

T  
615.0f2  
HGE  
P c1

**PENGARUH PEMBERIAN GANODERMA  
LUCIDUM TERHADAP RESPON PROLIFERASI  
LIMFOSIT MENCIT YANG DIINOKULASI  
SALMONELLA TYPHIMURIUM**

**TESIS**

**UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN MENCAPAI DERAJAT S2**



**DWI NGESTININGSIH  
G 4A 98004**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
PROGRAM PASCA SARJANA UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2001**

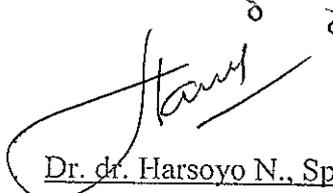
**UPT-PUSTAK-UNDIP**

**PENGARUH PEMBERIAN GANODERMA LUCIDUM TERHADAP  
RESPON PROLIFERASI LIMFOSIT MENCIT YANG  
DIINOKULASI SALMONELLA TYPHIMURIUM**

**Disusun oleh :**  
Dwi Ngestiningsih  
G 4A098004

Telah dipertahankan di depan dewan penguji pada tanggal 9 Agustus 2001  
dan dinyatakan telah lulus memenuhi syarat.

Pembimbing Utama :

  
Dr. dr. Harsoyo N., SpA(K)  
NIP 130 324 147

Pembimbing anggota

  
dr. Parno Widjojo, SpFK  
NIP 130 354 873

Disetujui tanggal :

Mengetahui



Kesjua Program Studi Ilmu Biomedik  
Pasca Sarjana Universitas Diponegoro

  
Prof. Dr. H. Soebowo, SpA  
NIP. 130 352 549

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Semarang,

Dwi Ngestiningsih

## KATA PENGANTAR

Penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh ekstrak *Ganoderma lucidum* terhadap respon proliferasi limfosit mencit yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*. Alasan penelitian ini dilakukan adalah karena *Ganoderma lucidum* telah digunakan sebagai tumbuhan untuk terapi kanker dan sudah dilaporkan bahwa *Ganoderma lucidum* mempunyai efek imunomodulator yang mungkin juga bermanfaat untuk mengeliminir infeksi bakteri intraseluler.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan penghargaan yang setinggi-tingginya dan rasa terima kasih yang tiada terhingga kepada Prof.dr. Soebowo, SpPA sebagai Ketua Program Studi Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP beserta seluruh staf yang telah membimbing saya selama menimba ilmu di Program Studi Ilmu Biomedik PPS UNDIP, Dr. dr. H. Harsojo N, SpAK sebagai pembimbing I, dr. Parno Widjojo, SpFK sebagai pembimbing II, dr. Edi Dharmana, MSc dan dr. Neni S, Msi sebagai konsultan di bidang imunologi. Terima kasih pula kepada Dekan FK UNDIP, Kepala Bagian dan staf Biokimia FK UNDIP yang telah membantu dan memberi kesempatan untuk melanjutkan Program Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP, juga kepada Pimpinan dan staf Laboratorium Bioteknologi Kedokteran FK UNDIP yang telah membantu penelitian ini. Kepada seluruh staf pengajar Program Studi Ilmu Biomedik, rekan-rekan seperjuangan dan semua pihak yang telah memberi dukungan dan bantuan selama pendidikan dan penelitian hingga selesainya penulisan ini saya ucapkan terima kasih.

Ucapan terima kasih tak lupa saya sampaikan kepada Pimpinan PT Jamu Sido Muncul Semarang yang telah menyediakan jamur *Ganoderma lucidum* dan dra. Meinny, MSc (FMIPA

UNDIP) yang telah membantu mengekstraksi *Ganoderma lucidum*. Terima kasih pula kepada staf laboratorium RS Telogorejo Semarang yang telah membantu menyediakan kuman *Salmonella typhimurium* dan dr. Wahyu Rochadi MSc yang telah banyak membantu saya dalam bidang statistik.

Akhir kata, dengan segala rendah hati dan rasa hormat, saya ucapkan terima kasih kepada Bapak dan Ibu tercinta yang telah memberi doa restu. Kepada suami dan anak-anak tercinta saya ucapkan terimakasih pula atas pengertian dan doa restu selama saya menempuh pendidikan. Semoga Allah SWT memberikan balasan yang setimpal dan karunia yang tak terbatas Amin.

Penulis

## DAFTAR ISI

	Hal.
Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Halaman Pernyataan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Daftar Isi.....	vi
Daftar Tabel.....	vii
Daftar Gambar.....	viii
Abstrak.....	ix
Abstract .....	x
BAB I   Pendahuluan.....	1
BAB II   Tinjauan Pustaka.....	4
BAB III  Metoda Penelitian.....	26
BAB IV  Hasil dan Pembahasan.....	35
BAB V   Kesimpulan dan Saran .....	52
BAB VI  Ringkasan .....	53
Daftar Pustaka... ..	56
Lampiran	

## DAFTAR TABEL

	Hal.
Tabel 1 Proporsi Jenis-jenis Sel Limfoid pada Manusia.....	14
Tabel 2 Taksonomi <i>Salmonella</i> dengan serogroup dan serovar...	19
Tabel 3 Sepuluh <i>S. enterica</i> tersering di Amerika Serikat 1994.....	21
Tabel 4 Hasil Uji LSD Berat Limpa.....	38
Tabel 5 Hasil Uji LSD Jumlah Limfosit Limpa.....	39
Tabel 6 Hasil Uji LSD Jumlah Limfosit Limfonodi.....	41
Tabel 7 Hasil Uji LSD Jumlah Limfosit Timus.....	42
Tabel 8 Hasil Uji LSD Limfoblas per 200 sel Limpa.....	44
Tabel 9 Hasil Uji LSD Limfoblas per 200 sel Limfonodi.....	46
Tabel 10 Hasil Uji LSD Limfoblas per 200 sel Timus.....	47

## DAFTAR GAMBAR

	Hal.
Gambar 1 Jamur <i>Ganoderma lucidum</i>	7
Gambar 2 Fase – fase pada Respon Imun	12
Gambar 3 Respon Imun Tubuh terhadap Bakteri Intraseluler	17
Gambar 4 Distribusi Berat Limpa	37
Gambar 5 Distribusi Jumlah limfosit Limpa	39
Gambar 6 Distribusi Jumlah limfosit Limfonodi	40
Gambar 7 Distribusi Jumlah limfosit Timus	42
Gambar 8 Distribusi Jumlah Limfoblas per 200 sel Limpa	44
Gambar 9 Distribusi Jumlah Limfoblas per 200 sel Limfonodi	45
Gambar 10 Distribusi Jumlah Limfoblas per 200 sel Timus	47
Gambar 11 Jumlah Limfosit Limpa, Limfonodi dan Timus	48
Gambar 12 Jumlah Limfoblas per 200 sel Limpa, Limfonodi dan Timus..	48

**Pengaruh Pemberian *Ganoderma lucidum* terhadap Respon Proliferasi Limfosit  
Mencit yang Diinokulasi *Salmonella typhimurium*.**

**Abstrak**

*Ganoderma lucidum* merupakan jamur yang telah terbukti sebagai imunomodulator, dimana dia dapat meningkatkan ekspresi sel T CD4+ dan meningkatkan produksi IL-2.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian *Ganoderma lucidum* terhadap respon proliferasi limfosit mencit yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*.

Digunakan rancangan penelitian "*The Posttest Only Control Group Design*". Dua puluh empat mencit jantan BALB/c dibagi secara acak menjadi 4 kelompok. Kelompok ke 1 mendapat *S.typhimurium* saja, kelompok ke 2 mendapat *G.lucidum* 4 mg/hari peroral, kelompok ke 3 mendapat *G.lucidum* 1 mg/hari peroral & *S.typhimurium* dan kelompok ke 4 mendapat *G.lucidum* 4 mg/hari peroral & *S.typhimurium*. Pemberian *G.lucidum* dilakukan mulai hari pertama sampai dengan hari ke 18, pemberian *S.typhimurium* dilakukan pada hari ke 15. Pada hari ke 19 dilakukan pemeriksaan sampel yaitu berat limpa, jumlah limfosit limpa, limfonodi dan timus serta jumlah limfoblas per 200 sel limpa, limfonodi dan timus.

Hasil penelitian menunjukkan pada pemberian *G.lucidum* terjadi peningkatan respon proliferasi limfosit. Peningkatan jumlah limfosit dan jumlah limfoblas per 200 sel limpa, limfonodi dan timus sangat bermakna ( $p < 0.001$ ) tetapi peningkatan berat limpa mencit tidak bermakna ( $> 0.05$ ).

Kata kunci : *Ganoderma lucidum*, proliferasi limfosit, *Salmonella typhimurium*

**Effect of *Ganoderma lucidum* on Lymphocyte Proliferation Respons of Mice  
which are inoculated with *Salmonella typhimurium***

Abstract

*Ganoderma lucidum* had been proved to act as immunomodulator. It could also increase IL-2 secretion and stimulates CD4+ T expression.

The objective of this study was has to improve the effect of *Ganoderma lucidum* on Lymphocyte proliferation response of mice which were inoculated *Salmonella typhimurium*.

This study was design as “ The Posttest Only Control Group Design”. Twenty four BALB/c male mice were divided into 4 groups randomly. The first group was inoculated with *S. typhimurium*, the second group was given *G. lucidum* 4 mg/day orally, the third group was inoculated with *S. typhimurium* and given *G. lucidum* 1 mg/day orally and the fourth group was inoculated with *S. typhimurium* and given *G. lucidum* 4 mg/day orally. *Ganoderma lucidum* was given orally on the first day until day 18<sup>th</sup>, the *S. typhimurium* was inoculated on day 15<sup>th</sup>. The Spleens, limphnodes and thymus were harvested on day 19<sup>th</sup>.

The result of this study showed that *Ganoderma lucidum* could increase lymphocyte proliferation response. The lymphocyte and lymphoblast count of spleens, lymphnodes and thymus were increase significantly (  $p < 0.001$  ), but spleens weight was not increase significantly (  $p > 0,05$  ) .

Key words : *Ganoderma lucidum*, lymphocyte proliferation, *Salmonella typhimurium*

## BAB I PENDAHULUAN

### I.1. LATAR BELAKANG

*Ganoderma lucidum* (GL) mempunyai nama lain jamur ling zhi atau reishi telah dikenal sebagai obat tradisional yang diindikasikan untuk kelelahan, asma, insomnia, dan batuk, merupakan obat tradisional Cina sejak lebih dari 4000 tahun yang lalu. *Ganoderma lucidum* mengandung bahan-bahan seperti sterol, coumarin, manitol, polisakarida, triterpenoid dan asam ganoderic.<sup>1</sup>

Hasil studi baru-baru ini memperlihatkan bahwa kandungan jamur ini yang berupa polisakarida ( $\beta$ -8-(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan) merupakan zat "carcinistatic" yang bekerja melalui peningkatan imunitas tubuh. Zat lain yang terkandung dalam jamur ini tampaknya juga dapat menurunkan tekanan darah, menurunkan kolesterol darah, menurunkan gula darah dan menghambat agregasi trombosit.

Penelitian invitro membuktikan bahwa GL mempunyai efek imunomodulasi. Efek imunomodulasi ini dapat berupa perubahan fenotip sel T dari sel T<sub>H</sub>2 menjadi sel T<sub>H</sub>1 atau berupa peningkatan fungsi sel T.<sup>2</sup> Selain itu juga dapat meningkatkan kadar IL-1 $\beta$  (5,1 kali), TNF $\alpha$  (9,8 kali), IL-6 (29 kali), IFN $\gamma$ .<sup>3</sup> Peneliti lain membuktikan bahwa ekstrak GL dapat meningkatkan jumlah sel TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>.<sup>4</sup> Peningkatan jumlah sel T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> dan sitokin-sitokin yang berkaitan ini kemungkinan dapat digunakan juga sebagai peningkatan kemampuan host untuk mengeliminir bakteri intraseluler patogen. Salah satu bakteri intraseluler patogen adalah *Salmonella typhi*.

Bakteri *Salmonella typhi* adalah kuman batang bergerak, gram negatif yang secara khas meragikan glukosa dan manosa tetapi tidak meragikan laktosa atau sukrosa, bersifat fakultatif intraseluler.<sup>5,6</sup> Sistem imun tubuh yang berperan untuk membunuh bakteri ini adalah sistem imun seluler. Sel-sel yang sangat berperan dalam respon imun seluler adalah sel fagosit polimorfonuklear (granulosit), sel NK, makrofag dan limfosit T. Cara membunuh bakteri ini ada 2 cara yaitu : (1) dengan fagositosis dan "killing" oleh makrofag dan (2) dengan cara lisis sel yang terinfeksi oleh sel T sitolitik atau sel NK.<sup>7</sup>

Karena secara etis tidak memungkinkan melakukan penelitian eksperimental dengan *Salmonella typhi* pada manusia, maka sebagai ganti pada penelitian ini dilakukan inokulasi *Salmonella typhimurium* (sebagai imunogen) pada mencit. Hal ini telah dipakai untuk memeriksa dasar-dasar mekanisme imunologi terhadap infeksi *Salmonella* sp.<sup>8</sup> Pada penelitian terdahulu, Schwacha MG dan Einstein TK membuktikan bahwa inokulasi *Salmonella typhimurium* pada mencit dapat meningkatkan produksi Nitric Oxide dan IFN $\gamma$ ; van Diessel mendapatkan data bahwa tidak ada perbedaan kemampuan fagositosis makrofag peritoneal pada mencit galur Swiss, CBA dan C57BL yang diinfeksi *S.typhimurium*, namun pemeriksaan-pemeriksaan tersebut mempunyai kendala yaitu susahny mendapat reagen untuk pemeriksaan ( harus impor dari Amerika Serikat).

Dengan melihat keadaan tersebut di atas maka penelitian ini berusaha untuk membuktikan adanya peningkatan kemampuan respon proliferasi limfosit mencit yang diberi GL bila mendapatkan infeksi *Salmonella typhimurium*. Respon proliferasi limfosit dideteksi pada limpa, limfonodi dan timus mencit.

## **I. 2. Perumusan Masalah**

Apakah pemberian *Ganoderma lucidum* dapat meningkatkan respon proliferasi limfosit pada mencit yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* ?

## **I. 3. Tujuan Penelitian**

### **1. 3. 1. Tujuan Umum**

Membuktikan bahwa pemberian *Ganoderma lucidum* dapat meningkatkan respon proliferasi limfosit pada mencit yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* .

