

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum adalah jamur yang biasa digunakan untuk pengobatan tradisional Cina. *Ganoderma lucidum* sering disebut juga sebagai simbol pengobatan tradisional dari Cina, memiliki khasiat yang sudah diakui oleh *American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium*. *Ganoderma lucidum* memproduksi lebih dari 400 komponen bioaktif, sehingga sering disebut sebagai pabrik seluler untuk substansi yang bermanfaat secara medis (Chen et al, 2012).

Ganoderma lucidum merupakan anggota family fungus yang secara alami tumbuh di pohon dan dedaunan. Kegunaan *Ganoderma lucidum* sebagai obat panjang umur dan obat ajaib digunakan sejak 2000 tahun yang lalu di Cina. Dari hasil investigasi secara ilmiah menunjukkan manfaat untuk kesehatan secara umum, sekarang sering digunakan sebagai terapi untuk melawan kanker di Asia (Yuen, 2005).

Ganoderma lucidum umumnya dapat ditemukan di area tropis dan subtropis. Disebut juga Ling Zhi di Cina, Mannentake di Jepang, atau Tuwonbiri di Hausa. Umumnya jamur tersebut tumbuh tergantung musim dan ditemukan tumbuh sendiri atau berkelompok pada batang pohon yang mulai membusuk. Awalnya caps jamur berbentuk *irreguler* memanjang, namun seiring pertumbuhan bentuknya akan berubah mirip seperti bentuk kipas, dengan permukaan yang mengkilap dan berwarna merah kecoklatan ketika dewasa. Saat masih muda, warnanya kuning cerah dan semakin memutih mendekati tepi.

Kadang-kadang tidak memiliki batang, namun umumnya terdapat batang dengan panjang 3-14 cm dengan ketebalan 3 cm berwarna mirip dengan cap. Bagian bawah caps berwarna krem atau coklat muda, dan berpori-pori (Mohammed et al, 2007).

Ganoderma lucidum merupakan anggota ordo polyporales dari family polyporaceae (Zhang et al, 2003), yang memiliki sejenis pori-pori di bawah caps atau pileusnya. Ciri lain yang mudah dikenali dari permukaan atasnya yang berwarna merah. Merupakan jamur saprofit yang tumbuh di iklim hangat, dan cenderung tumbuh di permukaan batang pohon untuk membedakan dengan *Ganoderma tsugae* yang juga berwarna merah tetapi tumbuh di atas conifer.

Ganoderma lucidum memiliki caps yang cukup keras sehingga tidak bisa dimakan langsung, namun harus diekstrak terlebih dahulu. Jamur *Ganoderma lucidum* dilaporkan mengandung komponen biologis aktif, seperti sakarida dan triterpenes. Polisakarida yang terkandung pada *Ganoderma lucidum* memiliki properti anti-tumor (Maruyama et al, 1989; Miyazaki dan Nishijima, 1981; Zhang dan Lin, 1999) dan imunomodulator (Xia dan Lin, 1989; Lei dan Lin, 1992). Baru-baru ini ditemukan juga bahwa polisakarida dari jamur *Ganoderma lucidum* memiliki kemampuan untuk bekerja sebagai scavenger melawan radikal bebas (You dan Lin, 2002; Shi et al, 2002). Peptida polisakarida yang terkandung dalam jamur *Ganoderma lucidum* menunjukkan adanya fungsi inhibisi pertumbuhan tumor dan sebagai agen anti-angiogenesis pada tikus (Wu et al, 2014). Jamur *Ganoderma lucidum* diklaim oleh Lin et al (1993) memiliki efek antiinflamatori dan efek protektif pada hepar tikus.



Gambar 2.1 Jamur *Ganoderma lucidum*
(Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. 2011)

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Basidiomycota
Class	: Agaricomycetes
Order	: Polyporales
Family	: Ganodermatacea
Genus	: Ganoderma
Species	: lucidum

Ganoderma lucidum dilaporkan mengandung polisakarida pada *fruiting body* dan ganoderan atau β -glukan pada *fruiting body* dan miselium (Ooi dan Liu, 2000), memiliki kandungan anti-tumor dua kali lebih banyak dibandingkan spesies jamur lain yang juga memiliki kandungan polisakarida anti-tumor seperti *Grifora umbellata* atau *Lampteromyces japonicus*.

2.1.1 Zat aktif

Peptida polisakarida diekstrak dari *Ganoderma lucidum*. Awalnya jamur *Ganoderma lucidum* dikeringkan dan dihaluskan. Berbagai metode dapat digunakan untuk mengekstrak zat bioaktifnya seperti *subcritical water extraction* (SWE). Ekstrak jamur *Ganoderma lucidum* mengandung banyak zat bioaktif (Mizuno, 1997), antara lain sebagai berikut:

2.1.1.1 Peptida Polisakarida

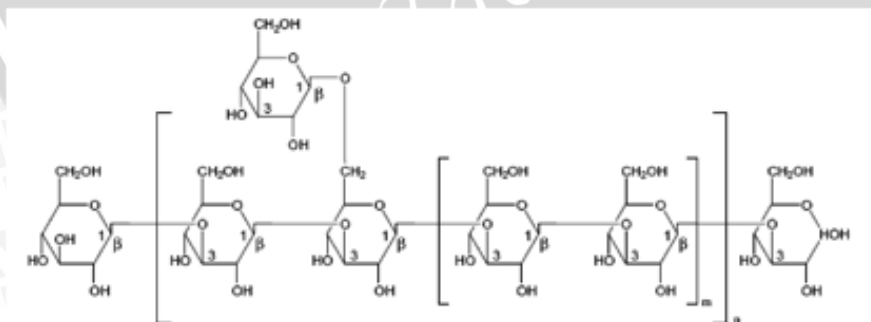
Peptida Polisakarida merupakan temuan baru dalam dunia kedokteran, berfungsi sebagai terapi anti-tumor dan imunomodulator (Tsang et al. 2002). PsP merupakan polisakarida yang terikat dengan protein diekstrak dari jamur *Coriolus versicolor* atau *Ganoderma lucidum*. PsP menunjukkan adanya efek imunopotensiasi dengan meningkatkan proliferasi limfosit, meningkatkan fungsi *Natural Killer Cell*, serta meningkatkan produksi IgG dan IL2 (Qian, Xu, dan Tang, 1997). PsP juga memiliki sifat untuk membunuh sel-sel kanker (Zong, Cao dan Wang, 2012).

