Potensi Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) Sebagai Imunostimulator pada PBMC Kelinci

The Potential of Soursop (*Annona muricata* Linn.) Leaves Extract As Immunostimulantin Rabbit PBMC

[1]Fedik Abdul Rantam, [1]Lucia Tri Suwanti, [2]Almaedawati Erina

[1]Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
[2]PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampus C. Jl. Mulyorejo Surabaya 60115.
Tlp. 0315992785 Fax. 0315991530
E-mail : vetunair@telkom.net

Abstract

The usage of plant-based tradisional medicine is getting popular because there is minimum risk to health unlike chemical or synthetic drugs. One of the alternative usage of herbal medicine as immunostimulant to increase immune system is by using soursop leaves (*Annona muricata* Linn.). Soursop leaves extract contains *flavanoid* from *flavonol* group which can improve activation and proliferation of T-cell. The aim of this research is to prove that soursop leaves ethanol extract with dosage 5 µg, 15 µg, 25 µg and 50 µg have immunostimulant potensial to increase the expression of T-cell $CD4^+$ and secretion IFNγ in PBMC *White New Zealand* rabbits. The result from immunocytochemistry for $CD4^+$ expression on *White New Zealand* rabbit PBMC culture shows the lowest dosage 5 µg of soursop leaves extract is able to stimulate the expression of T-cell$CD4^+$ (47.64±0.7021) which greatly differs from control group (K), comparative control *Phylantus niruri* extract (P0), and experimental group P2, P3 and P4 ($p \leq 0.05$). The increased number of T-cell $CD4^+$ indicates that *flavonol* in soursop leaves helps to activation macrofag to release IL-12 and TNFα, cytokine TNFα induces NK cell to release IFNγ, IFNγ induces T-cell $CD4^+$. The test for IFNγ amount secretion with ELISA method on *White New Zealand* rabbit PBMC culture show that at the lowest dosage 5 µg soursop leaves ethanol extract is able to increase the amount of secreted IFNγ (353.89±54.04) which greatly differs from control group (K), and experiment P2, P3 and P4 ($p \leq 0.05$), but not significant difference from comparative control with *Phylantus niruri* extract (P0). The increase IFNγ secretion proves that *glycoside flavonol* in soursop leaves ethanol extract induces thymocyte to increase IFNγ transcription.

Keywords : Soursop leaf, *Annona muricata* Linn., Imunostimulator, $CD4^+$, IFNγ

Pendahuluan

Salah satu alternatif penggunaan herbal sebagai imunostimulator untuk meningkatkan respon imun adalah dengan menggunakan daun sirsak (*Annona muricata* Linn.). *Acetogenin* merupakan salah satu bahan aktif yang telah berhasil diisolasi dari daun sirsak dan terbukti dapat membunuh sel kanker seperti kanker hepatoma, *cell line* kanker ovarium, payudara, kandung kemih dan kulit pada dosis yang sangat rendah (Yuan *et al*.,

2003). Ekstrak etanol daun sirsak mengandung senyawa *flavanoid* dari golongan *flavonol* (Takahashi *et al*., 2006). *Flavonol* merupakan ko-pigmen yang banyak tersebar luas di bagian daun (Ideasanti dkk., 1995). *Flavonol* berpotensi sebagai imunostimulan karena mampu meningkatkan produksi IL-2 yang terlibat dalam aktivasi dan proliferasi sel T (Ohashi *et al*., 2003). Daun sirsak dapat dimanfaatkan sebagai imunostimulator yang dapat mempengaruhi mekanisme pertahanan atau sistem imunitas tubuh baik pada sistem imunitas spesifik maupun non spesifik melalui ekspresi sitokin. Peran sitokin sebagai komunikator antar sel khususnya limfosit sangat diperlukan agar reaksi imunologik dapat berjalan.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Dewi dkk (2013) membuktikan bahwa senyawa flavonol yang terkandung dalam daun sirsak dapat menstimulasi peningkatan sintesis IL-2 sehingga terjadi aktivasi dan proliferasi sel T. Penelitian tersebut melaporkan bahwa penggunaan ekstrak etanol daun sirsak secara *in vivo* pada tikus mencit (*Mus musculus*) menggunakan dosis 25, 50 dan 100 mg/kg BB, dan pada dosis paling rendah yaitu 25 mg/kg BB mampu meningkatkan jumlah sel T $CD4^+$ dan $CD8^+$. Senyawa-senyawa flavonol glikosida merupakan glikoprotein asal tanaman yang bersifat mitogenic (Adewole and Ezekiel, 2006). Senyawa mitogenik juga menginduksi sintesis IL-2. Sel T yang terpapar mitogen akan meningkatkan ekspresi mRNA IL-2 dalam waktu 4 jam dan mencapai puncaknya setelah 12 jam. Selanjutnya IL-2 akan menstimulasi proliferasi sel T (Bellanti, 1993).

