

Pengaruh pemberian vitamin B₁ dan seng sulfat terhadap produksi polisakarida tudung jamur sitake (*Lentinus edodes*) serta uji imunomodulatornya pada sel limfosit mencit Balb/c

The influence of vitamin B₁ and zinc sulphate to the polysaccharide production of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) and the immunomodulatory test on lymphocyte cells of Balb/c mice

Ediati Sasmito, Agung Endro Nugroho dan Chyntia Resti Wijaya
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta.

Abstrak

Jamur sitake (*Lentinus edodes*) merupakan salah satu jenis jamur kayu yang sudah banyak dibudidayakan di beberapa daerah di Indonesia, antara lain di Jogjakarta. Diketahui bahwa substansi yang berperan penting untuk pengobatan adalah polisakarida lentinan (β -1,3 glukukan dengan β -1,3 dan β -1,6 glukopiranosida yang berfungsi sebagai imuno-modulator. Kemampuan lentinan sebagai imunomodulator sangat penting untuk pengobatan berbagai penyakit, terutama tumor dan kanker. Vitamin B₁ dan seng sulfat diketahui sebagai kofaktor reaksi enzimatik yang terlibat dalam biosintesis polisakarida melalui jalur pentosa fosfat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian larutan berbagai kadar vitamin B₁ dan larutan 1 mMol seng sulfat pada media tumbuh jamur sitake fase primordia terhadap kadar polisakarida serta uji imunomodulatornya terhadap sel limfosit. Penetapan kadar polisakarida dilakukan dengan metode *phenol sulphuric acid* (AOAC Official method of Analysis No.988.12) yang telah dimodifikasi dan uji aktivitas proliferasi sel limfosit dengan metode *MTT reduction*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar polisakarida tudung jamur sitake terbesar adalah pada penambahan 8% vitamin B₁, yang diikuti dengan aktivitas peningkatan proliferasi sel limfosit dibandingkan dengan kontrol.

Kata kunci : sitake, vitamin B₁, seng sulfat, polisakarida, limfosit, proliferasi

Abstract

Mushroom had been used for a long time as medicine. Shiitake (*Lentinus edodes*) which is known as one kind mushroom of wood, has very large benefit and various advantages. Shiitake consist of polysaccharide, which is known as lentinan, arrange on shape β -1,3 glucan with β -1,3 and β -1,6 glucopyranoside having immunomodulatory properties. These properties are important for treatment of tumor and cancer. The purpose of this research is to increase polysaccharide production in shiitake by adding various concentration of vitamin B₁ and 1 mMol zinc sulphate which are known as cofactor on enzymatic reaction of polysaccharide metabolism via pentose phosphate pathway. These cofactor are added on the media of primordial phase of shiitake cultures. The concentration of polysaccharide was determined by modified *phenol sulphuric acid test* (AOAC Official Method of

Analysis No. 988.12) and the immunomodulatory test was conducted by employing lymphocyte cells and the proliferation of these cells was determined by *MTT reduction* method. The result showed that the maximum production of polysaccharide was reached by adding 8% of vitamin B₁ and this was followed by the increase of lymphocyte cells proliferation activity.

Key words: shiitake, vitamin B₁, zinc sulphate, polysaccharide, lymphocyte, proliferation.