Polisakarida yang memiliki efek sebagai anti-tumor sebelumnya ditemukan pada *fruiting body*, miselia yang dikultur, dan filtrat kultur basidiomycetes. Polisakarida anti-tumor tersebut memiliki komposisi kimia, struktur dan aktivitas anti-tumor yang berbeda-beda. Lucas et al (1957) pertama kali melaporkan aktivitas anti-tumor pada ekstrak jamur *Boletus edulis* dan *Clitopilus abortivus*. Sejak itulah banyak polisakarida anti-tumor yang diisolasi dari jamur-jamur lainnya dan dipelajari lebih lanjut terutama di negara Jepang. Banyak polisakarida yang dimurnikan

dari jamur yang termasuk homoglikan atau heteroglikan, dan yang lainnya berikatan dengan residu protein sebagai kompleks polisakarida-peptida. Anti-tumor fungal polisakarida umumnya berupa glukukan dengan berbagai tipe glikosidik, namun beberapa adalah heteroglikan asli (Ooi dan Liu, 2000).

Sumber utama polisakarida anti-tumor tampaknya masih berhubungan dengan dinding sel fungal yang terdiri atas berbagai macam polisakarida seperti kitin, selulosa, (1-3),(1-6)-b-glucans dan (1-3)-a-glukan atau kompleks polisakarida-protein seperti protein-galaktomanan atau protein-glukuromannan (Stone dan Clarke, 1992). Namun kitin and kitosan (kitin fungal) dilaporkan tidak memiliki properti anti-tumor (Mizuno et al, 1995).

Ganoderma lucidum dan spesies *Ganoderma* lainnya merupakan jamur yang terkenal sebagai bahan pengobatan oriental. Berbagai macam komponen polisakarida anti-tumor dapat diekstrak dari *G. lucidum*, seperti β -glukan, glukuronoglikan, mannoglukan, dan heteroglikan aktif lainnya, lalu dimurnikan untuk penggunaan secara medis (Saito, Nishijima dan Miyazaki, 1989).



Gambar 2.2 Struktur kimia Peptida Polisakarida (PSP) (Zhou and Yang, 1999).

2.1.1.2 Steroid

Ergosterol (provitamin D2) memiliki konsentrasi 0.3-0.4% dalam ekstrak *Ganoderma lucidum* dan dari studi terbaru peneliti sudah dapat mengisolasi ganodesteron (Mizuno, 1997).

2.1.1.3 Terpenoids

Rasa pahit dalam jamur *Ganoderma lucidum* disebabkan adanya zat lanostan triterpenoids teroksidasi yang menunjukkan efek sebagai anti alergi (Mizuno, 1997).

2.1.1.4 Adenosine

Seperti jamur lainnya, *Ganoderma lucidum* juga mengandung adenosin yang berkontribusi terhadap rasa *umami*. Baru-baru ini ditemukan bahwa nukleosida yang mengandung adenosin dan guanisin dari ekstrak jamur *Ganoderma lucidum* memiliki efek inhibisi agregasi platelet (Mizuno, 1997).

2.1.1.5 Blood Pressure Stabilizer

Jamur *Ganoderma lucidum* selalu dianggap memiliki efek untuk mengontrol hipotensi dan hipertensi. Dari studi yang mengekstrak peptidoglikan memiliki efek hipotensi sedang pada tikus wistar yang hipertensi kongenital. Dikatakan bahwa enzim *hypertension-related* angiotensin dihambat oleh *ganoderic acid* (B, D, F, H, R, S, dan Y), ganoderal A dan ganoderal A dan B (Mizuno, 1997).

2.1.1.6 *Anti thrombotic compound*

Salah satu bahan aktif yang bisa diisolasi dari ekstrak *Ganoderma lucidum* merupakan inhibitor agregasi platelet. Diperkirakan juga adenosin dan guanosin dari ekstrak *Ganoderma lucidum* juga berpotensi memiliki sifat inhibitor (Mizuno, 1997).

2.1.1.7 *Zat Anti Tumor*

2.1.2.7.1 *Cytotoxic Terpenoids*

Dari studi sebelumnya menunjukkan triterpenoids (ganoderic acid -R, -T, -U, -V, -W, -X, -Y, and -Z) dari ekstrak *Ganoderma lucidum* memiliki efek karsinostatik *cytotoxicity-based* pada sel hepatoma in vitro (Mizuno, 1997).

2.1.2.7.2 *Polisakarida*

Polisakarida memiliki efek imunomodulasi aktivitas anti-tumor atau anti inflamasi yang terkandung tidak hanya pada β -D-glukan yang larut dalam air tetapi juga pada hemiselulosa (atau yang sering disebut *dietary fiber*), yang bersifat tidak larut air (Mizuno, 1997).

2.1.2.7.3 *Germanium*

Korelasi aktivitas anti-tumor *interferon-inducing* dan Germanium disebutkan bahwa Ge memiliki sifat untuk menetralsir rasa sakit pada kanker stadium akhir (Mizuno, 1997).