Hasil penelitian lain juga dilaporkan oleh Rachmawati dkk (2012) dengan menggunakan ekstrak etanol daun sirsak secara *in vitro* pada sel Hela dosis pemberian 25, 50, 100 dan 200 µg/ml, dan pada dosis 200 µg/ml dapat menginduksi apoptosis sel Hela dan meningkatkan ekspresi p53 sel Hela dengan lama pemaparan 24 dan 48 jam. Pengujian potensi ekstrak etanol daun sirsak sebagai imunostimulator secara *in vivo* maupun *in vitro* telah banyak dilakukan, namun hingga saat ini belum diketahui potensi ekstrak etanol daun sirsak sebagai imunostimulator terhadap ekspresi sel T $CD4^+$ dan sekresi IFNγ secara *in vitro* menggunakan PBMC (*Pheriperal Blood Mononuclear Cells*) kelinci *White New Zealand*.

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Dewi dkk (2013) tentang potensi ekstrak etanol daun sirsak secara *in vivo* maupun penelitian yang telah dilakukan oleh Rachmawati dkk (2012) dengan menggunakan ekstrak etanol daun sirsak secara *in vitro*, tersebut di atas, menunjukkan adanya aktivitas imunostimulator daun sirsak dalam meningkatkan jumlah sel T $CD4^+$ dan $CD8^+$. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi ekstrak etanol daun sirsak dengan dosis ≤ 50 µg, sebagai imunostimulator terhadap ekspresi sel T $CD4^+$ dan sekresi IFNγ secara *in vitro* menggunakan PBMC kelinci *White New Zealand*.