### **1. 3. 2. Tujuan Khusus**

1. Membuktikan bahwa pemberian *Ganoderma lucidum* dapat meningkatkan berat limpa mencit .
2. Membuktikan bahwa pemberian *Ganoderma lucidum* dapat meningkatkan jumlah limfosit limpa, limfonodi dan timus mencit.
3. Membuktikan bahwa pemberian *Ganoderma lucidum* dapat meningkatkan jumlah relatif limfoblas per 200 sel limpa , limfonodi dan timus mencit.

## **1. 4. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi penggunaan *Ganoderma lucidum* sebagai tanaman obat untuk penyakit yang disebabkan oleh bakteri intraseluler dan untuk penelitian lebih lanjut mengenai respon imun terutama pada manusia.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II. 1. GANODERMA LUCIDUM (GL)

*Ganoderma* adalah genus cendawan tingkat tinggi yang tergolong dalam famili Polyporaceae, ordo Polyporales, kelas *Basidiomycetes*, divisi *Eumycophyta*. Tubuh buah yang menyerupai cakram dengan permukaan atas berwarna coklat dan permukaan bawah berwarna putih sampai krem, bertekstur liat pada waktu muda dan keras pada waktu tua ( gambar 1 ). Disamping hidup sebagai patogen, *Ganoderma* mampu hidup sebagai saprofit dengan memanfaatkan sisa-sisa akar didalam tanah. Sisa-sisa akar dan sisa-sisa bagian tanaman lainnya yang terinfestasi *Ganoderma* berfungsi sebagai sumber penularan penyakit yang sangat potensial.<sup>9,10,11</sup> Jumlah spesies *Ganoderma* di seluruh dunia belum diketahui dengan pasti, tetapi diperkirakan ada sekitar 60 spesies (Pegler, 1973). Di Herbarium Bogoriense dan Herbarium Leiden ada 29 spesies, (Steyaert, 1972).<sup>10</sup>

##### II.1.1 Manfaat *Ganoderma lucidum* dalam Medis

*Ganoderma lucidum* (GL) yang telah dikenal sebagai obat tradisional Cina dari beberapa penelitian terakhir dilaporkan bahwa GL mempunyai efek hepatoprotektif, analgetik, anti inflamasi dan anti tumor.<sup>1,2</sup>

Pada percobaan dengan menggunakan hati tikus yang telah diinduksi dengan zat fibrotik, polisakarida dari *G. lucidum* dapat menghambat penumpukan jaringan kolagen sehingga proses *fibrotisasi* tidak terjadi. Fenomena lain yang ditemukan adalah ternyata

morfologi sel-sel hepar di sekitarnya juga terlihat semakin baik dengan pemberian *G. lucidum*.<sup>11</sup>

Pemberian *ganoderan B* pada tikus dapat meningkatkan aktivitas *glukokinase hepatic*, *fosfofruktokinase* dan *glukosa-6-fosfat dehidrogenase*, menurunkan *glukosa-6-fosfatase* hepatic dan aktivitas *glikogen sintetase*, serta tidak mempengaruhi aktivitas *heksokinase* dan *glikogen fosforilase*. *Ganoderan B* menurunkan kandungan glikogen di dalam hati tetapi tidak berpengaruh terhadap total kolesterol dan tingkat trigliserida di dalam darah dan hati. Dengan adanya rangsangan terhadap terhadap enzim-enzim hepar yang berperan dalam metabolisme karbohidrat tersebut, maka metabolisme glukosa di hepar juga akan meningkat.<sup>12</sup>

Biakan murni badan buah *Ganoderma lucidum* dapat menghasilkan enzim-enzim dalam aktivitas fisiologisnya. Enzim-enzim itu antara lain : *amilase*, *oksidase ekstraseluler*, *invertase koagulase*, *lakase*, *protease*, *renetase*, *pektinase* dan *selulose*.<sup>13</sup>

Ekstrak GL dapat mempunyai aktifitas antimikrobial terhadap bakteri *Bacillus subtilis* yang telah dibuktikan oleh Lisdar I Sudirman.<sup>14</sup> Hsu ,dkk (1986) melaporkan bahwa ekstrak *Ganoderma lucidum* mempunyai efek antibakterial terhadap *Staphilococcus*, *Streptococcus* dan *Bacillus pneumoniae*. Yoon,dkk (1994) melaporkan aktifitas anti mikrobial GL terhadap *Micrococcus luteus* dengan MIC 0,7.

Efek imunomodulasi dan antitumor dari GL telah dibuktikan dengan pemberian polisakarida dari GL (PSG) 100 µg/ml dalam kultur monosit-makrofag dan limfosit T manusia dengan hasil kadar IL-1β meningkat 5,1 kali, TNFα meningkat 9,8 kali dan IL-6 meningkat 29 kali dibanding kelompok kontrol yang tidak diberi apa-apa. Pelepasan IFNγ

oleh sel T juga meningkat pada pemberian PSG 25-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .<sup>2</sup> Penelitian menggunakan binatang coba mencit C3H yang diberi GL dengan dosis 4-200 mg/kgBB dengan cara pemberian intraperitoneal hasilnya aktivitas sel NK di lien meningkat dan  $\text{IFN}\alpha\beta\gamma$  serum meningkat. Sunee(1997)melaporkan bahwa studi in vitro ekstrak GL pada sel-sel mononuklear darah tepi dapat meningkatkan ekspresi sel T  $\text{CD4}^+$ . Zhang,dkk (1993) melaporkan bahwa pemberian GL 300 mg/kg dapat meningkatkan produksi IL-2 sel-sel splenosit mencit.

Stavinoha (1997) melaporkan bahwa ekstrak GL mempunyai efek anti inflamasi yang poten. Hal ini dibuktikan dengan pemberian ekstrak GL per oral pada tikus dengan inflamasi yang diinduksi 'carragean' dan inflamasi yang diinduksi minyak 'croton'. Aktivitas anti inflamasi ini setara dengan hidrokortison, tetapi tidak ada efek samping seperti steroid.

Van der Hem LG,dkk. melaporkan bahwa Ling Zhi-8 (LZ-8) suatu protein dalam *G. lucidum* mempunyai efek imunomodulasi berupa efek mitogenik terhadap sel-sel splenosit mencit secara in vitro.LZ-8 juga mempunyai efek immunosupresif pada pembentukan antibodi yang diinduksi antigen dan perlindungan sempurna terhadap insiden diabetes otoimun pada mencit'nonobese diabetic' in vivo. LZ-8 mempunyai efek yang signifikan pada imunitas seluler sebab meningkatkan 'survival time' pada model kulit mencit alograf. Kino K,dkk melaporkan bahwa LZ-8 menghambat terbentuknya antibodi terhadap HBs-Ag (inhibisi 83,3%-96,8%) pada mencit C57BL/10 dan C57BL/10BR dengan pemberian LZ-8 intra peritoneal dua kali seminggu (8 dan 12 mg/kg).

Gambar 1.

Jamur *Ganoderma lucidum* dan ekstraknya.



## II. 1.2 Komponen-komponen aktif secara farmakologi dalam GL<sup>1</sup> :

### *a. Triterpenoids.*

- Rasanya pahit
- Mempunyai efek anti alergi.

### *b. Steroida*

- Ergosterol (provitamin D2) dilaporkan sekitar 0,3 – 0,4% dalam GL
- Komponen steroid utama adalah 24-methylcholesta-7, 22-dien-3-,6-ol.
- Komponen yang baru diisolasi adalah ganodersterone.

### *c. Nukleosida dan Nukleotida*

- Nukleosida dalam GL mengandung adenosin dan guanosin yang berefek menghambat agregasi trombosit.
- Nukleotida dapat berupa 5'-GMP, 5'XMP, RNA.

### *d. Proteoglycan*

- Ganoderan B dan C, suatu kompleks protein-polisakarida yang berefek hipoglikemik (anti hiperglikemik).
- Polisakarida yang larut dalam air, 3% polisakarida yang larut dalam amonium oksalat dan 5% peptidoglikan yang larut dalam NaOH mempunyai efek antitumor yang kuat.

### *e. Komponen yang menjaga kestabilan tekanan darah*

- Asam – asam ganoderic (B,D,F,R,S dan Y), ganoderal A, ganoderol A dan B mempunyai efek menurunkan hipertensi yang berhubungan dengan 'angiotensin-I-converting enzyme'
- Peptidoglikan dengan berat molekul 100.000, punya efek anti hipertensi ringan.

*f. Senyawa-senyawa antitrombotik.*

- Merupakan 80% ekstrak GL dalam etanol berupa adenosin, guanosin dan derivatnya. Strukturnya telah diidentifikasi sebagai epimer 5'-deoxy-5'-methylsulphanyl adenosine.

*g. Lektin*

- Lektin diisolasi dari tubuh buah dan miselium jamur.

## II .2. MEKANISME RESPON IMUN

Menurut kejadiannya, imunitas tubuh dapat dibagi dua yaitu : (1) Imunitas alami atau natural ("Innate or Native Immune System") yang mengadakan reaksi yang umum dan (2) Imunitas didapat atau spesifik (Adaptive/ Specific/Acquired Immune System") yang bersifat spesifik dan memerlukan waktu untuk mengadakan reaksi yang penuh.<sup>5</sup>

Untuk dapat menimbulkan respon imun diperlukan adanya zat asing atau yang disebut antigen. Molekul atau zat yang dapat menginduksi timbulnya respon imun lebih sering disebut sebagai imunogen. Yang termasuk imunogen adalah mikroorganisma patogen ( virus, bakteri atau parasit ), transplantasi jaringan asing atau protein pada bahan makanan .<sup>20</sup>

### II. 2. 1. PROSES PEMBENTUKAN IMUNITAS TUBUH (gambar 2 )

- **LANGKAH PENGENALAN (RECOGNITION)**

Limfosit B dapat mengenali antigen tanpa bantuan sel lain, sedangkan limfosit T akan menanggapi antigen apabila disajikan oleh sel pelengkap (accessories cells). Sel – sel pelengkap tersebut antara lain : Sel penyaji antigen (Antigen Presenting Cell=APC )

yaitu makrofag, sel dendritik dalam jaringan limfoid, sel limfosit B, sel Langerhans di kulit.

Limfosit T hanya akan menanggapi antigen apabila disajikan oleh sel pelengkap yang terikat pada protein Major Histocompatibility Complex (MHC). Ada 2 kelas protein MHC yaitu : MHC kelas I yang diekspresikan oleh semua sel tubuh dan akan dikenali oleh sel TCD8+ yang bersifat sitotoksik dan MHC kelas II yang diekspresikan oleh makrofag yang akan dikenali oleh sel T CD4+ yang berfungsi sebagai sel helper.

- **LANGKAH AKTIFASI**

Untuk memulai langkah aktivasi ini dibutuhkan signal pertama yaitu ikatan antara antigen dengan reseptor dan signal kedua yaitu aktivasi sel T oleh molekul-molekul kostimulator. Salah satu yang terpenting dan merupakan jalur khusus untuk aktivasi sel T yaitu molekul permukaan CD28 yang akan berikatan dengan molekul kostimulator B7-1 (CD80) dan B7-2 (CD86) yang diekspresikan oleh sel APC.

Proliferasi Limfosit T sebagai jawaban terhadap pengenalan antigen terutama bekerja melalui jalan pertumbuhan otokrin (autocrine Growth Pathway). Limfosit T mengeluarkan sitokin peningkat pertumbuhan dan menampilkan reseptor pada permukaan sel bagi sitokin ini. Faktor pertumbuhan ini antara lain IL-2, IL-4. Respon proliferasi ini adalah pembiakan klon dari limfosit T yang spesifik bagi antigen tersebut. Beberapa sel Limfosit T ini kemudian berkembang menjadi sel T pengingat antigen spesifik ( 'Antigen –Specific Memory Cells).

Salah satu molekul yang berperan sebagai regulator negatif yang penting adalah CTLA-4 yaitu suatu molekul permukaan dari sel T dimana ekspresinya diinduksi oleh adanya aktivasi . CTLA-4 bersifat menghambat respon sel T , seperti halnya CD28, CTLA-4 juga mengikat B7.1 dan B7.2.<sup>21</sup>

- **LANGKAH EFEKTOR**

Langkah pelaksanaan efektor meliputi : (1) produksi sitokin oleh sel Limfosit T dan sel non limfoid yang merupakan “soluble mediator” pada imunitas alami dan imunitas spesifik, (2) Kehadiran sel-sel efektor dari imunitas seluler termasuk sel T, makrofag dan sel NK yang ikut serta dalam reaksi inflamasi karena fungsinya sebagai pertahanan pertama terhadap mikroba intraseluler, (3) bekerjanya system komplemen dan (4) reaksi khusus yang berhubungan dengan imunitas humoral.

