

Studi awal potensi jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) sebagai imunomodulator dengan sampel sel limfosit

Preliminary studies on potential oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) as an immunomodulator with a sample of lymphocytes

NETTY WIDYASTUTI[✉], IIM SUKARTI[✉], RENI GIARNI[✉], DONOWATI TJOKROKUSUMO[✉]

Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gedung 2, BPP Teknologi, Lt. 15, Jl. M.H. Thamrin no. 8 Jakarta 10340. Tel. +62-21-3169552, Fax: +62-21-316 9510, ✉email: nettysigit@hotmail.com

Manuskrip diterima: 3 Juni 2015. Revisi disetujui: 19 Juni 2015

Abstrak. Widyastuti N, Sukarti I, Giarni R, Tjokrokusumo D. 2015. Studi awal potensi jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) sebagai imunomodulator dengan sampel sel limfosit. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1528-1531*. Prevalensi penyakit kanker menunjukkan peningkatan yang signifikan setiap tahunnya dan merupakan salah satu penyebab utama kematian di Indonesia. Beta glukukan merupakan sumber potensial untuk mengatasi penyakit kanker melalui sifatnya sebagai imunomodulator. Jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) telah terbukti mengandung senyawa aktif beta glukukan yang diharapkan dapat berfungsi sebagai imunomodulator. Tujuan penelitian ini adalah merupakan studi awal untuk mengetahui potensi ekstrak jamur tiram dari kebun jamur CV. Asa Agro Corporation, Cianjur, Jawa Barat, untuk meningkatkan proliferasi sel limfosit dan indikasi potensi imunostimulasi pada ekstrak jamur tiram. Telah dilakukan pengenceran sampel dengan konsentrasi lima dan 10 kali. Pengujian aktifitas imunomodulator dari ekstrak beta glukukan menunjukkan nilai induksi proliferasi limfosit. Hasil analisa menunjukkan bahwa ekstrak jamur tiram dengan pengenceran 10 kali meningkatkan proliferasi sel 8,97%, sedangkan yang lima kali meningkatkan proliferasi sel limfosit 35,17% lebih tinggi dibandingkan proliferasi sel tanpa penambahan imunostimulan (K-). Aktifitas imunostimulasi jamur tiram ekstrak dengan pengenceran lima kali adalah 135,17%, sedangkan kontrol positif yakni concavalin A pada konsentrasi 10 ppm mempunyai indeks stimulasi 145,52%.

Kata kunci: Ekstrak, imunostimulasi, jamur tiram, limfosit, *Pleurotus ostreatus*, proliferasi

Abstract. Widyastuti N, Sukarti I, Giarni R, Tjokrokusumo D. 2015. Preliminary studies on potential oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) as an immunomodulator with a sample of lymphocytes. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1528-1531*. The prevalence of cancer showed a significant increase each year and is one of the main causes of death in Indonesia. Beta glucan is a potential source to overcome cancer through its nature as an immunomodulator. Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) has been shown to contain active compounds beta-glucan which is expected to function as an immunomodulator. The purpose of this study was a preliminary study to determine the potential of oyster mushroom extracts from the mushroom farm of CV. Asa Agro Corporation-Cianjur, West Java, to increase the proliferation of lymphocytes and an indication of the potential for immunostimulation on oyster mushroom extracts. Sample dilution had been carried out with a concentration of five and 10 times. Testing of immunomodulatory activity of beta glucan extract showed lymphocyte proliferation induction value. The analysis showed that the oyster mushroom extract with a dilution of 10 times increase cell proliferation 8.97%, while the five times increased proliferation of lymphocytes 35.17% higher than without the addition of immunostimulatory cell proliferation (K). Immunostimulation activity oyster mushrooms extracts by dilution of five times was 135.17%, while the concavalin A positive control at a concentration of 10 ppm had a stimulation index 145.52%.