Pendahuluan

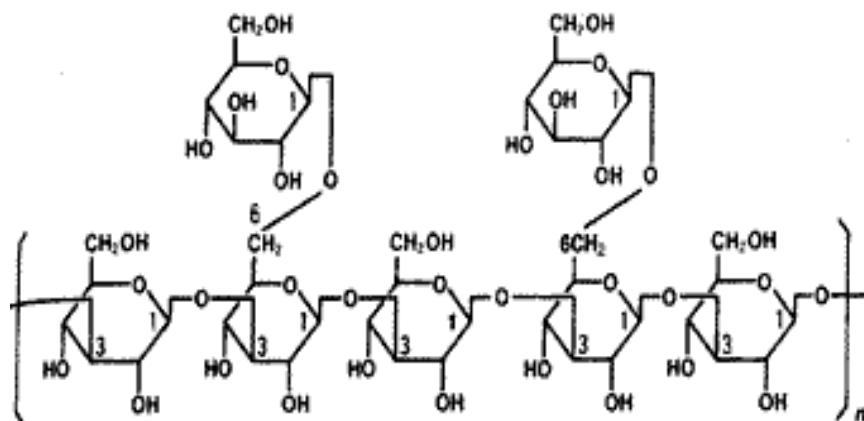
Sitake merupakan salah satu jamur kayu yang mempunyai manfaat luas dalam pengobatan. Khasiat sitake dalam dunia medis antara lain sebagai antitumor (polisakarida), antiviral (asam mukonat), senyawa penghambat aglutinasi platelet dan senyawa aktif penurun kolesterol (Mizuno *et. al.*, 1995). Kandungan kimia dalam jamur sitake cukup banyak, terutama vitamin B kompleks (tiamin, riboflavin, sianokobalamin, niasin, asam pan-totenat), asam amino esensial, serat, ergosterol dan polisakarida (lentinan). Lentinan banyak terdapat pada bagian tudung dan bagian batang dekat tudung (Suriawiria, 2001).

Polisakarida yang terdapat dalam sitake adalah lentinan. Lentinan merupakan polisakarida bercabang rantai panjang dengan berat molekul 400.000 – 800.000 dalton. Struktur primernya adalah β -1,3 glukukan dengan cabang β -1,3 dan β -1,6 glukopiranosida (Gambar 1). Lentinan dilaporkan berperan sebagai adjuvant sel-T dan mempertahankan fungsi sel-T *helper*, tapi tidak secara langsung menstimulasi sel-B ataupun sel-T *suppressor* (Chihara, 1992).

Aktivitas antikanker lentinan tidak menyerang sel kanker secara langsung tapi melalui aktivitas respon imun. Aksi lentinan sebagai potensiator pertahanan inang, karena kemampuannya dalam mempertahankan respon inang melalui maturasi, diferensiasi, dan proliferasi sel imun (Chihara, 1992).

Vitamin B₁ atau tiamin, yang bentuk aktifnya berupa koenzim tiamin pirofosfat (TPP). TPP diketahui sebagai koenzim reaksi enzimatik transketolase yang terlibat dalam biosintesis polisakarida melalui jalur pentosa fosfat (Machlin, 1984). Pada tanaman, sebagian jalur pentosa fosfat berperan dalam reaksi pembentukan fruktosa-6-fosfat sebagai prE-kursor biosintesis polisakarida, yang kemudian berperan dalam sintesis β -1,3-1,6-glukopiranosida (Stryer,2000).

Seng termasuk dalam unsur kelumit esensial yang berkaitan langsung dengan aktivitas enzim dan dibutuhkan hanya dalam jumlah yang sangat kecil. Seng berperan aktif dalam metabolisme karbohidrat dan merupakan komponen esensial pada hampir ratusan jenis enzim yang berbeda. Seng berfungsi



Gambar 1. Struktur primer lentinan (Chihara, 1993).

sebagai kofaktor dari enzim dehidrogenase yang berikatan dengan NAD dan NADP.

Dari penetapan kadar polisakarida pada jamur *Ganoderma lucidum* yang telah diberi perlakuan dengan menambahkan vitamin B₁ dan Mg⁺⁺ pada media tumbuhnya (Ediati, *et. al.*, 2003) dan penelitian yang telah dilakukan oleh Soegihardjo *et. al.* (1988) dapat diambil kesimpulan bahwa penambahan vitamin B₁ dan magnesium sulfat sebagai kofaktor dalam reaksi enzimatik biosintesis polisakarida, akan meningkatkan kadar polisakarida dalam jamur. Juga telah dilakukan penetapan kadar polisakarida jamur sitake kering (bagian tudung dan batang dekat tudung) dan sediaannya dalam bentuk kaplet yang ada di pasaran, Hasil yang diperoleh berturut-turut adalah 16,75%, 16,0% dan 13,21% (Ediati dan Bambang, 2003). Dari uraian tersebut, maka penting untuk dilakukan penelitian peningkatan kadar polisakarida dengan penambahan vitamin B₁ dan seng sulfat sebagai kofaktor dalam reaksi enzimatik biosintesis polisakarida dalam jamur sitake, yang dilanjutkan dengan uji imunomodulatornya pada sel limfosit, sehingga diperoleh jamur sitake yang dapat digunakan lebih efektif dalam sistem pertahanan tubuh.