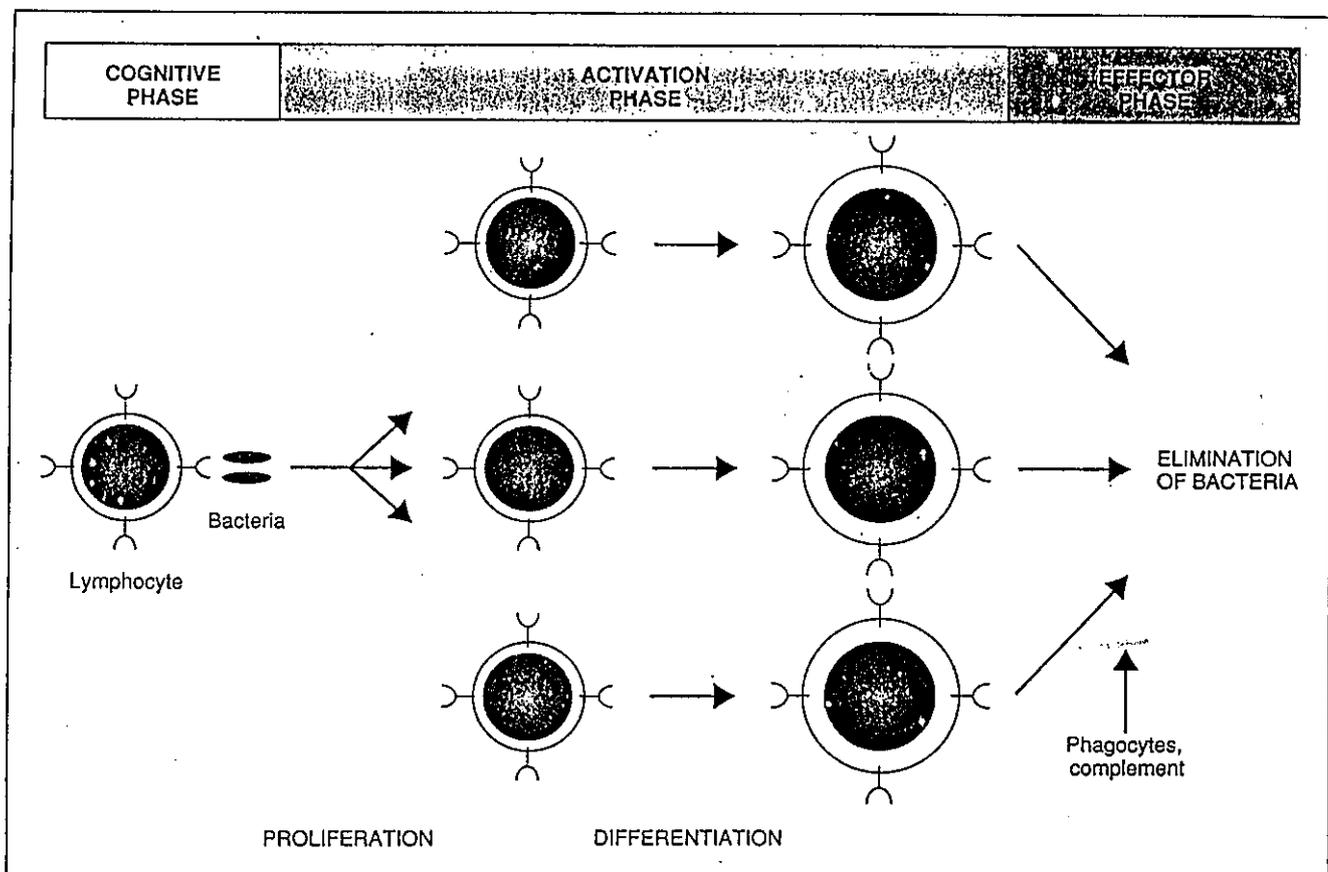
- **FUNGSI DAN PERTUMBUHAN SUBSET SEL T**

Sel T CD4+ yang telah teraktifasi akan berdeferensiasi . Sitokin terpenting yang dihasilkan sel TH1 pada fase efektor adalah IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  akan memacu aktifitas pembunuhan mikroba sel-sel fagosit dengan meningkatkan destruksi intrasel pada mikroba yang difagosit. Sel TH1 juga mengeluarkan IL-2 yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan otokrin dan memacu proliferasi dan diferensiasi sel TCD8+.

Jadi sel TH1 berfungsi sebagai pembantu (helper) untuk pertumbuhan sel Limfosit T sitotoksik yang juga meningkatkan imunitas terhadap mikroba intrasel.

Gambar 2.

Fase-fase pada Respon Imun ( Diambil dari ABBAS AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, WB Saunders, 1997 : 10 )



**FIGURE 1-3. Phases of specific immune responses.** Immune responses consist of three phases: cognitive (antigen recognition), activation (proliferation and differentiation of lymphocytes), and effector (elimination of antigen). This example illustrates an immune response to bacteria, but the same phases are seen in all specific immune responses. Since this applies to both B and T lymphocytes, the lymphocytes shown can be of either class.

Sel TH2 menghasilkan sitokin IL-4 dan IL-5 yang merupakan mediator untuk reaksi alergi. Sel TH2 juga memproduksi IL-6, IL-10 dan IL-13 yang bersifat antagonis terhadap IFN- $\gamma$  dan menekan aktivasi makrofag.

Diferensiasi sel TCD4<sup>+</sup> menjadi TH1 dan TH2 tergantung sitokin yang diproduksi pada saat merespon mikroba yang memacu reaksi imunitas. Beberapa bacteria intraseluler seperti Listeria dan Mikobakteria yang menginfeksi makrofag akan memacu makrofag untuk mengeluarkan IL-12. Virus dan beberapa parasit memacu produksi IL-12 secara tidak langsung yaitu melalui IFN- $\gamma$  yang diproduksi sel NK. IL-12 yang berikatan dengan sel TCD4<sup>+</sup> akan memacu diferensiasi menjadi sel TH1. IL-12 juga meningkatkan produksi IFN- $\gamma$  dan aktifitas sitolitik yang dilakukan oleh sel T sitotoksik dan sel NK sehingga memacu imunitas seluler.

Diferensiasi sel TCD4<sup>+</sup> menjadi sel TH2 dipacu oleh IL-4. Sel TCD4<sup>+</sup> mengeluarkan IL-4 dalam jumlah kecil pada saat aktivasi inisial.

## II. 2. 2. ORGAN LIMFOID

Timus dan sumsum tulang biasa disebut organ limfoid primer karena mereka merupakan hal yang penting untuk limfopoiesis yaitu produksi permulaan limfosit dari sel-sel progenitor. Timus dan sumsum tulang memproduksi kira-kira  $10^9$  limfosit matur setiap hari yang kemudian dilepaskan ke dalam sirkulasi. Limfosit ini dalam keadaan "virgin" atau "naïve". Limfosit "naïve" ini kemudian bermigrasi ke organ limfoid sekunder /perifer yaitu limpa, limfonodi atau tonsil. Fungsi dari organ limfoid sekunder adalah untuk

memaksimalkan pertemuan antara limfosit dan sunbstansi asing dan dari sinilah sebagian besar respon imun dibentuk. Limpa merupakan organ penting pada pertahanan host terhadap infeksi sebab merupakan filter fagositik untuk aliran darah dan organ penting untuk memproduksi sel T dan sel B pada respon imun.

**Tabel 1.** Proporsi dari jenis-jenis sel limfoid pada jaringan manusia normal.<sup>20</sup>

Jaringan	Perkiraan (%)		
	Sel T	Sel B	Sel NK
Darah tepi	70-80	10-15	10-15
Sumsum tulang	5-10	80-90	5-10
Timus	99	<1	<1
Limfonodi	70-80	20-30	<1
Limpa	30-40	50-60	1-5

Sumber : Parslow TG. Immune Response In : Medical Immunology, 9<sup>th</sup> ed. Prentice Hall, New Jersey, 1997:63-72.

### II. 3. RESPON IMUN TERHADAP BAKTERI INTRASELULER

Kapsul pada *Salmonella* sp memegang peranan penting pada virulensi. Antibodi tidak dapat menghancurkan kapsul tersebut. Beberapa "*carrier typhoid*" memiliki antibodi dalam sirkulasinya, hal ini menunjukkan bahwa *Salmonella* tidak dapat dihancurkan oleh antibodi dan dapat menetap dalam sel-sel retikuloendotelial.<sup>22</sup>

Respon imun host terhadap *Salmonella* ada dua fase yaitu : (1) respon imun alami (innate), dimana sel-sel fagosit polimorfonuklear / sel-sel granulosit sangat berperan pada fase ini dan (2) respon imun spesifik, dimana sel limfosit T berperan dalam mengaktivasi makrofag, sel NK dan sel T sitolitik untuk menghancurkan bakteri ini ( gambar 3 ).

Respon imun protektif yang utama melawan bakteri intraseluler adalah imunitas seluler (*cell-mediated immunity*) Imunitas seluler ini terdiri dari 2 jenis reaksi yaitu :(1) penghancuran bakteri yang difagosit oleh makrofag yang diaktifasi sitokin-sitokin yang diproduksi limfosit T dan (2) lisis terhadap sel yang terinfeksi oleh sel TCD8<sup>+</sup> (CTLs)<sup>5</sup>

Antigen bakteri intraseluler akan mengaktifasi sel TCD4<sup>+</sup> dan sel TCD8<sup>+</sup>. Sel TCD4<sup>+</sup> akan mengaktifasi makrofag untuk memproduksi spesies oksigen reaktif (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dan enzim-enzim yang akan membunuh bakteri yang difagosit.<sup>7</sup>

Pada respon imun natural terhadap bakteri intraseluler peran sel fagosit kurang efektif karena bakteri intraseluler resisten terhadap enzim-enzim lisosom sel-sel fagosit. Bakteri intraseluler ini juga mengaktifasi sel-sel NK secara langsung atau melalui stimulasi oleh IL-12 yang diproduksi makrofag. Sel NK juga memproduksi IFN $\gamma$  yang akan mengaktifasi makrofag dan meningkatkan degradasi bakteri yang difagosit.<sup>23</sup>

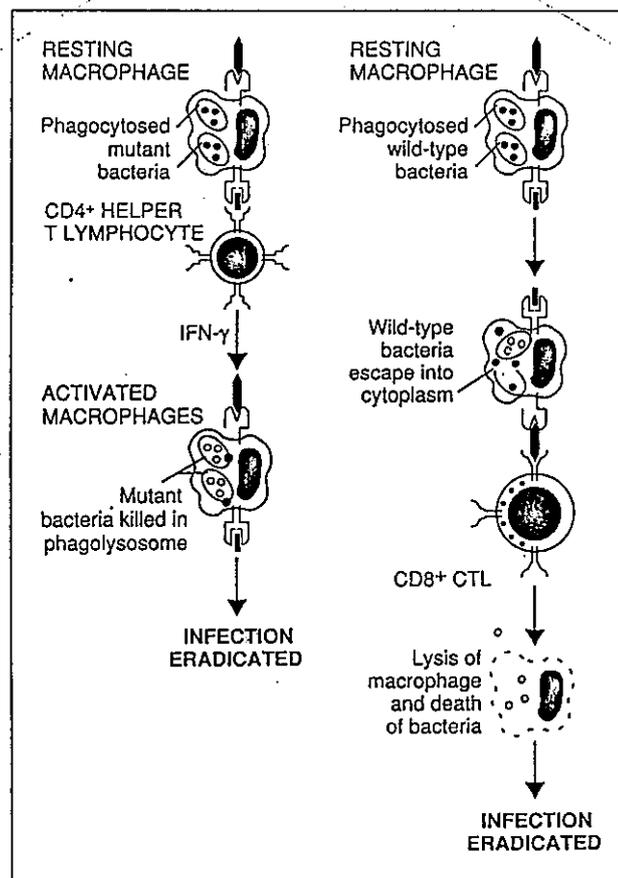
*Listeria monocytogenes* yang disuntikkan pada mencit dapat menyebabkan aktivasi limfosit T. Respon imun seluler mencit dapat ditandai dengan peningkatan proliferasi limfosit limpa, penyajian antigen oleh makrofag ke sel T dan proses pembunuhan bakteri intraseluler.

Pada 'respiration burst' di dalam makrofag salah satu spesies oksigen reaktif adalah Nitric Oxide (NO). Nitric Oxide bersifat sitotoksik atau sitolitik terhadap sel. Nitric Oxide yang diproduksi di dalam fagolisosom meningkatkan kemampuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam membunuh bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa NO yang diproduksi makrofag dapat meningkatkan aktifitas mikrobisidal dengan cara berinteraksi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selain itu dapat juga bersifat sitotoksik terhadap dirinya sendiri.<sup>24</sup>

Pada penelitian terdahulu diketahui terjadi peningkatan jumlah makrofag dan granulosit peritoneal dalam 24 jam setelah penyuntikan intraperitoneal *Salmonella typhimurium* dengan berbagai dosis. Pada mencit C57BL/10 didapatkan 2-4 kali lebih tinggi dibandingkan dengan mencit CBA. Kemampuan membunuh *Salmonella typhimurium* mencit CBA 2 kali lebih besar daripada mencit C57BL/10. Mencit BALB/c susceptibel terhadap *Salmonella typhimurium*. BA Sampson dan EC Gotschlich (1992) menggunakan mencit BALB/c sebagai model penelitian dimana *Salmonella typhimurium* dibiakkan dari limpa atau tinja mencit 1 minggu setelah inokulasi, oleh sebab itu pada penelitian ini digunakan mencit strain tersebut (BALB/c).<sup>25</sup>

Gambar 3.

Respon Imun Tubuh terhadap Bakteri Intraseluler ( Diambil dari ABBAS AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, WB Saunders, 1997 : 326 )



**FIGURE 16-4.** Cooperation of activated macrophages and CTLs in the elimination of an intracellular bacterium, *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes*-infected macrophages may stimulate CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Infection by mutant bacteria can be eradicated by macrophages activated by IFN- $\gamma$  produced by CD4<sup>+</sup> T cells, but wild-type bacteria are eradicated only after the colonized macrophages are lysed by CTLs.

## II.4. SALMONELLA sp

### II.4.1. Epidemiologi

Salmonella sp adalah kuman batang bergerak , gram negatif, fakultatif anaerob, fakultatif intraseluler yang secara khas meragikan glukosa dan manosa tapi tidak meragikan laktosa atau sukrosa. Kuman ini sering bersifat patogen untuk manusia atau binatang bila masuk melalui mulut. Termasuk famili *Enterobacteriaceae* dan secara signifikan menyebabkan penyakit enterik. Klasifikasi terbaru berdasarkan pada hubungan DNA, dikenal ada dua spesies yaitu *S. enterica* dan *S. bongori*. *S. enterica* terdiri dari 6 subspecies, masing-masing terdiri banyak anggota (*serovars*). *S. bongori* tidak patogen terhadap manusia.<sup>29</sup>

Beberapa Salmonella lebih beradaptasi dengan host manusia atau hewan. Strain yang beradaptasi dengan hewan tidak bersifat patogen pada manusia dimana strain yang beradaptasi dengan manusia sering menyebabkan demam tifoid.

