

**Bidang Ilmu/Kajian: Kesehatan**

## **LAPORAN PENELITIAN**

### **Uji Aktivitas Ekstrak *Ganoderma lucidum* sebagai Imunostimulan pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) pasca infeksi virus dengue 3 (DEN-3)**



**Tim Peneliti:**

- |  |                  |
|--|------------------|
| 1. Nama : Dra. Dewi Sulistyawati, M.Sc.          | NIDN: 0626106601 |
| 2. Nama : Dr. Ifandari, S.Si., M.Si.             | NIDN: 0605028302 |
| 3. Nama : dr. Ratna Herawati Prabowo , M.Biomed. | NIDN: 0627117401 |
| 4. Mahasiswa : Rina Melati                       | NIM: 39213174J   |

**Didanai dengan dana LLDIKTI dengan Surat perjanjian /kontrak Nomor. 159/H4- 07/20.07.2023  
Tanggal 20 Juli 2023**


**FAKULTAS ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
TAHUN 2023**


## HALAMAN PENGESAHAN

### PENELITIAN DOSEN PEMULA

<b>Judul Penelitian:</b> Uji Aktivitas Ekstrak <i>Ganoderma lucidum</i> sebagai Imunostimulan pada Tikus Putih ( <i>Rattus novergicus</i> ) pasca infeksi virus dengue 3 (DEN-3)	
<b>Nama Rumpun Ilmu:</b> [Kesehatan/ Bidang Kesehatan Umum Lain Yang Belum Tercantum]	
<b>Ketua Peneliti</b>	
a. Nama	: Dra. Dewi Sulistyawati, M.Sc.
b. NIDN	: 0626106601
c. Jabatan Fungsional	: Asisten Ahli
d. Program Studi	: D3 Analis Kesehatan
e. Nomor HP	: 08112800389
f. Alamat surel (e-mail)	: dewi.trop.08@gmail.com
<b>Anggota Peneliti</b>	
a. Nama	: Dr. Ifandari, S.Si. M.Si.
b. NIDN	: 0605028302
c. Prodi/ Fakultas	: D3 Analis Kesehatan/Fakultas Ilmu Kesehatan
a. Nama	: dr. Ratna Herawati Prabowo, M.Biomed.
b. NIDN	: 0627117401
c. Prodi/ Fakultas	: D4 Analis Kesehatan/Fakultas Ilmu Kesehatan
a. Nama	: Rina Melati
b. NIM	: 39213174J
c. Prodi	: D3 Analis Kesehatan/Fakultas Ilmu Kesehatan
<b>Biaya Penelitian</b>	: - dana USB Rp. 0 - dana institusi lain (LLDIKTI) Rp. 15,052,000 - in kind Rp. 0

Surakarta,

Mengetahui  
 Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan  
  
 Prof. dr. Marsetyawan HNE S., M.Sc., Ph.D.  
 NIDK. 8893090018

Ketua Peneliti  
  
 Dra. Dewi Sulistyawati, M.Sc.  
 NIDN. 0626106601

Mengetahui  
 Ketua Lembaga Penelitian  
  
 Rina Herowati, M.Si.  
 NIDN 0605057403

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
RINGKASAN .....	1
BAB 1. PENDAHULUAN.....	3
1.1 Latar Belakang.....	3
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Target Capaian.....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 State Of The Art.....	5
2.2 Vektor Virus Dengue .....	5
2.3 Etiologi Virus Dengue .....	6
2.4 Transmisi Virus Dengue .....	7
2.5 Patogenesis Infeksi Virus Dengue .....	8
2.6 Demam Berdarah Dengue.....	8
2.7 Respon Imun Terhadap Infeksi Virus Dengue.....	9
2.8 Jamur Ling Zhi .....	11
BAB 3 METODE PENELITIAN .....	13
3.1 Bagan Alir.....	13
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	13
3.3 Bahan dan Alat Penelitian.....	14
3.4 Tahapan Penelitian.....	14
3.5 Analisis Data.....	16
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....	17
BAB 5 KESIMPULAN .....	22
DAFTAR PUSTAKA .....	

## RINGKASAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan merupakan salah satu penyakit infeksi yang sulit untuk diberantas. Setiap tahun sering terjadi KLB di beberapa wilayah di Indonesia dengan jumlah kematian yang cukup tinggi. Incidence rate DBD di Indonesia pada tahun 2021 sebesar 27 per 100.000 penduduk<sup>1</sup>.

Kasus kematian biasanya terjadi akibat keterlambatan pengobatan, kekeliruan diagnosa dan terjadinya infeksi sekunder sehingga kasusnya menjadi semakin parah dan berkembang sebagai *Dengue Shock Syndrom* (DSS). Tingginya angka morbiditas dan mortalitas akibat DBD menjadi alasan pentingnya dilakukan penelitian tentang diagnosa dan tatalaksana pengobatan yang cepat dan akurat serta penelitian tentang pengembangan antivirus dengue yang efektif<sup>2</sup>.

Dewasa ini masyarakat semakin meningkat kesadarannya tentang kemanan obat sehingga mereka memilih obat alami dari tumbuhan atau jamur. Obat alami cenderung lebih aman karna efek samping yang sangat kecil terutama pada pemakaian jangka panjang. Salah satu obat alami yang cukup dikenal masyarakat adalah Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*)<sup>3</sup>. *Ganoderma lucidum* merupakan jenis jamur yang sejak jaman dahulu sangat populer di Tiongkok (China). *Ganoderma lucidum* banyak dimanfaatkan untuk mengobati penyakit degeneratif seperti tumor, diabetes dan hipertensi, dan mempertahankan imunitas tubuh (imunomodulator). Aktivitas jamur ini sebagai imunomodulator diantaranya adalah mengaktifkan sel-sel imun seperti Limfosit T, Limfosit B, sel dendritic, makrofag dan sel NK<sup>4</sup>.