Metodologi

Bahan

Jamur Sitake yang diambil dari daerah Cangkringan Sleman (Gambar 2), vitamin B₁ (tiamin hidroklorida), magnesium sulfat (MgSO₄.7H₂O), mencit putih jantan galur Balb/c dengan umur antara 10-12 minggu, Dekstran p.a. (Sigma), asam klorida p.a. (E.Merck), asam sulfat p.a (E.Merck), fenol p.a. (E.Merck), akuades, RPMI (*Rosewell Park*



Gambar 2. Jamur sitake yang digunakan untuk penelitian

Memorial Institute) 1640 (Sigma), Natrium bikarbonat (Sigma), hepes (Sigma), fetal bovine serum (FBS) 10% (v/v) (Gibco), penisilin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco), fungison 0,5% (v/v) (Gibco), etanol, akuabides, sodium dedoksil sulfat (Sigma), asam hidroklorida p.a., phosphate buffer saline steril (Sigma), MTT kit (Sigma), phytohaemagglutinin (PHA).

Alat

Spektrofotometer UV (Genesys 20), Sentrifus (Sorvall), Inkubator CO₂ (Heraeus), *Inverted Microscope* (Olympus), hemositometer (Nebauer), Pipet Pasteur, Plate 96 well (Nunc), Elisa reader (Biorad), mikropipet (Eppendorf), *Eppendorf tubes*, tip biru, tip kuning, dan alat-alat gelas yang telah disterilkan.

Perlakuan pada media tumbuh jamur sitake

Penelitian dilakukan dengan metoda acak pola searah terhadap 7 kelompok masing-masing terdiri dari 5 media tumbuh jamur sitake fase primordia, dengan penambahan 5 ml larutan 1 mMol seng sulfat dan 10 mL larutan vitamin B₁ dengan kadar berturut-turut 1%, 2%, 4%, 8% dan 16% pada kelompok I, II, III, IV dan V; 5 mL larutan 1 mMol seng sulfat dan 10 mL akuades pada kelompok VI serta 15 mL akuades pada kelompok VII, sebagai kontrol.

Pemanenan jamur, pengeringan, penyerbukan dan penetapan kadar polisakarida.

Dalam waktu 90 hari semenjak bibit tanaman, jamur sudah dapat dipanen, sebelum tudung membuka. Proses pengeringan jamur dilakukan dengan menggunakan oven selama 24 jam yang dilengkapi vakum untuk menarik uap air. Suhu oven diatur pada angka 50°C. Jamur yang sudah kering diambil bagian tudungnya lalu diserbuk sampai halus, kemudian ditetapkan kadar polisakaridanya. Penetapan kadar polisakarida dilakukan dengan metode *Phenol Sulphuric Acid Test* (AOAC *Official Methods of Analysis*, No. 988.12) yang telah dimodifikasi (Ediati *et. al.*, 2003) dengan menggunakan dekstran untuk kurva bakunya.