Infeksi pada manusia yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* biasa disebut demam tifoid, sedangkan infeksi yang disebabkan Salmonella selain *Salmonella typhi* dinamakan "*nontyphoidal salmonellosis*"

Tabel 2<sup>29</sup>

Taksonomi	genus	<i>Salmonella</i> ,	dengan	Serogroup	dan	Serovars.
Spesies	Subspesies			Serogroup		Serovars yang sering
<i>S. enterica</i>	(I) <i>enterica</i>		A			paratyphi A
			B			typhimurium, agona, derby, heidelberg, paratyphi B
			C			choleraesuis, infantis, virchow
			D			dublin, enteritidis, typhi
			E			anatum
	(II)	<i>salamae</i>				
	(IIIa)	<i>arizonae</i>				
	(IIIb)	<i>diarizonae</i>				
	(IV)	<i>houtenae</i>				
	(V)	<i>indica</i>				
<i>S. bongori</i> *	—					

- Formerly subspecies V of *S. enterica*

Di negara yang sedang berkembang dimana status ekonominya masih rendah dan sanitasi lingkungan yang belum baik, penyakit demam tifoid masih merupakan masalah kesehatan yang serius. Di negara maju dimana keadaan sosio ekonomi dan sanitasi lingkungan sudah sangat baik, insiden penyakit demam tifoid sangat rendah sekali. Di Eropa Barat, Jepang dan Amerika Serikat angka kejadian demam tifoid berkisar antara 0,24-3,7

kasus per 100.000 penduduk per tahun. Di Indonesia insiden penyakit demam tifoid masih sulit ditentukan besarnya karena tidak adanya data dasar survei komunitas. Hasil survei rumah sakit di Indonesia menunjukkan bahwa jumlah penderita yang dirawat dengan diagnosa demam tifoid merupakan urutan kedua setelah gastroenteritis pada daftar sepuluh penyakit menular terbanyak. Di RS Dr Kariadi, penderita penyakit demam tifoid yang dirawat menduduki tempat teratas (50%), disusul gastroenteritis (39%) dan hepatitis (11%) dari 6513 penderita yang dirawat. Penderita demam tifoid yang dirawat di rumah sakit dari tahun ke tahun cenderung naik.<sup>8</sup>

Data survei di Amerika Serikat menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kejadian "*nontyphoidal salmonellosis*" ( 1960 : 5 per 100.000 penduduk, 1970: 15 per 100.000 penduduk, 1980: 20 per 100.000 penduduk, 1990: 22 per 100.000 penduduk ). Insiden penyakit ini lima kali lebih tinggi pada anak-anak dibanding dewasa dan meningkat lagi pada usia lebih dari 70 tahun.

Tabel 3<sup>29</sup>

Sepuluh *S. enterica* tersering yang diisolasi di Amerika Serikat tahun 1994

Rank	Serovar	Serogroup	No. of Isolations	Percentage (Cumulative percentage) of All <i>Salmonella</i> Isolations
1	enteritidis	D	10,009	26.1 (26.1)
2	typhimurium	B	8479	22.1 (48.2)
3	heidelberg	B	1855	4.8 (53.0)
4	newport	C2	1698	4.4 (57.4)
5	hadar	C2	1033	2.7 (60.1)
6	agona	B	766	2.0 (62.1)
7	montevideo	C1	639	1.7 (63.8)
8	oranienburg	C1	616	1.6 (65.4)
9	munchen	C2	562	1.5 (66.9)
10	thompson	C1	560	1.5 (68.4)

SOURCE : Centers for Disease Control and Prevention, Annual Surveillance Report, 1994.

#### II. 4. 2. Fase-fase infeksi *Salmonella typhimurium* secara eksperimental.<sup>23</sup>

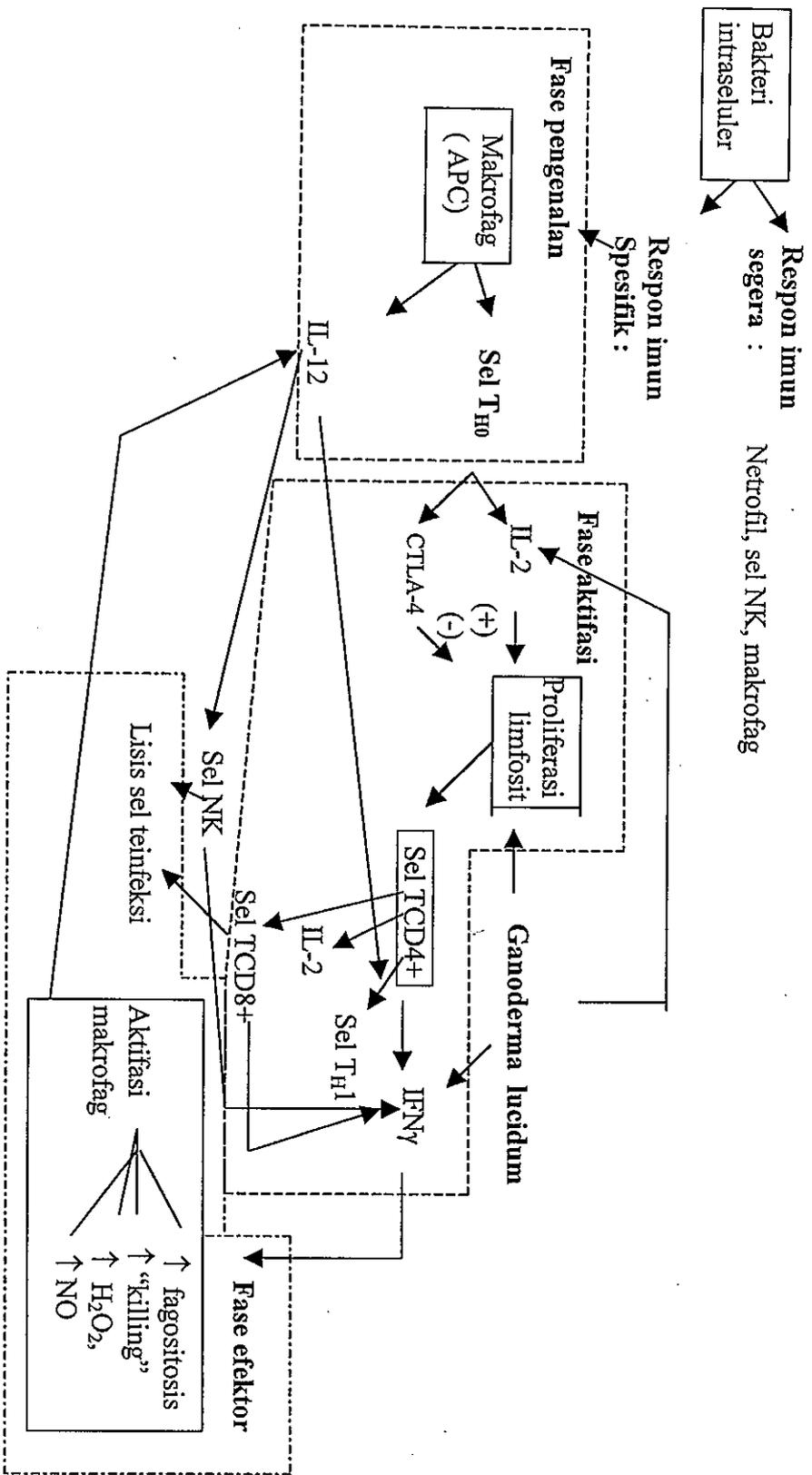
*Salmonella typhimurium* adalah agen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya salmonellosis pada mencit, dimana penyakit ini analog dengan demam typhoid yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* pada manusia meliputi anoreksia, penyebaran melalui system retikuloendotelial, splenomegali dan diare.<sup>31,32</sup>

Infeksi *Salmonella typhimurium* secara sistemik pada tikus diperkirakan melalui berbagai fase. Fase-fase tersebut adalah :

1. Fase pertama dari infeksi intravena atau intraperitoneal hanya memerlukan beberapa jam, dimana terjadi distribusi mikroorganisme ke berbagai tempat. Mikroorganisma ditemukan di hati dan limpa sekitar 3 dan 8 jam setelah infeksi.
2. Fase kedua. Pada fase ini selama hari pertama infeksi disebut sebagai tahap pertumbuhan eksponensial dan terjadi sebelum terjadi respon imunitas segera/natural. Pada fase ini faktor genetik host memegang peran penting. Netrofil sangat penting pada tahap ini. Netrofil penting sebagai pertahanan host yang efektif melawan infeksi *Salmonella*. Netrofil akan menghambat pertumbuhan *salmonella*.
3. Fase ketiga. Setelah 3 – 7 hari, terjadi pertumbuhan pesat mikroorganisme dalam hati dan limpa kemudian pertumbuhannya menetap (plateau) di bawah pengaruh makrofag teraktivasi yang memproduksi sitokin-sitokin proinflamatory. Pada fase ini tampaknya Limfosit T tampaknya tidak berperan penting. Makrofag sangat berperan dalam meningkatkan “*killing*” bakteri intrasel oleh sel lain ( sel Nk atau granulosit) dengan cara memproduksi sitokin-sitokin. Fase ketiga ini juga disebut “plateu phase”.
4. Fase pembersihan. Fase ini terjadi selama minggu ketiga infeksi yang melibatkan aktifitas limfosit T. Pada fase ini sel T CD4+ memperantarai terjadinya pembersihan *Salmonella* dari hati dan limpa. Sitokin yang terlibat adalah IFN $\gamma$ , dimana sitokin ini diekspresikan oleh sel T CD4+ dan sel NK.

## II. 5. KERANGKA TEORI/ KONSEP DAN HIPOTESIS

### II.5.1. KERANGKA TEORI



Keterangan :

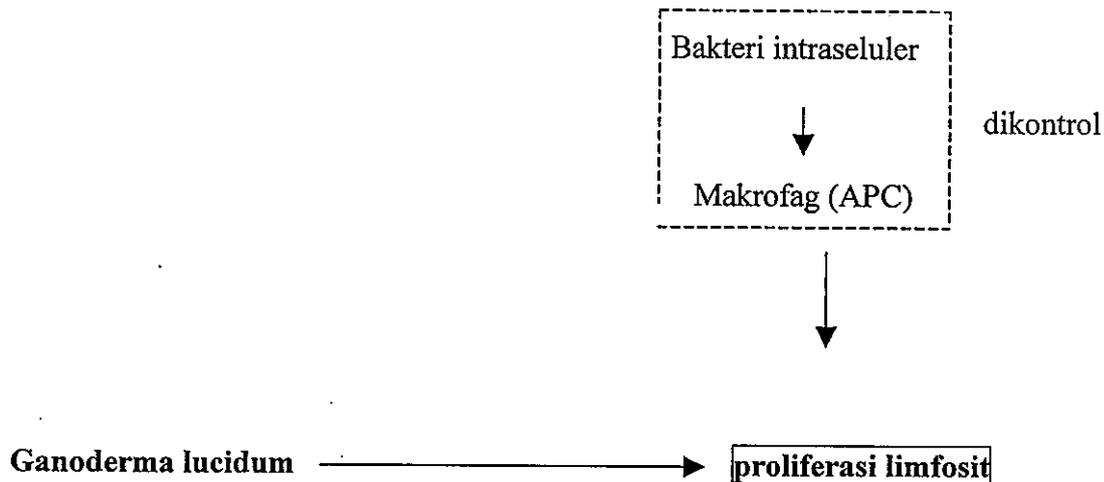
Bakteri intraseluler sebagai imunogen akan merangsang respon imun tubuh. Respon imun tersebut berupa respon imun segera/natural dan respon imun spesifik. Respon imun yang berperan terhadap bakteri intraseluler terutama adalah respon imun seluler, melalui fagositosis oleh makrofag ,melalui fagositosis oleh makrofag yang teraktifasi atau lisis sel yang terinfeksi oleh sel NK dan sel T CD8+.

Bakteri intraseluler akan difagosit oleh makrofag. Makrofag sebagai sel penyaji antigen (APC) akan mempresentasikan antigen ke permukaan sel. Hasil pemrosesan antigen akan berikatan dengan molekul MHC kelas II yang akan dikenali oleh Limfosit T. Limfosit T akan memproduksi IL-2 , IL-4 yang akan memacu proliferasi limfosit (*Autocrine Growth Factors*) dan CTLA-4 yang merupakan faktor penghambat proliferasi limfosit.

Makrofag akan mengeluarkan IL-12 yang akan membantu deferensiasi sel T menjadi sel T<sub>H</sub>1 dan memacu aktifitas sel NK. Sel T CD4+ akan mengeluarkan IL-2 yang membantu deferensiasi sel T menjadi sel T CD8+ dan IFN $\gamma$  yang akan memacu aktifasi makrofag dalam proses mengeliminir bakteri intraseluler.

*Ganoderma lucidum* berefek meningkatkan produksi IL-2 yang merupakan faktor pertumbuhan limfosit dan IFN  $\gamma$  yang memacu aktifasi makrofag.

## II.5.2. KERANGKA KONSEP



Pada penelitian ini diukur proliferasi limfosit mencit, sebab sudah menggambarkan adanya respon imun seluler mencit. Jumlah relatif limfoblas per 200 sel diambil dari limpa, limfonodi dan timus dengan dasar jumlah sel T di limpa 30-40%, sel T di limfonodi 70-80% dan sel T di timus 90%.

## II.5.3. HIPOTESIS PENELITIAN

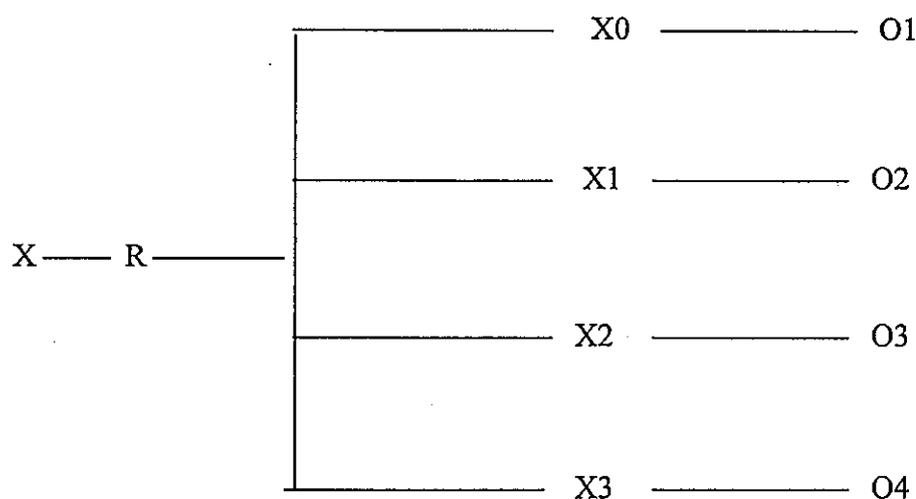
Pemberian *Ganoderma lucidum* meningkatkan proliferasi limfosit ( berat limpa; jumlah limfosit limpa, limfonodi dan timus; jumlah relatif limfoblas per 200 sel limpa, limfonodi dan timus ) pada mencit BALB/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*.

