



## POTENSI DAUN ASHITABA (*ANGELICA KEISKEI*) SEBAGAI OBAT ANTI VIRUS DILIHAT DARI RESPON KEKEBALAN SELULER PADA MENCIT *BALB/C*

Sudira I Wayan<sup>1)</sup>, Merdana I Made<sup>2)</sup>

1) Laboratorium Farmakologi Veteriner, 2) Laboratorium Farmasi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

E-mail : wayansudiradrh@yahoo.com

### ABSTRACT

*Ashitaba Plant (Angelica keiskei) is a plant that natively from Japan and it has been developed in Indonesia. The plant has been reported to have many benefits, some of them as a vegetable and as immunomodulator.*

*This study aims were to determine effects of ethanol extract of Ashitaba leaves (Angelica keiskei) in increasing immune response IL-2, IFN- Balb/C in mice that were vaccinated with rabies vaccine.*

*This study used a simple completely randomized design. Treatment consisted of six groups : without Ashitaba (control), giving a dose of 100 Ashitaba; 200; 300; 400, and 500 mg / kg orally for 21 days. Each treatment was repeated four times, theretores there were 24 units in this research. On the 28th day, the vaccination with rabies vaccine was applied to all groups of mice. On 42th day, the spleen was taken for cultured lymphocytes producing cells. Variables that observed were the levels of IL-2 and IFN levels of the lymphocyte.*

*The results showed that the extract of Ashitaba significantly increased IL-2 level ( $p < 0.05$ ). The average levels of interleukin-2 after treated with Ashitaba extract dose 0; 100; 200; 300; 400, and 500 mg/kg / mm, were 1,700 pg, 3,919 pg, 5,218 pg, 8,875 pg, 15,563 pg respectively. Gammainterferon was also increased as incread in aline with the dose of Ashitaba extract that being given. Statistically, it showed significant difference ( $p < 0.05$ ), except comperation at doses 400 and 500 was not significant ( $p > 0.05$ ). The average control levels of interferon gamma were 13, 534pg, 100mg/kgbb dose (15,222 pg), dose 200mg/kgbb (15,745 pg), dose 300mg/kgbb (16,749 pg), dose 400mg/kgbb (17,116 pg) and dose 500mg/kgbb (17,278 pg).*

*In conclusion, Ashitaba ethanol extract can improve the immune response of IL-2 and IFN- in mice that vaccinated with rabies vaccine.*

**Keywords:** *Ashitaba, Interleukin-2, Interferon- , Rabies*

### ABSTRAK

*Tanaman Ashitaba (Angelica keiskei) adalah tanaman asli Jepang yang sudah dikembangkan di Indonesia, memiliki banyak manfaat yaitu sebagai sayur dan sebagai imunomodulator.*

*Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun Ashitaba (Angelica keiskei) terhadap peningkatan respon kekebalan IL-2, IFN- mencit Balb/C yang divaksinasi dengan vaksin rabies.*

*Penelitian ini memakai rancangan acak lengkap sederhana. Perlakuan terdiri atas enam yaitu tanpa Ashitaba (kontrol), pemberian Ashitaba dosis 100; 200; 300; 400; dan 500 mg/kgbb selama 21 hari melalui oral. Masing-masing perlakuan diulang empat kali, sehingga terdapat 24 unit penelitian. Pada hari ke-28 dilakukan vaksinasi dengan vaksin rabies terhadap semua kelompok mencit. Pada hari ke-42 diambil organ limpa untuk dikultur dengan tujuan melihat sel penghasil limfosit. Variabel yang diamati yaitu kadar IL-2 dan kadar IFN dari limfosit tersebut.*

*Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak Ashitaba mampu meningkatkan kadar IL-2 secara bermakna ( $P < 0,05$ ). Rerata kadar interleukin-2 setelah perlakuan ekstrak Ashitaba dosis 0; 100; 200; 300; 400; dan 500 mg/kgbb, berturut-turut adalah 1,700pg, 3,919pg, 5,218pg, 8,875pg, 15,563pg. Interferon gamma juga menunjukkan adanya peningkatan seiring dengan peningkatan dosis ekstrak Ashitaba yang diberikan, dan secara statistic menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ), kecuali antara dosis 400 dan 500 tidak bermakna ( $p > 0,05$ ). Rerata kadar interferon gamma pada kontrol adalah 13,534pg, dosis 100mg/kgbb (15,222pg), dosis 200mg/kgbb (15,745pg), dosis 300mg/kgbb (16,749pg), dosis 400mg/kgbb (17,116pg) dan dosis 500mg/kgbb (17,278pg).*