Keywords: Extract, immunostimulation, oyster mushroom, lymphocytes, *Pleurotus ostreatus*, proliferation

PENDAHULUAN

Jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) adalah jamur pangan dari kelompok Basidiomycota dan termasuk kelas Homobasidiomycetes dengan ciri-ciri umum tubuh buah berwarna putih hingga krem dan tudungnya berbentuk setengah lingkaran mirip cangkang tiram dengan bagian tengah agak cekung. Jamur tiram masih satu kerabat dengan *Pleurotus eryngii* dan sering dikenal dengan sebutan *King Oyster Mushroom*. Di alam bebas, jamur tiram bisa dijumpai hampir sepanjang tahun di hutan pegunungan daerah yang sejuk. Jamur tiram tidak

memerlukan cahaya matahari yang banyak, di tempat terlindung miselium jamur akan tumbuh lebih cepat daripada di tempat yang terang dengan cahaya matahari berlimpah. Pertumbuhan miselium akan tumbuh dengan cepat dalam keadaan gelap/tanpa sinar. Pada masa pertumbuhan miselium, jamur tiram sebaiknya ditempatkan dalam ruangan yang gelap, tetapi pada masa pertumbuhan badan buah memerlukan adanya rangsangan sinar. Pada tempat yang sama sekali tidak ada cahaya badan buah tidak dapat tumbuh, oleh karena itu pada masa terbentuknya badan buah pada permukaan media harus mulai mendapat sinar dengan intensitas penyinaran 60-

70%. Pada budidaya jamur tiram suhu udara memegang peranan yang penting untuk mendapatkan pertumbuhan badan buah yang optimal. Pada umumnya suhu yang optimal untuk pertumbuhan jamur tiram, dibedakan dalam dua fase yaitu fase inkubasi yang memerlukan suhu udara berkisar antara 22-28°C dengan kelembapan 60-70% dan fase pembentukan tubuh buah memerlukan suhu udara antara 16-22°C. Kondisi di atas lebih mudah dicapai di daerah dataran tinggi sekitar 700-800 m dpl. Secara umum Kabupaten Cianjur beriklim tropis lembab dengan suhu udara minimum 18°C yang biasanya terjadi pada bulan Maret-April, sedangkan suhu maksimal adalah 24°C yang biasanya terjadi pada bulan Oktober-November dengan kelembapan nisbi berkisar antara 80-90% (Mariana 2008).

Salah satu sumber alam yang potensial yaitu beta glukukan yang dapat mengatasipenyakit kanker melalui sifatnya sebagai imunomodulator. Hasil penelitian Pranamuda et al. (2012) menunjukkan bahwa jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) lokal dapat dijadikan sumber ekstraksi beta glukukan. Proses ekstraksi beta glukukan dari tubuh buah jamur tiram segar secara alkali menghasilkan ekstrak kasar beta glukukan dengan rendemen sebesar 0,59% dan dengan kadar beta glukukan 48%.

Tujuan penelitian ini adalah merupakan studi awal untuk mengetahui potensi ekstrak jamur tiram dari kebun jamur CV. Asa Agro Corporation, Cianjur, Jawa Barat, untuk meningkatkan proliferasi sel limfosit dan indikasi potensi imunostimulasi pada ekstrak jamur tiram.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) segar berasal dari kebun jamur CV. Asa Agro Corporation-Cianjur Jawa Barat diekstrak. Ekstrak jamur tiram, aquabides, medium RPMI 1640, concanavalin A (Con A), antibiotik penisilin-streptomisin, Foetal Bovine Serum (FBS), tryphan blue, NaHCO₃, gas CO₂, MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-5-diphenyl-tetrazolium bromide), HCL 0,4 N-isopropanol, dan limfosit berasal dari darah segar manusia.

Alat

Alat yang digunakan *ELISA microplate reader*, *Laminar Air Flow*, inkubator CO₂ 5%, 37°C, *centrifuge*, *inverted microscop*, autoclave, membran steril 0,2 µm, syringe, pipet pasteur, test tube steril 15 mL dan 50 mL, mikro kultur plate steril, hemasitometer.

Preparasi sampel

Sampel limfosit dengan konsentrasi pengenceran yaitu 5 dan 10 kali. Media tumbuh yang terdiri dari RPMI, 10% serum Foetal Bovine Serum (FBS), antibiotik penisilin-streptomisin disterilkan dengan menggunakan syringe dan membran steril 0,2 µm dan sel limfosit manusia.