### BAB III

#### METODA PENELITIAN

##### III.1. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan menggunakan desain “*The Post Test Only Control Group Design*”. Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap. Perlakuan adalah dengan pemberian *Ganoderma lucidum* pada mencit dengan keluaran adalah perubahan respon imun seluler.



Keterangan :

X → R : masa adaptasi selama 1 minggu

R : randomisasi

- X0 : kontrol, sebagai pembanding mencit hanya mendapat pakan standar dan suntikan *S.typhimurium* pada hari ke 15.
- X1 : mencit mendapat pakan standar dan ekstrak GL 4 mg/hari selama 14 hari.
- X2 : mencit mendapat pakan standar dan ekstrak GL 0,1 mg/hari selama 14 hari, kemudian disuntik *S. typhimurium* pada hari ke 15
- X3 : mencit mendapat pakan standar dan GL 4 mg/hari selama 14 hari, kemudian disuntik dengan *S. typhimurium* hari ke 15
- O1 : pengamatan pada mencit kelompok kontrol.
- O2 : pengamatan pada mencit dengan perlakuan X1.
- O3 : pengamatan pada mencit dengan perlakuan X2.
- O4 : pengamatan pada mencit dengan perlakuan X3.

## III. 2. POPULASI DAN SAMPEL

### III.2.1. POPULASI

Populasi penelitian ini adalah mencit jantan strain BALB/c usia 8 - 10 minggu. Strain mencit yang dipilih adalah BALB/c sebab mencit ini pada umur antara 6 -12 minggu telah dilaporkan dapat menimbulkan respon imunitas seluler apabila mencit tersebut diinokulasi dengan *Salmonella typhimurium*.

Penentuan jenis kelamin mencit yang dipakai pada penelitian ini perlu dilakukan karena hormon estrogen, progesteron dan testoteron dapat mempengaruhi respon imunitas. Pada mencit yang berumur 7 minggu telah terjadi stadium ovulasi yang waktunya berbeda antara antara mencit yang satu dengan yang lain sehingga rasio

kadar estrogen dan progesteron pada tiap mencit berbeda-beda. Oleh karena itu pada penelitian ini dipilih mencit dengan jenis kelamin jantan.

### **III.2. 2 SAMPEL**

#### **III.2. 2.a. Cara pengambilan sampel.**

Sampel diambil dari mencit yang secara genetis sifatnya sama, maka pengambilan secara random atau tidak, tidak menjadi masalah. Untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan, maka pengelompokan sampel dilakukan secara acak.

Sebelum diberikan perlakuan, mencit diadaptasikan dulu selama 1 minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Setelah menjalani masa adaptasi mencit dibagi menjadi 4 kelompok secara acak.

#### **III.2. 2. b. Jumlah Sampel**

Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok ada 6 ekor mencit. Jadi jumlah seluruh mencit yang diperlukan ada 24 ekor.

### **III. 3. VARIABEL PENELITIAN**

#### **Variabel Bebas :**

Sebagai variabel bebas dalam penelitian ini adalah adalah *Ganoderma lucidum*. *Ganoderma lucidum* yang dipakai berupa ekstrak yang diperoleh dengan

cara ekstraksi dengan etanol yang dilakukan di Lab. FMIPA UNDIP. Jamur *Ganoderma lucidum* diperoleh dari PT. Sido Muncul. Dosis yang digunakan adalah 0,1 mg/hari dan 4 mg/hari.

#### **Variabel tergantung :**

Sebagai variabel tergantung adalah : Respon proliferasi limfosit berupa (1) berat limpa, (2) jumlah limfosit limpa, limfonodi dan timus, (3) jumlah relatif limfoblas yang diukur dari preparat hapus limpa, limfonodi dan timus yang dicat Giemsa kemudian dihitung limfoblas per 200 sel limpa, limfonodi dan timus .

#### **Variabel Kendali**

Pada penelitian ini digunakan *Salmonella typhimurium* sebagai imunogen . *Salmonella typhimurium* yang dipakai adalah strain *Salmonella virulen* (phagetype 501). dengan dosis LD<sub>50</sub> kurang lebih 10<sup>4</sup> bakteri. Dosis yang digunakan adalah 10<sup>2</sup>.

#### **Keterbatasan Penelitian**

Pada penelitian ini tidak diperiksa adanya petanda sel limfosit T terutama sel T<sub>H1</sub>, sitokin yang dihasilkan oleh makrofag untuk memacu proliferasi sel T<sub>H1</sub> ( IL-12) karena reagen harus diimpor dari Amerika Serikat; yang diperiksa adalah respon proliferasi limfosit karena sudah menggambarkan adanya proliferasi limfosit T dimana bahan pemeriksaannya adalah limpa, limfonodi dan timus.

### III. 4. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran UNDIP ( Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Bioteknologi).

Penelitian dilakukan mulai 5 April 2001 sampai dengan 27 April 2001

### III. 5. BAHAN PEMERIKSAAN

Limpa, limfonodi dan timus mencit.

### III. 6. ALAT/INSTRUMEN PENELITIAN

- 24 buah kandang hewan coba individual
- spuit disposable
- object glass
- mikroskop
- timbangan
- sentrifuge
- kanul mulut
- petri disk

### III. 7. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

- 24 ekor mencit jantan strain BALB/c, umur 8 – 10 minggu, diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standar selama 1 minggu secara ad libitum.
- 24 ekor mencit tersebut kemudian dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing 4 ekor yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual.

- Masing-masing kelompok mendapatkan pakan standar yang sama.
- Kelompok pertama mendapat pakan standar , pada hari ke 15 mendapat suntikan *S.typhimurium* intra vena kemudian pada hari ke 19 dilakukan pengambilan sampel.
- Kelompok kedua selain mendapat pakan standar dan ekstrak GL 4 mg/hari, pada hari ke 19 dilakukan pengambilan sampel.
- Kelompok ketiga mendapat pakan standar dan juga mendapatkan ekstrak *Ganoderma lucidum* sebanyak 0,1 mg/hari pada hari ke 15 mendapat suntikan *Salmonella typhimurium* secara intra vena ; pada hari ke 19 dilakukan pengambilan sampel.
- Kelompok keempat mendapat pakan standar dan ekstrak *Ganoderma lucidum* sebanyak 4 mg/hari, kemudian pada hari ke 15 mendapat suntikan *Salmonella typhimurium* intra vena; pada hari ke 19 dilakukan pengambilan sampel.
- Limpa ditimbang dalam miligram. Limpa, limfonodi dan timus masing-masing digerus sampai homogen.

### III. 8. ALUR KERJA

- \* 24 ekor mencit diadaptasikan selama 1 minggu dengan pakan standar ad libitum.
- \* Dibagi menjadi 4 kelompok secara acak , masing-masing kelompok dikandangan secara individual.
- \* Masing-masing kelompok mendapat makanan standar yang sama dan minum ad libitum.
- \* Kelompok I diberi suntikan *S.typhimurium* intra vena pada hari ke 15.
- \* Kelompok II diberi ekstrak GL 4 mg/hari.

- \* Kelompok III diberi *Ganoderma lucidum* dengan dosis 0,1 mg/hari dimulai 2 minggu (14 hari) sebelum disuntik *Salmonella typhimurium* pada hari ke 15.
- Kelompok IV diberi *Ganoderma lucidum* dengan dosis 4 mg/hari dimulai 2 minggu (14 hari) sebelum disuntik *Salmonella typhimurium* pada hari ke 15.

I # \_\_\_\_\_ # X1 \_\_\_\_\_ # Mendapat *Salmonella typhimurium*

II.# \_\_\_\_\_ X2a \_\_\_\_\_ # Mendapat *G. lucidum*

III. # \_\_\_\_\_ X2b \_\_\_\_\_ # X1 \_\_\_\_\_ # Mendapat *G. lucidum* dan *S. typhimurium*

IV. # \_\_\_\_\_ X2c \_\_\_\_\_ # X1 \_\_\_\_\_ # Mendapat *G. lucidum* dan *S. typhimurium*

Keterangan :

X1 : pemberian *Salmonella typhimurium* intra vena pada hari ke 15.

X2 a: pemberiann *Ganoderma lucidum* 4 mg/hari

X2 b: pemberian *Ganoderma lucidum* 0,1 mg/hari

X2 c: pemberiann *Ganoderma lucidum* 4 mg/hari

Pemberian *Ganoderma lucidum* secara peroral, inokulasi *Salmonella typhimurium* dilakukan secara intra vena. Empat hari setelah disuntik *Salmonella typhimurium* dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit limpa, limfonodi dan timus mencit tersebut.

### III. 9. PEMERIKSAAN

#### III. 9. 1. PEMERIKSAAN PROLIFERASI LIMFOSIT.

Respon proliferasi limfosit mencit dilihat berdasarkan parameter makroskopis berupa ukuran berat limpa, serta parameter mikroskopis berupa jumlah limfosit (di dalam limpa, limfonodi dan timus) dan jumlah relatif sel limfosit muda (limfoblas).

Hewan coba dimatikan dengan cara dibius menggunakan eter kemudian disemprot dengan alkohol 70% pada bulunya untuk mengurangi kemungkinan pencemaran ke ruangan atau kontaminasi selama pembedahan. Mencit diletakkan terlentang, kemudian dilakukan pembedahan memanjang sampai dinding peritoneum terpampang lebar. Limpa diidentifikasi terletak di sisi kiri atas, berwarna merah tua dan berbentuk memanjang. Kemudian limpa diangkat dan dibersihkan dari jaringan ikat maupun pembuluh darah yang masih melekat. Limpa diletakkan di cawan petri berisi larutan PBS. Pengambilan limfonodi berasal dari limfonodi cervicales, limfonodi mesenterika dan limfonodi inguinales sedangkan timus diambil dengan cara membuka sternum.<sup>27</sup>

Pengukuran berat limpa menggunakan timbangan elektronik dalam satuan miligram.

Penghitungan jumlah limfosit dilakukan dengan cara sebagai berikut :

Limpa, limfonodi dan timus masing-masing diletakkan di atas saringan *stainless-steel* kemudian dihancurkan dan menjadi cair. Kotoran pada substrat dibersihkan, kemudian

dilakukan pengenceran dengan larutan PBS. Eritrosit dilisis dengan larutan  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , cuci dengan PBS sebanyak 2 kali. Limfosit limpa, limfonodi dan timus dihitung menggunakan bilik hitung Neubauer improve.

Penghitungan jumlah relatif limfoblast dilakukan pada sediaan apus substrat limpa, limfonodi dan timus dengan menggunakan pengecatan Giemsa dan dihitung per 200 sel. Sediaan apus dibuat dengan cara :

- Setetes substrat limpa diambil dan dibuat preparat apus di atas gelas sediaan.
- Dilakukan fiksasi dengan menggunakan metanol dan dikeringkan.
- Dicat dengan pewarna Giemsa.
- Jumlah sel limfosit muda (limfoblast) dihitung dari 200 sel di area homogen menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali. Limfoblas berupa sel yang besar dengan inti sel yang bernukleolus, kromatin belum padat ( warna lebih muda ) , dan masih terlihat adanya sitoplasma; sedangkan limfosit ukuran selnya lebih kecil dengan inti bulat berkromatin padat (warna lebih tua ) tidak ada nucleolus dan hampir tak terlihat adanya sitoplasma.<sup>28</sup>

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Respon proliferasi limfosit mencit dilihat berdasarkan parameter makroskopis dan mikroskopis. Parameter makroskopis berupa ukuran berat limpa mencit. Parameter mikroskopis berupa jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas per 200 sel limfoblas dan limfosit di dalam limpa, limfonodi dan timus. Data diperoleh dari preparat hapus organ limpa, limfonodi dan timus serta jumlah limfosit limpa limfonodi dan timus yang dilakukan oleh penulis dan analis Laboratorium Bioteknologi FK UNDIP (pembacaan dilakukan *duplo* ).

#### IV. 1. HASIL

Dari 24 hewan coba, pada hari ke 18 perlakuan tinggal 21 ekor, karena 3 ekor mencit kelompok ke 1 ( yang mendapat *S. typhimurium* ) mati. Dari tiap ekor mencit diambil limpa, limfonodi dan timus. Limpa ditimbang dengan timbangan elektrik dalam miligram. Limpa, limfonodi dan timus diperiksa jumlah limfosit dan jumlah limfoblas dalam 200 sel limfoblas dan limfosit .

##### IV.1.1. Distribusi Variabel Penelitian

Rata-rata berat limpa adalah 152,7 mg dengan simpang baku 45,8 mg, limpa teringan adalah 84,8 mg dan terberat adalah 279,7 mg, kurva distribusi normal.

Rata-rata jumlah limfosit di jaringan limpa adalah 11759,0 dengan simpang baku 8538,5. Jumlah limfosit paling sedikit adalah 780 dan paling banyak adalah 36.650. Dengan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov, kurva distribusi data normal. Rata-rata jumlah limfosit di jaringan limfonodi adalah 6187,7 dengan simpang baku 5003,3. Jumlah limfosit paling sedikit adalah 1011 dan terbanyak adalah 18.050. Dengan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov kurva distribusi data limfosit normal. Rata-rata jumlah limfosit di jaringan timus adalah 2790,4 dengan simpang baku 2589,6. Jumlah limfosit paling sedikit adalah 188 dan jumlah terbanyak adalah 7070. Dengan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov, kurva distribusi data normal.

Rata-rata jumlah limfoblas per 200 sel di jaringan limpa adalah 151,0 dengan simpang baku 44,6. Jumlah limfoblas per 200 sel paling sedikit adalah 50 dan terbanyak adalah 206. Dengan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov, kurva distribusi data normal. Rata-rata jumlah limfoblas per 200 sel di jaringan limfonodi adalah 164,2 dengan simpang baku 39,9. Jumlah limfoblas per 200 sel paling sedikit adalah 45 dan terbanyak adalah 195. Dengan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov, kurva distribusi data tidak normal. Rata-rata jumlah limfoblas per 200 sel di jaringan timus adalah 151,0 dengan simpang baku 33,2. Jumlah limfoblas per 200 sel paling sedikit adalah 62 dan terbanyak adalah 188. Dengan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov, kurva distribusi data normal.