*Ganoderma lucidum* banyak tumbuh di hutan-hutan di Indonesia dan kualitas dari badan buahnya lebih tinggi dibandingkan *Ganoderma lucidum* yang tumbuh di China, akan tetapi masyarakat Indonesia banyak yang belum mengenal jamur ini sehingga terbuang sia-sia. Kami bermaksud mengangkat jamur ini agar lebih dikenal masyarakat terutama para praktisi di dunia kesehatan dengan

melakukan pengujian ekstrak *Ganoderma lucidum* sebagai antivirus dengue (DEN-3) pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*). Tema ini dipilih karena prevalensi DBD yang tinggi di Indonesia dan obat yang efektif untuk infeksi ini belum ditemukan. Terapi yang bisa dilakukan hanya terapi supportif untuk meningkatkan sistem imun tubuh terhadap virus dengue. Serotipe dengue 3 (DEN-3) yang dipilih karena serotipe ini yang paling dominan di Indonesia dan virulensinya lebih tinggi dibanding serotipe yang lain. Penelitian tentang aktivitas *Ganoderma lucidum* sebagai antivirus baru dilakukan pada virus HIV dan Virus Hepatitis B, sedangkan untuk virus dengue dan imunostimulan belum ada penelitian yang dilaporkan<sup>5</sup>.

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Demam Berdarah Dengue masih menjadi masalah di negara-negara tropis dan sub tropis seperti Indonesia terutama di musim hujan. Kasus DBD di Indonesia pada tahun 2021 sebanyak 73.518 dengan jumlah kematian sebanyak 705 kasus. Incidence Rate DBD di Indonesia pada tahun 2021 sebesar 27 per 100.000 penduduk <sup>1</sup>. Jumlah kasus DBD cenderung meningkat dan bertambah luas penyebarannya ke berbagai wilayah setiap tahunnya, bahkan menjadi salah satu penyakit endemis hampir di setiap propinsi di Indonesia<sup>2</sup>.

Kasus DBD yang tinggi dengan angka kematian yang cukup tinggi merupakan alasan penting dilakukannya penelitian secara intensif mengenai infeksi virus dengue, patogenitasnya beserta pengembangan vaksin dan antivirusnya. Sampai saat ini belum ada obat dan terapi yang spesifik untuk infeksi ini. Prinsip utama pengobatannya adalah terapi suportif yang adekuat sehingga angka kematian dapat diturunkan. <sup>2</sup>. Terapi suportif yang banyak dilakukan berupa produk obat alami yang mempunyai efek antivirus dan berperan sebagai imunostimulan <sup>2</sup>. Produk obat alami yang diekstrak dari tumbuhan dan jamur mempunyai kelebihan yaitu tidak beracun dan memiliki efek samping yang lebih sedikit dibanding obat kimia<sup>3</sup>. Produk obat alami yang belum banyak diteliti sebagai antivirus dengue adalah *Ganoderma lucidum*.

*Ganoderma lucidum* (Ling Zhi adalah obat tradisional Tiongkok yang populer, dan orang-orang memperhatikan efek farmakologisnya yang sebenarnya. Beberapa studi sistematis baru-baru ini telah menetapkan potensi terapeutik *Ganoderma* sebagai antitumor, hepatoprotektif, antiinflamasi, imunomodulator, antioksidan dan antivirus<sup>3</sup>. *Ganoderma* merupakan jamur yang sudah digunakan di China untuk berbagai macam penyakit infeksi maupun penyakit generatif. *Ganoderma lucidum* juga banyak ditemukan di hutan-hutan di Indonesia akan tetapi belum banyak masyarakat yang mengenal dan memanfaatkan jamur ini sehingga terbuang sia-sia.

Salah satu senyawa aktif *Ganoderma* adalah triterpenoid yang dapat berperan sebagai agen antivirus terhadap berbagai patogen virus termasuk human immunodeficiency virus tapi belum ada laporan mengenai aktivitas antivirus triterpenoid *Ganoderma lucidum* terhadap dengue<sup>5</sup>. Latar belakang tersebut membuat kami tergerak untuk mengetahui potensi dari ekstrak *Ganoderma lucidum* sebagai imunostimulan pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) pasca infeksi virus dengue 3 (DEN-3). Aktivitas imunostimulan ekstrak *Ganoderma lucidum* diukur dengan melihat pembentukan antibodi IgM anti-dengue menggunakan metode ELISA. Serotipe virus yang digunakan adalah DEN-3 yang paling banyak ditemukan di Indonesia maupun negara-negara Asia Tenggara dan serotipe ini paling banyak menimbulkan kasus berat disamping DEN-2<sup>2</sup>.

#### 1.2.Rumusan Masalah

Dalam penelitian ini didapatkan rumusan masalah apakah ekstrak jamur *Ganoderma lucidum* efektif digunakan sebagai imunostimulan pada tikus putih *Rattus norvegicus* pasca infeksi virus dengue 3 (DEN-3).

#### 1.3.Tujuan khusus

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efektivitas ekstrak jamur *Ganoderma lucidum* efektif sebagai imunostimulan pada tikus putih *Rattus norvegicus* pasca infeksi virus dengue 3 (DEN-3).

#### 1.4.Target capaian

Target penelitian ini adalah publikasi di jurnal nasional.

## BAB 2.

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. State of the Art.

No	Peneliti	Judul	Tahun	Hasil
1	Li Wang, Jie Ging-Li, Ji Zang dan Zhi-min Li.	Traditional uses, chemical components and pharmacological activities of the genus <i>Ganoderma</i>	2020	Senyawa kimia Ganoderma dapat meningkatkan respon imun melalui peningkatan aktivitas limfosit T, limfosit B, sel dendritic, makrofag dan sel NK.
2	Sissi Wachtel- Galor, John Yuen, John A. Buswell, and Iris F. F. Benzie	Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects, <i>Ganoderma lucidum</i> (Lingzhi or Reishi).	2011	<i>G. lucidum</i> menginduksi sitokin dan peningkatan efektor imunologi. Komponen <i>G. lucidum</i> menyebabkan proliferasi dan pematangan limfosit T dan B, sel mononuklear limpa, sel NK, dan sel dendritic in vitro maupun in vivo.
3	Shiv Bharadwaj.	Discovery of Ganoderma lucidum triterpenoid as potential inhibitors against Dengue virus NS-2B-NS3 Protease.	2019	Ganodermanontriol adalah triterpenoid bioaktif yang kuat untuk menghambat protease DENV NS2B-NS3.