*Disimpulkan ekstrak etanol Ashitaba mampu meningkatkan respon kekebalan IL-2 dan IFN- mencit yang divaksinasi dengan vaksin rabies.*

**Kata kunci :** *Ashitaba, Interleukin-2, Interferon- , Rabies*



## PENDAHULUAN

Ashitaba (*Angelica keiskei*), merupakan salah satu jenis imunomodulator yang dapat meningkatkan imunitas pada binatang percobaan (Okuyama, *et al.*, 2007). Penggunaan Ashitaba sebagai imunomodulator terus dikembangkan terutama untuk infeksi bakteri digunakan sebagai terapi pendamping antibiotika (Trivedi *et al.*, 2007). Selain itu, Ashitaba merupakan suatu imunomodulator alami dari jenis tanaman yang tumbuh dengan baik di Indonesia maupun di Jepang dan bagian dunia lainnya, sehingga hal ini perlu dikembangkan dan ditingkatkan kualitasnya. Sejalan dengan hal tersebut peneliti ingin menguji manfaat pemberian Ashitaba pada infeksi yang disebabkan oleh virus.

Ashitaba (*Angelica keiskei*), mempunyai multikhasiat, seperti antioksidan dan ampuh mengatasi kanker seperti yang dibuktikan oleh penelitian Okuyama, *et al.*, (2007). Hasil ini diperkuat oleh riset Kimura dan Baba (2003). Senyawa aktif yang berperan menghambat tumor itu adalah *xanthoangelol*, yang menghambat sintesis DNA pada sel-tumor. *Xanthoangelol* juga terbukti ampuh mengobati neuroblastoma atau kanker saraf dan leukemia. Tabata, *et al.*, (2007) membuktikan *xanthoangelol* bersifat apoptosis setelah inkubasi selama empat jam yang mana larutan caspase-3 yaitu sejenis protein dalam sel leukemia dan neublastoma menjadi aktif setelah diberi *xanthoangelol*.

Penelitian tentang manfaat Ashitaba sebagai imunomodulator 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). Penelitian *invitro* pemberian ekstrak Ashitaba diketahui mempunyai efek terhadap respon imun non spesifik berupa peningkatan fagositosis dan kemotaksis makrofag, kemotaksis netrofil, sitotoksitas sel pembunuh alami (NK), serta aktivasi komplemen. Terhadap respon imun spesifik pemberian ekstrak Ashitaba mempunyai efek meningkatkan proliferasi sel limfosit T, meningkatkan sekresi TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 (Zimhisu *et al.*, 2005).

## METODE

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimen laboratorik yang memakai rancangan acak lengkap sederhana (*Post Test Fully Randomized Design*). 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 metode 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*.

### Sampel Penelitian

Sampel diambil secara acak sistematis dan dihitung berdasarkan rumus Ferderer (Montgomery, 2001). Mencit umur 10 sampai dengan 12 minggu dengan berat badan 25 sampai dengan 30 g, diadaptasikan dengan lingkungan selama dua minggu, lalu diberi ekstrak etanol Ashitaba sesuai dengan perlakuan secara berturut-turut selama 21 hari, pada hari ke-22 divaksinasi dengan vaksin *rabies* secara intraperitoneal, dilakukan pengamatan setiap saat terhadap kesehatan mencit tersebut.

### Tempat dan Waktu Penelitian

Perlakuan pada mencit dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi FKH Universitas Udayana, isolasi dan vaksinasi *rabies*, deteksi IL-2, IFN- $\gamma$  dilakukan di Laboratorium Virologi FKH Universitas Udayana. Waktu penelitian mulai bulan Juni sampai dengan Desember 2012.

### Variabel Penelitian

Sebagai variabel bebas adalah pemberian Ashitaba dalam berbagai dosis (tanpa Ashitaba, diberi Ashitaba 100, 200, 300, 400 dan 500 mg/kg bb/hari) selama 21 hari. Sebagai variabel tergantung adalah

respon imun yaitu: jumlah IL-2, IFN- $\gamma$  mencit, yang diamati minggu ke-4 setelah inokulasi vaksin *rabies*. Variabel yang dikendalikan adalah umur, berat badan, jenis kelamin, makanan, minuman, jenis mencit, kandang, waktu pemberian makan, dan lingkungan.