2.1.2.7.4 Dietary Fibers

Jamur mengandung serat yang terdiri atas β -glukan, *chitinous substances*, hetero-polisakarida (*pectinous substances*, hemiselulosa, poliuronida), dan lain lain, sebanyak 10-50% pada zat kering. Diperkirakan β -D-glukan dan *chitinous substance* memiliki efek karsinostatik dan dapat menghambat pertumbuhan kanker pada saluran pencernaan (Mizuno, 1997).

2.1.1.8 Triterpenoids

Merupakan salah satu komponen terapeutik mayor pada *Ganoderma lucidum*, dan sudah dapat diisolasi sebanyak 150 triterpenoid. Kandungan triterpenoid sangat rendah pada fase miselia, meningkat pada fase primordia, dan menurun lagi pada saat pembentukan *fruiting body* (Chen et al, 2012).

2.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan untuk menilai keamanan atau bahaya yang terkandung pada suatu zat, merupakan salah satu uji yang perlu dilakukan untuk mengembangkan jenis obat baru atau melihat kemungkinan efek terapeutik pada zat baru (National Center for Biotechnology Information, 2011). Uji toksisitas preklinik dilakukan dengan adanya variasi pada spesies, organ, atau dosis spesifik pada produk yang diinvestigasi. Toksisitas zat dapat diobservasi dengan melihat (a) paparan aksidental (b) studi *in vitro* menggunakan sel (c) studi *in vivo* menggunakan hewan coba (United States Food and Drug Administration, 2003).

2.2.1 Uji toksisitas akut

Uji toksisitas akut dilakukan untuk menentukan efek *single dose* pada hewan coba tertentu. Zat akan diberikan pada hewan dengan variasi dosis, lalu diobservasi selama 14 hari. Indikator untuk uji toksisitas akut adalah LD₅₀, yaitu sebanyak 50% hewan coba mati selama observasi setelah diberikan *single dose* (United States Food and Drug Administration, 1988).

2.2.2 Uji toksisitas kronik

Uji toksisitas kronik mayoritas dilakukan pada hewan pengerat. Administrasi zat yang dapat diberikan pada hewan untuk uji toksisitas kronik antara lain via oral, dermal atau inhalasi. Administrasi zat dipilih berdasarkan rute paparan yang dominan untuk manusia. Objektif dari uji toksisitas kronik adalah untuk mengidentifikasi sifat beracun pada suatu zat, identifikasi organ target, identifikasi *no-observed-adverse-effect level* (NOAEL), serta memprediksi efek toksik kronik pada tingkat paparan untuk manusia (Organization for Economic Cooperation and Development, 2008)

Uji toksisitas kronik dapat memberikan informasi mengenai kemungkinan gangguan kesehatan yang dapat muncul apabila terpapar suatu zat dalam jangka waktu yang panjang. Substansi yang akan diuji diberikan setiap hari selama 12 bulan. Setelah jangka waktu 12 bulan tersebut semua hewan coba harus dikorbankan dan dilakukan pembedahan. Terdapat pengecualian yaitu dilakukan pembedahan setelah jangka waktu 6 bulan, untuk melengkapi informasi mengenai perkembangan perubahan mekanis dan efek yang disebabkan zat toksik tersebut (Organization for Economic Cooperation and Development, 2008).

Berdasarkan *guidelines* dari Organization for Economic Cooperation and Development (2008) umumnya uji toksisitas kronik dilakukan selama 12 bulan, namun bisa dilakukan dalam jangka waktu yang lebih pendek (6 atau 9 bulan) atau jangka waktu yang lebih panjang (18 atau 24 bulan). Jangka waktu tersebut tergantung kebutuhan, untuk menerapkan perencanaan khusus untuk zat yang akan diujikan atau untuk menemukan informasi tambahan.

Hasil dari uji toksisitas kronik yang perlu untuk dianalisis berupa pemeriksaan hematologi dan kimia darah yang dilakukan 3, 6, dan 9 bulan setelah dimulainya uji toksisitas dengan sampel minimal 10 tikus jantan dan 10 tikus betina. Diperlukan juga nekropsi gross organ antara lain kelenjar adrenal, otak, epididimis, jantung, ginjal, hepar, ovarium, limpa, testis, kelenjar tiroid, dan uterus (Organization for Economic Cooperation and Development, 2008).

2.3 Uji Toksisitas Subkronik

Uji toksisitas subkronis adalah uji untuk mengetahui toksisitas suatu senyawa yang dilakukan pada hewan coba dengan sedikitnya tiga tingkat dosis, umumnya dalam jangka waktu selama 10% dari masa hidup hewan, untuk tikus sekitar 90 hari, namun dapat dilanjutkan hingga 12 bulan. Tujuan akhir dari uji toksisitas subkronik adalah (1) memprediksi dosis yang tepat untuk studi toksisitas kronik selanjutnya; (2) untuk menentukan NOEL (No Observed Effect Level); (3) dapat digunakan untuk landasan studi jangka panjang selanjutnya yang lebih terfokus pada organ tertentu. NOEL adalah kadar dimana zat tersebut tidak menunjukkan efek toksik terhadap hewan coba. (Lu FC, Kacew SK, 2009; Legal Information Institute, 2000).

2.3.1. Pemilihan Hewan Coba

Pemilihan hewan coba dapat menggunakan berbagai spesies hewan pengerat, namun paling sering digunakan adalah tikus. Hewan coba yang digunakan berjenis kelamin jantan dan betina dengan usia 6-8 minggu. Jumlah hewan coba sama rata antara jantan dan betina, dan untuk hewan coba betina tidak pernah hamil dan tidak pernah melahirkan.

Lamanya aklimatisasi sebelum percobaan selama 5 hari, dan hewan yang digunakan tidak pernah dipakai dalam percobaan lain sebelumnya. Jumlah hewan seimbang antara jantan dan betina, dan dalam 1 kelompok dosis atau kelompok control minimal 20 ekor, berupa 10 ekor jantan dan 10 ekor betina. Hewan coba dikelompokkan tiap kandang sesuai jenis kelamin, tetapi jumlah hewan dalam kandang tidak boleh mengganggu proses penelitian atau evaluasi (Legal Information Institute, 2000).