#### 2.2. Vektor Virus Dengue

Infeksi virus dengue dapat menyebar melalui gigitan nyamuk betina *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Nyamuk *Aedes aegypti* dewasa memiliki sisik putih yang membentuk seperti kecap atau seperti bentuk biola disisi bagian dorsal thorax, sedangkan nyamuk *Aedes albopictus* dewasa memiliki garis putih di titik tengah bagian atas wilayah thorax. Nyamuk *Aedes* memiliki garis putih seperti pita di setiap segmen tarsal pada bagian kaki belakang nyamuk, perut berwarna hitam atau coklat tua biasanya memiliki sisik berwarna putih, nyamuk betina ukurannya lebih besar dari pada nyamuk jantan. Nyamuk jantan dapat diidentifikasi melalui jenis antenanya yang berbulu halus, bagian mulut jantan



dilihat strukturalnya untuk mencari nektar sedangkan mulut betina dilihat strukturalnya untuk memakan darah<sup>8</sup>.

### 2.3. Etiologi Virus Dengue

Demam Berdarah Dengue atau DBD dapat disebabkan oleh virus dengue yang merupakan famili dari Flaviridae. Virus ini terdiri atas empat serotipe utama, yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4. Serotip virus dengue memiliki masing-masing tingkatan, DEN-1 merupakan serotip yang paling mudah ditularkan karena sifatnya yang lebih kuat pada nyamuk maupun pada manusia, DEN-2 dapat menyebabkan kasus dengan gejala klinis ringan maupun berat, DEN-3 merupakan serotip yang dapat mengakibatkan infeksi paling berat di Indonesia, DEN-4 serotip ini sedikit ditemukan dan tidak ganas. Virus dengue termasuk golongan Grup B *Arthropoda Borne Viruses* (Arboviruses), virus ini sekarang dikenal sebagai genus Flavivirus yaitu virus yang ditularkan melalui serangga. Manusia bisa terjangkit penyakit demam berdarah dengue melalui gigitan nyamuk betina pembawa virus dengue yaitu nyamuk *Aedes aegypti* dan nyamuk *Aedes albopictus*<sup>9</sup>.

Genom virus dengue terdiri dari RNA dengan rantai tunggal dan dikelilingi dengan isometrik nukleokapsid atau ikosahedral, ditutup envelope dengan komposisi lemak. Genom virus RNA dan protein kapsid bergabung membentuk nukleokapsid yang aktif di retikulum endoplasma (ER). Nukleokapsid yang berhubungan dengan prM dan E membawa lipid dari inang untuk mengikat virion yang belum matang. Virion dengue yang belum matang memiliki permukaan kasar masing-masing terdiri dari trimer E yang terkait dengan protein prM. Partikel virus yang belum matang sepenuhnya dikeluarkan dari vesikel ke dalam aparatus golgi selama proses pematangan. Virion

mengalami glikosilasi dalam lingkungan asam jaringan trans-Golgi (TGN), pembelahan prM dimediasi oleh furin di M. Struktur dimer yang belum matang E mempertahankan interaksi dengan pr dan M setelah sel mulai terurai melalui proses pH netral lingkungan ekstraseluler memisahkan E dan prM, membentuk virion matang yang dapat menyebabkan kerusakan sel baru (Wang *et al.*, 2021). Virus ini berukuran sangat kecil dan berbentuk batang, tersusun oleh tiga protein struktural protein inti (core C), protein membran (M), dan protein selubung luar (*envelope E*), terdiri dari tujuh protein non struktural yaitu NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5<sup>10</sup>.

#### 2.4. Transmisi Virus Dengue

Infeksi virus dengue ditularkan melalui gigitan nyamuk. Saat nyamuk menghisap darah manusia yang sedang mengalami viremia, virus masuk ke dalam tubuh nyamuk dan nyamuk menularkan virus ke manusia lain. Setelah virus dengue masuk ke dalam tubuh manusia, virus berkembangbiak dalam retikuloendotel (sel kupffer hepar, endotel pembuluh darah, nodus limfatikus, sumsum tulang dan paru-paru) dan diikuti dengan viremia yang berlangsung 5-7 hari. Virus akan masuk ke dalam peredaran darah dan ditangkap oleh makrofag sehingga makrofag menjadi *antigen presenting cell* (APC). Antigen yang menempel di makrofag akan mengaktifasi sel T *helper* dan menarik makrofag lain untuk memfagosit virus lebih banyak. Sel T *helper* mengaktifasi sel T *sitotoksik* yang akan melisiskan makrofag yang sudah memfagositosis virus, disamping itu juga mengaktifkan sel B sehingga terjadi pelepasan antibodi<sup>11</sup>.

## 2.5. Patogenesis Infeksi Virus Dengue

Secara *in vitro*, antibodi anti-dengue memiliki empat fungsi biologis yaitu netralisasi virus, sitolisis komplemen, antibodi *dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) dan ADE. Berdasarkan perannya, antibodi tersebut terdiri dari netralisasi atau neutralizing antibodi yang memiliki serotipe spesifik yang dapat mencegah infeksi virus, dan antibodi non netralizing serotipe yang mempunyai peran reaktif silang dan dapat meningkatkan infeksi yang berperan dalam patogenesis DBD dan DSS<sup>12</sup>.

Infeksi dengue yang terjadi pada seseorang yang belum pernah terinfeksi oleh flavivirus atau oleh vaksin dari flavivirus, maka tubuhnya akan membentuk antibodi primer yang merupakan antibodi spesifik yang meningkat secara lambat. Antibodi IgM adalah isotype imunoglobulin yang pertama kali muncul. Antibodi tersebut ditemukan pada 50 % pasien pada hari 3-5 setelah onset penyakit. Meningkat menjadi 80 % pada hari ke-5 dan 99 % pada hari ke-10. Level IgM akan mencapai puncaknya pada 2 minggu setelah onset gejala penyakit dan kemudian secara umum tidak terdeteksi setelah 2-3 bulan. Anti-dengue IgG secara umum terdeteksi pada titer rendah pada akhir minggu pertama penyakit, meningkat perlahan setelahnya, sehingga serum IgG akan tetap terdeteksi setelah beberapa bulan dan mungkin selama hidup. Titer antibodi meningkat cepat dan bereaksi terhadap semua jenis flavivirus. Isotype immunoglobulin yang paling dominan adalah IgG yang titernya terdeteksi paling tinggi meskipun pada fase akut dan dapat bertahan sampai dengan 10 bulan kemudian. Stadium konvalesen level IgM jauh lebih rendah pada infeksi sekunder dari pada level IgM, pada infeksi sekunder bahkan pada beberapa kasus tidak terlihat<sup>13</sup>.