### **Pembuatan ekstrak Ashitaba**

Ashitaba (*Angelica keiskei*) diperoleh dari Desa Sembalun, Kabupaten Lombok Timur, Propinsi Nusa Tenggara Barat, Indonesia. Daun Ashitaba 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*.

### **Pemberian Ashitaba**

Pemberian Ashitaba dilakukan secara oral. Sebanyak 4 ekor mencit dari perlakuan pertama diberikan 0,5ml aquades steril. Sedangkan pada 4 ekor mencit dari perlakuan ke-2, ke-3, ke-4, ke-5 dan ke-6 diberikan ekstrak etanol Ashitaba masing-masing sebanyak 100, 200, 300, 400 dan 500 mg/kg bb/hari. Semua perlakuan dilakukan selama 21 hari.

### **Inokulasi vaksin *rabies***

Inokulasi vaksin *rabies* dilakukan tiga minggu setelah pemberian Ashitaba. Sebanyak 0,01ml vaksin *rabies* diinokulasikan secara intraperitoneal.

### **Pengukuran produksi IL-2 dan Interferon-**

Pemeriksaan Interleukin-2 dan *Interferon gamma* dilakukan dengan tehnik yang sama yaitu ELISPOT (*R&D system*). ELISPOT merupakan metoda ELISA yang dapat digunakan untuk mendeteksi sel penghasil sitokin atau antibodi. Limfosit diisolasi terlebih dahulu dari organ limpa. Limfosit kemudian dikultur secara *in vitro* dengan kepadatan  $4 \times 10^6$  sel/ml ke dalam mikroplate Elisa yang sebelumnya telah dilekatkan antibodi spesifik. Sel kemudian dirangsang dengan menggunakan *pytohemagglutinin* (PHA) atau peptida tertentu dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18 sampai dengan 40 jam dalam inkubator mengandung CO<sub>2</sub>. Pasca perangsangan mikroplate dicuci dan ditambahkan konjugat berlabel biotin, serta diinkubasikan pada suhu ruang. Setelah pencucian, ditambahkan substrat *streptavidin alkaline phosphatase* dan diinkubasikan di ruang gelap sampai timbul *spot*. Reaksi dihentikan dengan jalan pencucian dengan menggunakan aquades dan mikroplate dikeringkan.

Pembacaan dilakukan dengan cara menghitung *spot* pada *dissection microscope*

### **Prosedur Pemeriksaan**

Jumlah IL-2 dan Interferon- $\gamma$  dalam plasma dan cairan supernatan kultur limfosit ditentukan dengan *Sandwich ELISA* menggunakan IL-2/IFN- $\gamma$  ELISA *development kit* (*R&D system*, USA) Kedalam setiap sumuran plat mikro ELISA ditambahkan 10  $\mu$ l suspensi *mouse anti-human IL-2/IFN- $\gamma$  monoclonal antibodies* dalam PBS dan dibiarkan selama 18 jam pada suhu kamar. Setelah dicuci 3 kali pada PBS, setiap sumuran diblok dengan larutan *bovine serum albumin* 1% dalam PBS dan dibiarkan pada suhu kamar selama 1 jam. Setelah dicuci 3 kali dengan PBS, kedalam setiap sumuran ditambahkan 100  $\mu$ l plasma/cairan supernatan kultur limfosit. Sebagai acuan, ditambahkan pula protein IL-2/IFN- $\gamma$  yang konsentrasinya telah diketahui dan diencerkan berlipatan 2 mulai dari konsentrasi 600 pg per 100  $\mu$ l sampai dengan konsentrasi 4 pg per 100  $\mu$ l. Setelah penambah sampel dan protein standar, plat mikro diinkubasi selama dua jam pada suhu kamar dan kemudian dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali seperti

diatas. Kedalam setiap sumuran lalu ditambahkan 100ul *rabbit anti human IL-2/IFN-* yang dilabel biotin dan diinkubasikan selama dua jam pada suhu kamar. Sebanyak 100 ul *avidin horse radish peroxidase* (Avidin-HRP) dalam 0,1% BSA dalam PBS ditambahkan ke dalam setiap sumuran, diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar, dan dicuci dengan PBS seperti diatas. Sebanyak 100 ul substrat TMB kemudian ditambahkan ke setiap sumuran plat mikro dan dibiarkan dalam suhu kamar selama 20 menit. Tingkat kepekatan substrat kemudian dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 405 nm. Jumlah IL-2/IFN- ditentukan dengan memplot tingkat kepekatan warna (nilai absorban) protein standar terhadap konsentrasinya diplot pada kertas log3. Konsentrasi IL-2/IFN- pada setiap sampel kemudian ditentukan dengan regresi logistik dengan 4 parameter logistik dengan mengacu pada grafik protein standar.