2.3.2. Observasi Hewan Coba

Untuk uji toksisitas subkronik, masa observasi (dihitung dari hari pertama pemberian perlakuan) selama 90 hari. Observasi minimal dilakukan dua kali sehari untuk melihat apakah ada morbiditas atau mortalitas, serta perlunya melakukan intervensi segera untuk mengurangi angka kematian hewan coba. Pemeriksaan klinis dilakukan satu kali setiap minggu dan perlu dilakukan pencatatan. Pemeriksaan klinis tersebut bisa meliputi evaluasi kulit dan bulu, membran mukosa, mata, efek pada sistem respirasi dan sistem kardiovaskular, atau melihat apakah ada efek pada sistem saraf pusat. Gejala-gejala keracunan perlu segera direkam atau dicatat, termasuk onset, derajat keparahan, dan

durasi. Berat badan hewan coba perlu dicatat sebelum pemberian perlakuan, setiap minggu selama perlakuan, dan saat akan dilakukan pembedahan.

2.3.3. Level Dosis

Dosis yang diujikan pada uji toksisitas subkronik harus bisa menentukan hubungan dosis-respons, serta NOEL, sehingga dosis yang diujikan minimal 3 level dosis dan kontrol. Dosis yang diujikan perlu diperhitungkan agar dapat menghasilkan kurva dosis-respons. Dosis yang paling tinggi harus menghasilkan efek toksik tetapi tidak sampai menimbulkan insiden fatal yang dapat mengganggu evaluasi. Dosis intermediet perlu diberi rentang dengan dosis tertinggi agar dapat menghasilkan gradasi efek toksik. Dosis terendah seharusnya tidak akan menghasilkan efek toksik (Legal Information Institute, 2000).

2.3.4. Klinis Patologi

Pemeriksaan hematologi dan kimia darah harus dilakukan di semua hewan coba, termasuk kelompok kontrol negatif, dan meliputi hewan jantan dan betina. Direkomendasikan untuk tidak memberikan pangan satu hari sebelum melakukan pengambilan darah atau pembedahan (*overnight fasting*). Tes hematologi yang perlu dilakukan adalah *red blood cell count*, konsentrasi hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, MCHC, *white blood cell count*, *differential leukocyte count*, *platelet count*, dan mengukur waktu pembekuan darah. Untuk kimia darah, direkomendasikan untuk mengukur total kolesterol, urea, nitrogen, potassium, sodium, kreatinin, protein total dan albumin. Perlu juga dilakukan

pengukuran enzim hepar minimal 2, bila perlu disertai tambahan enzim ekstrahepatik (Legal Information Institute, 2000).

Uji toksisitas yang dilakukan menganut prinsip 3R yaitu *reduction*, *refinement*, dan *replacement*. *Reduction* merupakan alternatif untuk mengurangi jumlah hewan yang digunakan dalam uji toksisitas namun peneliti juga harus mengutamakan konsistensi dalam melakukan penelitian agar mendapatkan hasil yang valid. *Refinement* berarti melakukan prosedur yang meminimalisir rasa sakit atau tidak nyaman pada hewan coba. *Replacement* artinya mengusahakan untuk tidak menggunakan hewan coba, atau mengganti dengan hewan yang secara filogenetik lebih rendah dibandingkan hewan coba saat ini (Society of Toxicology, 2014)

Uji toksisitas PsP akan diujikan pada tikus *Rattus norvegicus* strain wistar usia dewasa, jenis kelamin jantan dan betina. Akan diujikan 3 kelompok dosis dan 1 kelompok kontrol negatif, masing masing kelompok terdiri atas 10 tikus jantan dan 10 tikus betina. Keuntungan menggunakan tikus untuk uji toksisitas yaitu (a) kemiripan *metabolic pathway* dengan manusia; (b) banyaknya kemiripan secara anatomis maupun fisiologis; (c) sudah banyak data uji toksisitas pada tikus yang dapat digunakan untuk perbandingan; (d) kemudahan untuk perawatan tikus dan biaya yang relatif terjangkau (Kacew dan Festing, 1995).

2.4 Komponen Darah

Darah terbentuk dari proses hematogenesis, yang dimulai dari sel-sel prekursor yang terdapat di sumsum tulang. Sel-sel prekursor inilah yang akan membelah dan berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel darah, yaitu eritrosit, leukosit, dan trombosit. Hematopoiesis diawali dari sejumlah kecil stem cell, yang

akan membelah diri dan berkembang menjadi sel-sel progenitor, yang kemudian akan mengalami maturasi menjadi sel darah dewasa (Gunn dan Parker, 1987).

2.4.1 Eritrosit

Eritrosit merupakan komponen terbanyak sel darah, yaitu sebanyak 4,4-5,9 Mil/uL pada manusia dewasa. Eritrosit berfungsi untuk transportasi oksigen dan nutrisi ke seluruh tubuh. Karakteristik eritrosit yaitu berwarna merah, berbentuk pipih dengan cekungan di bagian tengah, dan dapat berubah bentuk. Hal ini penting karena eritrosit harus bersifat fleksible untuk menyusup ke kapiler-kapiler yang sangat kecil. Peningkatan konsentrasi hemoglobin atau penurunan fluiditas dapat menurunkan kemampuan berubah bentuk (Komariah, 2010).

2.4.2 Trombosit

Trombosit atau platelet merupakan fragmen kecil sel yang tidak berinti yang bersirkulasi di dalam darah dan memegang peranan penting untuk mengatur integritas vaskular dan regulasi homeostasis. Trombosit juga terlibat dalam proses inflamasi kronik yang diasosiasikan dengan patologi suatu penyakit. Biomarker yang berhubungan dengan platelet antara lain *mean platelet volume* (MPV), *platelet distributed width* (PDW), dan *platelet crit* (PCT), merupakan biomarker yang murah dan noninvasif untuk mengukur tingkat keparahan suatu penyakit (Goshal dan Bhattacharyya, 2013).