Uji Imunomodulator

a. Isolasi sel limfosit

Mencit dikorbankan dengan narkose, kemudian diambil limpanya dan diletakkan dalam cawan petri yang berisi 5 mL media RPMI. Dengan hati-hati, media RPMI disempatkan berkali-kali ke dalam limpa, sehingga diperoleh suspensi sel. Suspensi sel disentrifugasi pada suhu 4°C, 1500 rpm, selama 10 menit. Pelet diresuspendikan dalam 2 mL larutan bufer tris-amonium klorida untuk melisiskan eritrosit. Sel dicampur dengan menggunakan pipet, diamkan 2 menit pada suhu ruang. Tambahkan 1 ml

FBS dan suspensi disentrifugasi pada suhu 4°C, 1500 rpm, selama 10 menit. Peletnya dicuci 2 kali dengan RPMI dan resuspensi sel dalam RPMI komplet sehingga diperoleh suspensi sel limfosit dengan kepadatan $1,5 \times 10^6$ /mL yang digunakan untuk uji imunomodulator (pertumbuhan dan proliferasi sel limfosit).

b. Uji pertumbuhan dan proliferasi sel limfosit

Jamur yang telah ditetapkan kadar polisakaridanya, digunakan untuk uji pertumbuhan dan proliferasi sel limfosit dengan metode MTT *reduction*, yaitu metoda kolorimetri dengan menggunakan senyawa tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida). Pada uji ini, 100 μ L suspensi sel limfosit dengan kepadatan $1,5 \times 10^6$ /mL, dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran dan masing-masing diberi 10 μ L infus 10% jamur sitake hasil perlakuan dengan berbagai kadar vitamin B₁. Inkubasi selama 24 jam, kemudian ditambahkan 10 μ L larutan 5 mg/mL MTT dalam PBS, inkubasi selama 4 jam, tambahkan 100 μ L larutan 10% SDS sebagai stop solution. Inkubasi kembali selama semalam dan hasilnya dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm, maka akan didapat nilai OD dari masing-masing perlakuan dan kontrol dengan PHA.

Analisis Data

Data penetapan kadar polisakarida dan nilai OD dari kultur sel limfosit yang diberi 10% infus sitake yang diperoleh, dianalisis secara statistik dengan uji Kruskal-Wallis, yang dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney menggunakan taraf kepercayaan 95%.

Hasil Dan Pembahasan

Perlakuan pada media tumbuh sitake

Fase primordial merupakan waktu yang tepat untuk penambahan vitamin B₁ dan seng sulfat. Penambahan zat tambahan bisa dilakukan pada tahap pencampuran bahan baku media, akan tetapi tahap sterilisasi dengan suhu 90-100°C selama 8 jam kemungkinan besar akan mempengaruhi vitamin B₁ yang tidak stabil dengan pemanasan. Penambahan vitamin B₁ dan seng sulfat ke media dilakukan dengan penyuntikan dibebberapa titik media tumbuh, karena *massa pinhead* yang tersebar di permukaan media sangat kenyal sehingga sulit ditembus bila hanya diberikan dengan penyiraman biasa.

Penetapan kadar polisakarida

Pada penelitian ini digunakan metode *phenol sulphuric acid* yang telah dimodifikasi untuk menetapkan kadar polisakarida (lentinan) yang terdapat pada tudung sitake. Adapun prinsip metode ini adalah pembentukan warna antara glukosa, hasil hidrolisis lentinan dengan pemanasan menggunakan asam klorida, dengan penambahan fenol dan asam sulfat pekat (Ediati *et. al.*, 2003). Glukosa akan terhidrasi oleh asam sulfat pekat membentuk struktur 5-hidroksimetilfurfural (Snell and Snell, 1961). Senyawa 5-hidroksime-tilfurfural selanjutnya akan berkondensasi dengan fenol menghasilkan senyawa kompleks yang memberikan warna kuning kecoklatan (Higuchi, 1961) yang dapat diukur pada panjang gelombang 493 nm. Kadar lentinan didapat dengan memasukkan nilai absorbansi pada kurva baku dekstran $Y=0,0913 X-0,141$. Dari Tabel I dapat diketahui pada kelompok IV diperoleh kadar lentinan tertinggi. Dari hasil ini, dapat disimpulkan bahwa perbedaan konsentrasi vitamin B₁ yang ditambahkan pada media tumbuh sitake, diperoleh produksi polisakarida yang berbeda signifikan ($p \leq 0,05$) dengan kadar optimum pada penambahan 8% vitamin B₁. Hal ini disebabkan oleh jumlah vitamin B₁ mempengaruhi pembentukan koenzim tiamin pirofosfat (TPP). TPP berperan dalam jalur pentosa fosfat sebagai penyedia prekursor biosintesis lentinan, yaitu fruktosa-6-fosfat. Pada penambahan vitamin B₁ yang lebih besar dari 8%, yaitu kadar 16% (kelompok V), terjadi penurunan produksi polisakarida. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya sifat reaksi enzimatik yang reversible, sehingga pada kadar vitamin B₁ yang lebih tinggi terjadi penurunan produksi polisakarida dalam jamur sitake. Pada kelompok VI yang hanya diberi seng sulfat dibandingkan dengan kelompok VII yang diberi akuades saja, terdapat produksi polisakarida yang berbeda signifikan, Walaupun demikian kenaikan produksi polisakarida pada kelompok VI, lebih rendah dibanding dengan kelompok IV. Hal ini dapat diambil kesimpulan. bahwa vitamin B₁ yang berperan dalam meningkatkan produksi polisakarida lentinan jamur sitake.