### Analisis Data

Data hasil penelitian diuji normalitasnya dan homogenitas dengan *Levene's test* 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.

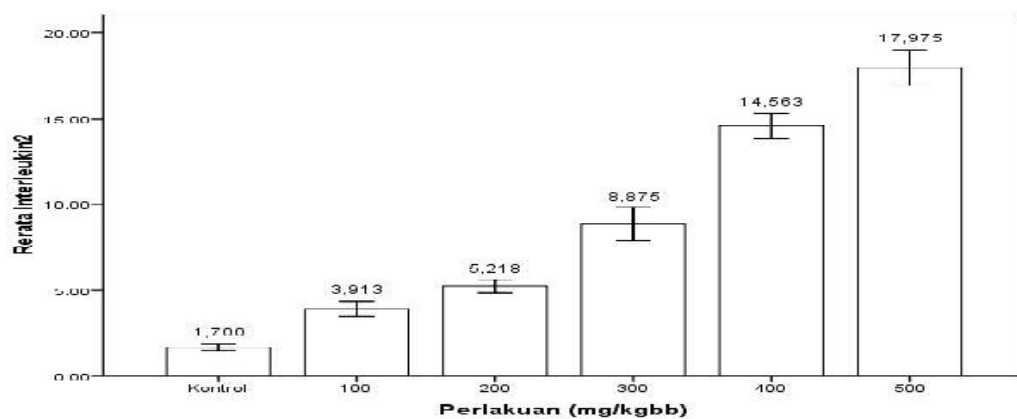
Perbedaan perlakuan dianalisis dengan *Analisis of Varian* pada taraf kemaknaan 5%. Jika perlakuan menunjukkan perbedaan yang bermakna maka diuji lebih lanjut dengan LSD pada taraf kemaknaan 5%. Semua analisis data dibantu dengan program SPSS versi 17.00.

## HASIL

### HASIL PENELITIAN

#### 1 Kadar Interleukin-2 Setelah Perlakuan Ekstrak Ashitaba

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

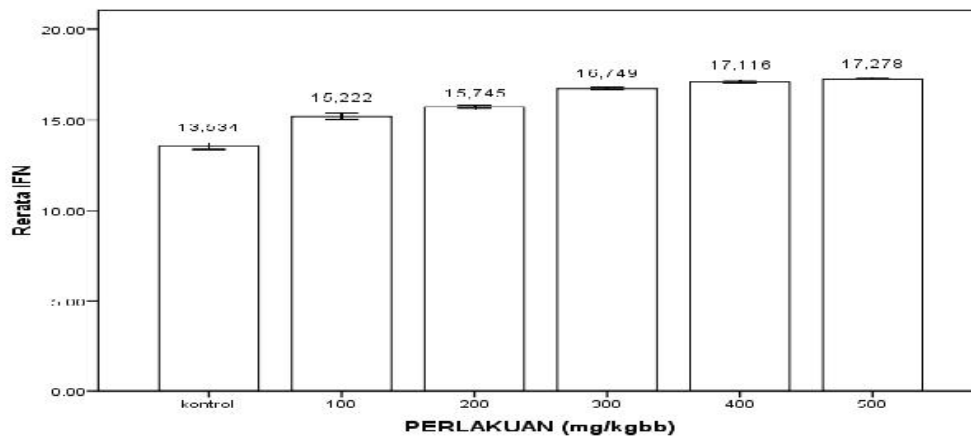


Gambar .1 Rerata Interleukin-2 Setelah Perlakuan Ekstrak Ashitaba

Dari Gambar.1 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 yang diberikan. Hasil analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antar dosis perlakuan.