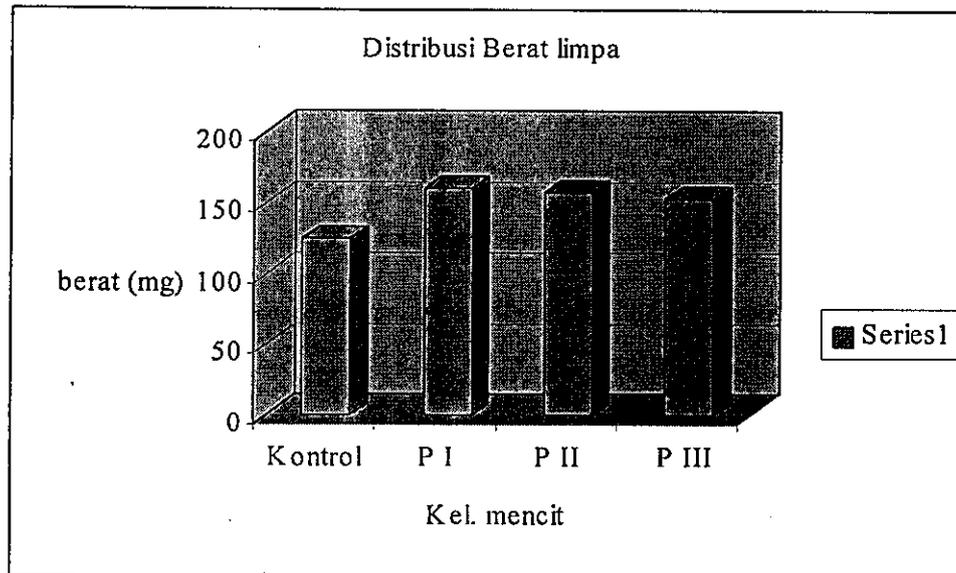
Merujuk distribusi data di atas maka semua data kecuali data limfoblas per 200 sel dari jaringan limpa, distribusinya normal; oleh sebab itu untuk mengetahui apakah ada perbedaan rata-rata sel-sel tersebut di atas menurut kelompok perlakuan dapat

digunakan uji "one way anova". Sedangkan perbedaan rata-rata sel limfoblas pada jaringan limpa digunakan uji Kruskal-Wallis dan uji beda nyata terkecil digunakan uji Wilcoxon.

#### **IV.1.2. Berat Limpa**

Berat limpa yang digunakan sebagai obyek pengamatan berat rata-ratanya adalah  $152,7 \pm 45,8$  mg. Berat limpa kelompok P I ternyata paling tinggi yaitu 160,2 mg dan paling ringan pada kelompok kontrol, yaitu 125,8 mg. Secara statistik perbedaan di atas tidak memberikan bukti yang kuat, hal ini ditunjukkan dari hasil uji anova menunjukkan nilai p tidak signifikan ( $p = 0,765$ ). Uji LSD menunjukkan subset yang berada dalam satu garis, yang artinya rata-rata antara satu dan lainnya tidak berbeda secara signifikan. Dengan kata lain, data berat limpa tersebar homogen di semua kelompok perlakuan. Dengan demikian faktor jaringan tersebut pengaruhnya terhadap hasil ( sel-sel limfosit dan limfoblas ) dapat dikendalikan.

Gambar 4.



Hasil uji beda makna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ( uji Anova)  $p = 0,765$

Tabel 4.

Hasil uji beda makna antar kelompok ( Uji LSD) Berat Limpa

Kelompok	kontrol	P I	P II	P III
kontrol	-	0,327	0,357	0,429
P I	0,327	-	0,941	0,809
P II	0,357	0,941	-	0,868
P III	0,429	0,809	0,868	-

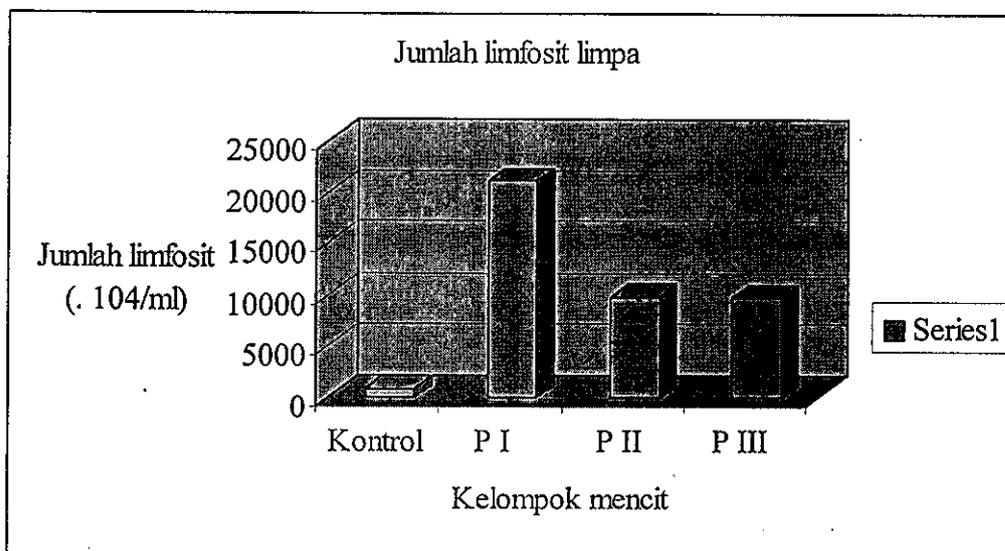
Hasil uji beda makna antar kelompok ( Uji LSD) keempat kelompok berada di dalam 1 subset, hal ini menunjukkan berat rata-rata antara satu kelompok dengan lainnya tidak berbeda secara signifikan.

#### **IV.1.3 Jumlah Limfosit**

##### **A. Jumlah limfosit jaringan limpa.**

Jumlah limfosit jaringan limpa terbanyak pada kelompok P I ( $21.098,3 \pm 9970,5$ ) dan terkecil terdapat dalam kelompok Kontrol ( $856,7 \pm 80,2$ ). Dengan uji anova menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan  $p < 0,005$  ( $0,0005$ ). Dengan uji beda makna terkecil (LSD) nampak ada 3 susunan subset, subset 1 (Kontrol), subset 2 (P II dan P III) dan subset 3 (P I) yang berarti rata-rata jumlah limfosit sel jaringan limpa kelompok kontrol berbeda bermakna dibanding kelompok P I, P II, P III. Rata-rata jumlah limfosit limpa kelompok P I juga berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol, P II dan P III. Jumlah limfosit kelompok P II dan P III berbeda bermakna terhadap kelompok Kontrol dan P I; namun jumlah limfosit kelompok P II dan P III sendiri tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan walaupun jumlah limfosit P II lebih tinggi.

Gambar 5.



Hasil uji beda makna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ( uji Anova)  $p = 0,001$

Tabel 5.

Hasil uji beda makna antar kelompok ( Uji LSD) Jumlah Limfosit Limpa

Kelompok	kontrol	P I	P II	P III
kontrol	-	0,000	0,037	0,037
P I	0,000	-	0,003	0,003
P II	0,037	0,003	-	0,988
P III	0,037	0,003	0,988	-

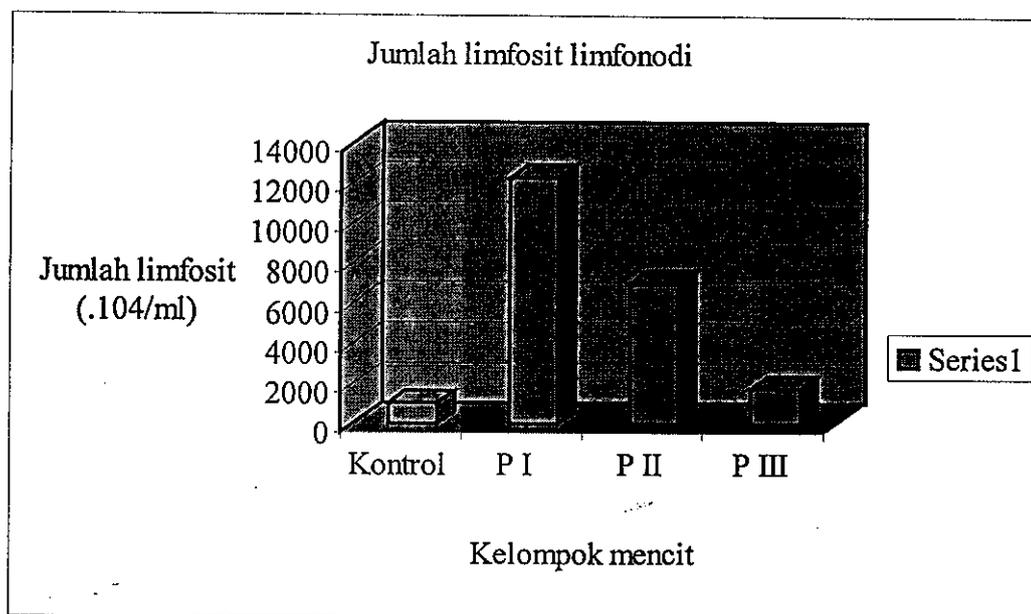
#### B. Jumlah Limfosit jaringan limfonodi.

Jumlah limfosit jaringan limfonodi terbanyak pada kelompok P I (  $12.291,7 \pm 3778,5$  ) dan terkecil terdapat dalam kelompok Kontrol (  $1087,0 \pm 99,8$  ). Dengan uji anova

menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan  $p < 0,005$  (  $0,0000$  ). Dengan uji LSD ternyata perbedaan ini antara kelompok Kontrol dengan kelompok perlakuan (P I, P II, P III), sedangkan antara kelompok P I berbeda bermakna dibanding kelompok P II dan P III . Dengan kata lain pemberian GL 4 mg akan menghasilkan jumlah limfosit limfonodi yang lebih banyak dibanding pada mencit yang hanya diberi *S.typhimurium*, *S.typhimurium* & GL 0,1 mg atau *S.typhimurium* & GL 4 mg.

Gambar 6.

Distribusi Jumlah limfosit jaringan limfonodi pada tiap kelompok coba ( $10^4 / \text{ml}$ ).



Hasil uji beda makna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ( uji Anova)  $p = 0,000$

Tabel 6.

Hasil uji beda makna antar kelompok ( Uji LSD) Jumlah Limfosit Limfonodi

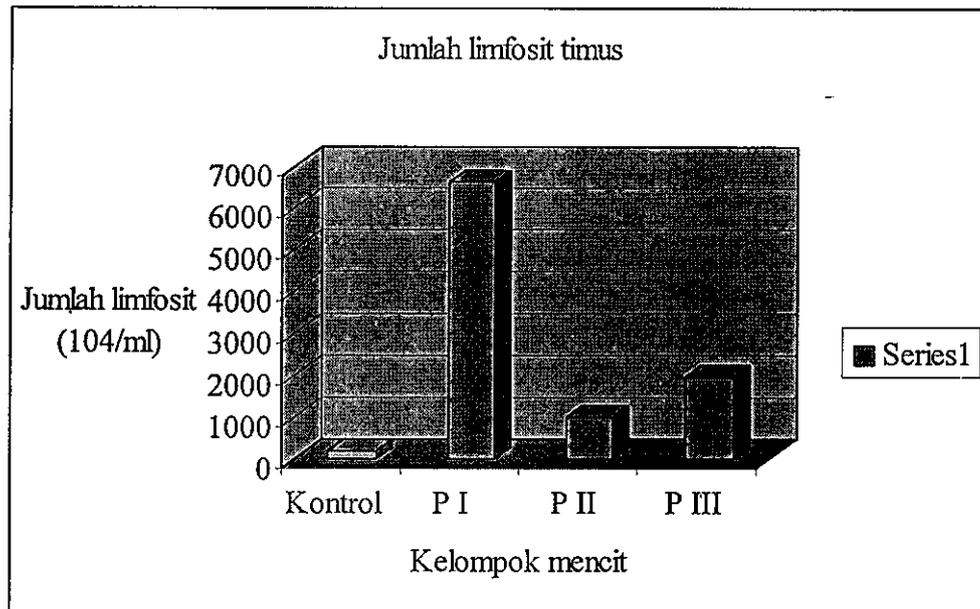
Kelompok	kontrol	P I	P II	P III
kontrol	-	0,000	0,001	0,641
P I	0,000	-	0,001	0,000
P II	0,001	0,001	-	0,001
P III	0,641	0,000	0,001	-

### C. Jumlah Limfosit pada jaringan timus.

Jumlah limfosit jaringan timus terbanyak pada kelompok P I (  $6656,7 \pm 324,4$  ) dan terkecil terdapat dalam kelompok Kontrol (  $192,7 \pm 4,2$  ). Dengan uji anova menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan  $p < 0,005$  ( 0,000 ). Dengan uji LSD ternyata perbedaan ini bermakna antara masing-masing kelompok. Dengan kata lain Kelompok Kontrol berbeda dengan kelompok P I, P II dan P III; kelompok P I berbeda dengan kelompok P II, P III dan Kontrol; kelompok P II berbeda dengan kelompok P I, P III dan Kontrol; kelompok P III berbeda dengan kelompok P I, P II dan Kontrol. Dapat dikatakan bahwa Jumlah limfosit timus mencit yang diberi GL 4 mg saja terbentuk lebih banyak dibandingkan mencit yang diberi *S.typhimurium*, *S.typhimurium* dan GL 4 mg atau *S.typhimurium* dan GL 0,1 mg.

Gambar 7.

Distribusi Jumlah limfosit jaringan timus pada tiap kelompok coba ( $10^4 / \text{ml}$ ).



Hasil uji beda makna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ( uji Anova)  $p = 0,000$

Tabel 7.

