh Ashitaba dan vaksin virus rabies. Ashitaba mampu merangsang makrofag untuk meningkatkan aktivitasnya, sehingga menjadi lebih tanggap terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh. Kemudian virus rabies juga memberikan sinyal yang mampu ditangkap oleh makrofag untuk melakukan migrasi dan melakukan fagositosis. Makrofag ini akan mengeluarkan mediator sel seperti IL-1, IL-2, IL-6, yang merangsang sel makrofag lainnya untuk merespon dan mendekati sumber rangsangan. Pengeluaran IL-2 secara berantai ini akan meningkatkan kadar IL-2 dalam sistem sirkulasi (Roitt *et al*, 2003).

Efek yang ditimbulkan oleh IL-2 adalah memacu perkembangan sel T dari fase G1 ke fase sintesis, merangsang tahap sintesis IL-2 selanjutnya oleh sel T dalam waktu 24 jam setelah teraktivasi akan merangsang pembentukan sitokin lain yaitu interferon gamma dan limfotoksin, juga meningkatkan sintesis p55 yaitu reseptor IL-2 sendiri, meningkatkan pertumbuhan dan fungsi sitolitik sel NK. Oleh karena fungsinya sangat berkaitan dengan sistem imun maka kuantitas sintesis IL-2 sangat menentukan respon imun (Munazir *et al* 2002). Mekanisme meningkatnya aktivitas sel NK dan sel T dengan penambahan IL-2 adalah dengan meningkatkan jumlah reseptor p70-75. Reseptor IL-2 terdiri atas 2 macam protein yaitu polipeptida 55 kD (p55) dan polipeptida yang berkisar antara 70-75 kD (p70-p75). Sel CD4⁺ yang belum teraktivasi memiliki sedikit p70-p75, dan tidak mengandung p55. Bila sel tersebut teraktivasi menyebabkan peningkatan p70-p75 dan ekspresi p55. Afinitas p70-p75 lebih tinggi dibandingkan p55. Tanpa adanya p55 sel yang mengekspresi p70-p75 saja dapat memacu proliferasi sel setengah dari kemampuan maksimum bila dirangsang dengan IL-2 konsentrasi tinggi, sedangkan tanpa p70-p75 sel yang hanya mengekspresi p55 tidak dapat memacu proliferasi sel. Bila kedua reseptor membentuk kompleks maka dapat dirangsang dengan IL-2 konsentrasi rendah (Elfahmi, 2006).

Reseptor IL-2 yang terdapat pada sel NK dan sel T tidak sama, baik pada manusia maupun pada tikus (Raffatellu, *et al*, 2005. Reseptor IL-2 pada sel NK berupa p70-p75, tidak ditemukan adanya p55 sehingga kebutuhan aktivasi sel NK oleh IL-2 selalu tinggi (Elfahmi, 2006). Kenyataan ini dijadikan dasar untuk mengaktivasi sel NK secara *ex vivo* untuk menghasilkan sel LAK (Elfahmi, 2006)

Pengaruh rIL-2 terhadap reseptor IL-2 Pendapat yang menyatakan bahwa pemberian rIL-2 terhadap kultur limfosit yang tidak aktif menyebabkan *upregulation* reseptor IL-2 sehingga limfosit menjadi aktif berlaku pada TIL. Hal ini dibuktikan dari penelitian pada kanker paru dan kolon dengan menambahkan rIL-2 pada biakan TIL yang distimulasi dengan sel tumor otolog. Sel yang mengekspresikan reseptor IL-2, 16 jam setelah pemberian IL-2, 65% di antaranya adalah sel yang memiliki molekul permukaan CD3. Persentase ini jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan persentase sebelum pemberian IL-2 yaitu 3-10% (Bratawidjaya, 2004). Tetapi, bila TIL dengan rIL-2 distimulasi sel allogenik ternyata tidak ada peningkatan persentase reseptor IL-2. Kecilnya persentase sel yang memiliki reseptor IL-2 menunjukkan kecilnya jumlah limfosit yang aktif (Bratawidjaya, 2004).