Materi dan Metode Penelitian

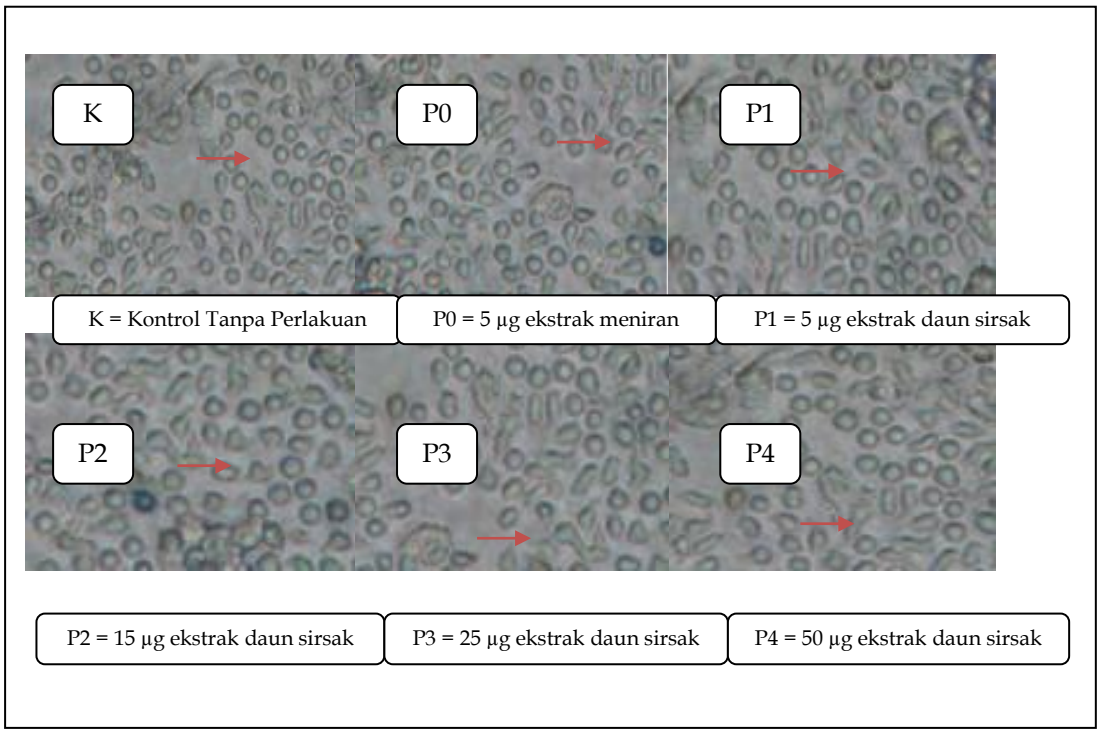
Populasi penelitian ini adalah kultur sel PBMC dari kelinci *White New Zealand* sehat, berumur 2-3 bulan dengan berat kurang lebih 1 kg. Prosedur isolasi PBMC, darah tepi kelinci diambil secara aseptik dari vena auricularis dengan spuit sebanyak 10 ml. Besar sampel 30 sel kultur PBMC yang ditanam pada media (α-MEM; FBS 10%; penisilin streptomisin 1/1000 IU, fungisol). Kelompok penelitian dibagi menjadi enam yaitu kelompok kontrol tanpa perlakuan (K), kelompok kontrol pembanding ekstrak meniran (P0), kelompok perlakuan pertama (P1), perlakuan kedua (P2), perlakuan ketiga (P3) dan perlakuan keempat (P4) menggunakan ekstrak etanol daun sirsak, dengan masing-masing lima ulangan (Soegiyono, 2010). Sebelum diberikan perlakuan, sel PBMC di tanam sebanyak

0,3 ml pada media kultur (α-MEM; FBS 10%; penisilin streptomisin 1/1000 IU, fungisol) dan di inkubasi pada inkubator temperatur 37°C, 5% CO_2 selama 24 jam. Ekstrak etanol daun sirsak dilakukan pengenceran menggunakan DMSO 0,01%, kelompok kontrol tanpa perlakuan (K) diberikan 5 µl DMSO 0,01%, kelompok kontrol pembanding 5 µg ekstrak meniran (P0), kelompok perlakuan pertama (P1) 50 µl (konsentrasi ekstrak 5 µg), perlakuan kedua (P2) 150 µl (konsentrasi ekstrak 15 µg), perlakuan ketiga (P3) 250 µl (konsentrasi ekstrak 25 µg) dan perlakuan keempat (P4) 500 µl (konsentrasi ekstrak 50 µg). Secara hati-hati diinokulasikan pada kultur sel PBMC kelinci *White New Zealand* dan di inkubasi pada inkubator temperatur 37°C, 5% CO_2 selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan ekspresi sel T $CD4^+$ menggunakan teknik imunositokimia dan pemeriksaan kadar sekresi IFNγ menggunakan teknik ELISA. Data hasil penelitian, meliputi ekspresi sel T $CD4^+$dan sekresi IFNγ setelah pemberian dosis ekstrak etanol daun sirsak, dianalisis menggunakan ANOVA dan dilanjutkan uji Duncan.