Ekstraksi jamur tiram

Untuk mendapatkan ekstrak, caranya adalah: tubuh buah jamur tiram segar seluruh bagian (batang dan tudung) diblender, kemudian ditambah larutan NaOH, sambil

diaduk selama beberapa jam. Kemudian disaring dengan kain saring ukuran 500 mesh. Filtrat yang diperoleh dinetralkan menggunakan asam asetat, kemudian disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Endapan kemudian dikeringkan dengan Freeze Dryer dan dihaluskan.

Preparasi suspensi limfosit/isolasi limfosit

Darah diambil sebanyak 20 mL dengan menggunakan jarum *Precisionglide* steril sekali pakai secara aseptis dan disimpan dalam tabung *vacutee* steril yang sudah terdapat EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*) 10%. EDTA berfungsi sebagai antikoagulan darah. Darah kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifuse 50 l secara aseptis di dalam *laminar air flow*. Sampel darah disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifuse terbentuk tiga lapisan, yakni: (i) Lapisan atas adalah plasma darah, (ii) Lapisan *buffy coat* yang mengandung sel darah putih, (iii) Bagian paling bawah adalah sel darah. Lapisan *buffy coat* ini diambil kemudian dituang ke dalam 5 mL media RPMI basal dan di homogenkan. Kemudian dipindahkan kembali ke dalam beberapa tabung sentrifuse yang berisi *ficol hypaque* menggunakan pipet pasteur. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 30 menit. Lapisan atas yang mengandung limfosit diambil dan dimasukkan ke dalam 5 mL media RPMI basal sebagai media untuk pencucian, kemudian campuran tersebut di sentrifuse kembali dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuse akan diperoleh limfosit bersih yang berada dibagian bawah tabung sentrifuse berupa platelet. Supernatan dibuang kemudian platelet ditambahkan dengan media RPMI tumbuh sebanyak 1 mL. RPMI tumbuh yang mengandung sel limfosit digunakan untuk penghitungan jumlah sel untuk mengetahui konsentrasi sel limfosit per mL yang diperoleh.

Pengujian sel limfosit

Sebanyak 40 µL RPMI (RPMI-1640 telah dikembangkan oleh Moore et al. di Roswell Park Memorial Institute), basal dimasukkan ke dalam lempeng sumur mikro 96 sumuran (*well*), kemudian ditambahkan 10 µL sampel yang telah diencerkan sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan. Kemudian ditambahkan 50 µL sel limfosit (2.10⁶) dalam RPMI tumbuh. Kedalam sumuran kemudian ditambahkan 50 µL ekstrak beta-glukan jamur tiram. Kontrol positif yang digunakan adalah 10 µL Con A 10 ppm, kemudian ditambahkan 40 µL RPMI basal dan 50 µL sel limfosit dalam RPMI tumbuh. Sedangkan kontrol negatif terdiri dari 50 RPMI basal dan 50 µL RPMI tumbuh tanpa sel limfosit. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C (5% CO₂, 95% O₂) dan RH 96% selama 72 jam. Lebih kurang 4 jam sebelum masa inkubasi berakhir, kultur sel ditambahkan 20 µL larutan MTT 0.5%. Setelah masa inkubasi berakhir, pada masing-masing sumur kultur sel ditambahkan 80 µL HCL-Isopropanol 0.04 N untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 570 nm (λ 570 nm) menggunakan *Elisa Microplate Reader*. Nilai absorbansi yang terbaca bersifat proporsional

terhadap jumlah sel yang hidup. Indeks Stimulasi (I.S) dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ I.S} = \text{Absorbansi sampel} / \text{Absorbansi kontrol} \times 100\%$$