## 2.6. Demam Berdarah Dengue

*Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) atau bisa disebut juga Demam berdarah dengue adalah penyakit yang disebabkan oleh virus berbahaya karena bisa menyebabkan penderita meninggal dalam waktu yang singkat. Gejala klinis Demam Berdarah Dengue atau DBD berupa demam tinggi yang berlangsung secara terus-menerus selama 2-7 hari. Tanda dan gejala perdarahan biasanya didahului dengan terlihatnya tanda khas berupa patechi. Patechia merupakan bintik-bintik merah pada .

Kasus DBD di Indonesia dilaporkan pada tahun 2022 dan tercatat sebanyak 143.184 kasus. Jumlah kasus ini meningkat sebanyak 94,8% dibandingkan tahun 2021 tercatat sebesar 73.518 kasus. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia melaporkan kembali kasus demam berdarah dengue pada minggu ke 22 tahun 2023 sebanyak 35.694, dari jumlah tersebut kasus demam berdarah dengue di Indonesia terbanyak di provinsi Jawa Barat, Bali, Jawa Tengah, Jawa Timur dan Nusa Tenggara Barat <sup>14</sup>.

## 2.7. Respon Imun Terhadap Infeksi Dengue

Tahap pengenalan merupakan tahap awal daya tahan tubuh, dimana tubuh akan membentuk respon imun pada saat virus dengue masuk ke dalam tubuh. Virus akan berkembangbiak di dalam sel retikuloendotelial diikuti dengan viremia atau masa dimana virus dengue berada di dalam aliran darah, sehingga virus dapat berpindah atau ditularkan melalui gigitan nyamuk berlangsung selama 5-7 hari<sup>15</sup>.

Respon imun yang berperan terhadap infeksi dengue sebagai berikut :

a. Sistem pertahanan tubuh alamiah atau non spesifik (innate immune system)

Sistem pertahanan alami diawali sejak virus masuk ke dalam tubuh dan mengaktivasi system komplemen dan diikuti adanya depresi sumsum tulang yaitu tahap hipovaskuler pada hari ke 3-4 demam dan perubahan sistem patologi megakariosit. Pada respon imun non spesifik yang memiliki peran adalah makrofag, komplemen, dan trombosit. Makrofag berperan dalam fagositosis virus dengan opsonisasi antibodi, namun proses fagositosis menyebabkan peningkatan replikasi virus dan sekresi sitokin oleh makrofag (Fatmawati & Chandra, 2010). Terdapat empat tipe respon trombosit terhadap aktivitas tersebut yaitu perubahan bentuk trombosit dari pipih keping menjadi bulat berduri, sekresi, agregasi dan adhesi<sup>16</sup>.

b. Sistem pertahanan tubuh yang didapat atau spesifik (adaptive immune system)

Sistem imun *adaptive* sangat berbeda dengan sistem imun *innate*, dimana sistem imun *adaptive* sangat spesifik dan tergantung pada rangsangan antigen. Antigen merupakan substansi asing yang akan menimbulkan suatu respon imun. Imunogen yaitu molekul molekul yang dapat menimbulkan suatu respon imun pada suatu host tertentu misalnya virus. Sistem imun *adaptive* terdiri dari 2 tipe limfoid yaitu sel T ( 70-75% dari sistem imun *adaptive*) dan sel B ( 10 – 20% dari sistem imun *adaptive*). Makrofag-makrofag khusus yang dikenal dengan nama antigen presenting cells (APCs) juga termasuk didalamnya. Reseptor yang digunakan untuk mengenal mikroorganisme tertentu dibentuk dengan menyatukan atau menempelkan beberapa segmen dari gen sehingga dapat terbentuk suatu reseptor mikroorganisme tertentu.

## 2.8. Jamur Ling zhi (*Ganoderma lucidum*)



**Gambar 1. Jamur *G.lucidum***  
**Sumber: (Pambudi, 2019)**

Jamur ling zhi termasuk golongan jamur yang tidak bisa dimakan (*non-edible*), bentuknya bervariasi ada yang berbentuk bundar, semi-bundar, berbentuk seperti kipas, berbentuk seperti payung, bahkan ada yang berbentuk seperti ginjal. Jamur ini merupakan jamur pelapuk kayu yang mempunyai tubuh buah keras dan tebal, jamur ini tumbuh atau menempel pada pohon yang sudah mati dan pohon yang sudah membusuk seperti pohon maple, elm, oak, dan magnolia<sup>17</sup>.