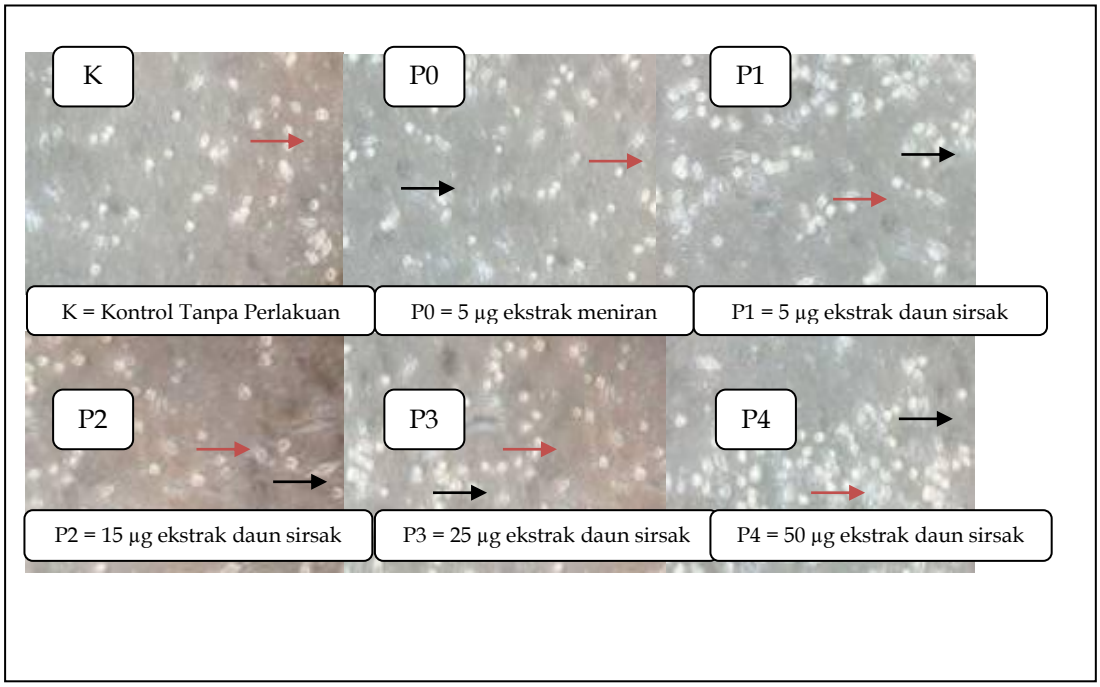
Hasil dan Pembahasan

Ekspresi Sel T $CD4^+$

Daun sirsak mengandung *flavonol* yang dapat menstimulasi peningkatan sintesis IL-2 sehingga terjadi aktivasi dan proliferasi sel T (Dewi dkk., 2013). Perkembangan kultur sel PBMC bisa menjadi salah satu indikasi potensi imunostimulasi suatu bahan. Sel induk mesenkim (*mesenchymal stem cell*) pada kultur PBMC menandakan komunikasi aktif antar sel (Rantam, 2005). Kultur sel PBMC setiap perlakuan dapat dilihat pada Gambar 1. dan Gambar 2. Limfosit dengan ekspresi antigen *Cluster Differentiation* sekarang banyak digunakan dalam pengobatan klinis dan eksperimental imunologi. Sebagian besar sel T-*helper* mengekspresikan protein permukaan $CD4^+$, sedangkan CTL mengekspresikan protein permukaan $CD8^+$ (Karnen dkk., 2003).



Gambar 1. Kultur sel PBMC kelinci *White New Zealand* hari pertama (inkubasi 24 jam). Perbesaran 400x. Tanda panah merah (⟶) menunjukkan sel PBMC.



Gambar 2. Kultur sel PBMC kelinci *White New Zealand* hari ketiga (48 jam pasca penambahan perlakuan). Perbesaran 40x. Tanda panah merah (⟶) menunjukkan sel PBMC. Tanda panah hitam (⟶) menunjukkan sel induk mesenkim.