Platelet juga bertindak sebagai marker suatu inflamasi, selain leukosit dan sel endotel. Reaktivitas platelet berbeda untuk tiap patogenesis penyakit yang berbeda, tergantung marker biologis aktifnya, seperti CD36, CD41, CD42a. Hal ini disebabkan perbedaan reseptor aktif di permukaan platelet dan produk

sekret platelet. Platelet biasanya mengubah ekspresi dan sinyal pada marker-marker tersebut sehingga memberikan informasi yang luas mengenai perkembangan suatu penyakit (Goshal dan Bhattacharyya, 2013).

Platelet merupakan partikel darah dinamik yang dapat berinteraksi dengan sel lainnya, termasuk leukosit dan sel endothel. Fungsi platelet dapat diukur dengan *light transmission aggregometer*, yang memiliki fungsi primer untuk mengukur transmisi cahaya melewati suspensi platelet saat platelet diagregasi oleh agonis. Namun karena memiliki banyak kekurangan, saat ini diganti dengan *flow cytometry assay*, yang lebih mudah dan akurat (Michelson, 1996).

2.5 Leukosit

Leukosit adalah sel darah yang mengandung inti, disebut juga sel darah putih. Di dalam darah manusia, normal didapati jumlah leukosit rata-rata 5000-9000 sel/mm³, bila jumlahnya lebih dari 12000, keadaan ini disebut leukositosis, bila kurang dari 5000 disebut leukopenia (Effendi, 2003).

Leukosit mempunyai peranan dalam pertahanan seluler dan humoral organisme terhadap zat-zat asing. Leukosit dapat melakukan gerakan amuboid dan melalui proses diapedesis leukosit dapat meninggalkan kapiler dengan menerobos antara sel-sel endotel dan menembus ke dalam jaringan penyambung (Effendi, 2003). Fitur yang sangat penting untuk respon imun adalah pergerakan sel-sel imun dari satu tempat ke tempat lain untuk menyediakan fungsi efektor. Sehingga untuk lebih memahami mengenai fungsi imun diperlukan pula pemahaman mengenai mekanisme migrasi leukosit dari darah ke jaringan (Petri, Phillipson dan Kubes, 2008).

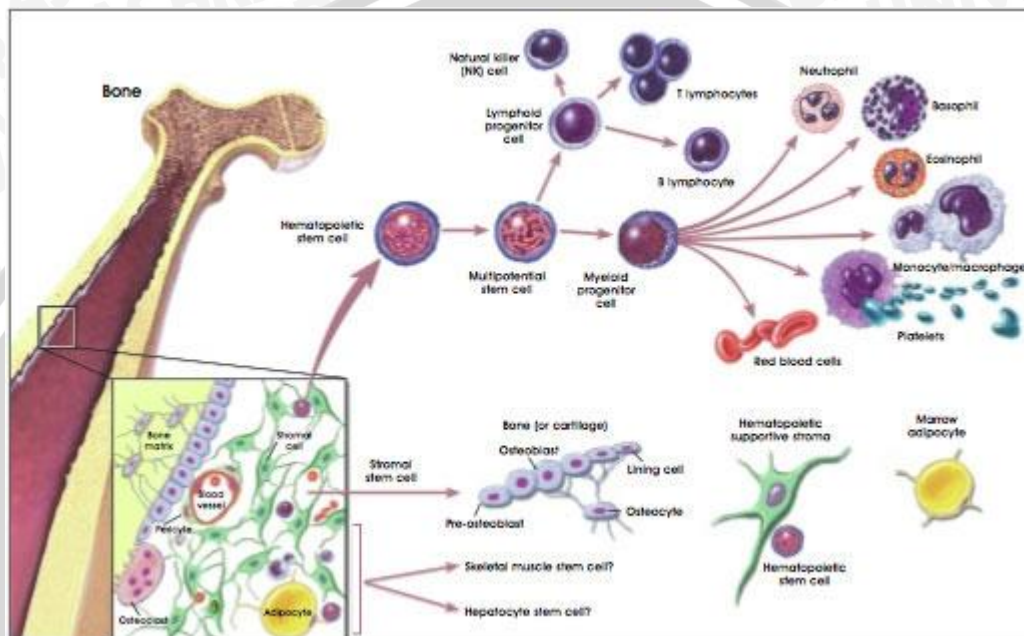
Keadaan dimana leukosit jumlahnya lebih sedikit daripada normal disebut leukopenia sedangkan keadaan leukosit lebih tinggi daripada jumlah normal disebut leukositosis. Dapat disebut leukositosis apabila jumlahnya melebihi 11,000 per mm³ (11×10^9 per L) (Shapiro dan Greenfield, 1987).

Peningkatan jumlah leukosit disebabkan oleh reaksi sumsum tulang terhadap inflamasi atau infeksi. Kebanyakan dari sel tersebut adalah leukosit polimorfonuklear (PMN). Sel-sel PMN yang bersirkulasi dan bentuk mudanya akan berkumpul di tempat yang mengalami infeksi atau inflamasi. Kemudian dilanjutkan dengan pelepasan leukosit yang disimpan, umumnya disebut sebagai *left-shift* (Abramson dan Melton, 2000).

Penurunan jumlah leukosit atau leukopenia dapat disebabkan berbagai faktor, antara lain infeksi virus, penggunaan obat-obatan, reaksi idiosinkratik, dan keganasan. Pada kasus penggunaan obat-obatan atau zat tertentu dalam jangka panjang dapat menimbulkan efek toksik terhadap leukosit melalui berbagai mekanisme yang menyebabkan kerusakan hematopoetik, antara lain mensupresi sel stem hematopoetik, bersifat sitotoksik terhadap sel prekursor, hematotoksisitas yang dimediasi sistem imun, mutasi genetik, atau menyebabkan kerusakan mikrovaskular pada sumsum tulang (Weiss, 1993).