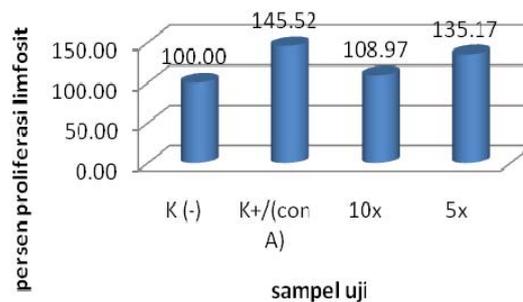
HASIL DAN PEMBAHASAN

Jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) telah diketahui mempunyai khasiat dan manfaat, di antaranya adalah dapat meningkatkan system kekebalan tubuh yakni dapat sebagai imunomodulator. Aktivitas imunomodulator beta glukon dapat diketahui dengan cara melihat pengaruhnya terhadap induksi proliferasi limfosit manusia. Suatu senyawa dikatakan mempunyai sifat sebagai imunomodulator jika senyawa tersebut mampu menginduksi proliferasi limfosit jika dibandingkan terhadap kontrol. Metode ini dilakukan dengan MTT Assay, prinsip uji ini yaitu menghitung viabilitas sel setelah diberi perlakuan dengan ekstrak beta glukon. Sel yang hidup dapat ditunjukkan dengan terjadinya reduksi senyawa 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipenil tetrazolium bromide (MTT) menjadi formazan yang menyebabkan terjadinya perubahan warna. Reaksi reduksi ini dikatalisis oleh enzim mitokondrial dehidrogenase yang menunjukkan bahwa suatu sel masih hidup (viabel).

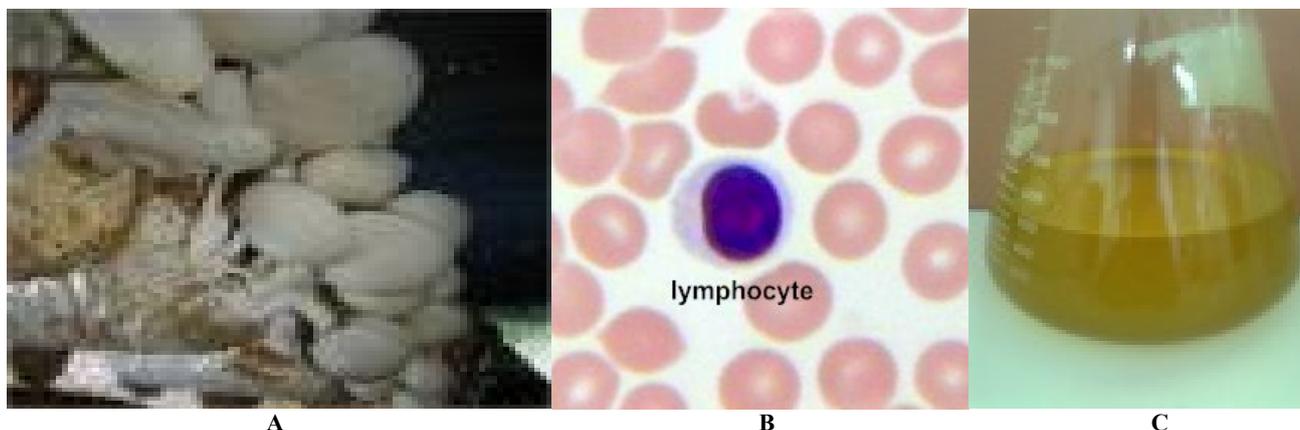
Gambar 1. menunjukkan ekstrak jamur tiram 5x meningkatkan proliferasi sel limfosit 35,17% lebih tinggi dibandingkan proliferasi sel tanpa penambahan imunostimulan (K-). Menunjukkan adanya indikasi potensi imunostimulasi pada ekstrak jamur tiram 5%. Aktivitas imunostimulasi jamur tiram ekstrak 5% jika dibandingkan dengan pembanding positif (kontrol positif) yaitu concavalin A pada konsentrasi 10 ppm memiliki indeks stimulasi 10% lebih rendah Hasil analisa menunjukkan bahwa ekstrak jamur tiram dengan pengenceran 10 (sepuluh) kali meningkatkan proliferasi sel 8,97%, sedangkan yang lima kali meningkatkan proliferasi sel limfosit 35,17% lebih tinggi dibandingkan proliferasi sel tanpa penambahan imunostimulan (K-). Aktifitas

imunostimulasi jamur tiram ekstrak dengan pengenceran lima kali adalah 135,17%, sedangkan kontrol positif yakni concavalin A pada konsentrasi 10 ppm mempunyai indeks stimulasi 145,52%.