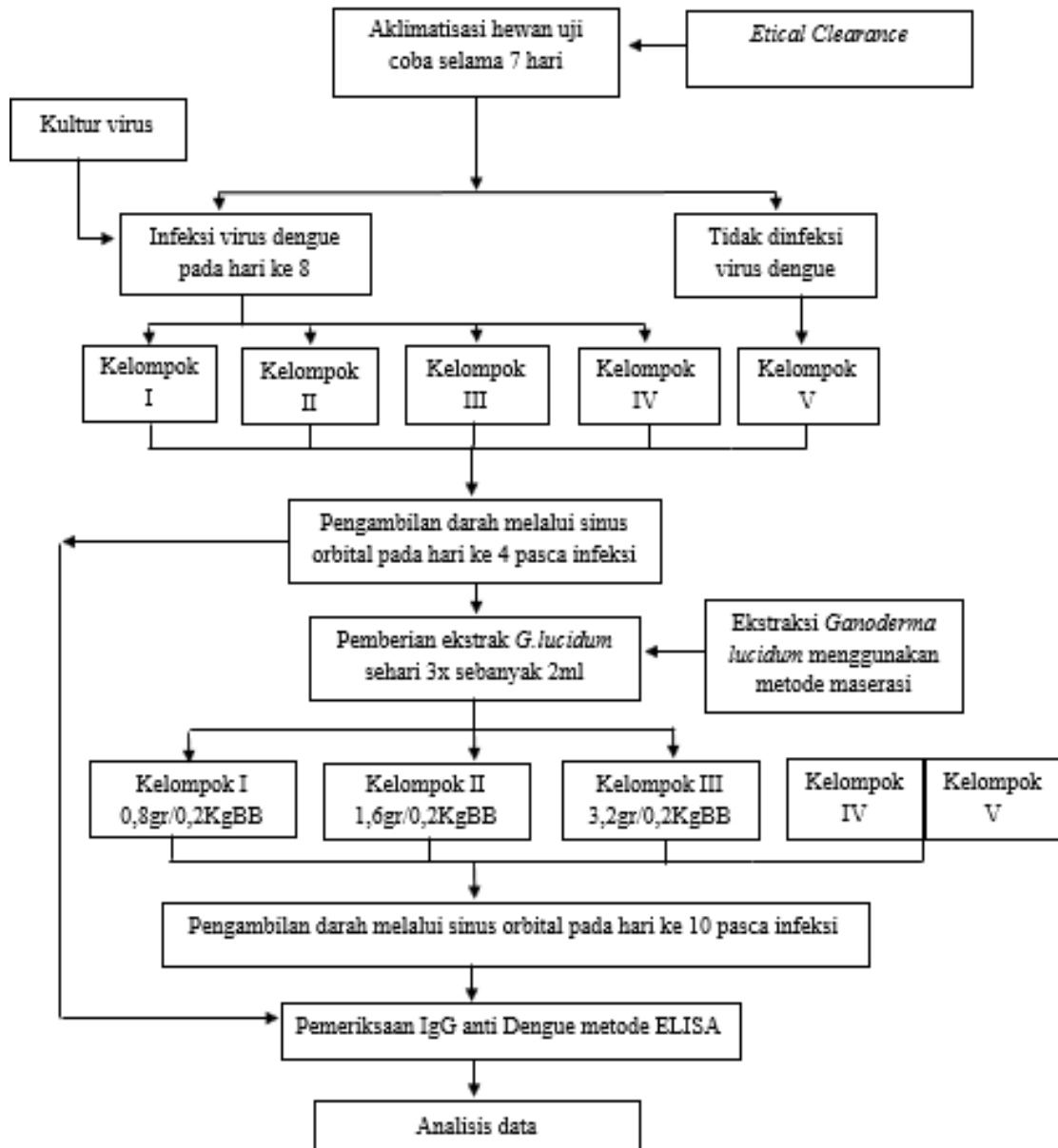
Jamur ling zhi (*Ganoderma lucidum*) diketahui berpotensi mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh karena mengandung polisakarida, triterpenoid tinggi dan mengandung senyawa germanium aktif. Triterpenoid merupakan jenis senyawa organik yang berasal dari unit isoprena dan kelompok senyawa alami yang lebih besar disebut terpan. Salah satu senyawa aktif dalam *Ganoderma lucidum* yaitu triterpenoid (lanostan C30, C24, C25, C27, pentasiklik C30) yang berperan sebagai agen anti-virus bagi virus patogen seperti virus *Herpes simplex tipe 1 (HSV-1 dan HSV-2)*, *virus influenza a (Flu A)*, *Human immunodeficiency virus (HIV)*, tetapi hingga saat ini dampak mengenai aktivitas triterpenoid terhadap virus dengue belum dilakukan secara menyeluruh. Lebih dari dua ratus triterpenoid ditemukan dalam tubuh buah, spora, dan miselia *Ganoderma*

*lucidum*. Triterpenoid terkandung dalam tubuh buah kering *Ganoderma lucidum*. *Ganodermanotriol* (salah satu triterpenoid kuat) ditemukan sebagai senyawa yang paling berperan melawan infeksi virus<sup>18</sup>.

### BAB 3.

#### METODE PENELITIAN

##### 3.1 Bagan Alir Penelitian



##### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan pada bulan November 2023 - Januari 2024, bertempat di di Laboratorium Farmakologi FKMK Universitas Gadjah Mada dan Imunoserologi Universitas Setia Budi Surakarta.



### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan pada pemeriksaan ini adalah serum tikus putih (*Rattus norvegicus*) dari 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol, Kit reagen IgG Dengue.

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah, alat untuk membuat ekstraksi jamur ling zhi (*Ganoderma lucidum*), pipet hematokrit, tube, centrifuge, ELISA Microplate Washer Rayto RT- 2600 C, ELISA Microplate Reader Rayto RT-2100C, mikropipet dan blue/ yellow tip, inkubator, stopwatch, sarung tangan karet, masker, cup serum, sumuran plat.

### 3.3. Tahapan Penelitian

- a. Pembuatan Ekstrak Jamur Ling zhi (*Ganoderma lucidum*) metode maserasi. Jamur Ling zhi, yang sudah di ekstrak dibuat variasi dosis *Ganoderma lucidum* yaitu 0,8 g; 1,6 g; 3,2 g/0,2 KgBB.
- b. Pengujian triterpenoid. Uji triterpenoid dilakukan menggunakan metode *Lieberman Burchard* (LB) untuk memastikan adanya senyawa triterpenoid.
- c. Aklimatisasi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)  
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diaklimatisasi selama 7 hari dengan tujuan untuk menyeragamkan dan mengamati keadaan tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebelum diberi perlakuan.
- d. Kultur Virus Dengue 3 (DEN-3)  
Supernatan virus DEN-3 yang berasal dari kultur sel C6/36 yang telah diinfeksi virus DEN-3 dengan inkubasi selama 7 hari, digunakan sebagai sumber isolat virus DEN-3.
- e. Infeksi virus Dengue 3 (DEN-3)  
Virus DEN-3 diambil dengan syringe sebanyak 50 µl dan diinjeksikan kedalam intra vena melalui ekor. Tikus putih yang sudah diinfeksi, dikeluarkan dari tabung dan dimasukkan dalam kandang pemeliharaan.
- f. Pengambilan sampel darah tikus

Pengambilan sampel darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) menggunakan metode *Sinus orbital* diambil dari vena dibagian mata sebanyak kurang lebih 1 ml pada hari ke 4 dan hari ke 10 pasca infeksi.