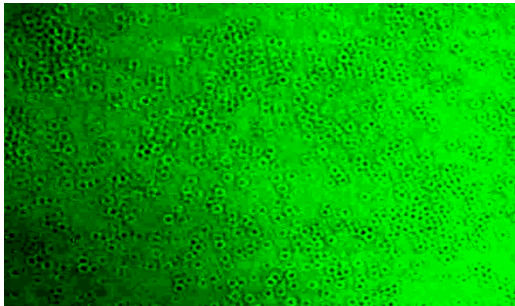
Tabel I. Data penetapan kadar lentinan dengan metode *Phenol-Sulphuric Acid* yang dimodifikasi

Kelompok	Kadar (%)					Purata \pm SD
I	37,12	39,16	38,36	39,09	37,39	38,22 \pm 0,422
II	42,71	44,10	45,02	41,87	42,90	43,32 \pm 0,554
III	47,35	46,76	45,85	47,98	48,47	47,32 \pm 0,463
IV	56,63	57,82	62,16	57,13	61,75	59,098 \pm 1,183
V	44,88	45,33	39,27	43,54	39,09	42,42 \pm 1,356
VI	48,96	46,73	42,96	46,18	47,52	46,47 \pm 0,994
VII	37,49	37,26	37,67	37,42	38,03	37,57 \pm 0,131

Keterangan :

I : 1% vitamin B₁ + 1mMol seng sulfat
 II : 2% vitamin B₁ + 1mMol seng sulfat
 III : 4% vitamin B₁ + 1mMol seng sulfat
 IV : 8% vitamin B₁ + 1mMol seng sulfat

V : 16% vitamin B₁ + 1mMol seng sulfat
 VI : Akuades + 1 mMol seng sulfat
 VII : Kontrol negatif (akuades)



Gambar 3. Limfosit hasil isolasi dari mencit Balb/c (Perbesaran 100 X)



Gambar 4. Kristal formazan yang terbentuk dari hasil reduksi senyawa MTT oleh enzim dehidrogenase mitokondria sel limfosit

Uji Imunomodulator dengan metode *MTT reduction*

Hasil pengamatan sel limfosit limpa mencit dibawah mikroskop, terlihat bentuk sel limfosit yang bulat dan bergerombol dengan inti yang berukuran kecil, seperti dapat dilihat pada Gambar 3. Sel limfosit yang diperoleh merupakan campuran sel B dan sel T. Antara sel B dan sel T tidak dapat dibedakan, karena secara morfologik kedua sel tersebut sama.

Kultur sel limfosit yang telah diberi infus 10% jamur sitake, diinkubasi selama 24 jam agar tumbuh dan berproliferasi. Sel yang tumbuh dan berproliferasi, dapat diukur dengan terbentuknya kristal formazan, yang merupakan hasil reduksi garam tetrazolium oleh enzim dehidrogenase mitokondria yang terdapat dalam sel yang hidup. Selama propagasi jumlah sel limfosit dalam kultur akan bertambah banyak karena mengalami proliferasi. Banyaknya sel yang hidup dan berproliferasi ditandai dengan jumlah kristal formazan yang terbentuk. Dari terbentuknya kristal formazan yang larut dengan penambahan larutan SDS, maka dapat diketahui besarnya pertumbuhan dan proliferasi sel dari nilai OD yang dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm (Tabel II).