Potensi ekstrak etanol daun sirsak melalui aktivasi sistem imun spesifik dapat diamati berdasarkan ekspresi sel T $CD4^+$. Rata-rata dan simpangan baku potensi ekstrak daun sirsak dalam persen terhadap ekspresi $CD4^+$ dengan menggunakan metode imunositokimia, ditunjukkan pada Tabel 1. dan hasil uji imunositokimia yang menunjukkan jumlah ekspresi sel T $CD4^+$ (%) ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 1. Rata-rata dan simpangan baku potensi ekstrak daun sirsak terhadap ekspresi $CD4^+$ dan sekresi IFNγ

No.	Perlakuan	Ekspresi $CD4^+$ dalam %	Kadar IFNγ dalam pg/ml
1	K (kontrol tanpa perlakuan)	$14,7^{a}$±0,4472	$23,82^{a}$±7,19
2	P0 (5µg ekstrak meniran)	$51,44^{c}$±2,4110	$389,82^{bc}$±20,96
3	P1 (5µg ekstrak daun sirsak)	$47,64^{b}$±0,7021	$353,89^{b}$±54.04
4	P2 (15µg ekstrak daun sirsak)	$61,28^{d}$±0,9311	$515,68^{d}$±106,08
5	P3 (25µg ekstrak daun sirsak)	$63,22^{e}$±0,5215	$454,96^{cd}$±64,83
6	P4 (50µg ekstrak daun sirsak)	$62,84^{e}$±0,1817	$448,82^{cd}$±47,47

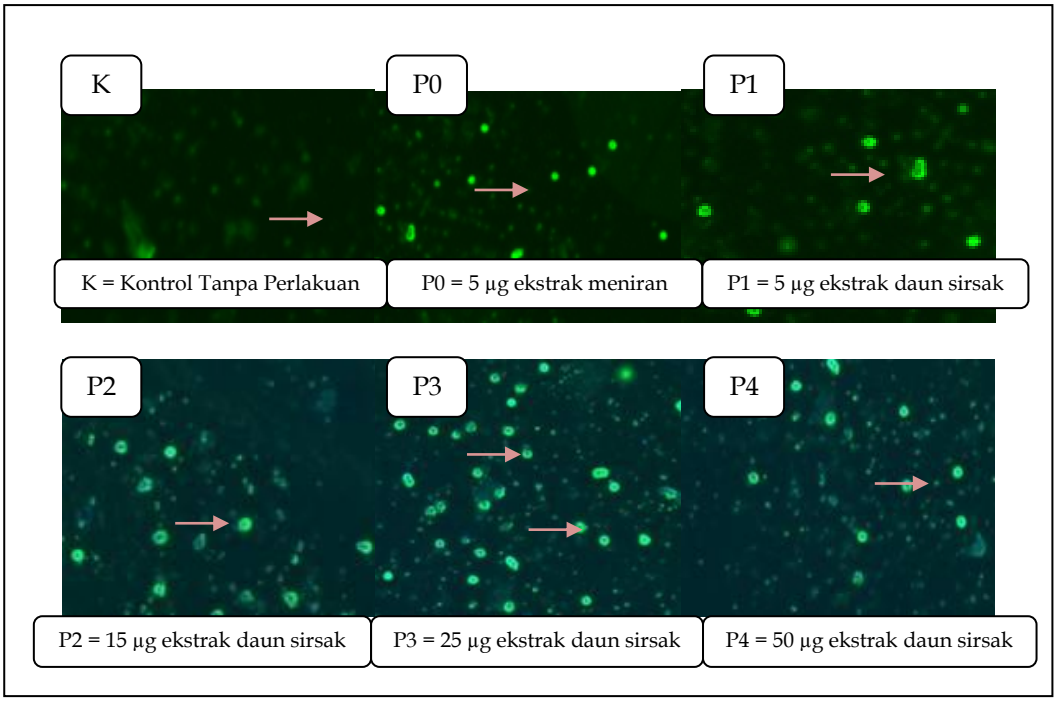
Keterangan : Superskrip berbeda artinya berbeda nyata