Dalam pengujian sel limfosit menggunakan media Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) yakni merupakan salah satu media yang banyak digunakan untuk menumbuhkan sel mamalia, terutama sel suspensi, contohnya sel limfosit manusia. Selain itu, media ini juga dapat digunakan untuk menumbuhkan sel hybrid. Media ini merupakan modifikasi dari media RPMI 1630 yang membutuhkan bikarbonat sebagai buffer serta terdapat perubahan komposisi asam amino dan vitamin. Media ini berwarna merah karena adanya phenol red sebagai indikator pH untuk mendeteksi terjadinya perubahan pH akibat metabolisme sel. Jika sisa metabolisme sudah terakumulasi di media, maka warna media akan berubah menjadi kuning. Hal ini menandakan bahwa sel harus dikultur di media baru agar sel tidak mati akibat sisa metabolisme tersebut. Selain itu, RPMI 1640 mengandung CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, NaHCO, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, glukosa, Glutathione, phenol red, berbagai asam amino (L-aspargie, L-Cystine, tirosin, valin, dan sebagainya), serta vitamin (biotin, pantotenat, kolin) (Invitrogen 2009).



Gambar 1. Proliferasi limfosit setelah diberikan ekstrak jamur tiram



Gambar 2. A. Jamur tiram, B. Limfosit, C. Ekstrak jamur tiram

Pada penelitian ini digunakan seluruh bagian dari jamur tiram yakni tubuh buah, karena polisakarida terletak pada dinding sel semua bagian tubuh buah, sehingga diharapkan mendapatkan polisakarida yang lebih banyak. Untuk pembuktian secara ilmiah telah dilakukan uji aktifitas sel kanker atau pengujian sel limfosit. Wahyudi et al. (2010), telah melakukan penelitian tentang kapasitas dan fagosititas ekstrak jamur tiram dan shiitake sebagai imunomodulator. Hasil penelitian disebutkan bahwa jamur tiram dan shiitake mempunyai khasiat sebagai imunomodulator dan tidak berbeda nyata. Konsentrasi ekstrak polisakarida ekstrak jamur tiram dan shiitake tidak berbeda nyata, aktifitas dan kapasitas fagositosisnya dengan kontrol positif adalah sebesar 100 000 ppm.

Pranamuda et al. (2012) menyebutkan bahwa uji aktivitas imunomodulator ekstrak beta glukon dilakukan melalui uji proliferasi limfosit dengan metode MTT assay. Seperti ditampilkan dalam hasil pengujian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak beta glukon mampu menginduksi proliferasi limfosit manusia, dimana pengaruhnya cenderung bersifat dose dependent. Indeks stimulasi terbesar dicapai dengan pemberian beta glukon pada konsentrasi sebesar 250ppm, pada konsentrasi tersebut indeks stimulasinya mencapai 106,9% atau 2,5 kali lebih tinggi daripada kontrol (sel tanpa penambahan ekstrak beta glukon). Uji aktivitas antikanker (uji sitotoksik) dilakukan dengan dengan metode MTT assay. Ekstrak beta glukon dalam berbagai variasi konsentrasi ditambahkan pada plat kultur sel kanker payudara MCF-7. Hasil pengujian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak beta glukon mampu menghambat proliferasi sel MCF-7, di mana pengaruhnya bersifat dose dependent. Dari hasil uji sitotoksik diperoleh nilai IC50 sebesar 587.13 ppm, mengindikasikan pada konsentrasi tersebut dapat membunuh sel kanker sebanyak 50%. Dari penelitian Khairinal (2012) tentang efek kurkumin terhadap proliferasi sel limfosit dari limpa mencit C3H bertumor payudara secara *in vitro* menjelaskan bahwa sel limfosit merupakan sel dengan inti yang besar dan bulat serta memiliki sedikit plasma. Telah dihitung bahwa pada manusia sekitar $3,5 \times 10^{10}$ limfosit setiap hari masuk dalam sirkulasi darah. Ukuran bervariasi dari 7 sampai dengan 15 mikron. Banyaknya 20-25% dari semua leukosit dalam sirkulasi darah manusia terdiri dari sel T dan sel B (Baratawidjaja dan Rengganis 2014). Sel limfosit merupakan respon imun spesifik yang terdiri dari respon humoral dan seluler. Respon humoral dilakukan oleh limfosit B, dimana sel ini menghasilkan antibody sebagai respon imunnya, sedangkan respon imun seluler dilakukan oleh sel limfosit T, dimana sel ini menghasilkan limfokinase yang dapat menolak keberadaan benda asing (Holan et al. 1991; Khairinal 2012).