Fungsi imunomodulator adalah memperbaiki sistem imun yang terganggu (imunostimulan) atau menekan/menormalkan reaksi imun yang abnormal (imunosupresan). Dikenal dalam golongan imunostimulan biologis dan sintetik.

KESIMPULAN

Ekstrak Ashitaba (*Angelica keiskei*) dapat meningkatkan jumlah sel yang menghasilkan Interleukin-2 yang lebih tinggi pada mencit Balb/C yang divaksin rabies.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., and Lichtman, A.H. 2003. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. WB Saunders Company Saunders, Philadelphia. 19-347.
- Bratawijaya, K.G., 2004. Pemeriksaan Sistem Imun, Dalam Immunologi Dasar, Edisi ke-4, Balai Penerbit FK Universitas Indonesia; p: 275-302.
- Elfahmi, 2006, Phytochemical and Biosynthetic Studies of Lignans, With a Focus on Indonesian Medicinal Plants (Dissertation), University of Groningen
- Hida, Y., Pandey, Place, A., Sporn, M.B., Gribble, G. W., Honda T., Kharbanda, S. and Kufe, D., 2000. The Novel Triterpenoid 2-Cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic Acid Induces Apoptosis of Human Myeloid Leukemia Cells by a Caspase-8-dependent Mechanism. Cell Growth & Differentiation. Vol. 11, 261–267.
- Jayathirtha, M. G., and Mishra, S. H., 2004. Preliminary Immunomodulatory Activities of Methanol Extracts of *Eclipta alba* and *Curcuma zedoaria*. Phytomedicine 11: 361–365, <http://www.elsevier.de/phymed>
- Kimura, P., Baba, K., 2003, Antitumor and Antimetastatic Activities of *Angelica keiskei* Roots Int. J Cancer :106, 429-437.
- Munazir, Z., 2003 Manfaat Pemberiaan Ekstrak *Phyllanthus niruri* Sebagai Immunostimulator Pada Penyakit Infeksi Anak. Available from URL: <http://www.trial.mil.id/cakrawala.php3.12.1.2012>
- Okuyama, T., Takata, M., Takayasu, J., Hasegawa, T., Tokuda, H., Nishino, A., 2007. Antitumor Promotion by Principles Obtained from *Angelica keiskei*. Planta medica, 57(3), 242-246
- Parle, M., and Vasudevan, M., 2007. Memory Enhancing Activity of Abana® An Indian Ayurvedic Poly-Herbal Formulation. Journal of Health Science, 53(1) pp. 43-52
- Roit, P. H., and Edington, N., 1985. Veterinary Viruses. London: The Burlington Press.
- Zimhizu, E., Hayashi, A., Takashi, R., Aoyagi, Y., Murakami, T., Kimota, K., 2005 Effect of angiotensin L Converting enzyme inhibitor from Ashitaba (*Angelica keiskei*) on blood

pressure of spontaneously hypertensive rats, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* (Tokyo), 45 (3), 375-385.

Tabata, K., Morita, N., Baba, K., Hata, K., 2007 The Structure of Xantoangelol, a new chalcone from the root of *Angelica keiskeikoidzumi* (umbel ifray). *Chem pharm Bull* (Tokyo), 25;515-6

Trivedi, J. C., Bariwal, J., Upadhyae, K.D., Naliapara, Y.T., Soshi, S.K., Panncouque, C.C., De Clereq, Shan, A.K, 2007. Improved and rapid synthesis of new coumarinyl chalcone derivat and thair antiviral activity, *Tetrahedrone Lett.*, 48,8472-8474.

Wahyuniari, I.A.I., 2006, Pengaruh Buah Merah (*Pandanus conoideus*, Lam) pada Respon Imun Selluler Setelah Infeksi *Listeria monocytogenus* (Kajian Aktifitas Fagositosis Makrofag Peritoneal dan Proliferasi Limfosit –Limfa Mencit Balb/C) Tesis Program Pascasarjana Universitas Gajah mada, Yogyakarta.