Tabel 2. Hasil uji imunositokimia menunjukkan jumlah ekspresi sel T $CD4^+$ (%)

Perlakuan \ Ulangan	1	2	3	4	5
K	15	15	15	14	14,5
P0	49,8	50,2	55,2	49,5	52,2
P1	47,8	48,2	48,2	46,5	47,5
P2	60	62,6	61,1	61,2	61,5
P3	64	62,8	63,4	63,2	62,7
P4	63	62,6	62,9	63	62,7

Keterangan : Jumlah per *well* 2 x 10^5 sel

Hasil uji imunositokimia pengamatan dengan menggunakan mikroskop fluoresent ekspresi sel T $CD4^+$ dari masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan ditunjukkan pada Gambar 3.



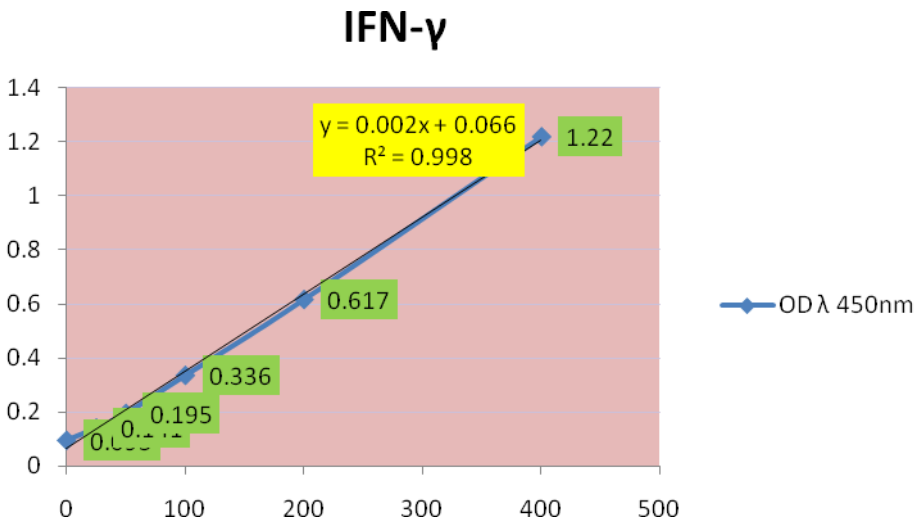
Gambar 3. Hasil ekspresi $CD4^+$ pada sel PBMC tiap perlakuan, diamati menggunakan mikroskop fluoresent perbesaran 40x. Positif berpendar warna hijau, ditunjukkan panah merah muda (⟶).

Berdasarkan uji ANOVA menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak dapat meningkatkan jumlah ekspresi sel T $CD4^+$ secara nyata, rata-rata antar dosis perlakuan cenderung meningkat dibandingkan (K) kontrol. Perhitungan dilanjutkan dengan analisis *post hoc* dengan uji Duncan, didapatkan hasil bahwa kelompok perlakuan P1, P2, P3 dan P4 dengan dosis 5, 15, 25 dan 50 µg ektrak etanol daun sirsak

memiliki perbedaan yang signifikan dibanding kontrol negatif (K) dan kontrol pembanding ekstrak meniran (P0). Peningkatan jumlah sel T $CD4^+$ mengindikasikan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sirsak bersifat imunostimulan. Hal ini diduga senyawa *flavonol* dalam daun sirsak berfungsi untuk mengaktivasi makrofag untuk mengeluarkan IL-12 dan TNFα, sitokin TNFα akan menginduksi sel NK untuk menghasilkan IFNγ, dengan adanya IFNγ dapat menginduksi sel T yang mengekspresikan $CD4^+$. IL-12 akan menginduksi limfosit T $CD4^+$ untuk menghasilkan sitokin IL-2, selanjutnya IL-2 akan menstimulasi proliferasi sel T (Ohashi *et al*., 2003).