Hasil uji beda makna antar kelompok ( Uji LSD) Jumlah Limfosit Timus

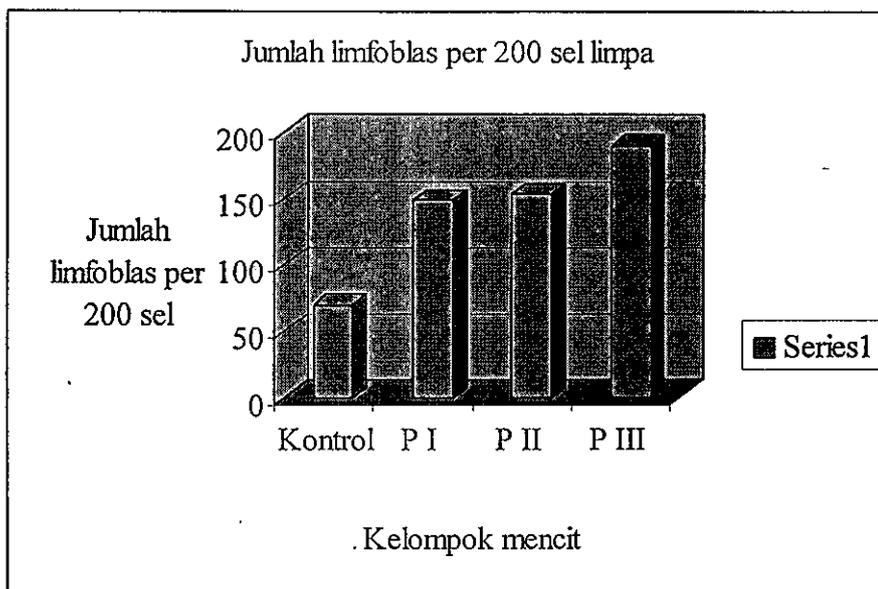
Kelompok	kontrol	P I	P II	P III
Kontrol	-	0,000	0,002	0,000
P I	0,000	-	0,000	0,000
P II	0,002	0,000	-	0,000
P III	0,000	0,000	0,000	-

#### IV.1.4 Jumlah Limfoblas per 200 sel

##### A. Jumlah Limfoblas per 200 sel pada jaringan limpa

Rata-rata jumlah limfoblas per 200 sel jaringan limpa kelompok P III tampak paling tinggi (  $190,8 \pm 9,0$  ) dibanding kelompok lain bahkan dibanding kelompok Kontrol (  $69,7 \pm 17,6$  ) bedanya cukup besar. Perbedaan rata-rata jumlah limfoblas per 200 sel jaringan limpa antar kelompok coba sangat bermakna (  $p < 0,05$  ). Dengan uji beda makna terkecil (LSD) nampak ada 3 susunan subset, subset 1 dan subset 3 yang hanya berisi kontrol dan kelompok P III yang berarti rata-rata jumlah limfoblas per 200 sel jaringan limpa kelompok kontrol berbeda bermakna dibanding kelompok P I, P II, P III. Rata-rata jumlah limfoblas per 200 sel limpa kelompok P III juga berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol, P I dan P II. Jumlah limfoblas per 200 sel limpa kelompok P I dan P II berbeda bermakna terhadap kelompok Kontrol dan P III; namun jumlah limfoblas per 200 sel kelompok P I dan P II sendiri tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan walaupun jumlah limfoblas per 200 sel P II lebih tinggi. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pemberian GL 4 mg & *S.typhimurium* menimbulkan reaksi pembentukan limfoblas di limpa yang lebih tinggi dibandingkan pada mencit yang hanya diberi *S.typhimurium*, GL 4 mg atau campuran *S.typhimurium* dan GL 0,1 mg.

Gambar 8.



Hasil uji beda makna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ( uji Anova)  $p = 0,000$

Tabel 8.

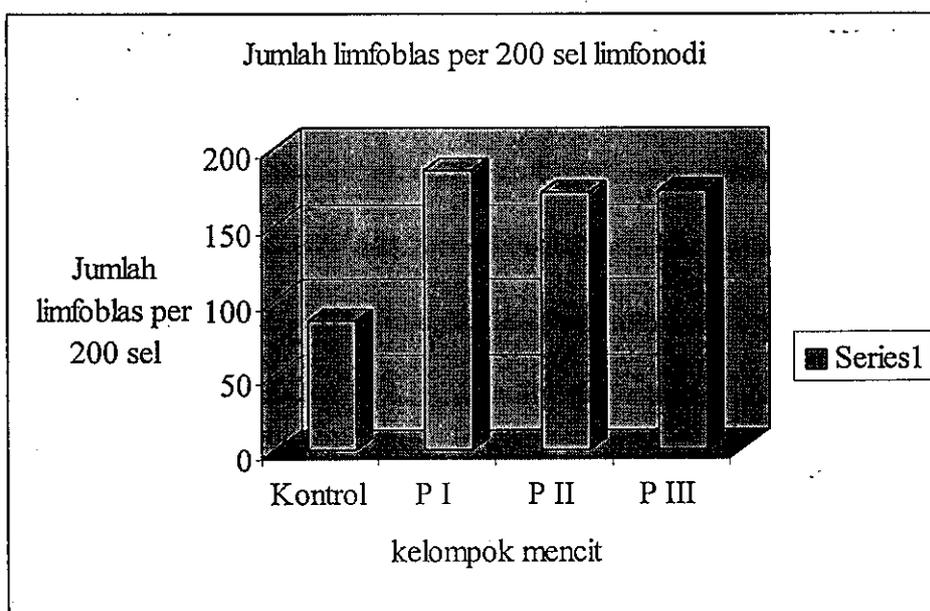
Hasil uji beda makna antar kelompok ( Uji LSD) Jumlah Limfoblas per 200 sel Limpa

Kelompok	kontrol	P I	P II	P III
kontrol	-	0,000	0,000	0,000
P I	0,000	--	0,688	0,009
P II	0,000	0,688	-	0,020
P III	0,000	0,009	0,020	-

### B. Jumlah Limfoblas per 200 sel pada jaringan limfonodi.

Jumlah limfoblas per 200 sel limfonodi pada kelompok P I paling tinggi dibanding kelompok lainnya, perbedaannya sangat bermakna. Bila ditelusuri lebih lanjut dengan uji LSD, ternyata perbedaan bermakna tersebut adalah perbedaan antara kelompok Kontrol dengan kelompok perlakuan, sedangkan antara kelompok P I, P II dan P III tidak menunjukkan perbedaan bermakna ( subset 2 ), ketiga kelompok berada dalam satu subset. Jadi mencit yang diberi GL 4 mg saja, reaksi pembentukan limfoblas di jaringan limfonodi tidak berbeda dibanding bila diberi GL 4 mg & *S. typhimurium* atau diberi GL 0,1 mg & *S. typhimurium*.

Gambar 9.



Hasil uji beda makna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ( uji Anova)  $p = 0,000$

Tabel 9.

Hasil uji beda makna antar kelompok ( Uji LSD) Jumlah Limfoblas per 200 sel

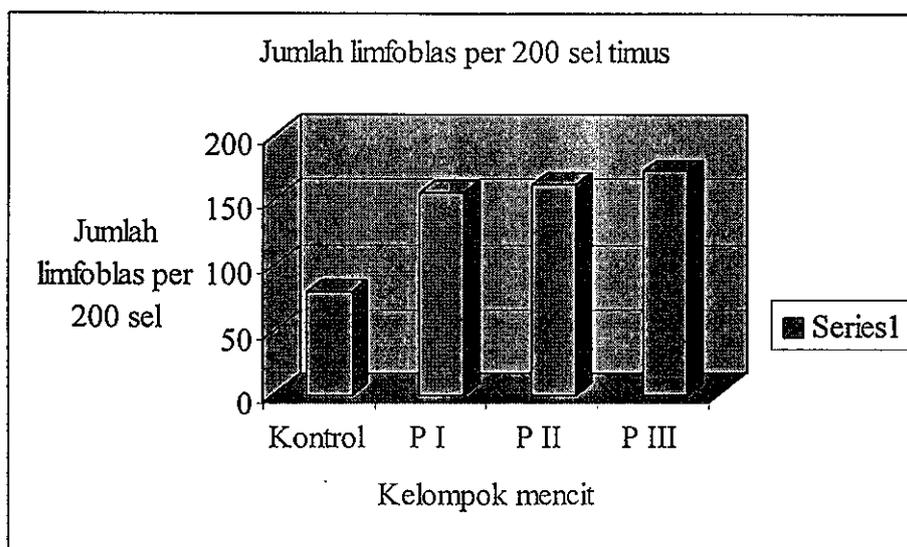
Limfonodi

Kelompok	kontrol	P I	P II	P III
Kontrol	-	0,000	0,000	0,000
P I	0,000	-	0,329	0,369
P II	0,000	0,329	-	0,935
P III	0,000	0,369	0,935	-

### C. Jumlah limfoblas per 200 sel jaringan timus.

Jumlah limfoblas per 200 sel pada jaringan timus ternyata pada kelompok P III yang terbanyak, jumlah terkecil terdapat pada kelompok kontrol. Perbedaan bermakna tersebut adalah perbedaan antara kelompok Kontrol dengan kelompok perlakuan, sedangkan antara kelompok P I, P II dan P III tidak menunjukkan perbedaan bermakna ( subset 2 ), ketiga kelompok berada dalam satu subset ( dengan uji LSD ). Dapat disimpulkan bahwa pemberian GL 4 mg saja tidak berbeda bermakna dengan pemberian campuran *S.typhimurium* dan GL 0,1mg atau *S.typhimurium* dan GL 4 mg dalam reaksi pembentukan limfoblas di timus.

Gambar 10.



Hasil uji beda makna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ( uji Anova)  $p = 0,000$

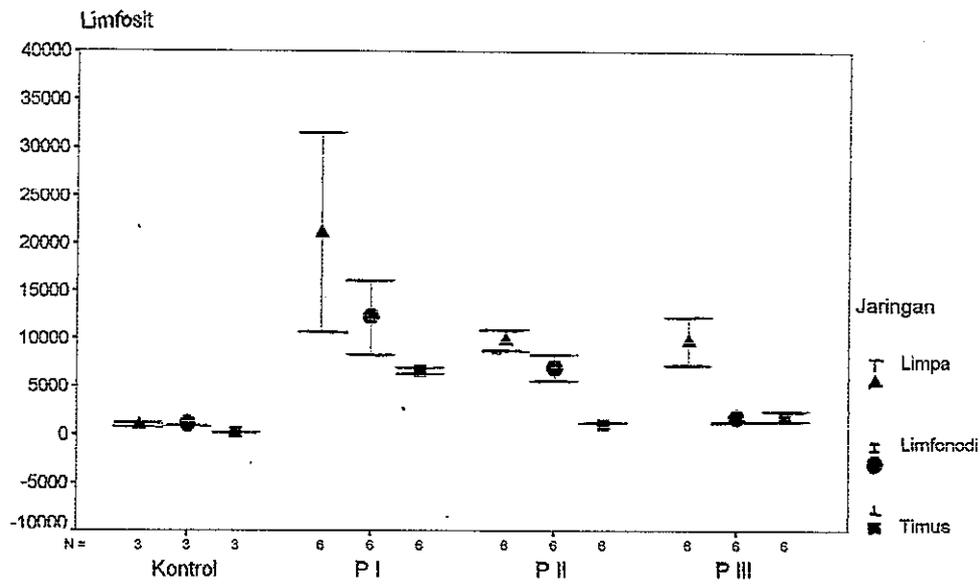
Tabel 10.

Hasil uji beda makna antar kelompok ( Uji LSD) Jumlah Limfoblas per 200 sel Timus

Kelompok	kontrol	P I	P II	P III
kontrol	-	0,000	0,000	0,000
P I	0,000	-	0,419	0,054
P II	0,000	0,419	-	0,231
P III	0,000	0,054	0,231	-

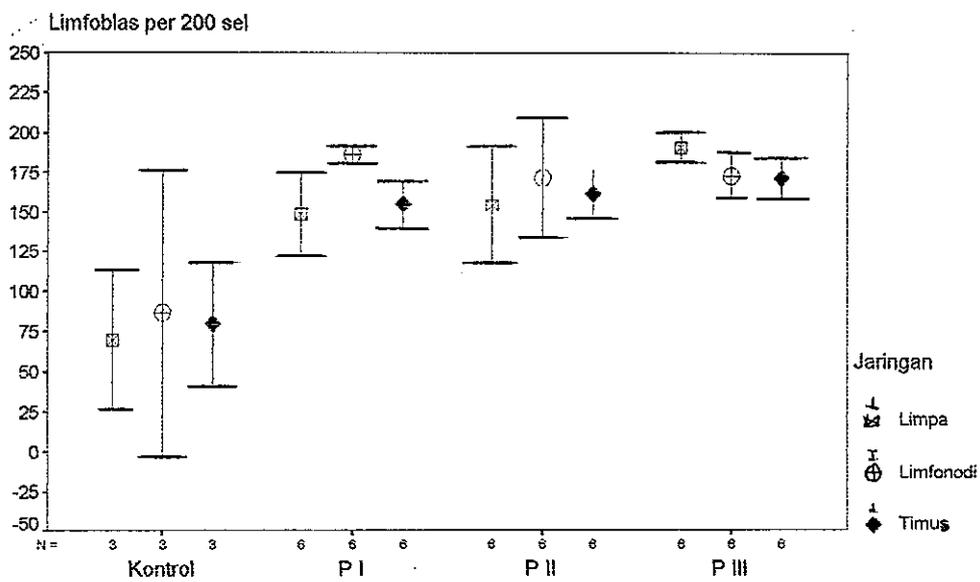
Gambar 11.

Jumlah Limfosit Limpa, Limfonodi dan Timus



Gambar 12.

Jumlah Limfoblas per 200 sel limpa, limfonodi dan timus.



#### IV. 2. PEMBAHASAN

Respon imun tubuh terdiri dari berbagai fase yaitu fase pengenalan, fase aktifasi dan fase efektor. Pada fase aktifasi ditandai dengan adanya proliferasi limfosit. Proliferasi limfosit ini berupa peningkatan produksi limfoblas yang nantinya akan menjadi limfosit dan secara makroskopis dapat berupa pembesaran organ-organ limfoid.

Pemberian *Ganoderma lucidum* dapat menyebabkan bertambahnya berat limpa mencit, tetapi penambahan berat ini tidak bermakna bila dibandingkan dengan kelompok yang hanya mendapatkan imunogen *S. typhimurium*. Kino,dkk mengatakan bahwa LZ-8 yang terdapat dalam *Ganoderma lucidum* dapat berfungsi sebagai anti inflamasi demikian juga Stavinoha (1997) juga berpendapat bahwa *Ganoderma lucidum* punya efek anti inflamasi sehingga pembesaran organ yang merupakan akibat dari inflamasi kemungkinan juga ditekan. Kemungkinan yang lain adalah pemberian *Ganoderma lucidum* yang hanya 18 hari belum dapat menambah jaringan limpa sehingga berat limpa mencit yang mendapat *G.lucidum* atau tidak, tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Pemberian *Ganoderma lucidum* dapat meningkatkan produksi limfosit di limpa, limfonodi dan timus. Peningkatan produksi limfosit ini bermakna dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak mendapat *Ganoderma lucidum*. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Zhang,dkk (1993) yang melaporkan bahwa pemberian *G. lucidum* dapat meningkatkan produksi IL-2 splenosit mencit, dimana IL-2 ini sangat berperan dalam peningkatan proliferasi limfosit. Demikian juga

produksi limfoblas yang meningkat bermakna pada mencit yang diberi *G.lucidum* dibanding dengan mencit yang tidak mendapat *G.lucidum*. Peningkatan produksi limfosit ini terbanyak pada kelompok P I yaitu yang hanya mendapat *G.lucidum* 4 mg/hari.