Sel darah putih jika dilihat melalui mikroskop mempunyai granula spesifik (granulosit), yang dalam keadaan hidup berupa tetesan setengah cair, dalam sitoplasmanya dan mempunyai bentuk inti yang bervariasi. Sedangkan sel yang tidak mempunyai granula, sitoplasmanya homogen dengan inti bentuk bulat atau bentuk ginjal. Terdapat dua jenis leukosit agranuler: limfosit sel kecil, sitoplasma sedikit; monosit sel agak besar mengandung sitoplasma lebih banyak. Terdapat tiga jenis leukosit granuler: Neutrofil, Basofil, dan Asidofil (atau

eosinofil) yang dapat dibedakan dengan afinitas granula terhadap zat warna netral basa dan asam. Granula dianggap spesifik bila ia secara tetap terdapat dalam jenis leukosit tertentu dan pada sebagian besar prekursor (Effendi, 2003).



Gambar 2.3 Diferensiasi hematopoetik dan sel stem stromal.
(National Institutes of Health, 2001)

2.5.1. Neutrofil

Neutrofil berkembang dalam sum-sum tulang dikeluarkan dalam sirkulasi, sel-sel ini merupakan 60 -70 % dari leukosit yang beredar. Garis tengah sekitar 12 μm , satu inti dan 2-5 lobus. Neutrofil merupakan garis depan pertahanan seluler terhadap invasi zat asing, memfagosit partikel kecil dengan aktif. Neutrofil mempunyai metabolisme yang sangat aktif dan mampu melakukan glikolisis baik secara aerob maupun anaerob (Effendi, Z. 2003).

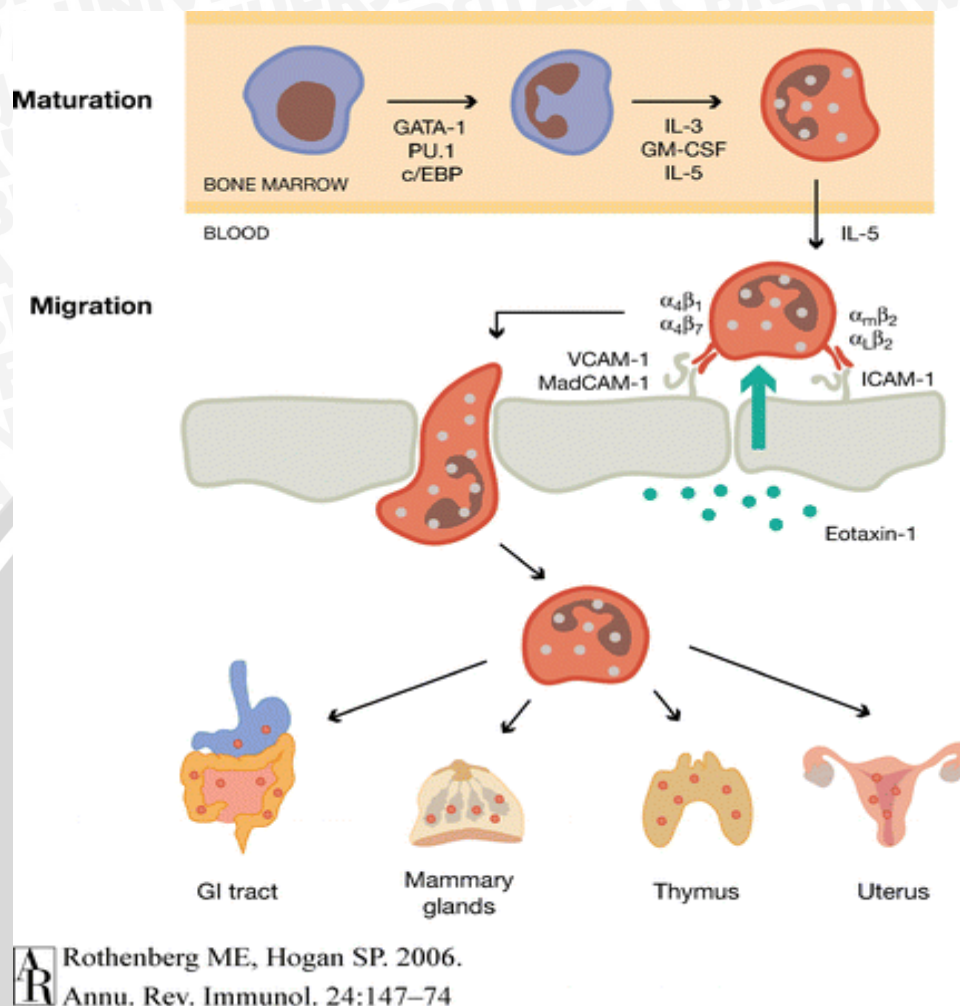
Neutrofil mempunyai metabolisme yang sangat aktif dan mampu melakukan glikolisis baik secara aerob maupun anaerob. Kemampuan neutrofil

untuk hidup dalam lingkungan anaerob sangat menguntungkan, karena mereka dapat membunuh bakteri dan membantu membersihkan debris pada jaringan nekrotik. Fagositosis oleh neutrofil merangsang aktivitas heksosa monofosfat shunt dan akan meningkatkan glikogenolisis (Effendi, Z. 2003).