Kadar Sekresi Interferon Gamma (IFNγ)

Hasil pemeriksaan kadar sekresi IFNγ dengan menggunakan metode ELISA pada kultur PBMC 48 jam inkubasi pasca penambahan ekstrak etanol daun sirsak, rata-rata dan simpangan baku potensi ekstrak daun sirsak dalam pg/ml terhadap sekresi IFNγ, ditunjukkan pada Tabel 1. Nilai *Optimum Density* (OD) dan Kadar IFNγ ELISA ditunjukkan pada Tabel 3.



Tabel 3. Nilai *Optimum Density* (OD) dan Kadar IFNγ ELISA

No	Standard & Sampel	Kadar (pg/ml)	OD λ 450nm	Dilusi	Kadar IFNg (pg/ml)
1	Standard 1	0	0.095		N : 0-188.9
2	Standard 2	25	0.141		
3	Standard 3	50	0.195		
4	Standard 4	100	0.336		
5	Standard 5	200	0.617		
6	Standard 6	400	1.220		
7	(K1)	29.96	0.15	1	29.96
8	(K2)	12.46	0.101	1	12.46
9	(K3)	21.04	0.125	1	21.04
10	(K4)	27.46	0.143	1	27.46
11	(K5)	28.18	0.145	1	28.18

12	(PO1)	364.61	1.087	1	364.61
13	(PO2)	369.25	1.100	1	369.25
14	(PO3)	404.96	1.200	1	404.96
15	(PO4)	405.32	1.201	1	405.32
16	(PO5)	404.96	1.200	1	404.96
17	(P1.1)	447.82	1.320	1	447.82
18	(P1.2)	334.61	1.003	1	334.61
19	(P1.3)	348.54	1.042	1	348.54
20	(P1.4)	324.61	0.975	1	324.61
21	(P1.5)	313.89	0.945	1	313.89
22	(P2.1)	420.32	1.243	1	420.32
23	(P2.2)	488.18	1.433	1	488.18
24	(P2.3)	416.75	1.233	1	416.75
25	(P2.4)	606.75	1.765	1	606.75
26	(P2.5)	646.39	1.876	1	646.39
27	(P3.1)	376.39	1.120	1	376.39
28	(P3.2)	415.68	1.230	1	415.68
29	(P3.3)	512.11	1.500	1	512.11
30	(P3.4)	529.96	1.550	1	529.96
31	(P3.5)	440.68	1.300	1	440.68
32	(P4.1)	389.25	1.156	1	389.25
33	(P4.2)	420.68	1.244	1	420.68
34	(P4.3)	488.18	1.433	1	488.18
35	(P4.4)	504.25	1.478	1	504.25
36	(P4.5)	441.75	1.303	1	441.75

Berdasarkan hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara PBMC yang diberikan perlakuan ekstrak etanol daun sirsak (P1, P2, P3 dan P4) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K), hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak meningkatkan sekresi IFNγ pada PBMC kelinci. Perhitungan dilanjutkan analisis *post hoc* dengan uji Duncan, didapatkan hasil bahwa kelompok perlakuan P1, P2, P3 dan P4 berbeda nyata dengan kontrol negatif (K), dan perlakuan P2, P3 dan P4 berbeda nyata dengan kontrol pembanding ekstrak Meniran (P0). Berdasarkan analisis data dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak dengan dosis perlakuan terendah 5 µg memiliki potensi imunostimulasi dengan meningkatkan kadar sekresi IFNγ pada kultur PBMC kelinci *White New Zealand*.