#### 2. Kadar Interferon Gamma (IFN- ) Setelah Perlakuan Ekstrak Ashitaba

*Interferon gamma* yang dihasilkan oleh limfosit setelah dilakukan pengamatan dengan menggunakan metode ELISPOT disajikan pada Gambar.2



Gambar.2 Rerata Interferon Gamma Setelah Perlakuan Ekstrak Ashitaba

### (Data Ditransformasi ke ln)

Dari Gambar.2 terlihat bahwa rerata Interferon Gamma setelah perlakuan ekstrak Ashitaba dosis 100mg/kgbb, 200mg/kgbb, 300mg/kgbb, 400mg/kgbb dan 500mg/kgbb menunjukkan adanya peningkatan dengan meningkatnya dosis yang diberikan. Hasil analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antar dosis perlakuan, namun antara dosis 400mg/kgbb dengan 500mg/kgbb tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ )

## PEMBAHASAN

### 1. Kadar Interleukin-2 Setelah Perlakuan Ekstrak Ashitaba

Kadar interleukin-2 yang disekresikan oleh limfosit diamati dengan cara menghitung spot dengan uji 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 pada dosis 400mg/kgbb (15,563pg), 300mg/kgbb (8,875pg), 200mg/kgbb(5,218pg), 100mg/kgbb (3,913pg) dan dengan kotrol (1,700pg). Hal ini disebabkan oleh tanaman Ashitaba kaya akan vitamin, mineral.asam amino maupun zat aktif penciri sehingga dapat disebut sebagai tanaman multi fungsi. Menurut Hida (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. Produksi IL-2 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, *et al.* 2003).

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan bermakna diantara kelompok-kelompok perlakuan, penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak Ashitaba mampu meningkatkan kadar IL-2 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. Produksi IL-2 secara berantai ini akan meningkatkan kadar IL-2 dalam sistem sirkulasi (Roitt *et al.*,2003)

Kadar IL-2 meningkat produksinya karena adanya aktivasi makrofag akibat pemberian ekstrak Ashitaba dan adanya rangsangan oleh antigen vaksin virus rabies. Aktivasi makrofag tanpa adanya rangsangan infeksi tidak akan mengakibatkan peningkatan kadar IL-2. Interleukin-2 merupakan glikoprotein dengan berat molekul berkisar antara 14 hingga 17 kD. Sitokin ini terutama dihasilkan oleh sel CD4<sup>+</sup> bila teraktivasi oleh antigen, (Munazir *et al* 2002, WHO, 2005). Fungsi utama IL-2 adalah mempengaruhi sel CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> yang memproduksinya (autokrin) atau pada sel tetangganya (parakrin). 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, serta 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, Anonim, 2003). 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<sup>+</sup> 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, Parry, 2006, Prasetyo, *et al*, 2005).

## 2. Kadar Interferon Gamma ( IFN- ) Setelah Perlakuan Ekstrak Ashitaba

Interferon gamma yang dihasilkan oleh limfosit menunjukkan adanya peningkatan seiring dengan peningkatan dosis ekstrak Ashitaba yang diberikan. Rerata kadar interferon gamma yang dihasilkan terlihat pada kontrol (13,534pg), dosis 100mg/kgbb(15,222pg), dosis 200mg/kgbb(15,745pg), dosis 300mg/kgbb(16,749pg), dosis 400mg/kgbb(17,116pg) dan dosis 500mg/kgbb(17,278)pg. Hasil analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antar dosis perlakuan, tetapi antara dosis 400mg/kgbb dengan dosis 500mg/kgbb tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa antigen mampu menginduksi kekebalan seluler. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Lambot, *et al* (2001) bahwa interferon gamma dapat dihasilkan dalam jumlah besar secara invitro dengan vaksin rabies. Interferon gamma dihasilkan oleh limfosit *T-helper/Th-1*. Antigen vaksin rabies yang diproses didistribusikan ke permukaan sel dan melalui molekul MHC-1 disajikan ke sel T sitotoksik (CD8<sup>+</sup>). Sebagai responnya sel Th-1 akan membelah dan menghasilkan Interferon gamma (IFN- ) (Abass, 2003). Jumlah sel yang mensekresikan sitokin tersebut mengindikasikan aktivitas TH-1 yang secara tidak langsung sebagai indikator kekebalan spesifik rabies yang diperantarai oleh sel T CD8<sup>+</sup>. Adanya sinyal TCD8<sup>+</sup> khas virus rabies dan sitokin yang dihasilkan Th-1 pada mencit (*Mus musculus*) yang disensitasi dengan vaksin rabies akan menghambat replikasi virus rabies dan menghancurkan sel yang terinfeksi virus rabies. Interferon gamma yang disekresikan oleh Th-1 berfungsi untuk mengaktifkan makrofag dan sel NK, yang mampu menghambat penyebaran virus kesekelilingannya, meningkatkan ekspresi molekul MHC-I dan MHC-II, serta menghambat pertumbuhan sel Th-2 (Roitt, *et al*, 2003).