g. Pemeriksaan IgG anti-Dengue dengan metode ELISA

- Dilakukan pemipetan 100 µl standar atau kontrol dan sampel yang telah diencerkan ke dalam lubang sumuran, dan kosongkan lubang sumuran A1 untuk substrat blanko.
- Sumuran ditutup menggunakan selotip atau *cover well* yang disertakan dalam kit.
- Dilakukan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C
- Setelah inkubasi selesai dilakukan pencucian sebanyak tiga kali pada tiap sumuran dengan *washing buffer* sebanyak 300 µl.
- Dilakukan penambahan 100 µl konjugat (antibodi) kesemua sumuran kecuali sumuran A1.
- Dilakukan inkubasi kembali selama 30 menit pada suhu ruang 20°C sampai 25°C dan disimpan pada tempat gelap untuk menghindari paparan cahaya langsung.
- Setelah inkubasi selesai dilakukan pencucian sebanyak tiga kali pada setiap sumuran dengan menggunakan *washing buffer* sebanyak 300 µl.
- Dilakukan penambahan 100 µl TMB substrat solution dalam semua sumuran kemudian diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu ruang 20°C sampai 25°C dan disimpan pada tempat gelap. Warna biru akan muncul karena reaksi enzimatik
- Dilakukan pemipetan reagen stop solution sebanyak 100 µl ke dalam semua sumuran denganurut.
- Ukur absorbansi pada panjang gelombang 620nm dalam waktu 30 menit setelah penambahan stop solution.
- Pengukuran absorbansi sampel menggunakan ELISA *Reader*.

### 3.4 Analisis Data

Data berupa hasil penelitian dianalisis secara statistik menggunakan uji normalitas (*Shapiro-Whilk*) untuk melihat data tersebut normal atau tidak. Apabila didapat nilai  $p > 0,05$  maka distribusi normal dan dilanjutkan dengan uji *one-way* Anova, apabila distribusi dijumpai tidak normal  $p < 0,05$  maka dilakukan uji *kruskal wallis* untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan diantara kelompok perlakuan dan dilanjutkan dengan analisis *post hoc* untuk mengetahui perbedaan kelompok.

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

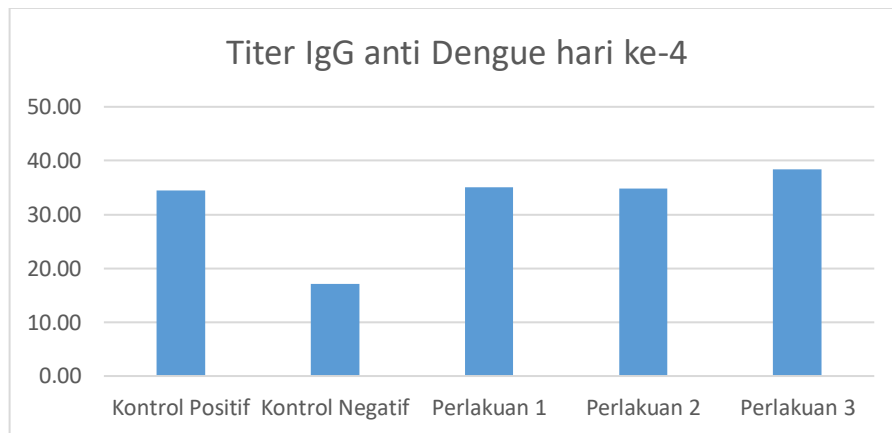
Penelitian ini menguji tentang efektivitas ekstrak *Ganoderma lucidum* sebagai imunostimulan pada tikus putih *Rattus novergicus* pasca infeksi virus Dengue 3 (DEN-3). *Ganoderma lucidum* (G. lucidum) merupakan jamur yang dapat dimanfaatkan sebagai antitumor, hepatoprotektif, antiinflamasi, imunomodulator, antioksidan dan antivirus<sup>1</sup>. Aktivitas jamur ini sebagai imunomodulator diantaranya adalah dengan mengaktifkan sel-sel imun seperti Limfosit T, Limfosit B, sel dendritik, makrofag dan sel NK<sup>2</sup>. Aktivitas imunostimulan ekstrak *Ganoderma lucidum* dapat diukur dengan melihat pembentukan antibodi IgM ataupun IgG anti-dengue menggunakan metode ELISA. Pada penelitian ini parameter yang diukur adalah IgG anti Dengue dengan pertimbangan antibody IgG lebih lama bertahan dalam peredaran darah. Serotipe virus yang digunakan adalah DEN-3 yang paling banyak ditemukan di Indonesia maupun negara-negara Asia Tenggara dan serotipe ini paling banyak menimbulkan kasus berat disamping DEN-2<sup>3</sup>.

Hewan coba yang dipakai adalah tikus putih *Rattus novergicus* yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu 3 kelompok perlakuan ekstrak *Ganoderma lucidum* dengan dosis yang bervariasi yaitu 0,8 g; 1,6 g; 3,2 g/0,2 KgBB dan 2 kelompok kontrol (kontrol potisif dan kontrol negatif). Tikus putih *Rattus novergicus* yang sudah diaklimatisasi dan diinfeksi dengan virus Dengue 3 (DEN-3), diambil darahnya pada hari ke 4 dan hari ke 10 pasca infeksi dan pemberian ekstrak *G. lucidum*. Serum yang dikumpulkan diukur titer IgG anti Dengue menggunakan metode Elisa dengan absorbansi 450/620 nm.

Hasil perhitungan rata-rata titer IgG anti Dengue 3 pada hari ke 4 dan ke 10 dapat dilihat pada tabel 1 dan 2 di bawah ini :

Tabel 1. Rata-rata titer IgG anti Dengue 3 pada hari ke-4

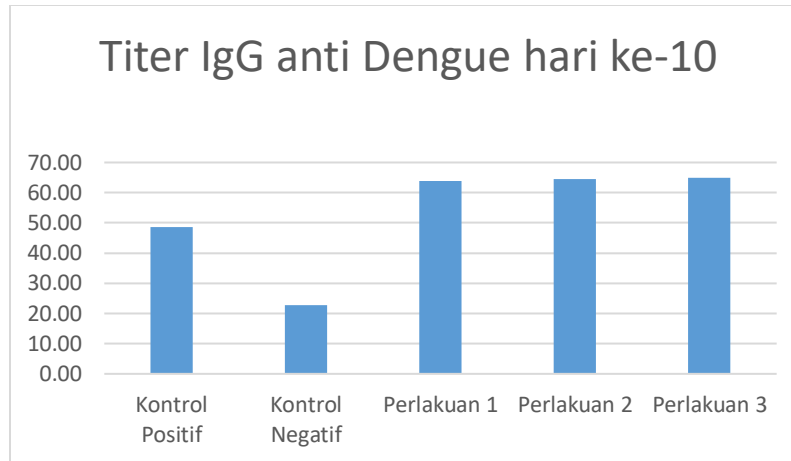
No.	Perlakuan	Rata-rata titer IgG anti Dengue (unit)
1	Kontrol Positif	34.46
2	Kontrol Negatif	17.10
3	Perlakuan 1	35.06
4	Perlakuan 2	34.80
5	Perlakuan 3	38.38