Penambahan ekstrak etanol daun sirsak dapat meningkatkan kadar sekresi IFNγ, hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Dewi dkk (2013) membuktikan bahwa senyawa *flavonol glikosida* yang terdapat dalam ekstrak etanol daun sirsak menginduksi timosit untuk meningkatkan transkripsi IFNγ. Induksi transkripsi IFNγ akan meningkatkan ekspresi reseptor sel T (TCR) yang matang. *Flavonol glikosida* juga menginduksi sintesis IL-2 (Adewole and Ezekiel, 2006), yang selanjutnya akan menstimulasi proliferasi sel T (Bellanti, 1993). Kadar sekresi IFNγ pada perlakuan P1 lebih tinggi dari pada kontrol (K), menunjukkan

bahwa penambahan dosis terendah pada penelitian ini yaitu 5 µg ekstrak etanol daun sirsak dapat menginduksi sekresi IFNγ. Kandungan flavanoid dalam ekstrak etanol daun sirsak tersebut dapat meningkatkan sekresi IFNγ pada kultur sel makrofag dan sel timosit (Oka, 2000; Jain *et al*., 2008).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak memiliki potensi sebagai imunostimulator dengan ditunjukkan adanya peningkatan ekspresi sel T $CD4^+$ dan peningkatan kadar sekresi IFNγ pada PBMC kelinci *White New Zealand*.

Daftar Pustaka

Adewole, S.O. and A.C.M. Ezekiel. 2006. Morphological Changes and Hypoglycemic Effect of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract in Pancreatic B-Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. African Journal of Biomed Research. 9 : 173-187.

Bellanti, JA. 1993. Immunologi III. Georgetown University School of Medicine. Washington D.C.

Dewi, LK., W.Sri dan R. Muhaimin. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Peningkatan Jumlah Sel T $CD4^+$ dan $CD8^+$ pada Timus Mencit (*Mus musculus*). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang : 24-26.

Ideasanti., Soetarno S dan Kusmardiyani S. 1995. Telaah Senyawa Fenolik Daun Sirsak, *Annona muricata* Linn., Annonaceae. Jurusan Farmasi ITB. Bandung.

Jain, M, L. Ganjua, A. Katiyal, Y. Padwad, K.P. Mishra, S. Chanda, D. Karan, K.M.S. Yogendra and R.C. Sawhney. 2008. Effect of Hippophae rhamnoides leaf extract against Dengue virus infection in human blood-derived macrophages. Published by Elsevier GmbH. Phytomedicine. 15 : 793–799.

Karnen, G.B., Djauzi S., Aditama T.Y., W. Heru dan S. Cartelieri. 2003. Peranan Echinacea (EFLA®894) sebagai Imunomodulator dalam Infeksi Virus dan Bakteri. Medika. 6 (13).

Ohashi K., M. Mukai ., P. Simanjutak and P.H. Shibuya. 2003. Cancer Cell Invasion Inhibitory Effects of Chemical Constituens in the Parasitic Plant *Scurrula artopurpurea* (Lorantaceae). Chem Phar Bulletin. 51(3) : 343-345.

Oka, S. 2000. Presence of B220 within Thymocytes and its Expression on the Cell Surface During Apoptosis. Immunology.100 : 417–423.

Rachmawati, E., K.Setyawati dan S. Hidayat. 2012. Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan Apoptosis Sel Hela yang Dimediasi oleh p53. Jurnal Kedokteran Brawijaya. Malang. 27 28-33.

Rantam, FA. 2005. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya.

Soegiyono. 2010. Memahami Penelitian Kualitatif. Cetakan Keenam. CV. Alfabeta. Bandung.

Takahashi, J.A., C.P. Pereira., L.P. Pimenta., M.A. Boaventura and L.G. Silva. 2006. Antibacterial Activity of Eight Brazilian Annonaceae Plants. Nat Prod Res. 20(1) : 21-26.

Yuan, S.F., H. Chang and H. Chen. 2003. Annonacin, a Monotetrahydrofuran Acetogenin, Arrest Cancer Cell at the G1 Phase and causes Cytotoxicity in a Bax and Capase-3-Releated Pathway. Life Science. 72 : 2853-2861.