Pemberian *G.lucidum* meningkatkan jumlah limfoblas per 200 sel pada organ limpa, limfonodi dan timus. Pada jaringan limpa dan timus jumlah limfoblas per 200 sel terbanyak pada kelompok P III ( mendapat *S. typhimurium* dan *G. lucidum* 4 mg/hari ) sedangkan pada limfonodi terbanyak pada kelompok P I (mendapat *G.lucidum* 4 mg/hari ).

Diasumsikan kalau jumlah relatif limfoblasnya tinggi maka pada kelompok tersebut akan didapatkan jumlah limfosit yang tinggi pula. Perbedaan dimana jumlah limfoblas tertinggi pada kelompok P III sedangkan jumlah limfosit tertinggi ada pada kelompok P I mungkin disebabkan adanya pengaruh dari *S. typhimurium*, dimana pada infeksi bakteri intraseluler dapat terjadi "suppression" sehingga pematangan limfoblas menjadi limfosit terganggu. Penekanan ini bersifat multifaktorial dan fenomena ini belum diketahui secara lengkap. Fenomena ini melibatkan berbagai faktor yang dikendalikan oleh bacteria dan sel host. Beberapa komponen yang sudah diketahui adalah yang disekresikan oleh *M. leprae* yaitu *Lipoarabinomannan* (LAM), *Phenolic glycolipid* (PGL) dan *Sulfatides* (ST) yang mempengaruhi secara langsung aktivasi sel T dan menyebabkan sekresi faktor-faktor penghambat sel T oleh makrofag yaitu Prostaglandin, IL-10 dan TGF- $\beta$ .<sup>34</sup>

Dari hasil penelitian yang didapat, dimana *Ganoderma lucidum* dapat meningkatkan respon proliferasi limfosit mencit maka *Ganoderma lucidum* kemungkinan dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan respon proliferasi limfosit manusia dimana dapat digunakan untuk terapi tambahan pada pengobatan infeksi bakteri intraseluler.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### V.1. KESIMPULAN

1. Pemberian *Ganoderma lucidum* meningkatkan berat limpa mencit yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* secara tidak bermakna.
2. Pemberian *Ganoderma lucidum* meningkatkan jumlah limfosit limpa, limfonodi dan timus mencit yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* secara sangat bermakna.
3. Pemberian *Ganoderma lucidum* meningkatkan jumlah limfoblas per 200 sel limpa, limfonodi dan timus mencit yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* secara sangat bermakna.

#### V.2. SARAN

1. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek *Ganoderma lucidum* terhadap fungsi makrofag dalam hal mengeliminir bakteri intraseluler.
2. Perlu dilakukan penelitian klinik untuk mengetahui efek *Ganoderma lucidum* terhadap infeksi bakteri intraseluler misalnya *Salmonella typhi*.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah ada faktor penghambat pematangan limfosit yang berasal dari *Salmonella typhimurium*.

## BAB VI

### RINGKASAN

*Ganoderma lucidum* sebagai obat tradisional telah banyak digunakan untuk terapi berbagai macam penyakit. *Ganoderma lucidum* dilaporkan mempunyai efek hepatoprotektor, anti tumor dan anti inflamasi. Sebagai imunomodulator *Ganoderma lucidum* dapat meningkatkan ekspresi sel T CD4+ dan perubahan fenotip sel T. Zhang,dkk (1993) melaporkan bahwa *Ganoderma lucidum* dapat meningkatkan produksi IL-2 sel splenosit mencit.

Respon imun tubuh terhadap bakteri intraseluler ada 3 fase yaitu fase pengenalan, fase aktivasi dan fase efektor. Pada fase pengenalan peran makrofag sebagai sel penyaji sangat penting. Peran itu adalah menyajikan molekul antigen sehingga dapat dikenali oleh sel T. Interaksi makrofag sebagai sel penyaji dengan sel T akan mengakibatkan dikeluarkannya berbagai sitokin, diantaranya adalah IL-2 yang akan memacu aktivasi sel T. Pada fase ini akan terjadi proliferasi dan diferensiasi sel T yang bertujuan untuk mengeliminasi bakteri.

Salah satu bakteri intraseluler adalah *Salmonella typhimurium* yang merupakan patogen pada mencit, dimana akibat yang ditimbulkan identik dengan infeksi *Salmonella typhi* pada manusia. Untuk mengeliminasi bakteri ini sangat diperlukan peran imunitas seluler tubuh, yaitu peran makrofag dan sel T.

Diselidiki pengaruh *Ganoderma lucidum* terhadap respon imun seluler yang berupa proliferasi limfosit mencit yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*. Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan bahwa pemberian *Ganoderma lucidum*

meningkatkan respon proliferasi limfosit yang berupa peningkatan berat limpa, jumlah limfosit limpa, limfonodi dan timus serta peningkatan jumlah limfoblas per 200 sel limpa, limfonodi dan timus.

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah eksperimental sesungguhnya dengan “ *The Posttest Only Control Group Design*”. Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia dan Laboratorium Bioteknologi FK UNDIP.

Mencit jantan galur BALB/c, umur 6-8 minggu sebanyak 24 ekor dibagi secara acak menjadi 4 kelompok dengan beda perlakuan. Kelompok ke 1 ( Kontrol) mendapat inokulasi *S.typhimurium*, kelompok ke 2 ( P I ) mendapat *G.lucidum* 4 mg/hari, kelompok ke 3 ( P II ) mendapat *G.lucidum* 0,1 mg/hari + *S.typhimurium*, kelompok ke 4 ( P III ) mendapat *G.lucidum* 4 mg/hari + *S.typhimurium*. Pemberian *G.lucidum* dimulai pada hari pertama sampai dengan hari ke 18, pemberian *S.typhimurium* dilakukan pada hari ke 15 secara intravena sebanyak  $10^2$ .

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian *Ganoderma lucidum* meningkatkan berat limpa mencit, walaupun tidak bermakna (  $p > 0,05$  ). Mungkin karena pengaruh *G.lucidum* yang mempunyai efek anti inflamasi sehingga pembesaran limpa tidak begitu nyata. Kemungkinan lainnya adalah pemberian *G.lucidum* yang hanya 18 hari belum menimbulkan penambahan jaringan limpa. Pemberian *G.lucidum* terbukti meningkatkan jumlah limfosit dan jumlah limfoblas per 200 sel di jaringan limpa, limfonodi dan timus secara sangat bermakna (  $p < 0,001$  ). Dosis *G.lucidum* yang diberikan ternyata tidak begitu memberikan perbedaan.

Adanya peningkatan jumlah limfosit dan jumlah limfoblas per 200 sel di limpa, limfonodi dan timus dapat dikatakan terjadi peningkatan respon imun seluler yaitu peningkatan proliferasi limfosit, dan karena di timus dan limfonodi bagian terbesar adalah limfosit T maka diperkirakan peningkatan proliferasi limfosit akibat pemberian *G.lucidum* ini adalah peningkatan proliferasi limfosit T.

Simpulan dari hasil penelitian ini ialah bahwa pemberian *G.lucidum* meningkatkan secara bermakna jumlah limfosit limpa, limfonodi dan timus mencit serta jumlah limfoblas per 200 sel limpa, limfonodi dan timus mencit dan meningkatkan secara tidak bermakna berat limpa mencit yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*.

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek *G.lucidum* terhadap makrofag dalam hal mengeliminir bakteri intraseluler, perlu dilakukan penelitian klinik untuk mengetahui efek peningkatan respon imun seluler terhadap infeksi bakteri intraseluler oleh *Salmonella typhi* dan dapat pula dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap kemungkinan adanya faktor penghambat pematangan limfosit pada *S. typhimurium*.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Mizuno T. Studies on Bioactive Substances and Medicinal Effect of Reishi, *Ganoderma lucidum* in Japan. The 1<sup>st</sup> International Symposium on *Ganoderma lucidum* in Japan. Tokyo, 1997.
2. Wang SY, Hsu ML, Hsu HC et al. The anti tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokine released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer*, 1997; 70: 699-705.
3. Sunee S, Phanuphak P, Hanvanich M. The immunomodulating effects of lacquired mushroom (*Ganoderma lucidum*) on lymphocytes of HIV-infected patients. *Int Conf AIDS*, 1992;3:135.
4. Abbas A K, Lichtman AH, Pober JS. *Celluler and Molecular Immunology*, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, WB Saunders, 1997 : 346-9.
5. Schwacha MG, Meissler JJ Jr, Eisenstein TK. *Salmonella typhimurium* infection in mice induces nitric oxide-mediated immunosuppression through a natural killer cell-dependent pathway. *Infect Immun* 1998; 66 (12) : 5862-6.

6. Umezawa K et al. Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice, *Infect Immun*, 65(7):2932-40 1997 Jul.
7. Huckstep RL. Typhoid fever and other *Salmonella* infection. E S Livingstone, Ltd. London, 1962.
8. Soeharjo . Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap kejadian perdarahan dan perforasi pada demam tifoid, Disertasi , Semarang, 1990.
9. Darmono WT. Solusi penanggulangan *Ganoderma* pada tanaman kelapa sawit melalui sanitasi lahan dan aplikasi fungisida. Bogor, 1998
10. Ginting G, Fatmawati, Hutomo T. Perbanyakkan pohon induk dura yang diduga toleran terhadap *ganoderma* melalui teknik kultur jaringan. *Berita PPKS* 1993; 1(1): 21-5
11. Purba YR. *Ganoderma*, penyebab penyakit yang menjadi obat. *Buletin Puslitbun Marihat* 1992; 12(No 3) : 52-3
12. Park EJ, Ko G, Kim J, Sohn DH. Antifibrotic effects of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, Glycyrrhizin, and pentoxifyllin in rats with chirrrosis induced by biliary obstruction. *Biol Pharm Bull* 1997; 20: 417-20

13. Kim KC, Kim IG. Ganoderma lucidum extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation. *Int J Mol Med* 1999; 4(3): 273-7
14. Sudirman LI, Mujiati S. Preliminary detection of antimicrobial activity of fruiting bodies extracts of tropical Ganoderma sp. The 1st International Symposium On Ganoderma Lucidum In Japan. Tokyo, 1997.
15. Yoon SY, Eo SK, Kim YS, Lee CK, Han SS. Antimicrobial Activity of Ganoderma lucidum Extract alone and combination with some antibiotics. *Arch Pharm Res* 1994 Dec; 17(6):438-42
16. Zhang LX, Mong H, Zhou XB. Effect of Japanese Ganoderma lucidum on production of IL-2 from murine splenocytes. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 1993 Oct;13(10):613-5.582.
17. van der Hem LG, van der Vliet JA, Bocken CF et al. Ling Zhi-8 : Studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation*, 1995 Sep 15;60(5):438-43.
18. Kino K, Sone T, Watanabe J et al. Immunomodulator, LZ-8, prevent antibody production in mice. *Int J Immunopharmacol*, 1991;13(8):1109-15.

19. Chang YR. Role of Ganoderma supplementation in cancer management. *Rheishi* 1997; 3: 1-3
20. Parslow TG. The Immune Response. In: *Medical Immunology*, 9<sup>th</sup> ed. Prentice Hall, New Jersey, 1997:63-72.
21. Imboden JB. T Lymphocytes and Natural Killer Cells. In: *Medical Immunology*, 9<sup>th</sup> ed. Prentice Hall, New Jersey, 1997:130-42.
22. Stewart FS. *Bigger's Bacteriology and Immunology for Students of Medicine*, 9<sup>th</sup> ed, Lowe and Brydone Ltd. Norfolk, 1974 : 353-69.
23. Keuter M. *Experimental Studies on The Pathogenesis of Salmonella Infection*, Thesis. Katholiek Universiteit Nijmegen. 1998.
24. Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology, *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(1) : 1-18.
25. Van Dissel J T, Leijh PCJ, van Furth R. Differences in Initial Rate of Intracellular killing of *Salmonella typhimurium* by Resident peritoneal Macrophages from Various Mouse Strain. *The Journal of Immunology* 1985; 134: 3404-10.

26. Sampson BA, Gotschlich EC. Elimination of the Vitamin B12 Uptake or Synthesis Pathway Does Not Diminish the Virulence of Escherichia coli K1 or Salmonella typhimurium in Three Model Systems. *Infection and Immunity*, 1992; 60: 3518-22.
27. Jawetz E, Melnick JL and Adelberg EA. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan*, Editor: Bonang G.dr, Edisi 16. EGC, Jakarta, 1992: 278-83.
28. Mishell B.B, Shiigi M.S. *Selected Methods in Cellular Immunology*. Freeman and Company. New York 1980.
29. Bureson, G.R., Dean, J.H, Munsom,A.E. *Methods in Immunotoxicology*. Vol.2. New York, Wiley-Liss Pub 1995.
30. Susilaningsih N, Johan A, Pudjadi, Purnawati RD. Pengaruh Pemberian Klorokuin Terhadap Respon Imun Seluler Mencit, *Media Medika Indonesiana* 1997, 32(2) : 87-92.
31. Keusch GT. *Harrison's principles of Internal Medicine* 14<sup>th</sup> ed. New York, McGraw-Hill Co. 1998 : 950-6.

32. Gahring LC, Hefron F, Finlay BB, Falkow S. Invasion and Replication of *Salmonella typhimurium* in Animal Cells. *Infection and Immunity* 1990; 58(2): 443-8
33. Xiao MG, Lipscombe M, Tite JP et al. Recombinant *Salmonella typhimurium* Strains That Invade Nonphagocytic Cells Are Resistant to Recognition by Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *Infection and Immunity* 1992; 60(9): 3780-9
34. Kaufmann SHE. Immune Response to Intracellular Bacteria. In: *Clinical Immunology Principles and Practice*. St. Louis, Mosby. 1996: 503-15