2.5.2. Eosinofil

Jumlah eosinofil hanya 1-4 % leukosit darah, mempunyai garis tengah 9 μm (sedikit lebih kecil dari neutrofil). Inti biasanya memiliki dua lobus, retikulum endoplasma mitokondria dan apparatus Golgi kurang berkembang. Eosinofil mempunyai pergerakan amuboid, dan mampu melakukan fagositosis, lebih lambat tapi lebih selektif dibanding neutrofil. Eosinofil memfagositosis kompleks antigen dan antibodi, ini merupakan fungsi eosinofil untuk melakukan fagositosis selektif terhadap kompleks antigen dan antibody. Kortikosteroid akan menimbulkan penurunan jumlah eosinofil darah dengan cepat (Effendi, Z. 2003).

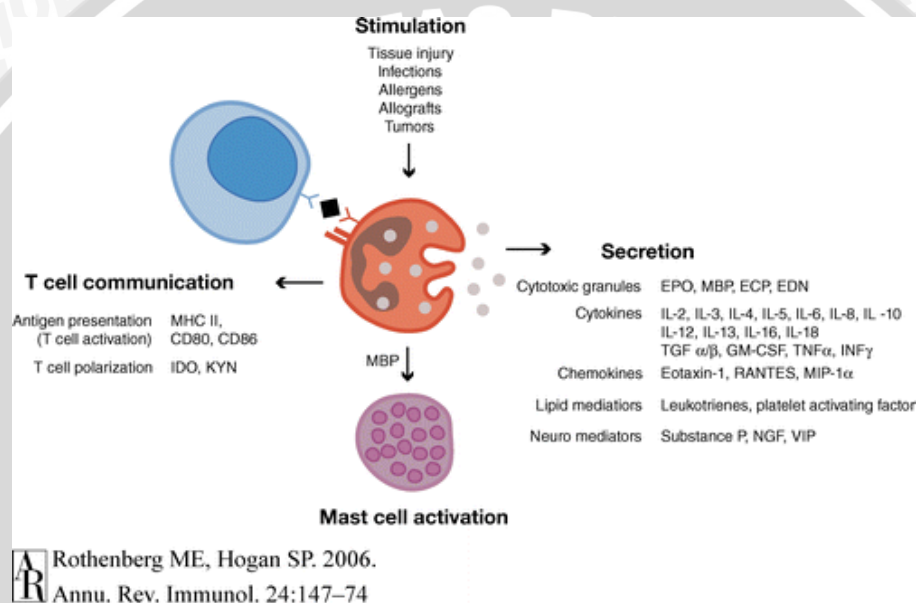
Eosinofil diproduksi di sumsum tulang dan berasal dari *pluripotent stem cell* yang awalnya akan berdiferensiasi menjadi prekursor hibrida dengan properti yang sama dimiliki oleh basofil dan eosinofil. Kemudian sel prekursor tersebut akan berdiferensiasi menjadi prekursor eosinofil. Perkembangan eosinofil diregulasi oleh 3 sitokin yaitu IL-3, IL5, dan GM-CSF (Lopez et al., 1986). Eosinofilopoietin tersebut merangsang proliferasi dan diferensiasi mengikuti sinyal instruksi dispesifikasi oleh faktor transkripsi GATA-1, PU-1 dan C/EBP (Rothenberg dan Hogan, 2006).



Gambar 2.4 Perkembangan dan maturasi eosinofil

Eosinofil merupakan sel yang bekerja dalam perlawanan host pada infeksi parasit, diimplikasikan dalam patogenesis proses inflamasi, seperti infeksi helminth atau reaksi alergi. Eosinofil dapat aktif apabila dipicu oleh reseptor sitokin, imunoglobulin, dan komplemen yang akan berlanjut ke sekresi sitokin proinflamasi (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10), *transforming growth factor* (TGF), kemokin, dan *lipid mediator*. Molekul-molekul tersebut memiliki efek proinflamatori, antara lain up regulasi sistem adhesi, modulasi *cellular trafficking*, aktivasi dan regulasi permeabilitas vaskular, sekresi mukus, dan konstiksi otot

polos. Eosinofil dapat menginisiasi antigen-spesifik respon imun dengan cara berperan sebagai *antigen presenting cell* (APC). Selain itu, eosinofil juga dapat berperan sebagai sel efektor mayor yang menginduksi kerusakan dan disfungsi jaringan dengan cara melepaskan granul protein roksik dan mediator lipid (Rothenberg dan Hogan, 2006).



Gambar 2.5 Eosinofil berperan sebagai APC

2.5.3. Basofil

Basofil jumlahnya 0-1% dari leukosit darah, ukuran garis tengah 12 μm , inti satu, besar bentuk pilihan ireguler, umumnya bentuk huruf S, sitoplasma basofil terisi granul yang lebih besar, dan seringkali granul menutupi inti, granul bentuknya ireguler berwarna metakromatik. Basofil merupakan sel utama pada tempat peradangan ini dinamakan hipersensitivitas kulit basofil (Effendi, 2003).

2.5.4. Limfosit

Limfosit merupakan sel yang sferis, garis tengah 6-8 μm , 20-30% leukosit darah. Normal, inti relatif besar, bulat sedikit cekungan pada satu sisi, kromatin inti padat, anak inti baru terlihat dengan elektron mikroskop. Sitoplasma sedikit sekali, sedikit basofilik, mengandung granula-granula azurofilik. Limfosit dalam sirkulasi darah normal dapat berukuran 10-12 μm ukuran yang lebih besar disebabkan sitoplasmanya yang lebih banyak (Effendi, 2003).

Limfosit yang bersirkulasi terutama berasal dari timus dan organ limfoid perifer, limpa, limfonodus, tonsil dan sebagainya. Akan tetapi mungkin semua sel progenitor limfosit berasal dari sum-sum tulang, beberapa diantara limfositnya yang secara relatif tidak mengalami diferensiasi ini bermigrasi ke timus, lalu memperbanyak diri, disini sel limfosit ini memperoleh sifat limfosit T, kemudian dapat masuk kembali kedalam aliran darah, kembali kedalam sum-sum tulang atau ke organ limfoid perifer dan dapat hidup beberapa bulan atau tahun (Effendi, 2003).

