

615.34  
PUD  
P  
e1

**PENGARUH PEMBERIAN DIET MINYAK IKAN  
DAN UPAYA PENGGUNAAN BCG TERHADAP  
AKTIVITAS MAKROFAG MENCIT TUA BALB/c**

**TESIS**

**Diajukan kepada Pengelola Program Magister Ilmu Biomedik  
Universitas Diponegoro untuk memenuhi syarat guna  
memperoleh Derajat Sarjana S2 Magister**



**Diajukan Oleh:**

**DWI PUDJONARKO  
NIM: G4A098005**

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

## RINGKASAN

Minyak ikan kaya omega-3 banyak digunakan sebagai suplemen makanan pada orang-orang tua terutama untuk penderita rematoid arthritis dan penyakit-penyakit kardiovaskuler. Meskipun ada keuntungannya tetapi dilaporkan juga bahwa penggunaan minyak ikan kaya omega-3 dalam jangka waktu tertentu dapat menurunkan respon imunitas seluler. Disisi lain ada imunostimulator yaitu BCG yang sudah biasa digunakan dan terbukti dapat meningkatkan respon imunitas seluler melalui respon tipe I. Penelitian ini berusaha membuktikan adanya perbedaan respon imunitas seluler pada mencit dengan diet minyak ikan yang mendapat vaksinasi BCG dan yang tidak mendapat vaksinasi BCG. Respon imunitas seluler dilihat dari aktivitas makrofag yang diukur dari jumlah jimfosit T yang berikatan dengan makrofag dan konsentrasi produksi NO makrofag serta hasil hitung kuman dari organ hepar (cfu/ gram) pada mencit tua yang telah mengalami immunosenescence.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Sampel penelitian adalah 24 ekor mencit jantan strain BALB/c, umur 12-13 bulan, dengan berat badan rata-rata 30 gram, yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Sampel dibagi menjadi 4 kelompok percobaan dengan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*), randomisasi sederhana dilakukan menggunakan komputer. Semua mencit mendapatkan makanan standar laboratoris (AIN-93M). Pada Kelompok Kontrol (K), mencit tidak mendapatkan perlakuan, sedangkan kelompok BCG (BCG) divaksinasi secara intra peritoneal dengan 0,1cc BCG pada hari ke-14 dan ke-24. Kelompok Minyak Ikan (MI), mencit mendapat suplementasi diet minyak ikan dua kali sehari masing-masing sebanyak 0,25 cc yang diberikan dengan sonde lambung, dan kelompok Minyak Ikan + BCG (MB) mendapat suplementasi diet

minyak ikan dua kali sehari masing-masing sebanyak 0,25 cc yang diberikan dengan sonde lambung dan divaksinasi secara intra peritoneal dengan 0,1cc BCG pada hari ke-14 dan ke-24. Pada hari ke-28, semua mencit disuntik secara intravena dengan  $10^4$  *Listeria monocytogenes* hidup yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Semarang. Semua mencit dibunuh dengan pembiusan chloroform yang dilanjutkan dengan dislokasi leher pada hari ke-33.

Hepar mencit diambil secara aseptis untuk penghitungan kuman dalam cfu/ gram. Penghitungan dilakukan dengan menghitung koloni yang tumbuh pada media *blood agar* setelah inkubasi gerusan hepar selama 24 jam. Penggerusan hepar dilakukan dengan *grinder* dan dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan NaCl 0,9% untuk ditanam dalam media *blood agar*. Penghitungan koloni yang tumbuh dilakukan dengan menggunakan *Colony Counter*.

Pemeriksaan Jumlah Limfosit T yang berikatan dengan makrofag diperoleh dengan mengisolasi makrofag peritoneal mencit. Makrofag kemudian diinkubasi 37°C selama 2 jam dalam tabung dengan alas datar yang bawahnya diberi kaca benda. Setelah PEL dipisahkan, makrofag disentrifus 800g dengan suhu 20°C selama 5 menit bersama heat killed *Listeria monocytogenes* dan diinkubasi lagi 37°C selama 1 jam. PEL dicampurkan kembali dengan makrofag setelah dilakukan pencucian kuman menggunakan PBS dan disentrifus 50g selama 4 menit pada suhu 4°C. Setelah itu dilakukan inkubasi 37°C selama 1 jam. Kaca benda dapat diambil dan difiksasi dengan metanol untuk selanjutnya dilakukan pengecatan menggunakan Giemsa 20% selama 20 menit. Penghitungan jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag dilakukan dengan melihat preparat dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000X dan menghitung jumlah limfosit T yang berikatan dengan 100 makrofag.