Seperti halnya pada penelitian Wahyudi et al. (2010), bagian jamur yang digunakan adalah seluruh bagian dari jamur, karena polisakarida terletak di dinding sel seluruh bagian jamur tiram, sehingga diharapkan mendapatkan polisakarida lebih banyak. Pemeriksaan terhadap ekstrak polisakarida jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) dan shiitake

(*Lentinus edodes*) dilakukan dengan metode congo red yang menyebutkan bahwa 0,25 gram per 5 mL polisakarida jamur tiram dan shiitake masing-masing mengandung 65.200 ppm dan 220.600 ppm beta-glukan. Hal tersebut menunjukkan bahwa kandungan beta-glukan pada tubuh buah jamur shiitake lebih tinggi disbanding jamur tiram. Hal lain menyebutkan polisakarida jamur tiram dan shiitake mempunyai aktifitas dan kapasitas fagositosis yang tidak berbeda nyata. Dengan demikian menunjukkan bahwa keduanya sama-sama berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat imunomodulator. Konsentrasi ekstrak polisakarida jamur tiram dan shiitake tidak berbeda nyata terhadap control positif pada konsentrasi 100.000 ppm.

Ekstrak jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat imunomodulator karena mengandung senyawa aktif beta-glukan. Pengujian aktifitas imunomodulator dari ekstrak beta glukon menunjukkan nilai induksi proliferasi limfosit. Hasil analisa menunjukkan bahwa ekstrak jamur tiram dengan pengenceran 10 kali meningkatkan proliferasi sel 8,97%, sedangkan yang lima kali meningkatkan proliferasi sel limfosit 35,17% lebih tinggi dibandingkan proliferasi sel tanpa penambahan imunostimulan (K-). Aktifitas imunostimulasi jamur tiram ekstrak dengan pengenceran lima kali adalah 135,17%, sedangkan kontrol positif yakni concovalin A pada konsentrasi 10 ppm mempunyai indeks stimulasi 145,52%. Disarankan adanya penelitian lanjutan pada ekstrak jamur lainnya selain jamur tiram.

DAFTAR PUSTAKA

- Baratawidjaja KG, Rengganis I. 2014. Imunologi Dasar. Edisi ke 11. Balai Penerbit FKUI, Jakarta.
- Holan V, Nakamura S, Minowada J. 1991. Inhibitory versus stimulatory effects of natural human interferon alpha on proliferation of lymphocyte sub populations. *Immunology* 75: 176-181.
- Invitrogen. 2009. RPMI media 1640. http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-CellCulture/Classical_Media/RPMI.html [6 Nov 2009].
- Invitrogen. 2009. RPMI media 1640. http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-CellCulture/Classical_Media/RPMI.html [6 Nov 2009].
- Khairinal. 2012. Efek kurkumin terhadap proliferasi sel limfosit dari limpa mencit C3H bertumor payudara secara *in vitro*. Program Pascasarjana Departemen Kimia Fakultas MIPA, UI, Depok.
- Mariana D. 2008. Laporan Akhir Studi Kelayakan Pemekaran Wilayah Kabupaten Cianjur. Pusat Penelitian Kebijakan Publik dan Pengembangan Wilayah Lembaga Penelitian UNPAD, Jatinangor.
- Pranamuda H, Giarni R, Pradana A, Mahsunah ISA, Dewi D. 2012. Aplikasi beta glukon sebagai bahan berkhasiat imunomodulator dan antikanker. *Prosiding InSiNas 2012*. Kemenristek. Jakarta.
- Wahyudi P, Priyanto, Ramdani MC, Rohman MS. 2010. Uji aktivitas imunomodulator polisakarida jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) dan jamur shiitake (*Lentinus edodes*) berdasar aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag peritonium mencit secara *in vitro*. *Farmasains* 1: 7-13.
- Zakaria FR, Nur Faridah D, Sandjaja S dan Madaniyah S, Pramudya. 1996. Hubungan Antara Status Imunologi dan Pola Konsumsi Makanan Jajanan Populasi Remaja di Bogor, Jawa Barat. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan* 1 (2): 50-59.