Limfosit akan berdiferensiasi menjadi 2 macam sel, yaitu sel T dan sel B. Sel-sel T bertanggung jawab terhadap reaksi imun seluler dan mempunyai reseptor permukaan yang spesifik untuk mengenal antigen asing. Limfosit lain yang masih menetap di sumsum tulang berdiferensiasi menjadi limfosit B berdiam dan berkembang didalam kompartemennya sendiri. Sel B bertugas untuk memproduksi respon antibodi humoral yang beredar dalam peredaran darah dan mengikat secara khusus dengan antigen asing yang menyebabkan antigen asing terbalut antibodi, kompleks ini meningkatkan fagositosis, lisis sel dan sel pembunuh (*natural killer cell*) dari organisme yang menyerang. Sel T dan sel B secara morfologis hanya dapat dibedakan ketika diaktifkan oleh antigen.

Tahap akhir dari diferensiasi sel-sel B yang diaktifkan berwujud sebagai sel plasma. Sel plasma mempunyai retikulum endoplasma kasar yang luas yang penuh dengan molekul-molekul antibodi, sel T yang diaktifkan mempunyai sedikit endoplasma yang kasar tapi penuh dengan ribosom bebas (Effendi, 2003).

2.5.5. Monosit

Merupakan sel leukosit yang besar 3-8% dari jumlah leukosit normal, diameter 9-10 μm tapi pada sediaan darah kering diameter mencapai 20 μm , atau lebih. Inti biasanya eksentris, adanya lekukan yang dalam berbentuk tapal kuda. Kromatin kurang padat, susunan lebih fibriler, ini merupakan ciri khas monosit. Monosit ditemui dalam darah, jaringan penyambung, dan rongga-rongga tubuh. Monosit tergolong fagositik mononuklear (system retikuloendotel) dan mempunyai tempat-tempat reseptor pada permukaan membrannya. Untuk imunoglobulin dan komplemen. Monosit beredar melalui aliran darah, menembus dinding kapiler masuk ke dalam jaringan penyambung. Dalam darah beberapa hari. Dalam jaringan bereaksi dengan limfosit dan memegang peranan penting dalam pengenalan dan interaksi sel-sel imunokompeten dengan antigen (Effendi, 2003).

Leukosit dihitung menggunakan *blood smear* yang diwarnai dengan *Wright stain*. Darah diambil dengan metode *cardiac puncture*, dengan menganastesi tikus terlebih dahulu lalu jarum ditusukkan ke jantung dari bagian lateral. Darah yang diambil sekitar 0.7-1.0 ml. *Cardiac puncture* merupakan metode yang paling cepat dan *reliable*, dapat mengambil volume darah paling banyak dibandingkan dari vena saphena, ekor atau kaki, tetapi stress yang

diberikan pada situs pengambilan darah paling minimal (Doeing, Borowicz, Crockett, 2003). Kisaran jumlah leukosit normal tikus, yaitu 5.000 - 25.000 sel/uL (Aboderin dan Oyetayo, 2006).

Pada penelitian ini, diteliti bagaimana hubungan leukosit dengan zat antioksidan yang terkandung di dalam PsP *Ganoderma lucidum*. Antioksidan adalah senyawa yang dapat menetralkan menetralkan radikal bebas, seperti: enzim SOD (Superoksida Dismutase), glutathion, dan katalase. Antioksidan juga dapat diperoleh dari asupan makanan yang banyak mengandung vitamin C, vitamin E dan beta karoten serta senyawa fenolik (Suryani dan Johan, 2011). Antioksidan berfungsi untuk menetralkan zat radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Radikal bebas adalah atom atau gugus atom apa saja yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan sehingga bersifat sangat reaktif. Senyawa radikal bebas dapat timbul sebagai hasil samping dari proses metabolisme tubuh atau disebabkan oleh polusi lingkungan seperti asap kendaraan, bahan pencemar, radiasi, dan lain-lain. Jumlah radikal bebas yang banyak dalam tubuh dapat berpotensi menonaktifkan berbagai enzim, mengoksidasi lemak dan mengganggu DNA tubuh sehingga terjadi mutasi sel yang merupakan penyebab timbulnya kanker. Tubuh memproduksi zat radikal bebas pada saat terjadi proses inflamasi. Saat inflamasi, neutrofil dan makrofag yang memfagosit zat-zat asing akan meningkatkan konsumsi oksigennya dan mengaktifkan *hexose monophosphate shunt*, kemudian memproduksi zat radikal bebas yang berasal dari oksigen atau ROS serta produk-produk metabolik lainnya (Fantone dan Ward, 1982).

2.6 Penggunaan *Rattus norvegicus* strain wistar pada uji subkronik

Tikus merupakan hewan yang paling sering digunakan untuk uji coba pada hewan, dalam bidang medis, kimia, farmakologi, toksikologi, biologi, dan genetika. Tikus paling sering digunakan karena banyaknya persamaan fisiologis dan genetik dengan manusia, selain itu tikus juga mudah dimanipulasi dan dianalisis genomnya (Spencer, 2012).

Hewan lain yang digunakan dalam percobaan antara lain lalat, cacing, dan sebagainya, namun tikus dapat menghasilkan efek yang paling mendekati dengan manusia. Beberapa penyakit lainnya yang terdapat pada manusia tetapi tidak pada tikus seperti alzheimer dan cystic fibrosis, kita dapat memanipulasi gen pada tikus sehingga tikus akan memunculkan gejala yang sama dengan manusia. Tikus juga memerlukan sedikit biaya perawatan dan cepatnya waktu untuk berkembang biak, yaitu sekitar 9 minggu (Spencer, 2012).