Pemeriksaan produksi NO makrofag diperoleh dengan mengisolasi makrofag peritoneal mencit. Makrofag kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% selama 2 jam dalam *plate 96 wells* dengan pengambilan sampel secara tripliket. Setelah diganti medium,

makrofag dikultur dalam inkubator pada suhu 37°C, dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam. Pemeriksaan konsentrasi produksi NO makrofag dilakukan dengan metode Griess dan dibaca menggunakan *Automated Microplate Reader* SLT LABINSTRUMENS Model 16 570.

Data-data yang diperoleh diuji bedanya dengan uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan dalam kelompok percobaan yang terdiri dari empat kelompok. Perbedaan lebih jauh antar kelompok percobaan diuji dengan uji *Mann-Whitney U*. Semua analisis dilakukan dengan bantuan komputer menggunakan program SPSS 10.01 for Windows.

Dari penelitian ini didapatkan adanya perbedaan yang signifikan dalam hal: hasil hitung kuman organ hepar, jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag dan produksi NO makrofag antar kelompok percobaan ( $p < 0,05$ ). Pada kelompok MI didapatkan jumlah hitung kuman tertinggi, jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag terendah dan produksi NO makrofag terendah bila dibandingkan dengan kelompok K, BCG dan MB. Sementara pada kelompok MB menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K maupun BCG dalam hal: hasil hitung kuman organ hepar, jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag dan produksi NO makrofag. Sehingga dapat dinyatakan bahwa pengaruh Minyak Ikan adalah menekan aktivitas makrofag, dan upaya penggunaan BCG dapat meminimalkan efek tersebut dengan memperbaiki aktivitas makrofag pada mencit tua BALB/c.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi dalam penggunaan minyak ikan sebagai makanan tambahan dan memberikan alternatif dalam upaya menanggulangi efek negatif berupa penurunan respon imunitas seluler yang ditunjukkan dengan menurunnya aktivitas makrofag. Menurunnya aktivitas makrofag tersebut kemungkinan dapat diatasi dengan pemberian BCG yang mudah didapatkan dengan harga murah. Karena penelitian ini dilakukan pada hewan coba maka hasil penelitian ini diharapkan juga dapat memberikan landasan untuk penelitian lebih lanjut pada manusia.

## ABSTRACT

Fish oil (rich in omega-3) has been used as a food supplement by elderly. However, some reports mentioned an impairment of cellular immunity when fish oil consumed for certain period, while BCG vaccination may increase it. To highlight the use of fish oil and effort to diminish the cellular immunity impairment, this particular study is designed using old mice as a model. The study is emphasized on the effects of Fish Oil diet and the use of BCG vaccination in cellular immune responses alteration through macrophage activity measurement i.e. bacterial growth (cfu/gram) in the liver, physical binding of T lymphocytes, and NO production.

The study adapts Laboratory Experimental and Post-Test Only Control Group Design. The 24 male BALB/c mice (12-13 months old and average weight 30 grams) are obtained from PUSVETMA = Pusat Veterinaria Farma, Surabaya. All mice are then divided into four groups and receive standard lab diet (AIN-93M) daily. The first group (control group = C group) receive no other additional treatment, while the second group (BCG group = BCG group) receive intra-peritoneal injection of 0.1 cc BCG at day 14<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup>. The third group (fish oil group = FO group) receive 0.25 cc fish oil through gastric instillation twice a day and the fourth group (fish oil +BCG group = FB group) receive 0.25cc fish oil twice a day and intra-peritoneal injection of 0.1 cc BCG at day 14<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup>. Close to the end of study, at day 28<sup>th</sup>, all groups are intravenously injected with 10<sup>4</sup> live *L. monocytogenes* (LD<sub>50</sub>= 2x10<sup>5</sup> bacteria) obtained from Balai Laboratorium Kesehatan Semarang and sacrificed at day 33<sup>rd</sup>.

The results show that there are significant differences in the liver bacterial growth, the physical binding of T lymphocytes, and the NO production ( $p < 0,05$ ) among the groups. The highest number of bacterial growth, the lowest number of physical binding of T lymphocytes, and the lowest NO production is found in the FO group. In contrast, there are no significant differences on the number of bacterial growth, physical binding of T lymphocytes, and NO production, between FB group and C group as well as with BCG group ( $p > 0,05$ ). Therefore, it could be concluded that fish oil is immunosuppressive, while additional treatment with BCG can restore immune response through macrophage activation in aged male BALB/c mice.

**Keyword :** *Fish oil, BCG, T lymphocyte binding, bacterial counts, NO.*