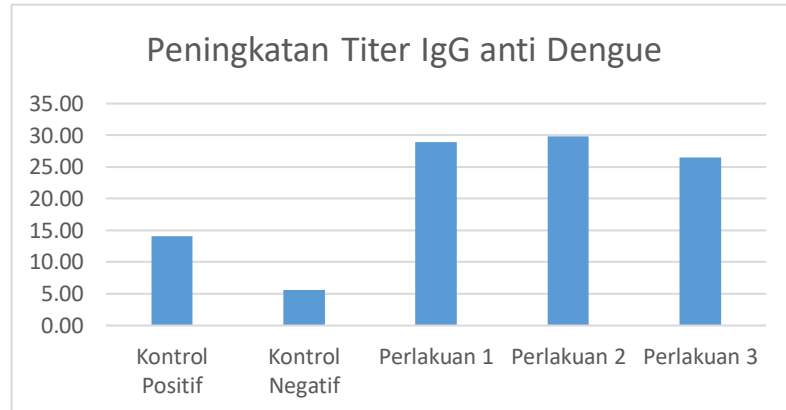
Grafik ke 1. Titer IgG anti Dengue pada hari ke-4 pasca infeksi virus Dengue 3 (DEN-3)

Tabel 2. Rata-rata titer IgG anti Dengue 3 pada hari ke-10

No.	Perlakuan	Rata-rata titer IgG anti Dengue (unit)
1	Kontrol Positif	48.53
2	Kontrol Negatif	22.68
3	Perlakuan 1	63.93
4	Perlakuan 2	64.60
5	Perlakuan 3	64.92



Grafik 2. Titer IgG anti Dengue pada hari ke-10 pasca infeksi virus Dengue 3 (DEN-3)



Grafik 3. Peningkatan titer IgG anti Dengue pada *Rattus norvegicus*

Tabel 3. Interpretasi hasil pemeriksaan IgG anti Dengue<sup>4</sup>

Cut-off	10 U	
Positive	> 11 U	Terdapat antibodi Telah terjadi kontak dengan antigen
Equivocal	9-11 U	Antibodi tidak terdeteksi dengan pasti Direkomendasikan untuk mengulangi pemeriksaan dengan sampel baru dalam 2-4 minggu, apabila hasilnya tetap equivocal, sampel dinyatakan negatif
Negative	< 9 U	Tidak terdapat antibodi

Berdasarkan hasil pemeriksaan Elisa pada hari ke-4 pasca infeksi, tikus kelompok kontrol positif maupun kelompok perlakuan mempunyai rata-rata titer IgG anti Dengue di atas 30 U. Berdasarkan acuan product information dengue virus

IgG ELISA, sampel dikatakan positif kalau titernya di atas 11 U, sehingga tikus kelompok kontrol positif dan ketiga kelompok perlakuan telah terpapar antigen virus Dengue dan telah membentuk antibodi IgG. Tikus kelompok kontrol negatif menunjukkan hasil yang positif meskipun titernya sangat rendah yaitu rata-rata titer 17 U, padahal kelompok ini tidak diinfeksi dengan virus Dengue. Hal ini dimungkinkan karena adanya reaksi silang dengan antigen lain. Reaksi silang bisa terjadi apabila sampel terpapar dengan anggota Flavivirus lain atau Arbovirus<sup>4</sup>.

Hasil pemeriksaan Elisa pada hari ke-10 pasca infeksi, tikus kelompok kontrol positif mempunyai rata-rata titer IgG anti Dengue sebesar 48.53 U, sedangkan tikus kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 masing-masing mempunyai rata-rata titer IgG anti Dengue sebesar 63.93 U, 64.60 U dan 64.92 U. Tikus kelompok kontrol positif mengalami peningkatan titer IgG sebesar 14.06 U, ketiga kelompok perlakuan mengalami peningkatan titer antibodi IgG rata-rata 28.87 U, sedangkan tikus kontrol negatif hanya mengalami sedikit peningkatan titer sebesar 5.58 U. Peningkatan titer antibodi IgG Dengue pada hari ke 10 dibandingkan titer hari ke 4 disebabkan adanya aktivasi komponen sel-sel imun terutama makrofag, limfosit T dan limfosit B. Virus yang masuk ke tubuh inang akan berkembang biak dalam sistem retikuloendotelial, dengan target utama sel-sel APC (*Antigen Presenting Cells*) yang umumnya berupa monosit atau makrofag. Viremia timbul pada saat menjelang gejala klinik hingga 5 - 7 hari setelahnya<sup>5</sup>. Limfosit T yang teraktivasi akan menghasilkan sitokin yang selanjutnya akan merangsang sel B membentuk antibodi. Peningkatan titer yang rendah pada kelompok negatif menguatkan alasan adanya reaksi silang dengan antigen lain.

Tabel 4. Hasil uji statistik

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8162.631 <sup>a</sup>	9	906.959	6.349	.000
Intercept	54043.758	1	54043.758	378.340	.000
Perlakuan	4179.872	4	1044.968	7.315	.001
Hari	3298.514	1	3298.514	23.092	.000
Perlakuan * Hari	684.244	4	171.061	1.198	.343
Error	2856.890	20	142.844		
Total	65063.279	30			
Corrected Total	11019.520	29			

a. R Squared = ,741 (Adjusted R Squared = ,624)

Pengujian statistik dengan one way anova membuktikan bahwa ada perbedaan signifikan rata-rata titer IgG anti Dengue pada setiap perlakuan dengan  $p\text{ value} = 0.001$  ( $< 0,05$ ), dengan kata lain terdapat perbedaan titer IgG antara kelompok kontrol positive, kontrol negative dan kelompok perlakuan. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak *G. lucidum* terbukti mempunyai efek sebagai imunostimulan dengan meningkatkan titer antibodi IgG anti Dengue. Aktivitas sebagai imunostimulan disebabkan adanya kandungan polisakarida dari *G. lucidum* yang terdiri dari 1,3-D-glucans dan Beta-1,6-D- glucans yang dapat meningkatkan respon imun tikus dengan menstimulasi sel limfosit T, makrofag dan sel NK<sup>6</sup>.