Interferon gamma akan meningkatkan sel T untuk berdiferensiasi. Di sini interferon gamma akan membantu naïve CD4<sup>+</sup> untuk berdiferensiasi ke subset Th-1 dan menghambat proliferasi Th-2 pada percobaan dengan mencit. Efek ini mungkin terjadi karena diperantarai oleh aktivasi sel fagosit mononuclear yang melepaskan IL-12 dan sel-T yang mengekspresikan reseptor IL-12. IFN- juga dibutuhkan untuk maturasi sel T sitotoksik CD8<sup>+</sup> (Munazir, 2002). IFN- berfungsi pada sel B untuk memacu *switching*

ke IgG1 dan IgE. IFN- akan mempengaruhi sub tipe IgG dalam berikatan dengan IFN- pada self fagositosis. Jadi IFN- akan menginduksi respon antibodi yang akhirnya berpengaruh pada eliminasi mikroba oleh fagosit (Munazir, 2002). IFN- $\gamma$  mengaktifkan netrofil untuk melakukan *respiratory burst* meskipun pengaruhnya kalah kuat dibandingkan TNF dan LT (Elfahmi, 2006). IFN- memacu aktivitas sitolitik dari sel NK yang sangat berperan pada imunologi tumor (Stagg, 2006). Peran ekstrak Ashitaba dalam merangsang peningkatan IFN- adalah kemampuannya dalam mempromosi fase induktif dari respon imun.

Interferon gamma juga meningkatkan ekspresi MHC I dan molekul 2 mikroglobulin di permukaan dari berbagai macam tipe sel. IFN- ikut meningkatkan aktivitas sitolitik limfosit T sitolitik (T-CD8+) yang hanya mengenal antigen atau sel target apabila antigen dipresentasikan bersama molekul MHC-1 (Samuel, 2001). Vaksinasi dengan virus rabies menyebabkan asam inti RNA *double stranded* yang merupakan produk samping dari replikasi virus. maka interferon gamma menginduksi dan mengaktifkan enzim 2- 5 *oligoadenilate*. Enzim yang telah diaktifkan mempolimerase ATP menjadi linkeg oligamer yang akan mengaktifkan RNA sel dan selanjutnya RNA sel tersebut mendegradasi RNA *single stranded* dan menghambat dinding sel (Samuel, 2001)

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan hal sebagai berikut :

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

## UCAPAN TERIMA KASIH

Tulisan ini merupakan bagian dari disertasi. Dalam penulisan disertasi penulis dibimbing oleh promotor dan kopromotor, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Prof. Dr.drh I Nyoman Mantik Astawa, PhD, Bapak Prof. Dr .drh. I Made Damriyasa, MS, dan bapak Prof. dr I Gusti Made Aman, SpFK. Dan juga penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada Pemerintah Republik Indonesia yang telah membantu penulis untuk mendapatkan hibah doktor.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., and Lichtman, A.H. 2003. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. WB Saunders Company Saunders, Philadelphia. 19-347.
- Elfahmi, 2006, Phytochemical and Biosynthetic Studies of Lignans, With a Focus on Indonesian Medicinal Plants (Disertation), University of Groningen.
- Jayathirtha MG and Mishra SH. 2004. Preliminary Immunomodulatory Activities of Methanol Extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. Phytomedicine 11: 361–365, <http://www.elsevier.de/phymed>
- Kimura, Y., M. Taniguchi, and K. Baba. 2004. "Antitumor and Antimetastatic Activities of 4-Hydroxyderricine Isolated From *Angelica Keiskei* Roots", Journal Planta Medica, No. 70. Vol. 3, hal. 211-219.
- Lambot, M., Blasco, E., Barrat, J., Cliquet, F., Brochier, B., Renders, C., Krafft, N., Bailly, J., Munier, M., Aubert, M., M.F., Pastoret P.P. 2001. humoral and cell-mediated immune responses of foxes (*Vulpes vulpes*) after experimental primary and secondary oral vaccination using SAG2 and VRG vaccines. Vaccines. 19:1827-1835
- 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



- WHO. 2003. Medicinal Plant and Traditional Medicine in Africa, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Diakses pada Januari 2006.
- Zimhizu, E., Hayashi, A., Takashi, R., Aoyogi, 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.