Kristal formazan yang terbentuk, dapat dilihat pada Gambar 4.

Pada Tabel II dapat dilihat adanya kenaikan harga OD yang signifikan terjadi pada kelompok 3, 4, 5, dan 6. Pada kelompok 4 terjadi kenaikan harga OD yang tertinggi. Data ini sesuai dengan data kadar lentinan yang juga tertinggi pada kelompok IV (Tabel I), yaitu kelompok yang ditambah dengan 8% vitamin B₁ + 1mMol seng sulfat. Kadar lentinan yang besar dapat menstimulasi sel limfosit untuk berproliferasi secara maksimal. Pada kelompok 8 yaitu kelompok kontrol dengan PHA, diperoleh harga OD yang rendah. PHA merupakan suatu senyawa yang dapat merangsang secara selektif sel T untuk berproliferasi dan berdiferensiasi serta merangsang terjadinya produksi limfokin. Dari nilai OD yang rendah dengan penambahan PHA, dapat diketahui

bahwa tidak terjadi peningkatan proliferasi sel limfosit T dalam kultur yang diinkubasi selama 24 jam.

Kesimpulan

1. Pemberian larutan 8% vitamin B₁ dan 1 mMol seng sulfat pada media tumbuh sitake dapat meningkatkan kadar polisakarida sitake, yaitu sebesar 27,17% terhadap kontrol VI (seng sulfat) dan 57,30% terhadap kontrol VII (akuades).
2. Peningkatan kadar polisakarida dapat meningkatkan efek imunomodulatornya terhadap sel limfosit, yaitu sebesar 305,43% terhadap kelompok 7 (akuades).

Daftar Pustaka

- Chihara, G., 1992, *Immunopharmacology of Lentinan, A Polysaccharide Isolated from Lentinus edodes : Its application as a host defence potentiator* <http://www.Enzolen.com/lentinan.cfm>.
- Chihara, G., 1993, *Mushroom Biology and Mushroom Products*,
- Ediati S., Abdul R, dan Bambang P, 2003, *Analisis Kadar Polisakarida Jamur Ganoderma lucidum dengan Metode Spektrofotometri Visibel (Modifikasi Phenol Sulphuric Acid Test (AOAC Official Methods of Analysis, No. 988.12))*. Laporan Hasil Penelitian, Fakultas Farmasi UGM, Jogjakarta.
- Ediati S. dan Bambang P, 2003, *Analisis Kadar Polisakarida dalam Jamur Sitake dengan Metode Spektrofotometri Visibel (Modifikasi Phenol Sulphuric Acid Test (AOAC Official Methods of Analysis, No.988.12))*. Laporan Hasil Penelitian, Fakultas Farmasi UGM, Jogjakarta.
- Higuchi, T., 1961, *Pharmaceutical Analysis*, Interscience Publisher, New York
- Mizuno, T., Sakai T, and Chihara,G., 1995, *Health Food and Medicinal Usage of Mushroom*, <http://www.Enzolen.com/lentinan.cfm>
- Snell, F.D. and Snell, C., 1961, *Colorimetric Method of Analysis*, volume IIIA, D. Van Nostrand Company Inc, Princeton, p. 186-187.
- Soegihardjo, C.J., 1988, *Mencari Kondisi Terbaik untuk Pertumbuhan Kalus Costus speciosus*, Dalam Risalah Seminar Nasional Metabolit Sekunder, PAU Bioteknologi UGM, Jogjakarta.
- Stryer, L., 2000, *Biokimia*, edisi keempat, diterjemahkan oleh Tim Penerjemah Bagian Biokimia FKUI, penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Suriawiria, U., 2001, *Budidaya Jamur Shiitake*, Penebar Swadaya, Jakarta.