Perbedaan signifikan juga terlihat antara titer IgG anti Dengue pasca infeksi hari ke-4 dengan hari ke-10 dengan  $p\text{ value} = 0.000$  ( $< 0,05$ ), dimana pada hari ke-4, tikus sudah terpapar virus tapi belum diberi ekstrak *G. lucidum* sedangkan pada hari ke-10 tikus sudah diberikan ekstrak *G. lucidum* selama 7 hari. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan pada dosis ekstrak *G. lucidum* pada ke-3 kelompok perlakuan dimana tikus diberikan 3 variasi dosis yaitu 0.8 g; 1.6 g dan 3.2 g/KgBB dengan  $p\text{ value} = 0.343$  ( $> 0,05$ ). Hal ini membuktikan bahwa ekstrak *G. lucidum* efektif sebagai imunostimulan pada infeksi virus Dengue 3 dan dosis ekstrak *G. lucidum* yang paling efektif adalah 0.8 g/0.2 KgBB.



## BAB 5.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak zhi *Ganoderma lucidum* efektif digunakan sebagai imunostimulan tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca infeksi dengue 3 (DEN-3).
2. Ekstrak *Ganoderma lucidum* yang paling efektif sebagai imunostimulan untuk tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca infeksi dengue 3 (DEN-3) adalah 0,8 g/0,2 KgBB.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Li-Wang, Jie Ging-Li, Ji Zang dan Zhi-min Li. 2020. Traditional uses, chemical components and pharmacological activities of the genus *Ganoderma*. Available from: URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/ra/d0ra07219b#!>
2. Sissi Wachtel-Galor, John Yuen, John A. Buswell, and Iris F. F. Benzie. 2011. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects, *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi). Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22593926/>
3. Pramudiarja, A.N.U., 2011. *Indonesia Juara Demam Berdarah di ASEAN* [cited 2011 August 22]. Jakarta: Detik. Available from: URL: <http://detikhealth.com/read/2011/02/18/163159/1573796/763/indonesia-juara-demam-berdarah-di-asean>.
4. Product Information DENG0120. 2022. Dengue Virus IgG ELISA, Demeditec Diagnostics. Lise-Meitner-Strasse 2. Germany.
5. Aryati, 2012. Diagnosis Laboratoris DBD Terkini. Pusat Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat. Universitas Airlangga.
6. Khatian, M dan Aslam, M. 2018. A Review of *Ganoderma lucidum* (Reishi) : A Miraculous Medicinal Mushrooms. *Inventi Spreading Knowledge*. <https://www.researchgate.net/publication/330988315>.
7. Bharadwaj S. 2019. Discovery of *Ganoderma lucidum* triterpenoid as potential inhibitors against Dengue virus NS-2B-NS3 Protease. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31836806/>
8. Islam, M. T., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Sarkar, C., Sharma, R., Garg, N., Fredes, L. I., Martorell, M., Alshehri, M. M., Sharifi-Rad, J., Daştan, S. D., Calina, D., Alsafi, R., Alghamdi, S., Batiha, G. E. S., & Cruz-Martins, N. (2021). Production, Transmission, Pathogenesis, and Control of Dengue Virus: A Literature-Based Undivided Perspective. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/4224816>
9. Arinjani, M., Mifbakhuddin, & Astuti, R. (2017). *Faktor Resiko Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) di Kelurahan Sendanguwo Kecamatan Tembalang Kota Semarang* (Vol. 1) [Universitas Muhaammadiyah Semarang]. <http://repository.unimus.ac.id/id/eprint/1063>
10. Indriyani, I., Rosa, E., Dania Pratami, G., & Nukmal, N. (2022). Effectiveness of Ovitrap Against *Aedes aegypti* Mosquito In Kemiling Raya Sub-District Bandar Lampung City And The Vulnerability Of Its Larvals To Temephos. *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen Dan Keanekaragaman Hayati (J-BEKH)*, 9(1), 57–64. <https://doi.org/10.23960/jbekh.v9i1.205>
11. Mayetti. (2017). *Hubungan Polimorfisme Gen Dan Kadar Angiopoetin 2 Serta Kadar Vascular Endothelial Growth Factor Serta Kadar Vascular Endothelial Growth Factor Dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue Pada Anak* [Universitas Andalas]. <http://scholar.unand.ac.id/id/eprint/28850%0A>
12. Dewi, N. L. P. K. (2019). *Demam dengue* (Issue 1302006035) [Universitas

- Udayana].  
<https://erepo.unud.ac.id/id/eprint/33477/1/1432ac20549ceba7726739ed496e9c2b.pdf>
13. Enny, N., & Sulistyowati, I. (2016). Diagnosis Molekuler Virus Dengue. *Jurnal Kedokteran*, 1, 385–392. <https://doi.org/https://doi.org/10.23960/jkunila12385-392>
  14. Kemenkes RI. (2023). Laporan Tahunan 2022 Demam Berdarah Dengue. *Kemenkes RI*, 37.
  15. Sakinah, N. (2019). Overview of Serological Results of IgG and IgM Examinations in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) at Padang Bulan Health Center, Medan. *Politeknik Kesehatan Kemenkes RI Medan*, 40. <https://doi.org/https://doi.org/10.20473/jvhs.V5.I1.2021.39-46>
  16. Fatmawati, & Chandra, W. (2010). Hubungan Respon Imun Humoral dengan Derajat Trombositopenia pada Pasien Demam Berdarah Dengue. *Jurnal of Medical Science*, 4 (1), 36–41. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.26891/JIK.v4i1.2010.36-41>
  17. Orole, O. (2016). GC-MS Evaluation, Phytochemical and Antinutritional Screening of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 5(4), 1–10. <https://doi.org/10.9734/jabb/2016/24261>
  18. Bharadwaj, S., Lee, K. E., Dwivedi, V. D., Yadava, U., Panwar, A., Lucas, S. J., Pandey, A., & Kang, S. G. (2019). Discovery of *Ganoderma lucidum* triterpenoids as potential inhibitors against Dengue virus NS2B-NS3 protease. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55723-5>